



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Caracterización de la producción de metabolitos primarios y secundarios por *Scenedesmus* sp. nativa
del Ecuador

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Jennifer Katheryn Paredes Paredes

Tutor: Dr. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Agosto - 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 19 de junio de 2024



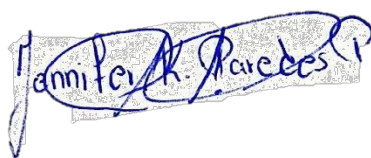
Dr. Mario Daniel García Solís

1103605471

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Jennifer Kathryn Paredes Paredes, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos, y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Jennifer Kathryn Paredes Paredes

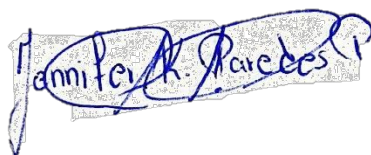
18050389816

AUTOR

DERECHOS DEL AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Jennifer Kathryn Paredes Paredes

18050389816

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Firmado electrónicamente por:
**SANTIAGO CASADO
ROJO**

Presidente del Tribunal



Firmado electrónicamente por:
**GABRIEL ALEJANDRO
MORENO TOASA**

Mg. Gabriel Alejandro Moreno Toasa

1500647910



Firmado electrónicamente por:
**WILLIAM RICARDO
CALERO CACERES**

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

1714348859

Ambato, 2 de agosto del 2024

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de este camino, con su amor y gracia este logro ha sido posible, iluminando día a día mi camino y por darme la sabiduría y el entendimiento necesario para completar un logro más en mi vida

A mis padres, Galo y Emma, por inculcarme los valores del esfuerzo y la perseverancia. Por ser el apoyo en cada etapa de mi vida, por su amor y bendiciones que han sido fundamental para llegar hasta aquí

A mis hermanos, Juan, Estefanía y Galo, por ser siempre una fuente de fortaleza y ánimo en mi vida

A mis sobrinos, Paul, Nicolas y Lía, cuya alegría y entusiasmo han sido una constante motivación para seguir adelante

Jennifer Paredes

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarme su sabiduría y fortaleza para superar cada obstáculo en mi camino

A mi familia por ser mi apoyo incondicional a lo largo de mi carrera universitaria

A mi tutor, Ph.D. Mario García y a la docente Ph.D. Liliana Cerda, quienes han depositado en mí su confianza y por guiarme durante el desarrollo de esta investigación

A mis amigos Joselyn, José, Dami, Juliana, Erika, Ale, Tomás, Joel y Fer, por formar parte de mi vida y ofrecerme su amistad incondicional

A mis compañeros de laboratorio, Josué, David Alex, Vivian, Karlita, Joss, Bibi y Joaquín, por su apoyo y las alegrías que compartimos

A mi grupo de la universidad, quienes me acompañaron a lo largo de toda mi vida universitaria. Su amistad y apoyo incondicional fueron esenciales para hacer de esta etapa una experiencia inolvidable

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, por recibirme en sus instalaciones, y por ser mi pilar fundamental para mi formación tanto profesional como personal

Jennifer Paredes

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DEL AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURA.....	xii
RESUMEN EJECUTIVO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1. Justificación	1
1.1.2. Perspectiva mundial sobre la producción de metabolitos primarios y secundarios	2
1.1.2.1. Demanda e Impacto ambiental.....	2
1.1.2.2. Metabolitos primarios y secundarios	3
1.1.3. Producción de metabolitos primarios y secundarios mediante microorganismos fotosintéticos.....	5
1.1.3.1. Generalidades de los microorganismos fotosintéticos	5
1.1.3.2. Aplicaciones industriales de los microorganismos fotosintéticos.....	5
1.1.3.3. Generalidades de <i>Scenedesmus</i>	6
1.1.3.4. Obtención de metabolitos de <i>Scenedesmus</i>	8
1.1.3.5. Condiciones óptimas de cultivo para la producción de metabolitos	9
1.2. Objetivos	10
1.2.1. Objetivo general.....	10
1.2.2. Objetivos específicos	10
CAPITULO II.- METODOLOGÍA	11
2.1. Materiales.....	11
2.1.1. Equipos de laboratorio	11
2.1.2. Reactivos.....	11

2.1.3.	Materiales fungibles.....	12
2.2.	Métodos.....	12
2.2.1.	Preparación de inóculos	12
2.2.2.	Condiciones de cultivo para <i>Scenedesmus</i> sp. empleando distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono	13
2.2.3.	Determinación de la curva de crecimiento celular	14
2.2.4.	Evaluación de las proteínas contenidas en la biomasa de <i>Scenedesmus</i> sp.	14
2.2.5.	Evaluación de los carbohidratos contenidos en la biomasa de <i>Scenedesmus</i> sp.	14
2.2.6.	Evaluación de los pigmentos contenidos en la biomasa de <i>Scenedesmus</i> sp.	15
2.2.7.	Diseño experimental	15
2.2.8.	Análisis de datos	17
2.2.9.	Análisis morfológico mediante microscopio óptico.....	17
CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		18
3.1.	Análisis y discusión de los resultados	18
3.1.1.	Evaluación de la cinética de crecimiento	18
3.1.2.	Evaluación de la cantidad de proteína contenida en la biomasa de <i>Scenedesmus</i> sp.	21
3.1.3.	Evaluación de la cantidad de carbohidratos contenidos en la biomasa de <i>Scenedesmus</i> sp.	25
3.1.4.	Evaluación de la cantidad de clorofila contenida en la biomasa de <i>Scenedesmus</i> sp.	28
3.1.5.	Evaluación de la cantidad de carotenoides contenidos en la biomasa de <i>Scenedesmus</i> sp.	30
3.1.6.	Análisis morfológico mediante microscopía	34
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		38
4.1.	Conclusiones	38
4.2.	Recomendaciones	39
BIBLIOGRAFÍA		40
ANEXOS		52
Anexo A. Análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey.....		52
Anexo A. Evaluación de la generación de biomasa de <i>Scenedesmus</i> sp.....		56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición bioquímica de principales especies de <i>Scenedesmus</i>	8
Tabla 2. Diseño experimental propuesto para la producción de biomasa, metabolitos primarios y secundarios en <i>Scenedesmus</i> sp. utilizando diferentes concentraciones de nitrógeno y fuente de carbono.	16
Tabla 3. Intervalos de producción máxima de células por <i>Scenedesmus</i> sp. empleando diferentes concentraciones de NaNO_3 y fuente de carbono.....	19
Tabla 4. Rendimiento porcentual de Proteína en relación con el Peso Seco de los tratamientos.....	24
Tabla 5. Promedio de producción máxima de metabolitos primarios y secundarios por <i>Scenedesmus</i> sp. empleando diferentes concentraciones de NaNO_3 y fuente de carbono.....	32
Tabla 6. Intervalos de producción máxima de metabolitos primarios y secundarios por <i>Scenedesmus</i> sp. empleando diferentes concentraciones de NaNO_3 y fuente de carbono.....	33
Tabla 7. Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaNO_3 y fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la densidad celular	52
Tabla 8. Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de NaNO_3 en el medio de cultivo sobre la densidad celular	52
Tabla 9. Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la densidad celular.....	52
Tabla 10. Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaNO_3 y fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de proteínas.....	52
Tabla 11. Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de NaNO_3 en el medio de cultivo sobre la producción de proteínas.....	53
Tabla 12. Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de proteínas.....	53
Tabla 13. Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaNO_3 y fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de carbohidratos.....	53
Tabla 14. Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de NaNO_3 en el medio de cultivo sobre la producción de carbohidratos.....	53
Tabla 15. Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de carbohidratos.....	54
Tabla 16. Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaNO_3 y fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de clorofila	54
Tabla 17. Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de NaNO_3 en el medio de cultivo sobre la producción de clorofila.....	54
Tabla 18. Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de clorofila.....	54

Tabla 19. Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaNO ₃ y fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de carotenoides	55
Tabla 20. Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de NaNO ₃ en el medio de cultivo sobre la producción de carotenoides	55
Tabla 21. Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de carotenoides	55
Tabla 22. Cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp. durante el periodo de evaluación empleando diferentes concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies del género <i>Scenedesmus</i> con mayor demandan en las industrias.	7
Figura 2. Curva de crecimiento del aislamiento de <i>Scenedesmus</i> sp.	18
Figura 3. Curva de la concentración de proteínas producidos a partir del aislamiento de <i>Scenedesmus</i> sp.	22
Figura 4. Curva de la concentración de carbohidratos producidos a partir del aislamiento <i>Scenedesmus</i> sp.	26
Figura 5. Curva de la concentración de clorofila producidos a partir del aislamiento <i>Scenedesmus</i> sp.	29
Figura 6. Curva de la concentración de carotenoides producidos a partir del aislamiento <i>Scenedesmus</i> sp.	31
Figura 7. Morfología celular del aislamiento de <i>Scenedesmus</i> sp. a lo largo de su fase de crecimiento vista desde un microscopio binocular (100x).....	37

RESUMEN EJECUTIVO

Actualmente, han surgido problemáticas mundiales como la limitada disponibilidad de alimentos y el incremento poblacional, causando el agotamiento de recursos naturales, emisiones de gases de efecto invernadero y óxido nitroso por fertilizantes y pesticidas, producción de metano por rumiantes, y deforestación. A su vez, la necesidad de alimentar a la creciente población ha impulsado el desarrollo de técnicas para obtener suplementos de microalgas, ya que producen compuestos activos y metabolitos como carbohidratos, proteínas, pigmentos, vitaminas y aminoácidos. Por esta razón, esta investigación busca evaluar la producción de metabolitos primarios y secundarios por la microalga *Scenedesmus* sp. nativa de Ecuador, cuantificando su capacidad para producir proteínas, carbohidratos y pigmentos bajo diferentes condiciones de cultivo. Se emplearon suplementos al medio BBM con diversas concentraciones de nitrato de sodio (0, 1.25, 2.5 y 5 gramos por litro) y fuentes de carbono (dióxido de carbono, etilenglicol, acetato de sodio). Estas condiciones se combinaron hasta obtener 12 tratamientos. El escenario de cultivo fueron 21 grados centígrados, un ciclo de luz-oscuridad de 16 y 8 horas, y aireación constante de 200 mililitros por minuto con dióxido de carbono al 0.04 por ciento volumen-volumen. Los resultados mostraron que el mejor tratamiento fue el cultivo mixotrófico con etilenglicol y alta concentración de nitrato de sodio, produciendo la mayor cantidad de proteínas, carbohidratos y pigmentos (clorofila y carotenoides). También, se determinó que la cinética de crecimiento de *Scenedesmus* sp. varía según la concentración de nitrato de sodio en el medio.

Palabras clave: Metabolitos primarios y secundarios, *Scenedesmus*, cultivo mixotrófico, etilenglicol, concentración de nitrato de sodio, cinética de crecimiento.

ABSTRACT

Currently, global problems have arisen, such as the limited availability of food and population growth, causing the depletion of natural resources, emissions of greenhouse gases and nitrous oxide from fertilizers and pesticides, methane production by ruminants, and deforestation. At the same time, the need to feed the growing population has driven the development of techniques to obtain microalgae supplements, since they produce active compounds and metabolites such as carbohydrates, proteins, pigments, vitamins and amino acids. For this reason, this research seeks to evaluate the production of primary and secondary metabolites by the microalga *Scenedesmus* sp. native to Ecuador, quantifying its capacity to produce proteins, carbohydrates and pigments under different culture conditions. Supplements to the BBM medium with different concentrations of sodium nitrate (0, 1.25, 2.5 and 5 grams per liter) and carbon sources (carbon dioxide, ethylene glycol, sodium acetate) were used. These conditions were combined to obtain 12 treatments. The culture scenario was 21 degrees Celsius, a light-dark cycle of 16 and 8 hours, and constant aeration of 200 milliliters per minute with 0.04 percent volume-volume carbon dioxide. The results showed that the best treatment was the mixotrophic culture with ethylene glycol and high concentration of sodium nitrate, producing the highest amount of proteins, carbohydrates and pigments (chlorophyll and carotenoids). It was also determined that the growth kinetics of *Scenedesmus* sp. varies according to the concentration of sodium nitrate in the medium.

Keywords: primary and secondary metabolites, *Scenedesmus*, mixotrophic culture, ethylene glycol, sodium nitrate concentration, growth kinetics.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Justificación

Los macronutrientes, como proteínas y carbohidratos, son de gran importancia para mantener una buena salud y funcionamiento óptimo del cuerpo humano. El consumo de una dieta equilibrada en proteínas ayuda a mantener la integridad estructural de células y tejidos, y el funcionamiento adecuado del sistema inmunológico. Por otra parte, los carbohidratos proporcionan energía a todas las células del cuerpo humano y permiten que se lleven a cabo procesos como el ciclo celular, la producción de energía y la síntesis de nuevas moléculas (Venn, 2020). Por lo tanto, los alimentos que presentan un alto contenido de carbohidratos, proteínas, y otros macro y micronutrientes, tales como la carne, legumbres, cereales, frutas y semillas, son necesarios como sustratos para el ser humano (Chen *et al.*, 2018). La Organización Mundial de la Salud (2015), recomienda consumir una dieta que satisfaga las necesidades energéticas y proporcione una variedad de alimentos con alta cantidad nutricional. Según el Comité de Seguridad Alimentaria (2018), la agricultura y la ganadería generan efectos tantos positivos como negativos sobre el medio ambiente, en relación con la producción del ganado y las prácticas que emplean los agricultores para la obtención de productos alimenticios.

Los estudios realizados por la FAO, IFAD, UNICEF, WFP y WHO (2023), han demostrado que la falta de nutrientes afecta al 33.3 % de adultos en las zonas urbanas a nivel mundial. Además, dichas organizaciones han manifestado su preocupación respecto a la limitada disponibilidad de alimentos, la cual afectará a las poblaciones en crecimiento debido al agotamiento de los recursos naturales, el uso excesivo de fertilizantes químicos, el cambio climático, y la deforestación para la crianza de animales (Rahut *et al.*, 2021).

En los últimos años, se han planteado nuevas técnicas para obtener suplementos a partir de microorganismos fotosintéticos, los cuales producen una alta concentración de metabolitos primarios, secundarios y compuestos bioactivos (Ferreira de Oliveira & Bragotto, 2022). Estos microorganismos fotosintéticos ofrecen una solución para mitigar los problemas ambientales ocasionados por la expansión de la producción de alimentos terrestres, ya que existen microalgas ricas en nutrientes que son útiles para aplicaciones en la alimentación y la salud humana (Kusmayadi *et al.*, 2021). Además, los estudios realizados por Tokusoglu & Unal (2003), han demostrado que las microalgas después de ser cultivadas pueden ser utilizadas como aditivos alimentarios para animales. Por otro parte, las microalgas pueden ser cultivadas en aguas residuales, aguas saladas o aguas salobres en vez de tierras cultivables, generando elementos valiosos de forma sostenible y mitigando el cambio

climático (Naik *et al.*, 2024). Los beneficios que también brindan las microalgas es su rápido crecimiento, ya que pueden producir 50 veces más biomasa que las plantas (Noreen *et al.*, 2021).

Scenedesmus es un género de microalgas verdes perteneciente a la familia *Scenedesmaceae*, destacada en diversas industrias debido a su alta producción de biomasa, así como su producción de biocombustibles y su capacidad para la gestión de aguas residuales. La biomasa de *Scenedesmus* es rica en componentes bioactivos y nutrientes, incluyendo altas concentraciones de carbohidratos, proteínas y lípidos que serán eficientes en la utilización de nutrientes en humanos. Además, sus componentes bioactivos proporcionarán beneficios antioxidantes, antiinflamatorios e hipolipidémicos (Ma *et al.*, 2019).

Estas microalgas pueden ser cultivadas en fotobiorreactores, con elevadas tasas de crecimiento, ya que emplean la energía solar en biomasa. Para ello, estos microorganismos demandan una cantidad mínima de nutrientes (N y CO₂ disuelto), e incubación a temperatura ambiente (Barone *et al.*, 2023). De esta manera, los microorganismos fotosintéticos tienen un gran potencial para brindar fuentes alternativas de biocompuestos con alta demanda en la industria alimentaria, farmacéutica, de fertilizantes y biocombustibles, como lo son las proteínas, los carbohidratos y los pigmentos naturales (Kothari *et al.*, 2017).

Las microalgas han generado un interés en diversas industrias debido a sus valiosas sustancias bioactivas. Este interés se ve marcado especialmente en los sectores farmacéuticos y alimentarios. Además, los microorganismos fotosintéticos presentan nuevas oportunidades para mejorar la eficiencia en diferentes industrias, al tiempo que contribuyen a mitigar problemas ambientales relacionados con la expansión de productos agrícolas (Sun *et al.*, 2023).

Con estos antecedentes, la presente investigación tiene como objetivo caracterizar la producción de metabolitos primarios y secundarios de *Scenedesmus* sp. nativa del Ecuador, con el fin de cuantificar su capacidad para producir proteínas, carbohidratos y pigmentos, alterando las condiciones de cultivo.

1.1.2. Perspectiva mundial sobre la producción de metabolitos primarios y secundarios

1.1.2.1. Demanda e Impacto ambiental

La producción de los metabolitos primarios y secundarios se origina principalmente del sector agrícola como las actividades ganaderas y la agricultura. Este sector enfrenta un reto significativo para salvaguardar la producción de alimentos para la creciente población, ya que se estima que podría crecer hasta los 8.500 millones en 2030 hasta llegar a 9.700 millones en 2050 (ONU, 2022). Este incremento poblacional conllevará un aumento drástico en la producción de alimentos, por lo cual las industrias alimentarias deberán incrementar su producción un 50 % más para 2050, con el fin de satisfacer las necesidades nutricionales de la población (FAO, 2017).

Existen diferentes técnicas que aplica el sector agrícola para aumentar la producción, ocasionando daño al medio ambiente. El sector agrícola produce emisiones directas de gases de efecto invernadero (GEI), emisiones de óxido nitroso de los suelos debido a la aplicación de fertilizantes y pesticidas, producción de metano por animales rumiantes y cambios en el uso de la tierra, como la deforestación y el desmonte de tierras (Agovino *et al.*, 2019).

El incremento de la demanda mundial de alimentos ha aumentado la producción de cárnicos, dado que se ha sacrificado cerca de 6 millones de animales por año. Se estima que para el año 2050 la producción de carne se duplique, pasando de 229 millones de toneladas en 1999 a 465 millones de toneladas. Además, la producción de leche aumentará aproximadamente de 580 a 1043 millones de toneladas (Steinfeld *et al.*, 2006). La cadena de la producción animal proporciona entre el 40 – 58 % de proteínas. La ganadería, principal fuente de productos cárnicos, ocupa el 77 % de todas las tierras agrícolas y el 30 % de los recursos hídricos (Smetana *et al.*, 2023). Según la FAO la cría y sacrificio de animales genera un impacto negativo a escala global, especialmente de agua, la extinción de plantas, degradación de suelos y consumo de recursos naturales, siendo estas actividades responsables del impacto ambiental al provocar un 61 – 81 % de GEI, el 95 % de la eutrofización y el 79 % de la acidificación del suelo (Poore & Nemecek, 2018).

Por otro lado, el sector agrícola es uno de los principales causantes del impacto ambiental, debido a las prácticas no convencionales, como incendios para la eliminación de vegetación no deseada, uso de fertilizantes, pesticidas y el sistema de riegos (Barros *et al.*, 2021). Estas prácticas son las principales causantes de las GEI, como el metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O); impactos sobre la salud del suelo, pérdida de biodiversidad y afectaciones a los servicios ecosistémicos (FAO, 2017). Estos efectos son causados por el uso excesivo de pesticidas, que en el año 2019 alcanzó aproximadamente 4.19 millones de toneladas métricas. Los pesticidas se emplean para proteger los cultivos de plagas, regular el crecimiento de las plantas, entre otros, pero el uso excesivo conlleva a la contaminación de suelos y cuerpos de agua, así como a la reducción de la biodiversidad y la contaminación alimentaria (Pathak *et al.*, 2022). Los efectos negativos del uso excesivo de los fertilizantes químicos es la reducción de la fertilidad del suelo, contaminación del suelo, agua y aire, provoca una debilidad microbiana en el sistema de cultivo, altera el pH del suelo, aumenta la acidificación del suelo y son los responsables del 38 % de emisiones de N₂O (Pahalvi *et al.*, 2021).

