

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE
Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Desarrollo tecnológico y generación de riqueza sustentable

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)
Programa para mejoramiento de la calidad, productividad y logística



ITESO
Universidad Jesuita
de Guadalajara

**4F04 Mejoramiento de la calidad, productividad y logística en la industria
regional**

**Mejora y escalamiento de la producción de ácidos grasos poliinsaturados
utilizando *Phaeodactylum tricornutum***

PRESENTAN

Ing. en Biotecnología. Paulo Adrián Covarrubias Herrera

Profesores PAP: Francisco Javier Villanueva Villanueva, Jorge Luis Chimal
Figueroa

Tlaquepaque, Jalisco, noviembre de 2018

ÍNDICE

REPORTE PAP	3
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	3
Resumen	3
1. Introducción.....	4
1.1. Objetivos	4
1.2. Justificación.....	4
1.3. Antecedentes	5
1.4. Contexto	7
2. Desarrollo	10
2.1. Sustento teórico y metodológico	10
2.2. Planeación y seguimiento del proyecto	14
3. Resultados del trabajo profesional.....	34
3.1. Primer experimento	34
3.1.1. Análisis del diseño de experimentos factorial completo	34
3.1.1. Análisis de diseño de experimentos factorial utilizando solo nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.	36
3.1.2. Curva de crecimiento.....	38
3.1.3. Intervalo de confianza	40
3.2. Segundo experimento	40
3.2.1. Superficie de respuesta.	40
3.2.2. ANOVA de un solo factor	41
3.2.3. Curva de crecimiento.....	45
3.3. Validación	46
3.3.1. Peso seco	46
3.3.2. Curva de crecimiento.....	47
3.3.3. Diferencias morfológicas.....	49
3.4. Caracterización de Fotobiorreactor(FBR).....	55
3.4.1. Mediciones y volumen	55
3.4.2. Bomba.....	56
3.4.3. Agitación	61

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto	62
4. Conclusiones.....	65
6. Bibliografía.....	66
Anexos	68

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.

A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El objetivo principal de este proyecto fue producir ácidos grasos omega-3 a escala industrial utilizando *Phaeodactylum tricornutum* y junto con este se plantearon otros cinco objetivos específicos, esto fueron generar una mejora en la productividad, escalar el proceso, determinar rendimientos, determinar algunos parámetros cinéticos y del perfil bioquímico de la biomasa (ácidos grasos y proteína) con sus debidos rendimientos y mantener cultivos monoalgales de *Phaeodactylum tricornutum*. En el primer experimento de mejora de medio de cultivo se logró una mejora de 48% en la tasa de crecimiento con respecto al control, en un segundo experimento para optimización de medio de cultivo se determinó las mejores concentraciones de Cloruro de Sodio y Bicarbonato de sodio, 15g/L y 1g/L respectivamente, con estas dos mejoras en conjunto se obtuvo un rendimiento de biomasa de 0.096 g/L Día para el medio optimizado en cultivos de 2L. También se caracterizó el fotobiorreactor horizontal(FBRH), de este se obtuvieron mediciones de longitud y flujos, estos se utilizaron para calcular volúmenes y otros parámetros importantes (velocidad de flujo, tiempo de retención y número de Reynolds). No se cumplió en su totalidad los objetivos planteados

al inicio del proyecto, por distintas situaciones que surgieron durante el desarrollo, entre estos la muerte en repetidas ocasiones de algunos cultivos, equipo con fallos y también por la aparición de otras actividades dentro de la empresa, pero se plantea que es necesario determinar el rendimiento de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) a escala laboratorio para iniciar el cultivo en el fotobiorreactor horizontal (FBRH) de 1.3 m³ y optimizar otros parámetros de esta escala.

1. Introducción

1.1. Objetivos

- Producir ácidos grasos poliinsaturados a escala industrial utilizando *Phaeodactylum tricornutum*.
- Generar una mejora en la producción de biomasa y ácidos grasos poliinsaturados.
- Escalar el proceso desde laboratorio a escala industrial.
- Determinar rendimientos ($g/(Día\ m^3)$) en las distintas escalas.
- Determinar algunos parámetros del perfil bioquímico de la biomasa (Ácidos grasos, proteína) con sus debidos rendimientos.
- Mantener cultivos monoalgales de *Phaeodactylum tricornutum*.

1.2. Justificación

El convenio de diversidad biológica de las naciones unidas que fue firmado define biotecnología como cualquier aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos o derivados de ellos para crear o modificar un producto o proceso, estas aplicaciones suelen ser llamadas bioprocesos, este convenio se firmó en 1992, entro en vigor en 1993 y sigue vigente a la fecha (UN, 1992).

Se calcula que en el 2016 el mercado mundial de omega 3 y ácidos grasos poliinsaturados tuvo un valor 2.04 miles de millones de dólares, y se estima que el número crecerá en los siguientes años por la tendencia a ser agregado en otros productos y el aumento en la demanda de alimentos funcionales, actualmente hay una gran variedad de productos que

se enriquecen con omega 3, desde leche de fórmula hasta alimento para mascotas o ganado (Sin autor¹, 2018).