1.1.2.2. Metabolitos primarios y secundarios

Los metabolitos primarios y secundarios se generan en diversos organismos vivos, tales como bacterias, hongos, plantas y animales (Mosunova *et al.*, 2021). Los metabolitos primarios o centrales desempeñan un papel fundamental en el crecimiento y la reproducción de los organismos. A diferencia de los metabolitos secundarios o especializados, no son indispensables para el crecimiento; sin embargo, cumplen funciones importantes en la supervivencia de dichos organismos (Oladipo *et al.*, 2022).

Tradicionalmente, los vegetales y los hongos han sido los principales productores de metabolitos en la dieta del ser humano, ya que generan una amplia variedad de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, pigmentos, terpenoides, compuestos que contienen azufre, compuestos fenólicos, polisacáridos, alcaloides, entre otros (**Guerriero *et al.*, 2018; Gupta & Rodriguez, 2017**). Entre los metabolitos primarios y secundarios, los carbohidratos, proteínas, pigmentos, vitaminas, aminoácidos y lípidos destacan por su alto valor comercial y nutricional (**Schweiggert *et al.*, 2020**) .

Las proteínas son metabolitos primarios, ya que desempeña un papel directo en el metabolismo y actúa como precursor de algunos metabolitos secundarios (**Chaturvedi & Gupta, 2021**). Las principales fuentes nutricionales de proteínas son de origen animal; entre ellas, los huevos, la leche, la carne, el pescado y las aves constituyen fuentes alimenticias de alta calidad. Por ejemplo, la caseína es una proteína láctea presente en la leche bovina que representa entre el 70 – 80 % de proteína total, generando significativo impacto en las industrias. Esta proteína ayuda al cuerpo a cumplir funciones relacionadas con la absorción de vitamina y nutrientes, además de ser fuente de péptidos biológicamente activos (**Deutz *et al.*, 1998**). A diferencia de las proteínas de origen animal, la soja es una de las fuentes vegetales más utilizadas debido a su alta concentración de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), que son importantes para el mantenimiento de tejidos. La soja se clasifica en tres categorías diferentes dependiendo su composición proteica: la harina de soja, que contiene un 50 % de proteína; el concentrado de soja, con un 70 %; y aislado de soja, con un 90 % (**Hasler, 2002**).

Por otra parte, los carbohidratos son moléculas que contiene átomos de hidrogeno, carbono y oxígeno. Desempeñan un papel importante en el cuerpo humano, ya que actúan como fuente principal de energía para el metabolismo celular y contribuir en la síntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN), proteínas, lípidos, entre otras moléculas, y son la fuente de carbono ideal en procesos de fermentación a escala industrial (**Holesh *et al.*, 2022**). Los carbohidratos se encuentran en las frutas, las fibras, las verduras y las legumbres. Las plantas producen carbohidratos a partir el CO₂ y H₂O, utilizando la energía de la luz en el proceso de la fotosíntesis. Estos carbohidratos producidos son ingeridos por los seres humanos, proporcionando una dieta equilibrada entre el 50 % y el 60 % del total de calorías que necesita una persona (**Blanco & Blanco, 2017**).

Los pigmentos naturales, también conocidos como compuestos bioactivos, presentan grandes beneficios para la salud. Estos se utilizan en diferentes campos, como la farmacología, la toxicología, y en diferentes industrias como la textil y la alimentaria (**Di Salvo *et al.*, 2023**). Las principales fuentes para la obtención de estos pigmentos provienen de plantas y microorganismos (**Venil, 2009**). Existen pigmentos liposolubles que son utilizados a gran escala en las industrias alimentaria y cosmética, como la clorofila y los carotenoides, que son ampliamente empleados como colorantes e ingredientes

esenciales en la formulación de cremas antienvjecimiento y promotores de la regeneración epitelial (Tominaga *et al.*, 2012).

Por lo tanto, la demanda actual de metabolitos primarios y secundarios es cubierta principalmente por productos de la agricultura y la ganadería intensiva, lo cual ha generado un impacto ambiental negativo. La expansión de áreas productivas ha contribuido al incremento de la frontera agrícola y la deforestación (Alengebawy *et al.*, 2021). Esta problemática ha llevado a la sociedad a buscar soluciones para la producción a gran escala, las cuales no solo contribuye a la salud humana, sino que también al cuidado del medio ambiente.

1.1.3. Producción de metabolitos primarios y secundarios mediante microorganismos fotosintéticos

1.1.3.1. Generalidades de los microorganismos fotosintéticos

Los microorganismos fotosintéticos son organismos autótrofos que habitan en ecosistemas marinos y de agua dulce. La mayoría de ellos son microalgas eucariotas, aunque también existen una variedad de procariotas fotosintéticas como las cianobacterias (Olasehinde *et al.*, 2017). Entre los grupos más representativos de microorganismos fotosintéticos, se encuentran las algas verdeazuladas (*Cyanophyta*), las algas rojas (*Rhodophyta*), las algas verdes (*Chlorophyta*) y las algas marrones y doradas (*Ochrophyta* y *Bacillariophyta*) (Manning, 2022).

En las últimas décadas, los microorganismos fotosintéticos han atraído un gran interés para su aprovechamiento en procesos biotecnológicos industriales debido a su alto potencial para la producción de metabolitos primarios y secundarios, así como su rápido crecimiento y producción de biomasa (Dolganyuk *et al.*, 2020). Los componentes principales de la biomasa de las microalgas son las proteínas, carbohidratos y lípidos, cuyas concentraciones dependen de las condiciones de cultivo, la intensidad de la luz, suministro de CO₂ y la composición del medio de crecimiento. Las microalgas pueden utilizarse como una fuente alternativa de proteínas debido a su composición de aminoácidos, la calidad de las proteínas y su digestibilidad. Se estima que el contenido de proteína bruta en base seca de la biomasa de las microalgas y cianobacterias oscila entre el 6 y el 63 %, donde algunas especies superan el 40 % de contenido de proteína bruta (Chacón & González, 2010). En cuanto a los carbohidratos, se encuentran principalmente en forma de celulosa o almidón, y se emplean en la producción de bioetanol y bioplásticos degradables (Shahid *et al.*, 2020).

1.1.3.2. Aplicaciones industriales de los microorganismos fotosintéticos

La producción a escala industrial de microorganismos fotosintéticos ha experimentado una evolución significativa. A diferencia de las prácticas agrícolas y ganaderas, estos microorganismos fotosintéticos

no compiten por el suelo, ni requieren de grandes recursos para su cultivo y que incluso pueden ser cultivados a partir de residuos de otros procesos industriales. Además, el cultivo de microorganismos fotosintéticos tiende a generar mayores rendimientos en comparación con los cultivos terrestres, dado que aquellos poseen un corto tiempo de replicación y se desarrollan fácilmente en sistemas eficientes de biorreacción (Barone *et al.*, 2023).

Existen varios géneros de microalgas que poseen la capacidad de realizar procesos metabólicos clave en la biorremediación ambiental y la producción de compuestos funcionales para la salud humana y la agricultura (Lee *et al.*, 2021). Entre los principales géneros de microalgas y cianobacterias utilizadas a gran escala por las industrias biotecnológicas destacan los géneros *Spirogyra*, *Oedogonium*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, y *Arthrospira* (*Spirulina*) (Barone *et al.*, 2023).

Diversas investigaciones han determinado que *Chlorella vulgaris* y *Arthrospira* sp. son las especies más utilizadas y explotadas a nivel industrial debido a su alto contenido de proteínas (51 – 58 %) y carbohidratos (12 – 7 %) en base seca. Por otro lado, *Spirogyra* sp. presenta un contenido de proteínas del 20 % de materia seca, mientras que *Scenedesmus dimorphus* presenta un contenido de proteína que varía en el rango de 8 – 18 % y de carbohidratos de 21 – 52 % de materia seca (Wang *et al.*, 2021). En este contexto, las microalgas del género *Scenedesmus*, como *S. dimorphus* es un excelente modelo para producción de carbohidratos que podrían ser empleados tanto en la alimentación humana o animal como en la producción de biocombustibles.

1.1.3.3. Generalidades de *Scenedesmus*

Scenedesmus es un género de alga verde que pertenece a la clase *Chlorophyceae*. A nivel mundial, se han identificado aproximadamente 200 taxones de *Scenedesmus*, los cuales fueron caracterizados mediante el tamaño de sus células, su forma, la disposición de células en el cenobio, así como la presencia de crestas y espinas en la pared celular (Kim, 2015). *Scenedesmus* es un organismo ubicuo que predomina en lagos y ríos de agua dulce, y su morfología generalmente es esférica, en forma de lente u ovaladas (González *et al.*, 2023). La morfología de las especies de *Scenedesmus* es variada, y se presenta a continuación en la Figura 1.

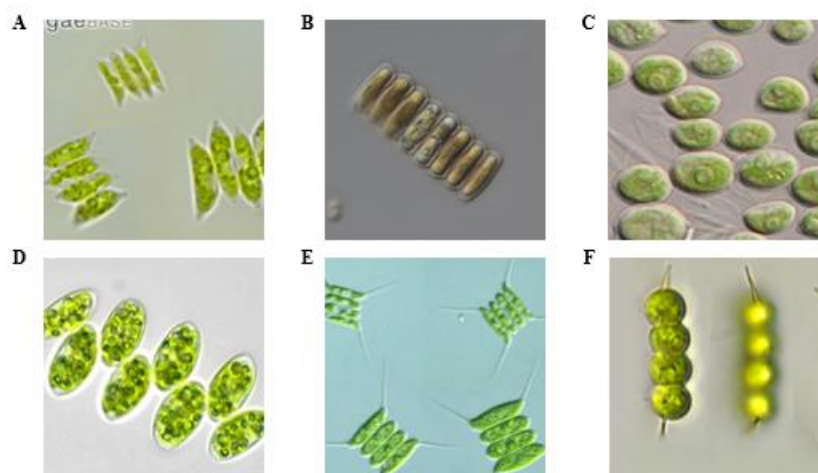


Figura 1. Especies del género *Scenedesmus* con mayor demandan en las industrias.

Se presentan algunas especies relevantes para la producción de bioproductos: **(A)** *S. dimorphus*, **(B)** *S. ellipticus*, **(C)** *S. obliquus*, **(D)** *S. obtusus*, **(E)** *S. quadricauda*, **(F)** *S. subspicatus*. Fotografías extraídas de **Figueroa et al. (2019)**.

Las microalgas pertenecientes al género *Scenedesmus*, han presentado un alto rendimiento fotosintético, alta productividad de biomasa, presencia de compuestos con alto valor nutricional y alta tolerancia a las aguas residuales (**Vieira et al., 2021**). Estas características han impulsado la producción de biomasa de diferentes especies pertenecientes a este género para distintas aplicaciones industriales. Por ejemplo, *S. obliquus* es utilizada en la industria alimentaria debido a que sus metabolitos poseen propiedades bioactivas y nutricionales, con un contenido proteico del 50 – 6 % (w/w), así como un contenido de clorofila a y b del 3.56 % y 6.58 % (w/w), y un contenido de carbohidratos del 10 – 17 % (w/w) (**Christaki et al., 2011; Dolganyuk et al., 2020; Singh et al., 2019**). Estudios realizados por **Richmond (2004)**, han demostrado la aceptabilidad de *Scenedesmus* sp. como suplemento proteico para el ser humano. Además, presenta un sabor atractivo comparable al de *C. vulgaris* y funcionaría para suministrar en alimentos humanos, y como fuente de alimentos para diferentes especies de animales (acuáticas, rumiantes, aves, cerdos, entre otros) (**Koyande et al., 2019**). La Tabla 1 presenta la composición bioquímica de las principales especies de *Scenedesmus*.

Tabla 1. Composición bioquímica de principales especies de *Scenedesmus*

Composición bioquímica (%)			
Especies	Carbohidratos	Proteínas	Referencias
<i>S. obtusus</i>	20.74	5.94	(Vinitha et al., 2023)
<i>S. obliquus</i>	10 – 17	50 – 56	(Christaki et al., 2011; Wallace, 2000)
<i>S. dimorphus</i>	21 – 52	8 – 18	(Milledge, 2011; Van Krimpen et al., 2013)
<i>S. quadricauda</i>	21 – 52	47	(Milledge, 2011)

Nota. Se presenta la composición en porcentaje peso seco de algunas especies de *Scenedesmus*. Adaptado de Koyande *et al.* (2019).

1.1.3.4. Obtención de metabolitos de *Scenedesmus*

Las microalgas presentan un alto potencial debido a su contenido de proteína de alta calidad y varios pigmentos (clorofila, carotenoides y luteína), que son importantes para la salud humana. Además, presentan actividades preventivas contra el cáncer y funcionan como antiinflamatorios y antioxidantes (Becker, 2007). Existen varias especies de microalgas que producen pigmentos, cuya naturaleza depende de su especie y color. Por ejemplo, las microalgas verdes contienen clorofilas, las microalgas rojas y azules presentan ficobiliproteínas y las microalgas amarillas, naranjas y rojas producen carotenoides (Koyande *et al.*, 2019). Las microalgas verdes, como *Scenedesmus* son una fuente común de clorofila. Por ejemplo, *S. dimorphus*, contiene un promedio entre 0.5 – 1 % de clorofila (Sun *et al.*, 2023).

Para la obtención de metabolitos, el nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes, ya que influye en la proliferación, la tasa de crecimiento y la composición bioquímica. A altas concentraciones, el nitrógeno favorece una mayor acumulación de proteínas (Wang *et al.*, 2013). De acuerdo con Ursu *et al.* (2014), las proteínas de las microalgas tienen una capacidad emulsionante y estabilidad de emulsión, a diferencia de las proteínas comerciales como el aislado de proteína de soja y el caseinato de sodio. Además, la microalga *S. obliquus* muestra características prometedoras como fuente de proteína, con un contenido total del 33.9 % (Amorim *et al.*, 2020; Andreeva *et al.*, 2021). Shamala *et al.* (1982) determinaron que la microalga *S. acutus* produce un mayor porcentaje de aminoácidos como alanina, valina, asparagina, glutamina y treonina. Estos aminoácidos son componentes fundamentales de las proteínas y se localizan en la pared celular de las microalgas, donde a menudo se degradan para asegurar el acceso a este componente.

Los carbohidratos en las microalgas están presentes como glucógeno, almidón, sacarosa, amilopectina o como celulosa extracelular. Estos se forman como respuestas de los cloroplastos a ambientes hostiles, como bajas concentraciones de nitrógeno o fósforo, o cambios de salinidad (Arias *et al.*, 2021). Por ejemplos, *S. obliquus* es considerada una microalga robusta, con un contenido de carbohidratos que oscila entre el 10 y el 34 % (w/w) de carbohidratos. Además, el contenido de carbohidratos depende de las condiciones de cultivo, ya sea fotoautótrofo, mixotrófico o heterótrofo (Singh *et al.*, 2019).

1.1.3.5. Condiciones óptimas de cultivo para la producción de metabolitos

Para la producción de metabolitos y de biomasa depende de varios factores ambientales o diferentes parámetros de los medios y condiciones de cultivo sobre la producción de biomasa de *Scenedesmus* y de sus metabolitos primarios y secundarios. Entre los más importantes, destacan la temperatura, la fase decrecimiento, la iluminación, el pH, la disponibilidad de carbono, nitrógeno, fósforo y el fotoperiodo (Hlaing *et al.*, 2020).

La temperatura óptima para el crecimiento de *Scenedesmus* se encuentra en el rango de 15 a 35 °C. En los parámetros tecnológicos aplicados al cultivo de *S. obliquus*, la producción de biomasa incrementa exponencialmente durante 14 días hasta alcanzar la fase estacionaria (Dolganyuk *et al.*, 2020). Se conoce que la tasa de crecimiento de estas microalgas depende significativamente de condiciones de estrés nutricional, incluyendo la limitación de nitrógeno, carbono, fósforo y hierro. El carbono desempeña un papel crucial para mantener las células, impulsar el crecimiento y la producción de proteínas y carbohidratos. El carbono puede ser aprovechado en condiciones autótrofas, donde las microalgas fijan CO₂ mediante su aparato fotosintético. *Scenedesmus* también es capaz de aprovechar el carbono en condiciones heterótrofas, donde las microalgas utilizan moléculas orgánicas disponibles el medio como glucosa, glicerol o acetato presente en el medio, proporcionando energía y carbono para su crecimiento (Manning, 2022). Finalmente, el crecimiento de *Scenedesmus* también puede ser estimulado en condiciones mixotróficas, donde las microalgas conservan su capacidad fotosintética para absorber el carbono atmosférico y suplementan sus requerimientos mediante la energía que obtienen del metabolismo de sustancias orgánicas (Korozi *et al.*, 2023).

El nitrógeno es otro elemento clave en el cultivo de *Scenedesmus*, ya que constituye aproximadamente el 14 % de la biomasa. Este elemento puede ser absorbido en diferentes formas inorgánicas, como NO₃, NO₂, NO y NH₄. En la célula, el nitrógeno se utiliza principalmente para la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos (Zhu *et al.*, 2019).

Por último, el fotoperiodo, la intensidad y fuente de luz dosificada a los cultivos afecta directamente sobre la máxima tasa de fotosíntesis para el crecimiento de las microalgas. Mientras que la mayoría de estudios emplean luz fluorescente y un fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad, el rango de longitud de onda puede variar entre los 400 a 700 nm y la intensidad de luz oscila alrededor de los 2500 lx. Es

importante tomar en cuenta que cuando se excede el rango de intensidad de la luz, las microalgas sufren un proceso de fotoinhibición que generalmente se caracteriza por un color verde pálido, disminución del tamaño celular y pérdida de clorofila (**Bialevich *et al.*, 2022**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar la producción de metabolitos primarios y secundarios por *Scenedesmus* sp. nativa del Ecuador.

1.2.2. Objetivos específicos

- Estimar la cinética de crecimiento de *Scenedesmus* sp. nativa del Ecuador empleando diferentes concentraciones de nitrógeno y fuente de carbono.
- Evaluar la producción de proteína, carbohidratos y pigmentos bajo diferentes concentraciones de nitrógeno y fuente de carbono.
- Determinar la morfología de *Scenedesmus* sp. nativa del Ecuador bajo las condiciones de estudio.

CAPITULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales

En el presente proyecto de investigación se realizó en los laboratorios de la UODIDE de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Los equipos, materiales y reactivos que se emplearon en el componente experimental se enlistan a continuación:

2.1.1. Equipos de laboratorio

- Autoclave (Hirayama Hicl. HV-110)
- Balanza analítica (VWR-224AC)
- Cámara de cultivo (incluye lámparas fluorescentes, compresores de aire seco, reguladores de flujo de aire, mangueras de silicona y temporizador)
- Cámara de flujo laminar (N1 Esco)
- Centrífuga (para microtubos de 1.5 mL) (Centrífuga Eppendorf 542R)
- Centrífuga (para tubos de 15 mL) (Rotina 380)
- Estufa (LABINCUBATOR)
- Espectrofotómetro UV-Vis (Fisher Scientific-accuSkan Go)
- Lisador de células (Biospec Products – Mini-Beadbeater-24)
- Microondas
- Micropipetas (2 – 20 µL; 20 – 200 µL; 100 – 1000 µL; 1 – 10 mL)
- Microscopio óptico binocular (Olimpus-CX21FS1)
- Potenciómetro (Mettler Toledo-SevenCompact)
- Refrigerador/congelador
- Termobloque (Labnet Accublock 2)
- Termómetro
- Vórtex (Labnet-varios huecos)

2.1.2. Reactivos

- Aceite de inmersión
- Acetato de sodio (NaOAc)
- Ácido sulfúrico concentrado 97 % (H_2SO_4)
- Ácido clorhídrico al 37 % (HCl)
- Agar Bacteriológico
- Agua desionizada de tipo 2
- Agua destilada
- Dextrosa
- Etanol (70 y 96 % de pureza)

- Etilenglicol (EG)
- Fenol 5 %
- Fosfato de ácido de potasio (KH_2PO_4)
- Kit BCA
- Medio Basal de Bold (BBM)
- Medio Basal de Bold modificado (0.625 y 1.25 g/L NaNO_3)
- Metanol concentrado 97 % (CH_3OH)
- Tartrato de sodio y potasio
- Triton X-100

2.1.3. Materiales fungibles

- Botellas (300 mL; 500 mL; 1 L)
- Cubreobjetos
- Frasco ámbar
- Gradillas para microtubos
- Gradillas para tubos Falcon
- Lámpara de alcohol
- Microtubos Eppendorf (2 mL)
- Pipetas pasteur de vidrio (18 cm)
- Placa de 96 pocillos
- Placas Petri
- Portaobjetos
- Puntas para micropipeta (2 – 20 μL ; 20 – 200 μL ; 100 – 1000 μL ; 1 – 10 mL)
- Tubos Falcon (15 mL; 50 mL)
- Tubos eppendorf (1.5 mL)
- Hemocitómetro de Neubauer
- Vasos de precipitación (100 mL; 250 mL; 500 mL)

2.2. Métodos

2.2.1. Preparación de inóculos

En el presente estudio se empleó un consorcio de microalgas proporcionado por MSc. Alejandra Cruz, docente-investigadora de la Universidad de las Américas (UDLA) y aislado de una muestra ambiental colectada en Mindo. Estudios previos permitieron determinar que el consorcio de microalgas pertenece al género *Scenedesmus* sp. Para la preparación del inóculo inicial, el consorcio se cultivó en un medio líquido en Medio Basal de Bold (BBM). Este medio fue compuesto por NaNO_3 , 250 mg/L; K_2HPO_4 , 75 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 75 mg/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 mg/L; KH_2PO_4 , 175 mg/L; NaCl , 25 mg/L; solución

alcalina de EDTA, 1 mL/L (5 g de Na₂-DTA y 3.1 g de KOH en 100 mL de agua desionizada); solución de hierro 1 mL/L (0.498 g de FeSO₄·7H₂O y 0,1 mL de H₂SO₄ en 100 mL de agua desionizada); solución de metales traza, 1 mL/L (H₂SO₄, 10 mL/L; MnCl₂·4H₂O, 1.44 g/L, ZnSO₄·7H₂O, 8.82 g/L; MoO₃, 0.71 g/L; Co(NO₃)₂·6H₂O, 0.49 g/L; CuSO₄·5H₂O, 1.57 g/L), solución de boro, 1 mL/L (0.11 g de H₃BO₃ en 100 mL de agua desionizada) (Figueroa *et al.*, 2020). Estas soluciones se disolvieron en agua desionizada, y se ajustó el pH del medio a $6,8 \pm 0,3$ mediante la adición controlada de HCl o NaOH. Posteriormente, el medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y 15 psi.

En el marco de este proyecto, el cultivo inicial de *Scenedesmus* sp. se llevó a cabo mediante un sistema semicontinuo. En este sistema, se retiró el 50 % del volumen del cultivo (100 mL) cada 15 días y se substituyó con medio fresco. Cada dos días se repuso el agua evaporada utilizando agua desionizada estéril. A lo largo de este proceso, se mantuvieron condiciones de incubación constante, tales como una temperatura ambiente de aproximadamente 21 °C, un ciclo de luz/oscuridad de 16h/8h proporcionado por luz fluorescente blanca con aproximadamente 2500 lx, y aireación constante de 200 mL/min con un suministro de CO₂~0.04 % (v/v). Este cultivo se empleó como inóculo inicial para las siguientes fases del proyecto.

2.2.2. Condiciones de cultivo para *Scenedesmus* sp. empleando distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono

Se empleó el medio de cultivo BBM para estimar la cinética de producción de *Scenedesmus* sp. bajo diferentes concentraciones de NaNO₃ y fuentes de CO₂, lo que permitió evaluar el crecimiento de la microalga (Silva *et al.*, 2022). Para evaluar la variación de la concentración de nitrógeno, se implementó 4 tratamientos de cultivo a distintas concentraciones: (1) BBM sin suplementar NaNO₃; (2) BBM suplementando con 1.25 g/L de NaNO₃; (N3) BBM suplementado con 2.5 g/L de NaNO₃ y (4) BBM suplementado con 5.0 g/L de NaNO₃. Con respecto a la fuente de carbono, se estableció un tratamiento en condiciones autótrofas y dos en condiciones mixotróficas, como se describe a continuación: (1) BBM sin suplementar, solo recibirá CO₂ procedente de la aireación; (2) BBM suplementando con 1.64 g/L de acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) con CO₂ y (3) BBM suplementando con 2.5 g/L de etilenglicol (EG) con CO₂ (Kishi *et al.*, 2015). Finalmente, se aplicó un control negativo donde solo contendrá el medio BBM sin inóculo.

Cada tratamiento se inoculó con una suspensión celular derivado del cultivo inicial, utilizando un volumen de 200 mL hasta alcanzar una densidad celular de 1×10^6 células/mL. Para todos los tratamientos, se mantuvieron las mismas condiciones de incubación mencionadas en el cultivo inicial, con la excepción de que, en este caso, todos los ensayos se llevaron a cabo en un sistema de cultivo discontinuo.

2.2.3. Determinación de la curva de crecimiento celular

Para la determinación de la curva de crecimiento celular, se llevó a cabo el conteo de células utilizando la cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad, donde se tomó 10 µl de la muestra de cultivo y fue colocada en la cámara. El conteo de células se realizó empleando un microscopio óptico binocular. El número de células por mL se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Número de células}}{5 \text{ cuadrantes}} * \frac{1 \text{ cuadrante}}{4 * 10^{-3} \text{ mm}^3} * \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} * \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ ml}} * FD \quad (\text{eq. 1})$$

Se mantuvo un registro diario del recuento celular, a excepción de los fines de semana, durante 15 días o hasta alcanzar la fase estacionaria. Los resultados obtenidos se representaron en una curva de crecimiento celular.

2.2.4. Evaluación de las proteínas contenidas en la biomasa de *Scenedesmus* sp.

Para cuantificar la producción de proteína de *Scenedesmus* sp., se aplicó el método del Ácido Bicinconínico (BCA), según lo descrito por **Smith et al. (1985)** y modificado para este estudio. Para llevar a cabo esta evaluación, se tomó una alícuota de 5 mL del medio de cultivo y se centrifugará a 12000 rpm por 4 minutos. Posteriormente, en un microtubo de 1.5 mL, el pellet se resuspendió en 1 mL de agua destilada, al cual se añadió 10 microesferas de vidrio de 3 mm de diámetro, junto con 0.05 % de Tritón X-100. Luego, fue homogenizado la muestra en un vortex durante 20 segundos. Seguidamente, se congeló las muestras a -20 °C por 2 minutos y se descongeló a 80 °C en un termobloque. Este proceso de congelación/descongelación se repitió durante 3 ciclos. Las muestras fueron sometidas a un lisador de células a 3500 rpm durante 20 minutos. Por último, se centrifugó las muestras a 12000 rpm durante 4 minutos. Una vez terminado este proceso, se tomó el sobrenadante y se aplicó el método del ácido bicinconínico (BCA). En una microplaca, se colocó 196 µl de la solución de ácido bicinconínico, 4 µl de pentahidrato de sulfato de cobre al 4 % y 25 µl de la muestra. Posteriormente, fue incubado a 37 °C durante 30 minutos. La medición se llevó a cabo en un espectrofotómetro lector de placas a una longitud de onda de 562 nm. La concentración de la proteína fue determinada en función de una curva estándar de albumina de suero bovino (BSA) determinada mediante el mismo procedimiento. Este proceso realizó a lo largo de aproximadamente 15 días, excepto los fines de semana, o hasta que el crecimiento celular alcance la fase estacionaria.

2.2.5. Evaluación de los carbohidratos contenidos en la biomasa de *Scenedesmus* sp.

Los niveles totales de carbohidratos presentes en la biomasa de *Scenedesmus* sp. fueron analizados mediante el proceso de hidrólisis ácida. La determinación de estos niveles se llevó a cabo utilizando el método colorimétrico fenol ácido sulfúrico descrito por **López et al. (2017)**. En este procedimiento, se

tomó 1 mL del medio de cultivo y se le añadió 0.5 mL de fenol al 5 % y 2.5 mL de ácido sulfúrico al 95 %. La muestra reposó durante 10 minutos; después, se agitó en un vórtex por 30 segundos y se dejó reposar en baño María a 25 °C durante 10 minutos. La medición fue realizada en microplacas de 96 pocillos, donde se adicionó 240 µl de la muestra en cada pocillo. La absorbancia se evaluó utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. La cuantificación de la concentración de carbohidratos se realizó en una curva estándar de glucosa obtenida mediante el mismo procedimiento. Este proceso se llevó a cabo durante aproximadamente 15 días, excepto los fines de semana, o hasta que el crecimiento celular alcance la fase estacionaria.

2.2.6. Evaluación de los pigmentos contenidos en la biomasa de *Scenedesmus* sp.

La medición de los pigmentos presentes en la biomasa de *Scenedesmus* sp. se llevó a cabo utilizando disolventes orgánicos según la técnica descrita por **Henriques *et al.* (2007)**. Primero, se tomó una muestra de 2.5 mL del medio de cultivo de cada tratamiento. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. A continuación, las células se suspendieron en 2 mL de agua destilada con el fin de eliminar las sales presentes en la biomasa, seguido de una segunda centrifugación a 4000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Después, se adicionó 2 mL de metanol al 95 % y se dejó reposar durante 20 minutos. Seguidamente, se realizó una nueva centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos, la absorbancia del sobrenadante se determinó mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 665 y 480 nm para determinar clorofila y carotenoides totales.

$$\mu g_{Clorofila}/mL_{Medio} = 15.65 A_{666} \quad (\text{eq. 2})$$

$$\mu g_{Carotenoides\ totales}/mL_{Medio} = \left(\frac{1000 A_{470} - 44.76 A_{666}}{221} \right) \quad (\text{eq. 3})$$

Este proceso se llevó a cabo durante aproximadamente 15 días, excepto los fines de semana, o hasta que el crecimiento celular alcance la fase estacionaria.

2.2.7. Diseño experimental

Para estimar la concentración de nitrógeno y la fuente de carbono, se implementó un diseño factorial A x B. Destacando que el factor A representaba la concentración de nitrógeno, presentando cuatro niveles, mientras que el factor B, representaba la fuente de carbono, incluyendo tres niveles según se detalla en la (Tabla 1). Por ende, se realizó combinaciones entre los niveles de cada factor para conformar un total de 12 tratamientos. Es importante recalcar, que cada uno de estos tratamientos se realizó por triplicado, para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Tabla 2. *Diseño experimental propuesto para la producción de biomasa, metabolitos primarios y secundarios en Scenedesmus sp. utilizando diferentes concentraciones de nitrógeno y fuente de carbono.*

Factor A	Factor B
Concentración de nitrógeno	Fuente de carbono
1. NaNO ₃ (0 g/L)	1. CO ₂ (0.04 % v/v)
2. NaNO ₃ (1.25 g/L)	2. CO ₂ (0.04 % v/v) + EG (2.5 g/L)
3. NaNO ₃ (2.5 g/L)	3. CO ₂ (0.04 % v/v) + C ₂ H ₃ NaO ₂ (1.64 g/L)
4. NaNO ₃ (5.0 g/L)	

- **Hipótesis**

Hipótesis Nula

La variación de la concentración de nitrógeno y fuentes de carbono en el medio de cultivo no mejoran la producción de biomasa y de metabolitos primarios y secundarios.

Hipótesis alternativa

La variación de la concentración de nitrógeno y fuentes de carbono en el medio de cultivo mejoran la producción de biomasa y de metabolitos primarios y secundarios.

- **Variables**

Generación de biomasa

Variable dependiente

Cantidad de biomasa generada

Variable independiente

Concentración de nitrógeno y fuente de carbono

Producción de proteínas, carbohidratos y pigmentos

Variable dependiente

Cantidad de proteína, carbohidrato y pigmentos generados

Variables independientes

Concentración de nitrógeno y fuente de carbono

2.2.8. Análisis de datos

Para el análisis de los datos obtenidos de las fases de generación de biomasa, producción de proteínas, carbohidratos y pigmentos, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA con modelo lineal general univariado) con un nivel de confianza del 95 %, utilizando un software estadístico. Con el fin de identificar las diferencias significativas y determinar el mejor tratamiento en cuanto a la cantidad de biomasa obtenida y la producción de metabolitos primarios y secundarios bajo diferentes concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono en el medio de cultivo, se aplicó una prueba de Tukey.

2.2.9. Análisis morfológico mediante microscopio óptico

Para llevar a cabo el análisis morfológico de las muestras, se aplicó el procedimiento establecido por **Yu *et al.* (2022)**. Es importante destacar que este análisis se realizó antes y después de la implementación de las condiciones de estudios mencionadas anteriormente. Se tomó una muestra de 3 µl del medio de cultivo, las cuales se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos. El precipitado se suspendió en 300 mL de medio BBM. Posteriormente, se tomó 40 µl de la muestra y se colocó en un portaobjetos. Se utilizó un microscopio óptico binocular para su posterior observación de la estructura celular y movilidad.

CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Evaluación de la cinética de crecimiento

Las microalgas fotosintéticas crecen en diversos tipos de cuerpo de agua, como ríos, lagos y mares. Son grupos autótrofos fotosintéticos que producen oxígeno atmosférico a partir de la fotosíntesis, que a su vez convierte en agua (H_2O) y el dióxido de carbono (CO_2) en carbohidratos utilizando la luz solar. Existen métodos para el cultivo de microalgas, como los cultivos autótrofos, heterótrofos y mixotróficos (Dolganyuk *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2020). El cultivo mixotrófico comprende partes de los cultivos heterótrofos o autótrofos, permitiendo el crecimiento bajo limitaciones de cualquier fuente de carbono, ya sea orgánico (EG, glucosa y NaOAc) o inorgánico (CO_2) (Patel *et al.*, 2020). Los cultivos mixotróficos mejoran la productividad de biomasa, tasa de crecimiento y la producción de metabolitos de alto valor a diferencia de las condiciones fotoautótrofas (Castillo *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2019).

Se estudió la capacidad de producción de biomasa del consorcio de *Scenedesmus* sp. en condiciones autótrofas y mixotróficas, aplicando diferentes concentraciones de $NaNO_3$ (0, 1.25, 2.5 y 5) g/L y diferentes fuentes de carbono (CO_2 , EG y NaOAc). La cinética de crecimiento de *Scenedesmus* sp. se evaluó durante un periodo de 18 días, además se determinó los valores máximos de concentración celular por volumen de cultivo (células·mL⁻¹), como se muestra en la Figura 2.

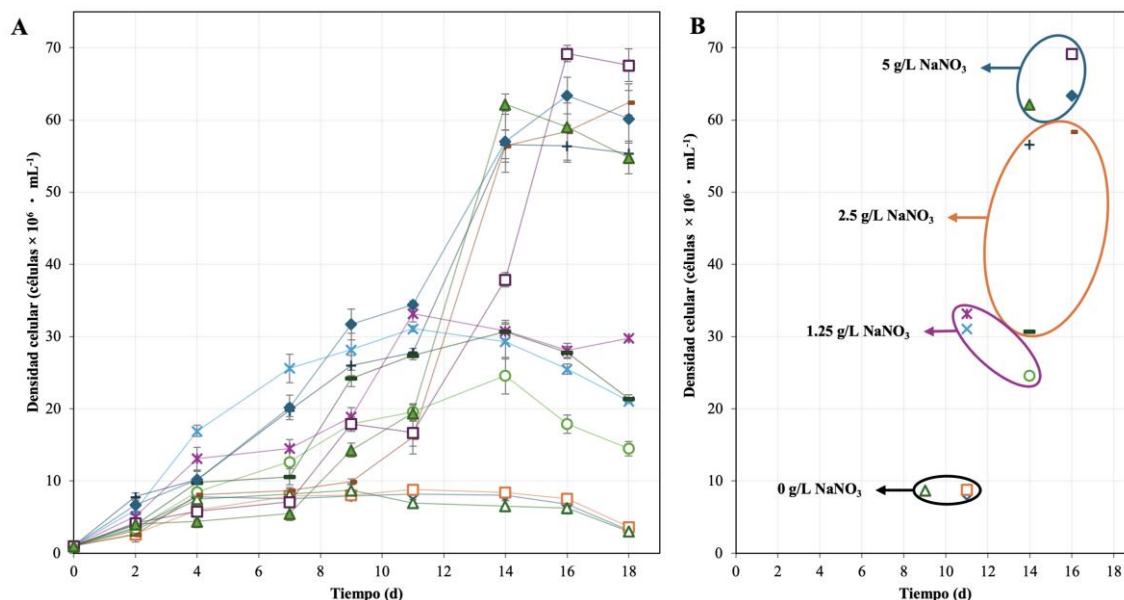


Figura 2. Curva de crecimiento del aislamiento de *Scenedesmus* sp.

Se representa: (A) La cinética de crecimiento a partir de la concentración celular por volumen de cultivo (células·mL⁻¹), a lo largo de 18 días (B) Los valores máximos de concentración celular por volumen de

cultivo (células·mL⁻¹) tomando en cuenta las distintas cinéticas de cada tratamiento, empleado distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono al medio de cultivo: N1 + C1 [—◇—]; N1 + C2 [—□—]; N1 + C3 [—△—]; N2 + C1 [—×—]; N2 + C2 [—*—]; N2 + C3 [—○—]; N3 + C1 [—+—]; N3 + C2 [—●—]; N3 + C3 [—■—]; N4 + C1 [—◆—]; N4 + C2 [—▣—]; N4 + C3 [—▲—]. Las líneas verticales presentes en cada punto representan la desviación estándar con respecto a la media.

Para cada tratamiento se observaron distintas cinéticas de crecimiento durante los 18 días de cultivo. El análisis de varianza (ANOVA) indicó que la tasa de crecimiento celular es significativamente distinta ($p < 0.05$), es decir que todos los tratamientos presentan una cinética de crecimiento distinta. Según la prueba de Tukey, las dos variables de estudio influyeron en el crecimiento de *Scenedesmus* sp., que son las concentraciones de NaNO₃ (0, 1.25, 2.5, 5) g/L y las fuentes de carbono (EG y NaOAc). Según los resultados de las pruebas de Tukey mostraron cuatro niveles de significancia para las concentraciones de NaNO₃; los tratamientos sin NaNO₃ presentaron el menor crecimiento, destacándose como el grupo de menor rendimiento, los cultivos suplementados con 1.25 g/L de NaNO₃ tuvieron un crecimiento moderado, mientras que los cultivos con 2.5 g/L de NaNO₃ mostraron un crecimiento significativamente mayor, formando parte del grupo con alto rendimiento y los cultivos con 5 g/L de NaNO₃ alcanzaron el mayor crecimiento. En cuanto a las fuentes de carbono, se observaron dos niveles de significancia, donde los cultivos sin suplementar CO₂ y los suplementados con EG pertenecen al mismo grupo de significancia, mientras que el cultivo suplementado con NaOAc se situaron en el grupo de menor crecimiento (Tabla 3). Estos resultados sugieren que las concentraciones de NaNO₃ y las fuentes de carbono en el medio son un factor importante para maximizar el rendimiento de los cultivos.

Tabla 3. Intervalos de producción máxima de células por *Scenedesmus* sp. empleando diferentes concentraciones de NaNO₃ y fuente de carbono.

Fuente de carbono	Densidad celular (células×10 ⁶ /mL)			
	Concentración de NaNO ₃ (g/L)			
	0	1.25	2.5	5
CO ₂	8.1 ± 8.3 ^{AX} (11)	31.0 ± 30.0 ^{BX} (11)	55.2 ± 58.0 ^{CX} (14)	65.2 ± 61.6 ^{DX} (16)
CO ₂ + EG	8.7 ± 9 ^{AX} (11)	32.4 ± 34.0 ^{BX} (11)	54.4 ± 59.2 ^{CX} (16)	70.0 ± 68.4 ^{DX} (16)
CO ₂ + NaOAc	8.1 ± 9.4 ^{AY} (9)	22.8 ± 26.4 ^{BY} (14)	31.8 ± 29.6 ^{CY} (14)	61.2 ± 63.2 ^{DY} (14)

Nota: Entre paréntesis se indica el tiempo de cultivo al cual se observó la mayor producción de células debido a que cada tratamiento presentó una cinética distinta. Los superíndices ubicados en la parte superior derecha (A, B, C, D) indican los niveles de significancia para la concentración de nitrógeno,

mientras que, (X, Y) indican los niveles de significancia para la fuente de carbono, según la prueba de Tukey.

La cinética de crecimiento basado en los conteos celulares mediante la cámara de Neubauer (células/mL) (Figura 3A) indica que, independientemente del tratamiento aplicado, todos los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, en la cual las microalgas detienen el aumento de biomasa debido al agotamiento de nutrientes en el medio (**Krishnan et al., 2015**). En todos los tratamientos, tanto en condiciones autótrofas como mixotróficas, se observó una fase inicial de adaptación al entorno que duró un período de 2 días. En la fase exponencial o logarítmica, el incremento de la densidad celular dependió del contenido de la concentración de nitrógeno (NaNO_3) (**Hlaing et al., 2020**). Como se muestra en la Figura 3A, el aumento de la concentración celular es independiente del tiempo. Por ejemplo; los cultivos suplementados con 2.5 y 5 g/L de NaNO_3 presentaron una tasa de crecimiento constante que duró entre 14 y 16 días, alcanzando la fase estacionaria. Por otro lado, los cultivos suplementados con 1.25 g/L de NaNO_3 , alcanzaron la fase estacionaria entre los 11 y 14 días. Los cultivos que no se suplementó NaNO_3 , no presentaron una fase exponencial significativa, ya que la ausencia de nitrógeno limitó la producción de biomoléculas esenciales como ácidos nucleicos, proteínas, pigmentos, necesarios para la división celular (**Morales et al., 2018**).

Otro aspecto importante de la cinética de crecimiento es que los cultivos con baja suplementación de NaNO_3 (0 y 1.25) g/L entraron en fase de muerte entre los días 14 y 16, mientras que los cultivos que presentaron una concentración alta (2.5 y 5) g/L no presentaron este comportamiento. Investigaciones realizadas por **Samkhaniyani et al. (2017)** sobre el crecimiento celular de *Scenedesmus* sp., encontraron que a bajas concentraciones de NaNO_3 (0,3 g/L) los cultivos presentaron una disminución en la tasa de crecimiento, lo que conllevó a una rápida transición a la fase de muerte debido a la limitación de recursos.

Por otro lado, los resultados obtenidos mostraron que la máxima densidad celular se alcanzó utilizando 2.5 y 5 g/L de NaNO_3 en el día 16. Estos medios de cultivo no alcanzaron la fase de muerte, pero se observó una disminución en el día 18, lo que se estima el inicio de la fase de muerte o decaimiento de células provocado por la limitación de nutrientes en la fase logarítmica. Estos resultados son congruentes con lo observado por **Bhola et al. (2011)**, quienes encontraron que la máxima densidad celular de *C. vulgaris* se alcanzó con una concentración de 5 g/L de NaNO_3 en el día 14. Otros estudios realizados por **Arumugam et al. (2013)** mostraron que las fuentes de nitrógeno ayudan a mejorar el crecimiento, pero el nitrato de potasio (KNO_3) mostró un máximo crecimiento para *S. bijugatus*, en contraste con el nitrato de sodio (NaNO_3). Estos autores destacan que la disponibilidad de nitrógeno es fundamental para mantener una tasa de crecimiento celular sostenible. Además, la concentración de nitrógeno que inhibe el crecimiento celular depende de las condiciones de cultivo y de las especies.

Estos hallazgos son conscientes con estudios previos, como los de **Samkhaniyani *et al.* (2017)**, que observaron que los cultivos con bajas concentraciones de nitrógeno reducen la tasa de crecimiento. Sin embargo, las altas concentraciones pueden causar una inhibición del crecimiento celular, debido a la toxicidad que puede provocar las altas concentraciones de nitrógeno.

En cuanto a la variación en la fuente de carbono, los cultivos autótrofos y mixotróficos presentaron datos similares para cada nivel de concentración de nitrógeno. Según los resultados obtenidos, la mayor densidad celular (células/mL) se alcanzó en los cultivos con CO₂ y EG suplementado con 5 g/L de NaNO₃. La mayor densidad celular se presentó en el día 16 en el tratamiento autótrofo (CO₂) y mixotrófico (EG) suplementados con 5 g/L de NaNO₃, siendo de $65.2 \pm 61.6 \times 10^6$ células/mL y $70.0 \pm 68.4 \times 10^6$ células/mL, respectivamente. Por otro lado, el tratamiento con NaOAc suplementado con 5 g/L de NaNO₃ produjo una menor densidad celular de $61.2 \pm 63.2 \times 10^6$ células/mL. Estos resultados indican que el tratamiento mixotrófico produjo aproximadamente 1.07 veces más células que el cultivo autótrofo, y 1.14 veces más que el tratamiento con NaOAc. lo que representa un aumento del 7.36 y 14.38 %.

Los cultivos mixotróficos presentan una mayor densidad celular debido a la suplementación con fuentes de carbono orgánica e inorgánica. Las fuentes de carbono inorgánico, como el dióxido de carbono (CO₂) y el bicarbonato (HCO₃⁻) presentan cualidades deseables para el cultivo, ya que ayuda a reducir la contaminación por microorganismos no deseados. A diferencia de las fuentes de carbono orgánico, como la glucosa, glicerol, metanol, acetato de sodio, etilenglicol y glicerol, aumentan la producción de biomasa en cultivos mixotróficos (**Goswami *et al.*, 2022**).

El acetato de sodio es la fuente de carbono orgánica que puede aumentar la biomasa en las microalgas. En estudios realizados por **Cheng *et al.* (2021)**, utilizaron acetato de sodios en los cultivos de *S. obliquus*, donde identificaron que a bajas concentraciones de NaOAc (10 mg/L) aumentaron la concentración de biomasa, mientras que a concentraciones superiores de 50 mg/L generaron una menor concentración de biomasa. En nuestro estudio, el cultivo con NaOAc presentó una menor concentración, lo que podría deberse a la suplementación de NaOAc de 1.64 g/L (1640 mg/L) generando una baja densidad celular.

El acetato puede provocar efectos inhibidores sobre las microalgas, ya que a altas concentraciones puede ser tóxico y afectar el rendimiento y la tasa de crecimiento. Estos efectos pueden causar un aumento en la fase de retraso o la ausencia total del crecimiento, lo que conlleva a la muerte celular (**Chen & Johns, 1996; Zuo *et al.*, 2012**).

3.1.2. Evaluación de la cantidad de proteína contenida en la biomasa de *Scenedesmus* sp.

La biomasa de las microalgas es un elemento crucial para las industrias debido a que los cultivos mixotróficos presentan una mayor productividad de biomasa, pigmentos, ácidos grasos, proteínas y

lípidos, dependiendo de la especie de microalga (Castillo *et al.*, 2021). En las algas fotosintéticas, las proteínas presentan una mayor acumulación durante el periodo de crecimiento celular y rápida división (Wang *et al.*, 2021). La evaluación de la cantidad de proteínas en la biomasa de *Scenedesmus* sp. es de gran importancia para entender su potencial como fuente de proteína en aplicaciones biotecnológicas y nutricionales.

En este estudio, se analizaron las concentraciones de proteína y el rendimiento porcentual de proteína bajo diferentes concentraciones de NaNO_3 (0, 1.25, 2.5 y 5) g/L en conjunto con distintas fuentes de carbono (CO_2 , EG y NaOAc). En la Figura 3, se observa la cantidad de proteína producida bajo diferentes condiciones de estudio.

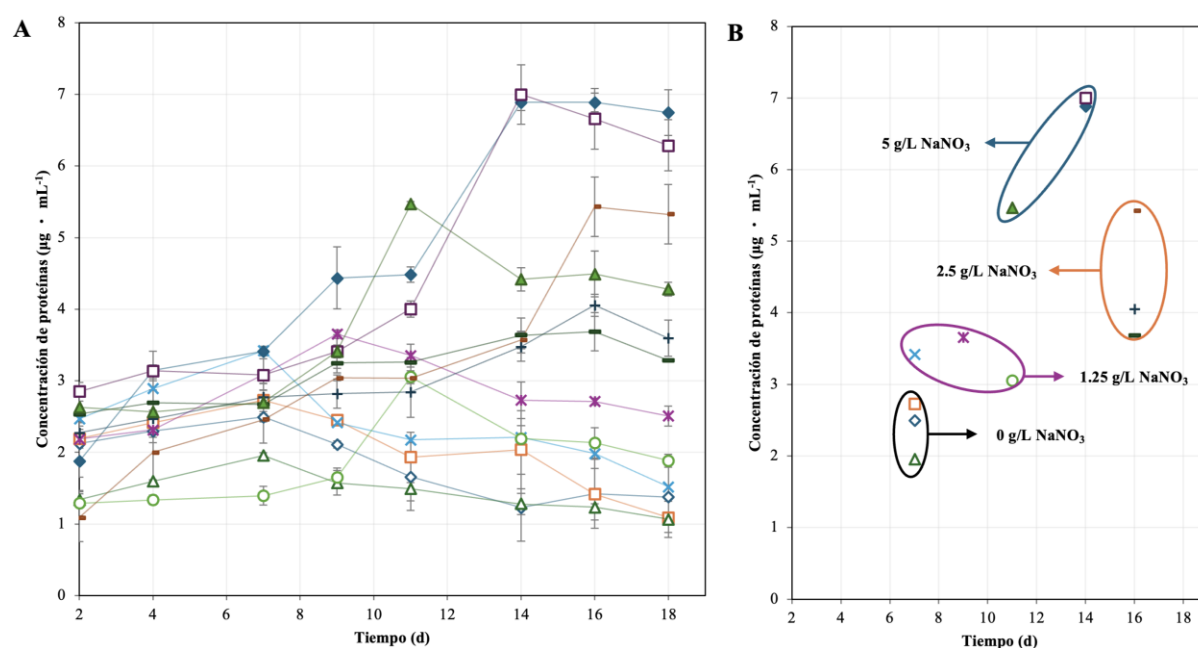


Figura 3. Curva de la concentración de proteínas producidos a partir del aislamiento de *Scenedesmus* sp.

La gráfica representa: (A) La producción de carbohidratos ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) a lo largo de 18 días a partir de la densidad celular, (B) Los valores máximos de producción de carbohidratos ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) empleado distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono al medio de cultivo: N1 + C1 [$\diamond$]; N1 + C2 [$\square$]; N1 + C3 [$\triangle$]; N2 + C1 [$\times$]; N2 + C2 [$\ast$]; N2 + C3 [$\circ$]; N3 + C1 [$+$]; N3 + C2 [$-$]; N3 + C3 [$-$]; N4 + C1 [$\bullet$]; N4 + C2 [$\square$]; N4 + C3 [$\triangle$]. Las líneas verticales presentes en cada punto representan la desviación estándar con respecto a la media.

Como se puede evidenciar en las Figura 3A, las proteínas van aumentando con el tiempo de cultivo hasta alcanzar su máxima producción. Además, el incremento de proteína se relaciona con la disponibilidad de nitrógeno. Según, Yaakob *et al.* (2021), las microalgas son capaces de asimilar altas concentraciones de nitrógeno y fósforo, generando una mayor acumulación de proteínas y síntesis de

ácidos nucleico hasta un 40 – 60 % de su peso seco. Se observó una máxima acumulación de proteínas en el día 14 en los cultivos suplementados con 5 g/L de NaNO₃ y fuente de carbono (CO₂ y EG). Estos picos coinciden con la cinética de crecimiento mostrado en la Figura 2A, ya que la mayor producción de proteínas ocurre en la fase de latencia o exponencial.

A diferencia de los cultivos que estaban suplementados con 1.25 y 2.5 g/L de NaNO₃, que presentaron una menor acumulación de proteínas entre los días 7 y 16, el cultivo suplementado con 2.5 g/L de NaNO₃ alcanzó su máxima acumulación de proteína durante la fase estacionaria en el día 16. Estos picos no coinciden con la fase exponencial del crecimiento de la microalga, como se observa en la Figura 2A. Esto puede deberse a que en la fase estacionaria aun no existía una disminución significativa de nutrientes para la producción de proteínas. Por otro lado, los cultivos con 0 g/L de NaNO₃ mostraron una menor acumulación de proteínas, debido a la falta de una fuente de nitrógeno que ayude a la producción de este metabolito.

Después de alcanzar el pico máximo, todos los cultivos presentaron un declive en la acumulación de proteínas. Esto se debe principalmente a la limitación de nutrientes y la deficiencia de nitrógeno, que provocan condiciones de estrés en los medios de cultivo, generando una baja acumulación de proteínas y ácidos nucleicos. Comparando con estudios previos, **Agirman & Cetin (2017)** reportaron que a una limitación del 25 % de nitrógeno, *S. acutus* generó una acumulación de proteínas del 42.820 %, mientras que a un 50 % de nitrógeno limitado, la tasa de aumento de proteína fue del 38.860 %.

Otros estudios, como el de **Çoban et al. (2021)**, determinaron que existen varios tipos de microalgas que prefieren distintas fuentes de nitrógeno. Para la producción de proteínas, *S. acutus* prefiere KNO₃ sobre NaNO₃, con un contenido de proteína de 275.65 y 225.55 µg/mL respectivamente. Además, entre las especies del género *Scenedesmus*, la más destacada para la producción de proteínas a altas concentraciones de nitrógeno es *S. obliquus*, con un contenido de proteína bruta que oscila entre 50 y 56 % (**Becker, 2007**).

El análisis de varianza ANOVA de los datos obtenidos mostró que la concentración de NaNO₃ y la fuente de carbono influyen de manera significativamente en la producción de proteína ($p < 0.05$). La prueba de Tukey identificó cuatro niveles de significancia relacionados con la concentración de NaNO₃ (Tabla 6). En relación con las fuentes de carbono, se presentaron tres niveles de significancia, lo que indica diferencias entre las fuentes de carbono (CO₂, EG y NaOAc). Estos resultados demuestran que la producción de proteína varía notablemente entre todos los tratamientos.

El rendimiento porcentual de proteína, un indicador clave de la eficiencia del cultivo en términos de producción, también se calculó. Los valores máximos de la producción de proteína por cada tratamiento se muestran en la Tabla 5. El tratamiento N4 + C2, que recibió EG como fuente de carbono y 5 g/L de NaNO₃, alcanzó la producción más alta con 7 µg/mL de proteína en el día 14, mostrando un rendimiento porcentual de 0.50 % (Tabla 4). En contraste, el tratamiento N1 + C3, mostró la menor concentración

de proteína con 2 $\mu\text{g/mL}$ y un rendimiento de 2.22 % al día 7. Estos resultados demuestran que el tratamiento N4 + C2 presenta un incremento de 3.5 veces en la producción de proteína respecto al tratamiento N1 + C3. Las concentraciones de nitrógeno ayudan al crecimiento de las microalgas, debido a que contribuye a la producción y es esencial en la síntesis de proteínas que están compuestas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos (Yirgu *et al.*, 2020).

Las fuentes de carbono también influyeron en la producción de proteínas. Los tratamientos sometidos a condiciones autótrofas presentaron resultados similares a los cultivos mixotróficos con EG. Las fuentes de carbono son importantes en los cultivos de las microalgas, ya que constituyen el 50 % de la fracción de elementos de la biomasa. Además, una parte de la fuente de carbono se utiliza para mantener las células y el crecimiento. Como se puede observar en la Tabla 5, el cultivo mixotrófico suplementado con 2.5 g/L de EG presento una mayor acumulación de proteínas y una mayor densidad celular (Tabla 3), a diferencia del cultivo autótrofo. Esto se debe a que los cultivos mixotróficos son capaces de metabolizar tanto el carbono orgánico (EG, glucosa y NaOAc) como el inorgánico (CO_2) al mismo tiempo. Según los estudios realizados por Kishi *et al.* (2015), los glicoles potencian el crecimiento de microalgas, ya que algunos grupos de pueden asimilar el carbono orgánico como el etilenglicol y el propilenglicol. Sin embargo, existe pocas investigaciones sobre la utilización de glicol en las microalgas, y es probable que algunas puedan metabolizar los glicoles, ya que utilizan sustratos químicos similares, incluidos el glicerol y otros polioles.

Por otro lado, los cultivos suplementados con 1.64 g/L de NaOAc, presentaron la menor concentración de proteína y densidad celular. Esto pueda deberse a que el NaOAc puede ser toxico para esta especie de *Scendesmus* o se aplicaron bajas concentraciones al medio de cultivo. Estudios realizados por Luz Marina *et al.* (2020) determinaron que a una concentración de 2.5 de NaOAc, se obtuvo un promedio de concentración de proteína de *S. obliquus* de 4.83 mg/g en 250 mL (19320 $\mu\text{g/mL}$). Tomando en cuenta estas referencias, se podría inferir que los tratamientos suplementados con NaOAc fueron los de menor producción debido a la baja concentración de NaOAc.

Tabla 4. Rendimiento porcentual de Proteína en relación con el Peso Seco de los tratamientos

Tratamiento	Rendimiento porcentual %		
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (Proteína)	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (Peso seco)	% (w/w)
N1 + C1	2.5	120	2.08
N1 + C2	2.7	180	1.50
N1 + C3	2.0	90	2.22
N2 + C1	3.4	550	0.62
N2 + C2	3.65	610	0.60
N2 + C3	3.05	440	0.69

Tratamiento	Rendimiento porcentual %		
	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (Proteína)	$\mu\text{g mL}^{-1}$ (Peso seco)	% (w/w)
N3 + C1	4.1	1570	0.26
N3 + C2	5.43	2370	0.23
N3 + C3	3.7	1130	0.33
N4 + C1	6.9	1320	0.52
N4 + C2	7.0	1390	0.50
N4 + C3	5.5	740	0.74

Nota: Se representa el rendimiento porcentual (%) de proteínas calculado a partir de la concentración de proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) medidas en diferentes tratamientos, el peso seco de cada tratamiento y el volumen de muestra utilizada para la medición.

3.1.3. Evaluación de la cantidad de carbohidratos contenidos en la biomasa de *Scenedesmus* sp.

Los factores ambientales que afectan la composición bioquímica de las microalgas incluyen la intensidad de la luz, el pH y la temperatura. Además, los factores nutricionales influyen significativamente, como la disponibilidad de fuentes de nitrógeno, fósforo, carbono, hierro y azufre (Bermejo *et al.*, 2021). El carbono representa el 50 % de los elementos de la biomasa de las microalgas, siendo crucial para la producción de carbohidratos y lípidos. El contenido de carbohidratos en la biomasa aumenta debido a la limitación de macronutrientes, especialmente nitrógeno (N) o fósforo (P). La adición de fuentes de carbono ya sea de forma orgánica e inorgánica, pueden aumentar la acumulación de lípidos y carbohidratos (Cointet *et al.*, 2019).

Para evaluar la producción de carbohidratos del aislamiento de *Scenedesmus* sp., se realizó el proceso de hidrólisis ácida mediante un cultivo autótrofo y dos mixotróficos. En los cultivos mixotróficos, se combinó el carbono inorgánico (CO_2) con dos fuentes orgánicas (EG y NaOAc), suplementadas con diferentes concentraciones de NaNO_3 (0, 1.25, 2.5 y 5) g/L. En la Figura 4 se presenta la curva de acumulación de carbohidratos durante el periodo de evaluación.

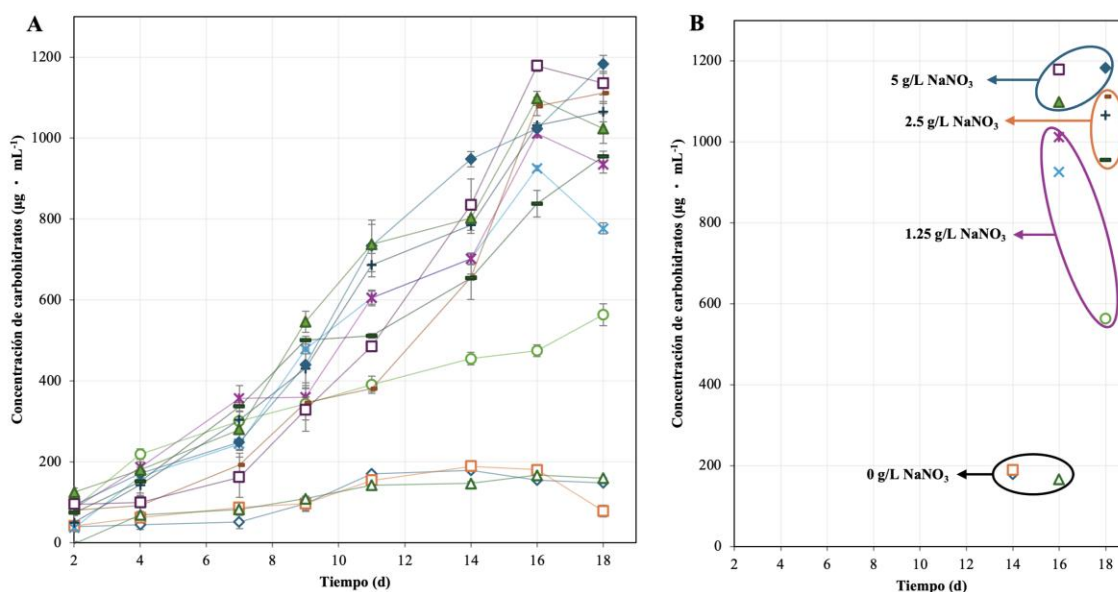


Figura 4. Curva de la concentración de carbohidratos producidos a partir del aislamiento *Scenedesmus sp.*

La gráfica representa: **(A)** La producción de carbohidratos ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) a lo largo de 18 días a partir de la densidad celular, **(B)** Los valores máximos de producción de carbohidratos ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) empleando distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono al medio de cultivo: N1 + C1 [$\diamond$]; N1 + C2 [$\square$]; N1 + C3 [$\triangle$]; N2 + C1 [$\times$]; N2 + C2 [$\ast$]; N2 + C3 [$\circ$]; N3 + C1 [$+$]; N3 + C2 [$-$]; N3 + C3 [$\dashv$]; N4 + C1 [$\blacklozenge$]; N4 + C2 [$\blacksquare$]; N4 + C3 [$\blacktriangle$]. Las líneas verticales presentes en cada punto representan la desviación estándar con respecto a la media.

En la Figura 4A, se representa la cantidad de carbohidratos producidos en los cultivos a lo largo del tiempo hasta alcanzar los picos máximos. Como se puede observar, los carbohidratos presentaron concentraciones máximas en los cultivos suplementados con 2.5 y 5 g/L de NaNO_3 a partir del día 16 y 18. Estos valores se contrastan con la curva de crecimiento y el contenido de proteínas (Figura 2 y 3), ya que a estas concentraciones a partir del día 14, el crecimiento empieza a decrecer. Por ello, se estima que a una limitación de nitrógeno o de nutrientes, las células entran en condiciones de estrés, lo que favorece a la producción de carbohidratos.

Estudios realizados por **de Farias & Sforza (2016)** estiman que existe una mayor acumulación de carbohidratos con bajas limitaciones de nitrógeno, generando estrés oxidativo y una mayor acumulación de carbohidratos, disminuyendo la síntesis de proteínas de las microalgas. Por otro lado, **Singh et al. (2019)** utilizaron urea como fuente de nitrógeno y encontraron que a una concentración baja de 0.15 g/L se obtuvo una productividad de carbohidratos de 255 mg/L, mientras que a una concentración mayor de urea de 0.55 g/L disminuyó el contenido de carbohidratos en *S. obliquus* UTEX 393. Estos resultados sugieren que las condiciones de estrés por nitrógeno ayudan a generar una mayor acumulación de carbohidratos, pero reduce la producción de biomasa (**Yeh & Chang, 2012**).

Según los datos obtenidos, el análisis de varianza ANOVA muestra que la cantidad de carbohidratos producidos por el aislamiento de *Scenedesmus* sp. depende tanto de la concentración de NaNO_3 como de las fuentes de carbono (EG y NaOAc). Además, la prueba de comparación de Tukey demostró tres niveles de significancia para las concentraciones de NaNO_3 , donde los tratamientos suplementados con 2.5 y 5 g/L de NaNO_3 pertenecen al mismo nivel ($p < 0.05$). Por otro lado, para la fuente de carbono se presentaron dos niveles de significancia, donde los tratamientos autótrofos y mixotróficos (EG) pertenecen al mismo nivel ($p < 0.05$) (Tabla 6).

Los cultivos autótrofos y mixotróficos (EG) suplementados con 2.5 y 5 g/L presentaron una mayor producción de carbohidratos en comparación con los cultivos suplementados con 0 y 1.25 g/L de NaNO_3 . Los cultivos con 5 g/L de NaNO_3 presentaron un valor significativamente más alto que a una concentración de 2.5 g/L de NaNO_3 . Los cultivos autótrofos y mixotróficos (EG) suplementados con 2.5 g/L de NaNO_3 alcanzaron una concentración de carbohidratos hasta los 1083.2 y 1130.2 $\mu\text{g/mL}$ en el día 18. En contraste, los cultivos autótrofos y mixotróficos (EG) suplementados con 5 g/L de NaNO_3 presentaron una concentración de 1182.1 y 1182.3 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente 1.09 y 1.04 veces superior al cultivo suplementado con 2.5 g/L de NaNO_3 .

Por otro lado, la producción de carbohidratos en el cultivo mixotrófico (EG) a 5 g/L de NaNO_3 es aproximadamente 1.051 veces superior al cultivo suplementado con 2.5 g/L de NaNO_3 , lo que representa 5.1 % mayor. En contraste, el cultivo mixotrófico (EG) a altas concentración de NaNO_3 presentó una mayor producción de carbohidratos de 1185.6 $\mu\text{g/mL}$ siendo 7.01 veces superior a la producción en el cultivo mixotrófico (NaOAc) sin limitaciones de nitrógeno. Por lo tanto, las microalgas cultivadas mixotróficamente presenta mayor eficacia para la producción de biomasa y metabolitos, ya que son capaces de realizar la fotosíntesis mientras metabolizan y asimilan carbono inorgánico u orgánico, generando un aumento significativo en la producción de lípidos y carbohidratos, en comparación con los cultivos heterótrofos (Manzoor *et al.*, 2020).

La fuente de carbono inorgánica/orgánica presenta efectos significativos en la producción de carbohidratos. En este estudio, la fuente de carbono NaOAc presentó una baja producción de carbohidratos. Según Cheng *et al.* (2021), el NaOAc es comúnmente utilizado en cultivos mixotróficos debido a su bajo costo. Además, el acetil-CoA sintetasa cataliza la producción de acetil-CoA en las células de algas a partir del acetato. Este compuesto es importante para la síntesis de lípidos, el metabolismo del ciclo del ácido cítrico y también mejora el flujo metabólico del carbono, lo que permite aumentar la producción de biomasa.

La concentración del acetato necesaria para la producción de biomasa depende de las cepas de algas. Cheng y sus colaboradores evaluaron el efecto de varias concentraciones de NaOAc sobre *S. obliquus*, encontrando que una baja concentración de NaOAc (10 mg/L) provocó un aumento significativo en la producción de biomasa (769.566 ± 4.925 mg/L), siendo 1.36 veces mayor a una concentración de

NaOAc de 250 mg/L. Algunos autores, como **Degrenne *et al.* (2010)** determinaron que concentraciones superiores a 1 g/L pueden provocar inhibición en el crecimiento de las microalgas por intoxicación. En el presente estudio con *Scenedesmus* sp., se administró 1.24 g/L de NaOAc, produciendo la menor cantidad de carbohidratos en comparación con los demás tratamientos. Estas bajas concentraciones posiblemente se deban a que la especie de *Scenedesmus* utilizada sufrió de intoxicación por el alto contenido de NaOAc.

Investigaciones actuales han demostrado la posibilidad de suplementación con fuentes de carbono como el EG para la producción de biomasa, ya que algunas especies pueden asimilar los glicoles. Según **Kishi *et al.* (2015)**, la degradación de EG en aguas residuales permite la producción de biomasa con diferentes especies de *Chorella*. A pesar de esta investigación, solo se han reportado estudios sobre la producción de biomasa, excepto para carbohidratos. Por otro lado, la fuente de carbono orgánico no influye solo en la producción de carbohidratos, sino también para la producción de biomasa y el metabolismo de las microalgas (**Ma *et al.*, 2022**).

3.1.4. Evaluación de la cantidad de clorofila contenida en la biomasa de *Scenedesmus* sp.

Los pigmentos naturales son importantes por su excelente capacidad colorante y por sus propiedades saludables, ya que no presentan efectos tóxicos ni secundarios en el cuerpo humano. Las microalgas son las principales productoras de pigmentos naturales como la clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas, debido a sus estructuras moleculares y colores únicos que benefician la salud y diferentes actividades fisiológicas (**Sun *et al.*, 2023**). La acumulación de clorofila depende de varios factores, como la variación de la intensidad de luz, la temperatura y las fuentes nutricionales. La variación en las fuentes nutricionales, como el nitrógeno, influyen en el crecimiento de las microalgas y la producción de clorofila (**da Silva Ferreira & Sant'Anna, 2017; Lourenço *et al.*, 2004**).

En la evaluación de la cantidad de clorofila producida por el aislamiento de *Scenedesmus* sp. en los cultivos autótrofos y mixotróficos, se emplearon diferentes concentraciones de NaNO₃ (0, 1.25, 2.5 y 5) g/L. También se combinaron CO₂ con fuentes de carbono orgánicas como el EG y NaOAc. La concentración de clorofila producida por *Scenedesmus* sp. a diferentes concentraciones carbono y NaNO₃ se presenta en la Figura 5.

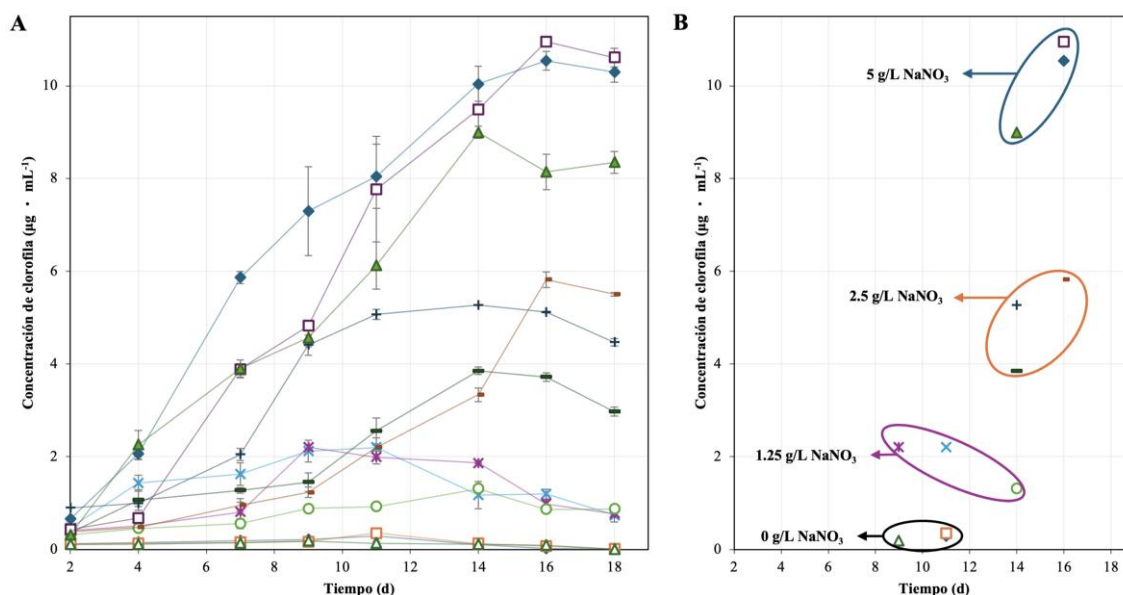


Figura 5. Curva de la concentración de clorofila producidos a partir del aislamiento *Scenedesmus* sp.

La gráfica representa: **(A)** La producción de carbohidratos ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) a lo largo de 18 días a partir de la densidad celular, **(B)** Los valores máximos de producción de carbohidratos ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) empleado distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono al medio de cultivo: N1 + C1 [$\diamond$]; N1 + C2 [$\square$]; N1 + C3 [$\triangle$]; N2 + C1 [$\times$]; N2 + C2 [$*$]; N2 + C3 [$\circ$]; N3 + C1 [$+$]; N3 + C2 [$-$]; N3 + C3 [$-$]; N4 + C1 [$\diamond$]; N4 + C2 [$\square$]; N4 + C3 [$\triangle$]. Las líneas verticales presentes en cada punto representan la desviación estándar con respecto a la media.

En la Figura 5 se observa la evolución de la concentración de clorofila producida por *Scenedesmus* sp. en diferentes cultivos. En la Figura 5A, la curva de producción de clorofila muestra que en los primeros días la concentración de clorofila es baja y aumenta gradualmente hasta alcanzar su máxima concentración hasta el día 16. Los cultivos con menor concentración de clorofila fueron aquellos cultivos suplementados con 0 y 1.25 g/L de NaNO_3 , mientras que los cultivos con mayor concentración fueron los suplementados con 2.5 y 5 g/L de NaNO_3 . Estos incrementos de clorofila están relacionados con la fase exponencial o logarítmica del crecimiento celular (Figura 2), indicando que a una mayor concentración de NaNO_3 incrementa la producción de clorofila. Además, todos los tratamientos alcanzaron su máxima concentración de clorofila como se observa en la Tabla 5, donde la máxima concentración fue en el tratamiento N4 + C2, alcanzando 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 16, disminuyendo significativamente en el día 18, indicando el ingreso a la fase estacionaria. Este efecto se debe a la limitación de nutrientes como el nitrógeno y la acumulación de metabolitos secundarios, el cual pueden inhibir la síntesis de clorofila (Krishnan *et al.*, 2015).

Estudios previos han demostrado que la concentración de nitrógeno está vinculada con el incremento en la concentración de clorofila en los cultivos de *Scenedesmus* sp. Por ejemplo, Ferreira *et al.* (2016) observaron que en cultivos sin nitrógeno la cantidad de clorofila en *S. dimorphus* disminuyó un 77-53

% a diferencia del cultivo inicial. *S. subspicatus*, también presentó una disminución de la concentración de clorofila cuando la concentración de nitrógeno se redujo de 19.6 a 0.8 mg/L (Dean *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que es necesarios suministrar al medio de cultivo una mayor concentración de N para aumentar la producción de clorofila.

Según los resultados, el análisis de varianza ANOVA mostró que la producción de clorofila del aislamiento *Scenedesmus* sp. depende de la concentración de la concentración de NaNO₃ como de la fuente de carbono suministrada al medio ($p < 0.05$). La prueba de Tukey presentó cuatro niveles de significancia para las diferentes concentraciones de NaNO₃ (Tabla 6), mientras que las fuentes de carbono mostraron dos grupos de significancia, donde los tratamientos autótrofos y mixotróficos (EG) pertenecen al mismo nivel ($p < 0.05$).

En la Figura 5B se representa los valores máximos de clorofila por cada tratamiento. Los tratamientos suplementados con 5 g/L de NaNO₃ presentaron una mayor acumulación de clorofila en comparación con los cultivos suplementados con 0 y 1.25 g/L de NaNO₃. La máxima concentración de clorofila se observó en el cultivo mixotrófico (EG) con 11 µg/mL, mientras que el cultivo mixotrófico (NaOAc) suplementado con 0 g/L presentó 0.2 µg/mL, lo que significa que el cultivo mixotrófico (EG) produjo 55 veces más clorofila que el cultivo mixotrófico (NaOAc) sin NaNO₃. Este estudio muestra claramente la relación entre la concentración de NaNO₃ y la producción de clorofila, ya que los cultivos a mayor concentración presentaron una mayor producción de clorofila. Según Humphrey (1980), la baja concentración de clorofila en los medios de cultivo se debe a la ausencia o disminución de N, ya que los átomos de nitrógeno son esenciales para la clorofila, que está formada por 4 grupos pirrol que forma un anillo alrededor de un átomo de magnesio, estabilizado por 4 átomos de nitrógeno.

3.1.5. Evaluación de la cantidad de carotenoides contenidos en la biomasa de *Scenedesmus* sp.

Las microalgas generan una variedad de compuestos beneficiosos para la salud, como los carotenoides. Estos pigmentos presentan actividades antioxidantes y colorantes únicos, y su producción puede aumentar cuando las microalgas están en condiciones de estrés. Se encuentran en los cloroplastos de las microalgas y pueden utilizarse en distintas industrias como colorantes (Novoveská *et al.*, 2019; Onay & Aladag, 2023). Los carotenoides se pueden clasificar en primarios, relacionados con la fotosíntesis y secundarios, que se acumulan en condiciones de estrés (Ren *et al.*, 2021).

Se evaluó la concentración de carotenoides en la biomasa de *Scenedesmus* sp. cultivado en medios suplementados con diferentes concentraciones de NaNO₃ (0, 1.25, 2.5 y 5) g/L y fuentes de carbono inorgánico y orgánico. La cuantificación de los carotenoides se realizó mediante el uso de disolventes orgánicos, con muestreo cada dos días, como se muestra en la Figura 6, para determinar la concentración máxima de carotenoides.

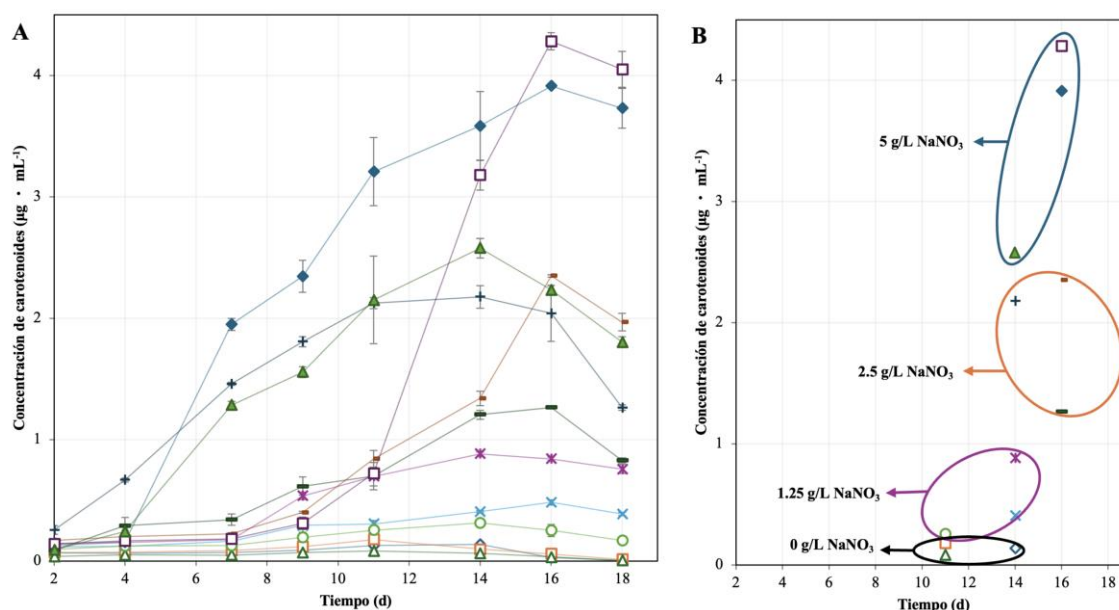


Figura 6. Curva de la concentración de carotenoides producidos a partir del aislamiento *Scenedesmus* sp.

La gráfica representa: **(A)** La producción de carotenoides ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) a lo largo de 18 días a partir de la densidad celular, **(B)** Los valores máximos de producción de carotenoides ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) empleado distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono al medio de cultivo: N1 + C1 [$\diamond$]; N1 + C2 [$\square$]; N1 + C3 [$\triangle$]; N2 + C1 [$\times$]; N2 + C2 [$\ast$]; N2 + C3 [$\circ$]; N3 + C1 [$+$]; N3 + C2 [$-$]; N3 + C3 [$-$]; N4 + C1 [$\diamond$]; N4 + C2 [$\square$]; N4 + C3 [$\triangle$]. Las líneas verticales presentes en cada punto representan la desviación estándar con respecto a la media.

En la Figura 6 se presenta la concentración de carotenoides durante el tiempo de evaluación de 18 días. Se observó una baja producción de carotenoides en el día 2, pero con el pasando del tiempo, presento una mayor acumulación a partir del día 11. Los cultivos con baja concentración de NaNO_3 generaron una baja producción de carotenoides, a diferencia de los cultivos suplementados con 2.5 y 5 g/L de NaNO_3 . Durante la producción de carotenoides se observó que en el mismo día se alcanzó la concentración máxima de clorofila (Figura 5). Según **Jin et al. (2006)**, los cloroplastos de las algas verdes que pertenece a la clase *Chlorophyceae* sintetizan clorofila a y b, y carotenoides primarios como luteína, neoxantina, anteraxantina, β -caroteno y zeaxantina. Por ende, los carotenoides producidos por *Scenedesmus* sp., pueden estar relacionados con los carotenoides primarios.

Los carotenoides primarios crecen en condiciones fisiológicas normales como temperatura, intensidad de luz y fuentes nutricionales. Estas moléculas son componentes esenciales del aparato fotosintético, tanto funcional como estructural, por lo que estos pigmentos son cruciales para la supervivencia (**Novoveská et al., 2019**). Estudios realizados por **Rajput et al. (2022)** observaron que a una mayor adición de nitrógeno (KNO_3) al medio de *S. quadricauda* aumentó el contenido de carotenoides 1.25 y

1.5 veces más, en comparación con bajas concentraciones de KNO₃, identificando los carotenoides producidos como luteína, astaxantina, β -caroteno y cataxantina. Otros estudios realizados por **Coulombier et al. (2020)** determinaron que la acumulación de clorofilas y carotenoides aumentaban junto con el crecimiento celular exponencial y empezó a disminuir cuando se limitó el nitrógeno en el medio de cultivo.

En los tratamientos con mayor adición de NaNO₃, la concentración de carotenoides comenzó a disminuir a partir del día 18 (Figura 6B). El tratamiento N4 + C2 presentó una mayor producción de carotenoides en el estado exponencial (día 16) y al día 18 presentó una disminución de 39.53 % en estado estacionario. En contraste, en los estudios de **Přibyl et al. (2016)**, *Scenedesmus* sp. en el estado exponencial produjo luteína, violaxantina y β -caroteno, con un total de 59.8, 22.1 y 18.1 % respectivamente, mientras que en el estado estacionario estos disminuyeron un 34.6, 7.4 y 5.4 %.

De acuerdo con los datos obtenidos, el análisis ANOVA, presentó que la cantidad de carotenoides producidos en la biomasa del aislamiento *Scenedesmus* sp. depende de la concentración de NaNO₃ suplementado al medio, con un nivel de significancia estadística ($p < 0.05$). La prueba de Tukey identificó tres niveles de significancia para la concentración de NaNO₃ (Tabla 6) perteneciendo al mismo grupo los tratamientos suplementados con 0 y 1.25 g/L de NaNO₃, mientras que las diferentes fuentes de carbono presentaron dos grupos de significancia, donde los tratamientos CO₂ y EG pertenecen al mismo nivel ($p < 0.05$).

El contenido de nitrógeno no es uniforme para todas las especies de microalgas, ya que algunas pueden aumentar su producción de carotenoides como respuestas al estrés, mientras que otras especies pueden aumentar su producción de carotenoides a una mayor concentración de nitrógeno. Existen diferentes fuentes de nitrógeno y concentraciones que juegan un papel crucial sobre las microalgas. En el estudio de **Erdoğan et al. (2024)**, se utilizó nitrato en los cultivos de *S. obliquus* para determinar la acumulación de luteína, y al suplementar el medio con NaNO₃, la cantidad de luteína aumentó de un 5.25 a 11.08 mg/g. Tomando en cuenta estos resultados, se puede determinar que el nitrógeno es fundamental para las vías metabólicas de las microalgas, incluidas las biosíntesis de los carotenoides.

Tabla 5. Promedio de producción máxima de metabolitos primarios y secundarios por *Scenedesmus* sp. empleando diferentes concentraciones de NaNO₃ y fuente de carbono.

Tratamiento	Producción máxima (µg/mL)			
	Proteína	Carbohidratos	Clorofila	Carotenoides
N1 + C1	2.5	179.0	0.3	0.1
	(7)	(14)	(11)	(14)
N1 + C2	2.7	188.7	0.4	0.2
	(7)	(14)	(11)	(11)

Tratamiento	Producción máxima (µg/mL)			
	Proteína	Carbohidratos	Clorofila	Carotenoides
N1 + C3	2.0 (7)	167.1 (16)	0.2 (9)	0.1 (11)
N2 + C1	3.4 (7)	925.9 (16)	2.2 (11)	0.5 (16)
N2 + C2	3.65 (9)	1011.0 (16)	2.2 (9)	0.9 (14)
N2 + C3	3.05 (11)	563.8 (18)	1.3 (14)	0.3 (14)
N3 + C1	4.1 (16)	1065.4 (18)	5.3 (14)	2.2 (14)
N3 + C2	5.43 (16)	1111.6 (18)	5.8 (16)	2.3 (16)
N3 + C3	3.7 (16)	954.9 (18)	3.9 (14)	1.3 (16)
N4 + C1	6.9 (14)	1182.1 (18)	10.5 (16)	3.9 (16)
N4 + C2	7.0 (14)	1182.3 (16)	11 (16)	4.3 (16)
N4 + C3	5.5 (11)	1097.8 (16)	9 (14)	2.6 (18)

Nota: Entre paréntesis se indica el tiempo de cultivo al cual se observó la mayor producción de cada metabolito. Cabe mencionar que cada tratamiento presentó una cinética distinta, con picos máximos de producción en diferentes estados de cultivo.

Tabla 6. Intervalos de producción máxima de metabolitos primarios y secundarios por *Scenedesmus* sp. empleando diferentes concentraciones de NaNO_3 y fuente de carbono.

Tratamiento	Producción máxima (µg/mL)			
	Proteína	Carbohidratos	Clorofila	Carotenoides
N1 + C1	$2.53 \pm 2.47^{\text{AX}}$ (7)	$176.19 \pm 181.75^{\text{AX}}$ (14)	$0.29 \pm 0.29^{\text{AX}}$ (11)	$0.14 \pm 0.14^{\text{AX}}$ (14)
N1 + C2	$2.94 \pm 2.52^{\text{AY}}$ (7)	$192.38 \pm 184.92^{\text{AX}}$ (14)	$0.39 \pm 0.31^{\text{AX}}$ (11)	$0.19 \pm 0.16^{\text{AX}}$ (11)
N1 + C3	$1.93 \pm 1.98^{\text{AZ}}$ (7)	$169.52 \pm 164.60^{\text{AY}}$ (16)	$0.19 \pm 0.18^{\text{AY}}$ (9)	$0.08 \pm 0.09^{\text{AY}}$ (11)

Tratamiento	Producción máxima (µg/mL)			
	Proteína	Carbohidratos	Clorofila	Carotenoides
N2 + C1	3.44 ± 3.40 ^{BX} (7)	921.43 ± 930.32 ^{BX} (16)	2.35 ± 2.05 ^{BX} (11)	0.50 ± 0.47 ^{AX} (16)
N2 + C2	3.69 ± 3.61 ^{BY} (9)	1017.6 ± 1004.3 ^{BX} (16)	2.24 ± 2.17 ^{BX} (9)	0.90 ± 0.87 ^{AX} (14)
N2 + C3	2.99 ± 3.12 ^{BZ} (11)	582.86 ± 544.76 ^{BY} (18)	1.34 ± 1.28 ^{BY} (14)	0.33 ± 0.30 ^{AY} (14)
N3 + C1	4.17 ± 3.95 ^{CX} (16)	1083.2 ± 1047.6 ^{CX} (18)	5.28 ± 5.26 ^{CX} (14)	2.24 ± 2.11 ^{CX} (14)
N3 + C2	5.72 ± 5.14 ^{CY} (16)	1130.2 ± 1093.0 ^{CX} (18)	5.70 ± 5.94 ^{CX} (16)	2.36 ± 2.34 ^{CX} (16)
N3 + C3	3.88 ± 3.50 ^{CZ} (16)	945.71 ± 964.13 ^{CY} (18)	3.80 ± 3.91 ^{CY} (14)	1.26 ± 1.27 ^{CY} (16)
N4 + C1	6.97 ± 6.81 ^{DX} (14)	1166.4 ± 1197.8 ^{CX} (18)	10.69 ± 10.40 ^{DX} (16)	3.91 ± 3.92 ^{DX} (16)
N4 + C2	7.29 ± 6.71 ^{DY} (14)	1188.1 ± 1168.4 ^{CX} (16)	11.0 ± 10.9 ^{DX} (16)	4.23 ± 4.33 ^{DX} (16)
N4 + C3	5.45 ± 5.49 ^{DZ} (11)	1085.6 ± 1110.0 ^{CY} (16)	9.09 ± 8.91 ^{DY} (14)	2.63 ± 2.52 ^{DY} (18)

Nota: Entre paréntesis se indica el tiempo de cultivo al cual se observó la mayor producción de cada metabolito debido a que cada tratamiento presentó una cinética distinta. Los superíndices ubicados en la parte superior derecha (A, B, C, D) indican los niveles de significancia para la concentración de nitrógeno, mientras que, (X, Y, Z) indican los niveles de significancia para la fuente de carbono, según la prueba de Tukey.

3.1.6. Análisis morfológico mediante microscopía

El crecimiento de las microalgas depende de principales nutrientes como la concentración carbono, que puede presentarse de forma orgánica e inorgánica, la intensidad de la luz, el pH, la temperatura y nutrientes como el fósforo (P) y el nitrógeno (N) (Çakirsoy *et al.*, 2022). Se observó la morfología del aislamiento *Scenedesmus* sp. a diferentes concentraciones de NaNO₃ (0, 1.25, 2.5 y 5) g/L y a distintas fuentes de carbono (CO₂, EG y NaOAc), presento variaciones significativas en el tamaño y la agrupación celular. Los tratamientos suplementados con 1.25, 2.5 y 5 g/L de NaNO₃ y 2.5 g/L de EG, mostraron un aumento en el tamaño celular y tendencia a la agrupación. Esto puede deberse a varios factores relacionados con la fisiología y el metabolismo de las microalgas.

El análisis morfológico mediante microscopia mostró que los cultivos autótrofos y mixotróficos sin suplementar NaNO_3 tuvieron un crecimiento similar a lo largo del ensayo. La morfología de las células no varió y durante todo el ensayo presentaron una forma circular. Además, el tamaño de las células fue menor en comparación con los tratamientos suplementados con 1.25, 2.5 y 5 g/L. Según **Baroni et al. (2019)**, la privación de nitrógeno en los medios de cultivo disminuye la velocidad de sedimentación y la disminución del tamaño de las células, provocando una disminución en la densidad celular durante el ensayo. Es por ello que los cultivos no suplementados con nitrógeno no presentaron cambios en el tamaño de la célula hasta el final de la evaluación, ya que el nitrógeno es un macronutriente esencial para el crecimiento y la producción de metabolitos en las microalgas (**Liu et al., 2022**).

Por otro lado, los cultivos suplementados con NaNO_3 presentaron un mayor tamaño celular. El incremento celular se observó desde el día 2 hasta aproximadamente el día 11, debido a las concentraciones de nitrógeno, que ayudan al crecimiento de las microalgas generando también un aumento en sus células. Sin embargo, a partir del día 14, las células comenzaron a disminuir su tamaño debido a la limitación de nutrientes como el nitrógeno. Las altas concentraciones de nitrógeno pueden generar cambios en la estructura y el engrosamiento de la pared celular, además de la acumulación de metabolitos que producen las microalgas (**Yaakob et al., 2021**). Esto contrasta con los estudios de **Pancha et al. (2014)**, que mostraron que la limitación de nitrógeno en las células de *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 disminuyó el ancho de la célula de 3.36 a 2.44 μm y cambio su morfología unicelular a cenobios de 2 y 4 células con espinas en las células terminales. Por otro lado, el estrés nutricional también es otro factor que puede influir en la infraestructura de las células y su tamaño. **Yan et al. (2021)**, determinaron que, a mayores concentraciones de nitrógeno, el área y volumen de *S. obliquus* aumentó entre un 46.5 y 56.9 % hasta el día 5, pero a bajas concentraciones disminuyó entre un 21.7 y 26 %. Los resultados de este estudio muestran que los cambios morfológicos pueden ser significativos a la limitación de nitrógeno y fosforo.

La combinación del nitrógeno y las fuentes de carbono también influyen en el crecimiento y la morfología celular. Como se puede evidenciar en la Figura 7, los tratamientos con EG presentaron un efecto sobre el aumento de tamaño en las microalgas. La interacción de NaNO_3 y EG, en los cultivos mixotróficos puede generar una mayor producción de biomasa y un aumento del tamaño celular (**Ma et al., 2022**). Los tratamientos suplementados con NaNO_3 y EG mostraron una mayor agrupación celular a diferencia de los otros cultivos. Según **Basil et al. (2014)**, la limitación de nutrientes, la intensidad de la luz y el pH puede generar estrés en las células de las microalgas, afecta su morfología y creando agrupamientos celulares. Además, los efectos sobre la morfología y la estructura interna de las microalgas también pueden deberse a compuestos tóxicos, cuya influencia depende de la concentración y el tiempo de exposición (**Machado & Soares, 2024**). Aunque existen pocas investigaciones sobre el uso del EG como fuente de carbono, se sabe que es toxico para los humanos y los animales con una

dosis letal de 1.4 a 1.6 g/kg, lo cual podría causar un agrupamiento celular debido a su toxicidad o concentración en los medios de cultivo de *Scenedesmus* sp. (Kishi *et al.*, 2015).

La morfología de *Scenedesmus* generalmente presenta formas esféricas, en forma de lente u ovaladas. La morfología es un aspecto importante para su identificación y clasificación. En todos los tratamientos se observó que las células de *Scenedesmus* sp., presentaron una forma circular (Figura 7), lo cual podría ayudar a identificar su especie. La forma circular u ovalas de las células es poco común en algunas especies de *Scenedesmus*, lo que sugiere una posible inclinación hacia *S. obliquus* (Figura 1C), ya que es conocida por presentar células en forma ovalada o circular, el cual coincide con las observaciones morfológicas de este estudio (Figueroa *et al.*, 2019).

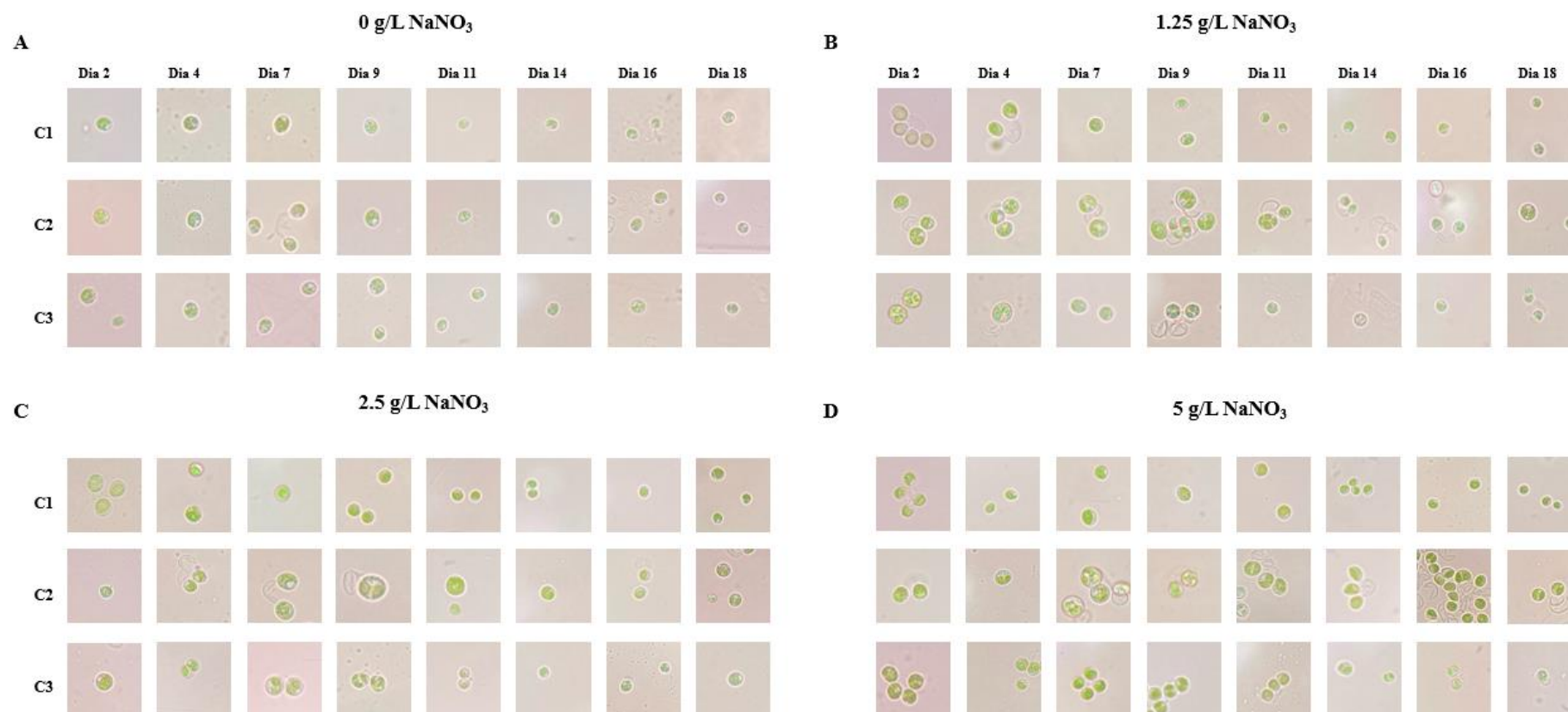


Figura 7. Morfología celular del aislamiento de *Scenedesmus* sp. a lo largo de su fase de crecimiento vista desde un microscopio binocular (100x).

Se representa la morfología de cada tratamiento aplicando distintas concentraciones de NaNO_3 (0, 1.25, 2.5 y 5 g/L), además de las diferentes fuentes de carbono: (C1) CO_2 , (C2) CO_2 +EG, (C3) CO_2 +NaOAc. Las fotografías corresponden a los días 2,5,8,12 y 16 del cultivo.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- En este estudio se ha demostrado que el aislamiento de *Scenedesmus* sp. representa un enfoque prometedor para la producción de proteínas, carbohidratos, clorofila y carotenoides, utilizando diferentes fuentes de carbono y distintas concentraciones de NaNO_3 . Los resultados obtenidos bajo las condiciones de cultivo autótrofo y mixotrófico indican un crecimiento significativo tanto en la densidad celular como el contenido de los metabolitos.
- La cinética de crecimiento del aislamiento de *Scenedesmus* sp. mostró comportamientos diferentes dependiendo de la concentración de NaNO_3 en el medio. Los cultivos mixotróficos con EG y 5 g/L de NaNO_3 presentaron un aumento significativo en la densidad celular ($70 \pm 68.4 \times 10^6$ células/mL), mientras que en los cultivos en ausencia de NaNO_3 + NaOAc, la densidad celular se mantuvo constante con un incremento de $8.1 \pm 9.4 \times 10^6$ células/mL. Además, los cultivos con 2.5 y 5 g/L de NaNO_3 exhibieron un crecimiento sostenible, evitando la fase de declive celular, en contraste con las concentraciones bajas de 0 y 1.25 g/L de NaNO_3 que condujeron a una rápida transición a la fase de muerte, debido a la limitación de nutrientes.
- Se evaluó la producción de proteínas en *Scenedesmus* sp., destacando el impacto significativo de las concentraciones de nitrógeno (NaNO_3) y las fuentes de carbono. Las concentraciones más altas de proteínas se obtuvieron del cultivo mixotrófico suplementado con EG y altas concentraciones de NaNO_3 (5 g/L) generando una acumulación de 7 $\mu\text{g/mL}$, lo cual representa 3.5 veces más que el cultivo sin NaNO_3 y con NaOAc. Demostrándose, la importancia del nitrógeno y su influencia en la síntesis proteína.
- Al igual que en el caso de producción de proteínas, la concentración de carbohidrato también se ve está influenciada por las fuentes de carbono y las concentraciones de nitrógeno, especialmente durante la fase estacionaria. Los cultivos que mostraron mayores concentraciones son los autótrofos (CO_2) y mixotrófico (EG) suplementados con 2.5 y 5 g/L de NaNO_3 respectivamente, a diferencia de los cultivos con bajas concentraciones de NaNO_3 . Por otro lado, los cultivo mixotrófico (NaOAc) sin NaNO_3 presentaron una menor acumulación, 167.1 $\mu\text{g/mL}$ en el día 16. Estos resultados obtenidos sugieren que altas concentraciones de NaNO_3 favorece la acumulación de carbohidratos. Además, se observó que la fuente de carbono orgánico (EG) exhibe una mayor eficiencia en comparación con el NaOAc.
- En el caso de la producción de pigmentos naturales como clorofila y carotenoides en *Scenedesmus* sp., estos están estrechamente ligados con las diferentes concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo (NaNO_3). La elección de la fuente de carbono es crucial para la producción de clorofila, como en el caso del EG. Se observó que la mayor concentración de NaNO_3 (5 g/L) favoreció la acumulación de estos pigmentos; por ejemplo, la clorofila alcanzó

una concentración de 11 µg/mL y carotenoides mostraron valores de 4.3 µg/mL en el día 16. En contraste, los cultivos con menor concentración de clorofila y carotenoide fueron de 0.2 y 0.1 µg/mL, respectivamente. En este estudio resalta la elección correcta de la fuente de carbono y la adición adecuada de nitrógeno para favorecer la producción de clorofila.

- Los cambios morfológicos de las microalgas, como *Scenedesmus* sp., estuvo influenciada por las variaciones en las concentraciones de NaNO₃ y las fuentes de carbono (CO₂, EG y NAOAc). Los tratamientos con mayor concentración de NaNO₃ y EG presentaron un aumento en el tamaño celular y una mayor agrupación hasta el día 11 del ensayo. Sin embargo, la limitación de nutrientes pudo influenciar sobre la disminución del tamaño de las células, observadas a partir del día 14 en los cultivos con NaNO₃. Además, se determinó que la forma predominante de la célula en todos los tratamientos fue ovalada o circular, el cual podría servir para la identificación taxonómica de la especie.

4.2. Recomendaciones

- Optimizar el medio de cultivo hacia la producción de metabolitos de interés como los carbohidratos y clorofila
- Identificar la especie específica de *Scenedesmus* sp. mediante análisis moleculares

BIBLIOGRAFÍA

- Agirman, N., & Cetin, A. (2017). Effect of nitrogen limitation on growth, total lipid accumulation and protein amount in *Scenedesmus acutus* as biofuel reactor candidate. *Natural Science and Discovery*. <https://doi.org/10.20863/nsd.322614>
- Agovino, M., Casaccia, M., Ciommi, M., Ferrara, M., & Marchesano, K. (2019). Agriculture, climate change and sustainability: The case of EU-28. *Ecological Indicators*, 105. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.064>
- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021). Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. In *Toxics* (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/toxics9030042>
- Amorim, M. L., Soares, J., Vieira, B. B., Batista-Silva, W., & Martins, M. A. (2020). Extraction of proteins from the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 followed by lipid extraction of the wet deproteinized biomass using hexane and ethyl acetate. *Bioresource Technology*, 307. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123190>
- Andreeva, A., Budenkova, E., Babich, O., Sukhikh, S., Ulrikh, E., Ivanova, S., Prosekov, A., & Dolganyuk, V. (2021). Production, purification, and study of the amino acid composition of microalgae proteins. *Molecules*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092767>
- Arias, D. M., Ortíz, E., Okoye, P. U., Rodríguez, H., Balbuena Ortega, A., Longoria, A., Domínguez, R., & Sebastian, P. J. (2021). A review on cyanobacteria cultivation for carbohydrate-based biofuels: Cultivation aspects, polysaccharides accumulation strategies, and biofuels production scenarios. In *Science of the Total Environment* (Vol. 794). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148636>
- Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M. C., & Ahmed, Z. (2013). Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource Technology*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.159>
- Barone, G. D., Cernava, T., Ullmann, J., Liu, J., Lio, E., Germann, A. T., Nakielski, A., Russo, D. A., Chavkin, T., Knufmann, K., Tripodi, F., Coccetti, P., Secundo, F., Fu, P., Pflieger, B., Axmann, I. M., & Lindblad, P. (2023). Recent developments in the production and utilization of photosynthetic microorganisms for food applications. In *Heliyon* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14708>
- Baroni, É. G., Yap, K. Y., Webley, P. A., Scales, P. J., & Martin, G. J. O. (2019). The effect of nitrogen depletion on the cell size, shape, density and gravitational settling of *Nannochloropsis salina*, *Chlorella* sp. (marine) and *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 39. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101454>

- Barros, A., Rangseekeaw, P., Lasudee, K., Pathom, W., & Manzanera, M. (2021). Impacts of agriculture on the environment and soil microbial biodiversity. In *Plants* (Vol. 10, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/plants10112325>
- Basil, G., Imran, P., Chahana, D., Kaumeel, C., Chetan, P., Tonmoy, G., & Sandhya, M. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* - A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology*, 171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086>
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. In *Biotechnology Advances* (Vol. 25, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Bermejo, E., Filali, R., & Taidi, B. (2021). Microalgae culture quality indicators: a review. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 41, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1854672>
- Bhola, V., Desikan, R., Santosh, S. K., Subburamu, K., Sanniyasi, E., & Bux, F. (2011). Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(3). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.11.006>
- Bialevich, V., Zachleder, V., & Bišová, K. (2022). The Effect of variable light source and light intensity on the growth of three algal species. *Cells*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/cells11081293>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Carbohydrates. *Medical Biochemistry*, 73–97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00004-5>
- Çakirsoy, I., Miyamoto, T., & Ohtake, N. (2022). Physiology of microalgae and their application to sustainable agriculture: A mini-review. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1005991>
- Castillo, T., Ramos, D., García, T., Brito, M., & Galindo, E. (2021). Mixotrophic cultivation of microalgae: An alternative to produce high-value metabolites. In *Biochemical Engineering Journal* (Vol. 176). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108183>
- Chacón, T. L., & González, G. E. (2010). Microalgae for “Healthy” Foods-Possibilities and Challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6). <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00132.x>
- Chaturvedi, S., & Gupta, P. (2021). Plant secondary metabolites for preferential targeting among various stressors of metabolic syndrome. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 71). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91095-8.00012-X>
- Chen, F., & Johns, M. R. (1996). Heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate in chemostat culture. *Process Biochemistry*, 31(6). [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(96\)00006-4](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(96)00006-4)

- Chen, Y., Michalak, M., & Agellon, L. B. (2018). Importance of nutrients and nutrient metabolism on human health. In *Yale Journal of Biology and Medicine* (Vol. 91, Issue 2).
- Cheng, J., Fan, W., & Zheng, L. (2021). Development of a mixotrophic cultivation strategy for simultaneous improvement of biomass and photosynthetic efficiency in freshwater microalga *Scenedesmus obliquus* by adding appropriate concentration of sodium acetate. *Biochemical Engineering Journal*, 176. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108177>
- Christaki, E., Florou, P., & Bonos, E. (2011). Microalgae: A novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(8). <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.582460>
- Çoban, A., Kendirlioğlu Şimşek, G., & Kadri, A. (2021). Effect of nitrogen source on growth and protein and lipid amounts of a freshwater microalga *Scenedesmus acutus*. *Turkish Journal of Science & Technology Research Paper*, 16(2).
- Cointet, E., Wielgosz, G., Bougaran, G., Rabesaotra, V., Gonçalves, O., & Méléder, V. (2019). Effects of light and nitrogen availability on photosynthetic efficiency and fatty acid content of three original benthic diatom strains. *PLoS ONE*, 14(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0224701>
- Comité de Seguridad Alimentaria. (2018). La nutrición y los sistemas alimentarios. *Informe Del Grupo de Alto Nivel de Expertos En Seguridad Alimentaria y Nutrición Del Comité de Seguridad Alimentaria Mundial, Roma*.
- Coulombier, N., Nicolau, E., Le Déan, L., Barthelemy, V., Schreiber, N., Brun, P., Lebouvier, N., & Jauffrais, T. (2020). Effects of nitrogen availability on the antioxidant activity and carotenoid content of the microalgae *Nephroselmis* sp. *Marine Drugs*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/md18090453>
- da Silva Ferreira, V., & Sant'Anna, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 33, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2181-6>
- de Farias, C. E., & Sforza, E. (2016). Carbohydrate productivity in continuous reactor under nitrogen limitation: Effect of light and residence time on nutrient uptake in *Chlorella vulgaris*. *Process Biochemistry*, 51(12). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.015>
- Dean, A. P., Sigee, D. C., Estrada, B., & Pittman, J. K. (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 101(12). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.065>

- Degrenne, B., Pruvost, J., Christophe, G., Cornet, J. F., Cogne, G., & Legrand, J. (2010). Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19). <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.02.067>
- Deutz, N. E. P., Bruins, M. J., & Soeters, P. B. (1998). Infusion of soy and casein protein meals affects interorgan amino acid metabolism and urea kinetics differently in pigs. *Journal of Nutrition*, 128(12). <https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2435>
- Di Salvo, E., Lo Vecchio, G., De Pasquale, R., De Maria, L., Tardugno, R., Vadalà, R., & Cicero, N. (2023). Natural pigments production and their application in food, Health and Other Industries. In *Nutrients* (Vol. 15, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/nu15081923>
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., & Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/biom10081153>
- Erdoğan, A., Karataş, A. B., Demir, D., Demirel, Z., Aktürk, M., Çopur, Ö., Çağır, A., & Conk-Dalay, M. (2024). Comprehensive analysis of lutein and luteoxanthin in *Scenedesmus obliquus*: From Quantification to Isolation. *Molecules*, 29(6). <https://doi.org/10.3390/molecules29061228>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2023). The state of food security and nutrition in the world 2023. In *The State of Food Security and Nutrition in the World 2023*. <https://doi.org/10.4060/cc3017en>
- FAO. (2017). El Futuro de la Alimentación y la Agricultura Tendencias y Desafíos; Versión Resumida. *Organizacion de Las Naciones Unidas Para La Alimentacion y La Agricultura*.
- Ferreira de Oliveira, A. P., & Bragotto, A. P. A. (2022). Microalgae-based products: Food and public health. *Future Foods*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100157>
- Ferreira, V. S., Pinto, R. F., & Sant'Anna, C. (2016). Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of Applied Microbiology*, 120(3). <https://doi.org/10.1111/jam.13007>
- Figuerola, G., Bermejo, E., Pittman, J., & Constantinos, T. (2020). *Microalgae strain catalogue*. Enhance MicroAlgae. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.3780067>
- Figuerola, G., Bermejo, E., & Theodoropoulos, C. (2019). A strain selection guide for microalgae users: Cultivation and chemical characteristics for high added-value products. *Microalgae Strain Catalogue*.

- González, M., Fernando, D., & Gentili, F. G. (2023). Morphological and cellular organization of green microalgae to cope with cold stress in subarctic environment. *Algal Research*, 75. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103254>
- Goswami, R. K., Mehariya, S., Karthikeyan, O. P., & Verma, P. (2022). Influence of carbon sources on biomass and biomolecule accumulation in *Picochlorum* sp. cultured under the mixotrophic condition. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph19063674>
- Guerriero, G., Berni, R., Muñoz, J. A., Apone, F., Abdel, E. M., Qahtan, A. A., Alatar, A. A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J. F., Siddiqui, K. S., Hernández, S. M. T., & Faisal, M. (2018). Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. In *Genes* (Vol. 9, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/genes9060309>
- Gupta, V. K., & Rodriguez, S. (2017). New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: *Penicillium* system properties and applications. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Penicillium System Properties and Applications*. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-00305-X>
- Hasler, C. M. (2002). The cardiovascular effects of soy products. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 16(4). <https://doi.org/10.1097/00005082-200207000-00006>
- Henriques, M., Silva, a, & Rocha, J. (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.
- Hlaing, S. A. A., Sadiq, M. B., & Anal, A. K. (2020). Enhanced yield of *Scenedesmus obliquus* biomacromolecules through medium optimization and development of microalgae based functional chocolate. *Journal of Food Science and Technology*, 57(3). <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04144-3>
- Holesh, J. E., Aslam, S., & Martin, A. (2022). Physiology, Carbohydrates. In *StatPearls*.
- Humphrey, A. M. (1980). Chlorophyll. *Food Chemistry*, 5(1), 57–67. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(80\)90064-3](https://doi.org/10.1016/0308-8146(80)90064-3)
- Jin, E., Lee, C. G., & Polle, J. E. W. (2006). Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (chlorophyceae): Biosynthesis, regulation, and biotechnology. In *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 16, Issue 6).
- Kim, Y. J. (2015). New records of genus *Scenedesmus* (Chlorophyceae) found in Korea. *Journal of Ecology and Environment*, 38(2). <https://doi.org/10.5141/ecoenv.2015.022>

- Kishi, M., Kawai, M., & Toda, T. (2015). Heterotrophic utilization of ethylene glycol and propylene glycol by *Chlorella protothecoides*. *Algal Research*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.020>
- Korozi, E., Kefalogianni, I., Tzagou, V., Chatzipavlidis, I., Markou, G., & Karnaouri, A. (2023). Evaluation of growth and production of high-value-added metabolites in *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* grown on crude glycerol under heterotrophic and mixotrophic conditions using monochromatic light-emitting diodes (LEDs). *Foods*, 12(16). <https://doi.org/10.3390/foods12163068>
- Kothari, R., Pandey, A., Ahmad, S., Kumar, A., Pathak, V. V., & Tyagi, V. V. (2017). Microalgal cultivation for value-added products: a critical enviro-economical assessment. In 3 *Biotech* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0812-8>
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D. T., & Show, P. L. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. In *Food Science and Human Wellness* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>
- Krishnan, V., Uemura, Y., Thanh, N. T., Khalid, N. A., Osman, N., & Mansor, N. (2015). Three types of Marine microalgae and *Nannochloropsis oculata* cultivation for potential source of biomass production. *Journal of Physics: Conference Series*, 622(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/622/1/012034>
- Kusmayadi, A., Leong, Y. K., Yen, H. W., Huang, C. Y., & Chang, J. S. (2021). Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans – Biotechnological and environmental aspects. *Chemosphere*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129800>
- Lee, S. K., Lur, H. S., & Liu, C. Te. (2021). From lab to farm: Elucidating the beneficial roles of photosynthetic bacteria in sustainable agriculture. In *Microorganisms* (Vol. 9, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122453>
- Li, X., Li, W., Zhai, J., Wei, H., & Wang, Q. (2019). Effect of ammonium nitrogen on microalgal growth, biochemical composition and photosynthetic performance in mixotrophic cultivation. *Bioresource Technology*, 273. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.042>
- Liu, T., Chen, Z., Xiao, Y., Yuan, M., Zhou, C., Liu, G., Fang, J., & Yang, B. (2022). Biochemical and morphological changes triggered by nitrogen stress in the oleaginous microalga *Chlorella vulgaris*. *Microorganisms*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030566>
- López, X., Taramuel, A., Arboleda, C., & Segura, F. (2017). Comparison of methods using sulfuric acid for determination of total sugars. In *Rev. Cubana Quím* (Vol. 29, Issue 2).

- Lourenço, S. O., Barbarino, E., Lavín, P. L., Lanfer Marquez, U. M., & Aida, E. (2004). Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *European Journal of Phycology*, 39(1). <https://doi.org/10.1080/0967026032000157156>
- Luz Marina, Z., Mariana, J.-V., Patricia Andrea, Z., Agustina Beatriz, F., Carolina Ayelén, Z., & Guillermina, C. (2020). Effect of light stress and concentrations of nitrogen and carbon in the production of phytonutrients in the microalga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). *J. Algal Biomass Utiln*, 2020(1).
- Ma, X., Mi, Y., Zhao, C., & Wei, Q. (2022). A comprehensive review on carbon source effect of microalgae lipid accumulation for biofuel production. In *Science of the Total Environment* (Vol. 806). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151387>
- Ma, Y., Zhou, W., Chen, P., Urriola, P. E., Shurson, G. C., Ruan, R., & Chen, C. (2019). Metabolomic evaluation of *Scenedesmus* sp. as a feed ingredient revealed dose-dependent effects on redox balance, intermediary and microbial metabolism in a mouse model. *Nutrients*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/nu11091971>
- Machado, M. D., & Soares, E. V. (2024). Features of the microalga *Raphidocelis subcapitata*: physiology and applications. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 108, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13038-0>
- Manning, S. R. (2022). Microalgal lipids: biochemistry and biotechnology. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 74). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.10.018>
- Manzoor, M., Ahmad, Q. ul A., Aslam, A., Jabeen, F., Rasul, A., Schenk, P. M., & Qazi, J. I. (2020). Mixotrophic cultivation of *Scenedesmus dimorphus* in sugarcane bagasse hydrolysate. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 39(2). <https://doi.org/10.1002/ep.13334>
- Milledge, J. J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9214-7>
- Morales, M., Sánchez, L., & Revah, S. (2018). The impact of environmental factors on carbon dioxide fixation by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*, 365(3). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx262>
- Mosunova, O., Navarro, J. C., & Collemare, J. (2021). The biosynthesis of fungal secondary metabolites: From fundamentals to Biotechnological applications. In *Encyclopedia of Mycology: Volume 1,2* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21072-8>

- Naik, B., Mishra, R., Kumar, V., Mishra, S., Gupta, U., Rustagi, S., Gupta, A. K., Preet, M. S., Bhatt, S. C., & Rizwanuddin, S. (2024). Micro-algae: Revolutionizing food production for a healthy and sustainable future. *Journal of Agriculture and Food Research*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100939>
- Noreen, A., Mahmood, S., Aziz, I., Takriff, M. S., Gulzar, S., Ditta, A., Khalid, A., & Mahmood, T. (2021). Microalgae as potential protein sources: Evidence from protein extraction and amino acid profiling of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 58(3). <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/21.511>
- Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V., & Sassi, J. F. (2019). Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. In *Marine Drugs* (Vol. 17, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/md17110640>
- Oladipo, A., Enwemiwe, V., Ejeromedoghene, O., Adebayo, A., Ogunyemi, O., & Fu, F. (2022). Production and functionalities of specialized metabolites from different organic sources. *Metabolites*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/metabo12060534>
- Olasehinde, T. A., Olaniran, A. O., Okoh, A. I., & Koulen, P. (2017). Therapeutic potentials of microalgae in the treatment of Alzheimer's disease. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/molecules22030480>
- Onay, M., & Aladag, E. (2023). Production and use of *Scenedesmus acuminatus* biomass in synthetic municipal wastewater for integrated biorefineries. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(6). <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23332-x>
- ONU. (2022). World Population Prospects 2022, Online Edition. *Department of Economic and Social Affairs, Population Division*.
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Healthy Diet Who. In *World Health Organization* (Issue September).
- Pahalvi, H. N., Rafiya, L., Rashid, S., Nisar, B., & Kamili, A. N. (2021). Chemical fertilizers and their impact on soil health. In *Microbiota and Biofertilizers, Vol 2: Ecofriendly Tools for Reclamation of Degraded Soil Environs*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4_1
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>

- Patel, A. K., Choi, Y. Y., & Sim, S. J. (2020). Emerging prospects of mixotrophic microalgae: Way forward to sustainable bioprocess for environmental remediation and cost-effective biofuels. In *Bioresource Technology* (Vol. 300). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122741>
- Pathak, V. M., Verma, V. K., Rawat, B. S., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., Dewali, S., Yadav, M., Kumari, R., Singh, S., Mohapatra, A., Pandey, V., Rana, N., & Cunill, J. M. (2022). Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>
- Poore, J., & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360(6392). <https://doi.org/10.1126/science.aag0216>
- Přibyl, P., Pilný, J., Cepák, V., & Kaštánek, P. (2016). The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp. *Algal Research*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.028>
- Rahut, D. B., Aryal, J. P., Manchanda, N., & Sonobe, T. (2021). Expectations for household food security in the coming decades: A global scenario. In *Future Foods: Global Trends, Opportunities, and Sustainability Challenges*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91001-9.00002-5>
- Rajput, A., Singh, D. P., Khattar, J. S., Swatch, G. K., & Singh, Y. (2022). Evaluation of growth and carotenoid production by a green microalga *Scenedesmus quadricauda* PUMCC 4.1.40. under optimized culture conditions. *Journal of Basic Microbiology*, 62(9). <https://doi.org/10.1002/jobm.202100285>
- Ren, Y., Sun, H., Deng, J., Huang, J., & Chen, F. (2021). Carotenoid production from microalgae: Biosynthesis, salinity responses and novel biotechnologies. In *Marine Drugs* (Vol. 19, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/md19120713>
- Richmond, A. (2004). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology/edited by Amos Richmond. *Orton.Catie.Ac.Cr.*
- Samkhaniyani, F., Najafpour, G. D., & Ardestani, F. (2017). Evaluation of effective nutritional parameters for *Scenedesmus* sp. microalgae culturing in a photobioreactor for biodiesel production. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(5). <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1212-z>
- Schweiggert, U., Eisner, P., Bader, S., & Osen, R. (2020). Food proteins from plants and fungi. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 32). <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.08.003>

- Shahid, A., Khan, F., Ahmad, N., Farooq, M., & Mehmood, M. A. (2020). Microalgal carbohydrates and proteins: Synthesis, extraction, applications, and challenges. In *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_14
- Shamala, T. R., Drawert, F., & Leupold, G. (1982). Studies on *Scenedesmus acutus* growth II. Effect of autotrophic and mixotrophic growth on the amino acid and the carbohydrate composition of *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24(6). <https://doi.org/10.1002/bit.260240606>
- Silva, D. L. B., de Moraes, L. B. S., Oliveira, C. Y. B., da Silva Campos, C. V. F., Bezerra, R. de S., & Gálvez, A. O. (2022). Influence of culture medium on growth and protein production by *Haematococcus pluvialis*. *Acta Scientiarum - Technology*, 44. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v44i1.59590>
- Singh, H., Varanasi, J. L., Banerjee, S., & Das, D. (2019). Production of carbohydrate enrich microalgal biomass as a bioenergy feedstock. *Energy*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.116039>
- Smetana, S., Ristic, D., Pleissner, D., Tuomisto, H. L., Parniakov, O., & Heinz, V. (2023). Meat substitutes: Resource demands and environmental footprints. In *Resources, Conservation and Recycling* (Vol. 190). <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106831>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., & de Haan, C. (2006). Livestock's long shadow: Environmental issues and options. *Renewable Resources Journal*, 24(4).
- Sun, H., Wang, Y., He, Y., Liu, B., Mou, H., Chen, F., & Yang, S. (2023). Microalgae-Derived Pigments for the Food Industry. In *Marine Drugs* (Vol. 21, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/md21020082>
- Tan, J. Sen, Lee, S. Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, S. H., & Show, P. L. (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, 11(1). <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626>
- Tokusoglu, O., & Unal, K. (2003). Fat Replacers in Meat Products. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(3). <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.196.203>
- Tominaga, K., Hongo, N., Karato, M., & Yamashita, E. (2012). Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. *Acta Biochimica Polonica*, 59(1). https://doi.org/10.18388/abp.2012_2168

- Ursu, A. V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., & Michaud, P. (2014). Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.071>
- Van Krimpen, M. M., Bikker, P., Van Der Meer, I. M., van der Peet-Schwering, C. M. C., & Vereijken, J. M. (2013). Cultivation, processing and nutritional aspects for pigs and poultry of European protein sources as alternatives for imported soybean products. *Wageningen UR Livestock Research*, February.
- Venil, C. (2009). An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. *Electronic Journal of ...*, 5(3).
- Venn, B. J. (2020). Macronutrients and human health for the 21st century. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/nu12082363>
- Vieira, B. B., Soares, J., Amorim, M. L., Bittencourt, P. V. Q., de Cássia Superbi, R., de Oliveira, E. B., dos Reis Coimbra, J. S., & Martins, M. A. (2021). Optimized extraction of neutral carbohydrates, crude lipids and photosynthetic pigments from the wet biomass of the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. *Separation and Purification Technology*, 269. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118711>
- Vinitha, V., Meignanalakshmi, S., Tirumurugan, K. G., Sarathchandra, G., & Meenakshi Sundaram, S. (2023). Enhanced lipid production and analysis of properties of biodiesel produced from freshwater microalgae *Scenedesmus obtusus* ON089666.1. *Bioresource Technology Reports*, 21. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101286>
- Wallace, J. S. (2000). Increasing agricultural water use efficiency to meet future food production. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 82(1–3). [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00220-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00220-6)
- Wang, J., Sommerfeld, M. R., Lu, C., & Hu, Q. (2013). Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyta*) in outdoor cultivation. *Algae*, 28(2). <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.2.193>
- Wang, Y., Tibbetts, S. M., & McGinn, P. J. (2021). Microalgae as sources of high-quality protein for human food and protein supplements. In *Foods* (Vol. 10, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/foods10123002>
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Ravishankar, G. A., & Ambati, R. R. (2021). Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview. In *Cells* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/cells10020393>

- Yan, P., Guo, J. song, Zhang, P., Xiao, Y., Li, Z., Zhang, S. qing, Zhang, Y. xin, & He, S. xuan. (2021). The role of morphological changes in algae adaptation to nutrient stress at the single-cell level. *Science of the Total Environment*, 754. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142076>
- Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.103>
- Yirgu, Z., Leta, S., Hussien, A., & Khan, M. M. (2020). Nutrient removal and carbohydrate production potential of indigenous *Scenedesmus* sp. grown in anaerobically digested brewery wastewater. *Environmental Systems Research*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40068-020-00201-5>
- Yu, X., Ye, X., Hu, C., Xu, N., & Sun, X. (2022). Sodium acetate can promote the growth and astaxanthin accumulation in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* as revealed by a proteomics approach. *Journal of Oceanology and Limnology*, 40(5). <https://doi.org/10.1007/s00343-021-1271-y>
- Zhu, L., Li, S., Hu, T., Nugroho, Y. K., Yin, Z., Hu, D., Chu, R., Mo, F., Liu, C., & Hiltunen, E. (2019). Effects of nitrogen source heterogeneity on nutrient removal and biodiesel production of mono- and mix-cultured microalgae. *Energy Conversion and Management*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112144>
- Zuo, Z., Zhu, Y., Bai, Y., & Wang, Y. (2012). Acetic acid-induced programmed cell death and release of volatile organic compounds in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.11.003>

ANEXOS

Anexo A. Análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey

Tabla 7. Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaNO_3 y fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la densidad celular

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
NaNO_3	3	10581.420	3527.140	107.46	< 0.001
Fuente de carbono	2	481.278	240.639	7.33	0.005
Error	18	590.803	32.822		
Total	24	45855			

Tabla 8. Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de NaNO_3 en el medio de cultivo sobre la densidad celular

Concentraciones de NaNO_3	N	Media	Agrupación
0 g/L	6	8.60000	A
1.25 g/L	6	29.4333	B
2.5 g/L	6	48.0333	C
5 g/L	6	64.9333	D

Tabla 9. Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la densidad celular

Fuente de carbono	N	Media	Agrupación
CO_2	8	39.6750	X
$\text{CO}_2 + \text{EG}$	8	42.0125	X
$\text{CO}_2 + \text{NaOAc}$	8	31.5625	Y

Tabla 10. Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaNO_3 y fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de proteínas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
NaNO_3	3	54.271	18.090	394.625	0.000
Fuente de carbono	2	5.431	2.715	59.231	0.000
Error	12	0.550	0.046		
Total	24	476.259			

Tabla 11. Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de NaNO_3 en el medio de cultivo sobre la producción de proteínas

Concentraciones de NaNO_3	N	Media	Agrupación
0 g/L	6	2.3950	A
1.25 g/L	6	3.3750	B
2.5 g/L	6	4.3933	C
5 g/L	6	6.4533	D

Tabla 12. Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de proteínas

Fuente de carbono	N	Media	Agrupación
CO_2	8	4.2175	X
$\text{CO}_2 + \text{EG}$	8	4.7025	Y
$\text{CO}_2 + \text{NaOAc}$	8	3.5425	Z

Tabla 13. Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaNO_3 y fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de carbohidratos

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
NaNO_3	3	3429764.875	1143254.958	165.604	< 0.001
Fuente de carbono	2	140089.138	70044.569	10.146	0.001
Error	18	124264.011	6903.556		
Total	24	19135264.916			

Tabla 14. Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de NaNO_3 en el medio de cultivo sobre la producción de carbohidratos

Concentraciones de NaNO_3	N	Media	Agrupación
0 g/L	6	178.2267	A
1.25 g/L	6	833.5467	B
2.5 g/L	6	1043.9683	C
5 g/L	6	1152.7000	C

Tabla 15. Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de carbohidratos

Fuente de carbono	N	Media	Agrupación
CO ₂	8	838.0762	X
CO ₂ + EG	8	872.3625	X
CO ₂ + NaOAc	8	695.8925	Y

Tabla 16. Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaNO₃ y fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de clorofila

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
NaNO ₃	3	340.724	113.575	764.304	< 0.001
Fuente de carbono	2	6.911	3.456	23.254	< 0.001
Error	18	2.675	0.149		
Total	24	800.665			

Tabla 17. Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de NaNO₃ en el medio de cultivo sobre la producción de clorofila

Concentraciones de NaNO ₃	N	Media	Agrupación
0 g/L	6	0.2765	A
1.25 g/L	6	1.9042	B
2.5 g/L	6	4.9817	C
5 g/L	6	10.1650	D

Tabla 18. Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de clorofila

Fuente de carbono	N	Media	Agrupación
CO ₂	8	4.5759	X
CO ₂ + EG	8	4.8321	X
CO ₂ + NaOAc	8	3.5875	Y

Tabla 19. *Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaNO₃ y fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de carotenoides*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
NaNO ₃	3	43.738	14.579	146.568	< 0.001
Fuente de carbono	2	3.163	1.582	15.900	< 0.001
Error	18	1.790	0.099		
Total	24	106.631			

Tabla 20. *Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de NaNO₃ en el medio de cultivo sobre la producción de carotenoides*

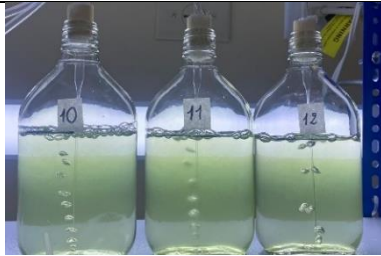
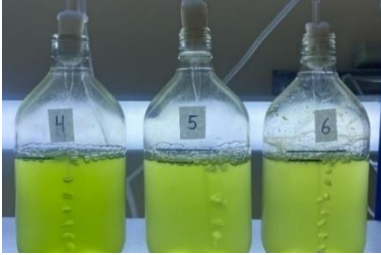
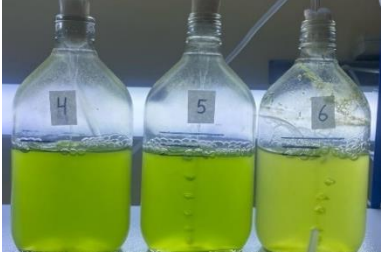
Concentraciones de NaNO ₃	N	Media	Agrupación
0 g/L	6	0.2765	A
1.25 g/L	6	1.9042	A
2.5 g/L	6	4.9817	C
5 g/L	6	10.1650	D

Tabla 21. *Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la producción de carotenoides*

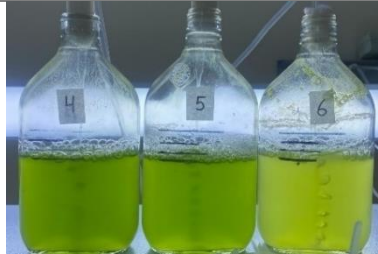
Fuente de carbono	N	Media	Agrupación
CO ₂	8	1.6788	X
CO ₂ + EG	8	1.9225	X
CO ₂ + NaOAc	8	1.0600	Y

Anexo A. Evaluación de la generación de biomasa de *Scenedesmus* sp.

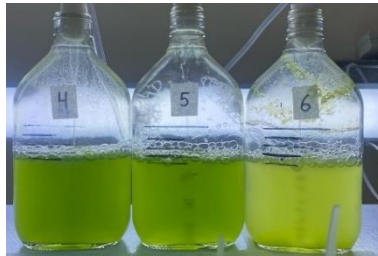
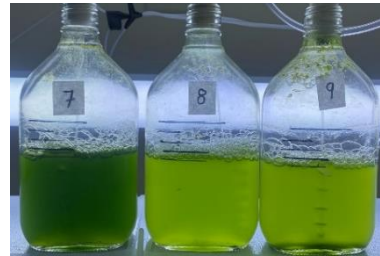
Tabla 22. Cultivo de *Scenedesmus* sp. durante el periodo de evaluación empleando diferentes concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono

Tiempo de cultivo	0 g/L NaNO ₃	1.25 g/L NaNO ₃	2.5 g/L NaNO ₃	5 g/L NaNO ₃
0				
2				
4				

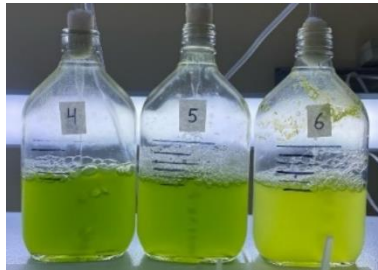
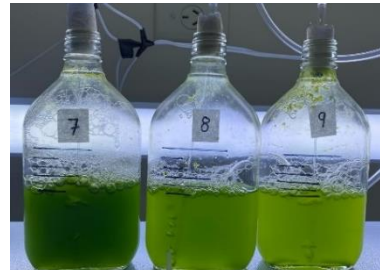
7



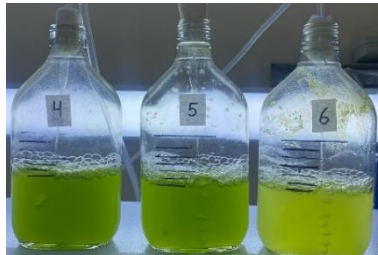
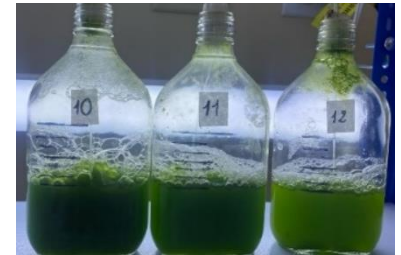
9



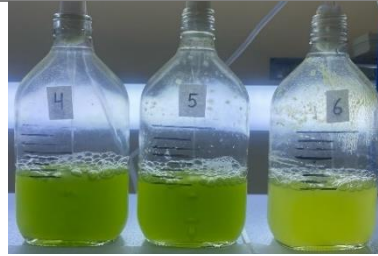
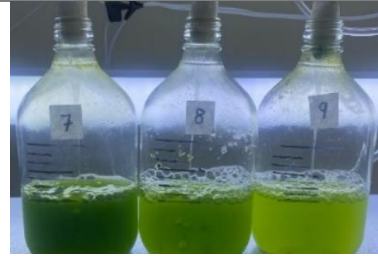
11



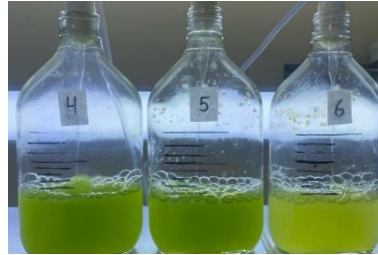
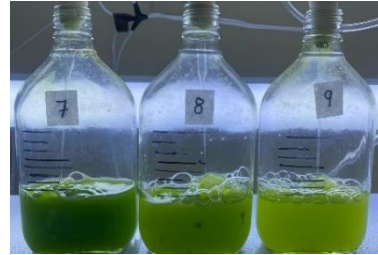
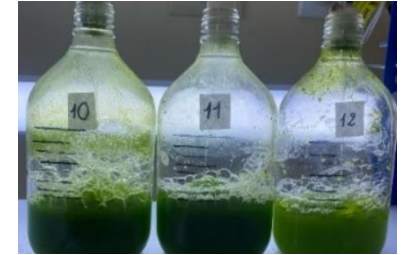
14



16



18



Nota: Los números de cada botella representa la fuente de carbono: 1 [CO_2]; 2 [$\text{CO}_2 + \text{EG}$]; 3 [$\text{CO}_2 + \text{NaOAc}$]; 4 [CO_2]; 5 [$\text{CO}_2 + \text{EG}$]; 6 [$\text{CO}_2 + \text{NaOAc}$]; 7 [CO_2]; 8 [$\text{CO}_2 + \text{EG}$]; 9 [$\text{CO}_2 + \text{NaOAc}$]; 10 [CO_2]; 11 [$\text{CO}_2 + \text{EG}$]; 12 [$\text{CO}_2 + \text{NaOAc}$].