La mayoría de los extractos con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados se extraen de aceite de pescado, lo que representa un problema para un sector de mercado que tiene una alta necesidad de estos, las personas con una dieta con un consumo reducido de carne necesitan suplementar estos ácidos grasos de otra forma que no involucre animales, la producción a partir de algas es una potencial solución para este problema, además la producción con algas trae otros beneficios como control de la proporción y pureza de DHA y EPA además de un proceso de separación más sencillo (Spruijt J., 2017). Al tratarse de un proyecto de investigación con un trasfondo innovador el proyecto atrae el interés de distintos organismos gubernamentales como Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECYTJAL) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que brindan apoyos económicos para el desarrollo de esta clase de proyectos.

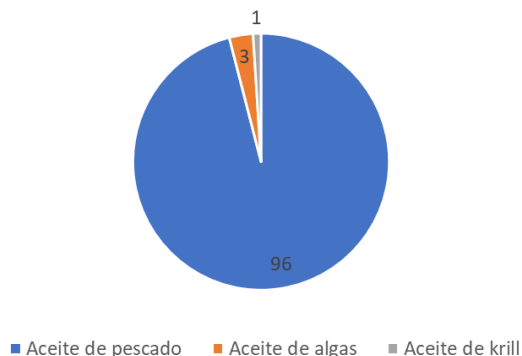
1.3. Antecedentes

Se estima que actualmente en México un 19% de la población tiene una dieta vegetariana, 15% flexitariana y 9% vegana, este sector demográfico se encuentra en constante crecimiento, este tipo de dietas como cualquier otra trae consigo ciertas ventajas y desventajas, algunas de estas desventajas pueden verse disminuidas por la adición de ácidos grasos poliinsaturados a la dieta (Clarys P., 2014), el problema es que actualmente la mayor fuente de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son los pescados de agua fría, 96% del mercado tiene este origen mientras que únicamente el 3% provienen de algas y el 1% de krill (Spruijt J., 2017).

Los PUFAs no solo representan un beneficio para las personas con dieta vegana, debido a que el cuerpo humano no es capaz de producirlos por sí mismo debe consumirlos en su dieta, está comprobado que una dieta con buenos niveles de PUFAs del tipo omega 3 como el eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) ha demostrado tener efectos positivos en la salud, por ejemplo tiene efecto antiinflamatorio, anti trombosis, reducir

presión sanguínea, niveles de triglicéridos, riesgo de diabetes y algunos tipos de cáncer (Ji XJ., 2015).

Fuente de extracto de DHA/EPA en el mercado



En las últimas décadas se ha buscado fuentes alternativas para obtener estos ácidos grasos, distintos organismos unicelulares o plantas han probado tener una eficiencia viable para la producción a nivel industrial. La producción de PUFAs utilizando algas ha avanzado en este periodo, utilizar estas fuentes trae ciertas ventajas como un mayor control de la proporción y pureza de DHA y EPA además de un proceso de separación más sencillo, puede ser más amigable con el medio ambiente al no afectar las poblaciones de peces salvajes (que están disminuyendo) y absorber dióxido de carbono de medio ambiente, y puede ser vendido como un producto vegano/vegetariano. Por otro lado, las fuentes alternativas pueden presentar desventajas como un elevado consumo de energía y dificultad al competir con los precios de las fuentes tradicionales (Spruijt J. 2017).

Actualmente la producción de DHA con estas fuentes alternativas ya se ha llevado a nivel industrial, principalmente utilizando organismos de las familias de Thraustochytriaceae y Cryptocodiniaceae, sin embargo la producción de EPA se mantiene a escala laboratorio, entre los organismos más usado para la producción de EPA se encuentra *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis* y *Nitzschia*, pero unas tasas de crecimiento y de acumulación de biomasa menores a las obtenidas al usar otras fuentes como levaduras o plantas detienen el uso de estos organismos en la industria. En los últimos años se ha alcanzado la producción a nivel industrial por DuPont utilizando la levadura modificada genéticamente *Yarrowia lipolytica*.

Phaeodactylum tricornutum es una cepa que pertenece a los Bacillariophyceae, tiene una alta capacidad para producir EPA, tiene la peculiaridad de presentar pleomorfismo esta característica se refleja en su pared celular que está ligeramente silicificada en comparación a otras diatomeas (Martino S., 2007), además tiene capacidad de producir EPA, puede tener contenido de lípidos hasta 30% de su peso, de estos alrededor del 17% corresponden a EPA (Domergue F., 2003) esto significa alrededor de un 5% de su peso seco corresponde al EPA .



Figura 1 Células de *P. tricornutum*

Fuente: <https://ccy.nioz.nl/Microalgae/CCY0033>

1.4. Contexto

El corporativo OLEOMEX está formado por 16 empresas que abarcan desde el establecimiento y mantenimiento de plantaciones hasta el procesamiento industrial, refinación de aceites y su comercialización con la industria farmacéutica y alimentaria. Microalgas Oleas de México es una división del grupo se estableció en el 2016 y actualmente

cuenta con tres líneas de desarrollo, estas son aceites en polvo (microencapsulados), pigmentos para la industria alimenticia y farmacéutica y bioestimulante para la agroindustria. Dentro de estas líneas de desarrollo se encuentran varios proyectos entre estos resaltan el diseño de:

- Sistema de filtración tangencial escala laboratorio y su próximo escalamiento a nivel piloto.
- Fotobiorreactor tubular vertical (0.4 m³)
- Raceway de cunero (3.6 m³)
- Raceway de capa fina (16 m³)
- Fotobiorreactor tubular horizontal (1.3 m³)
- PEI: Proyecto PEI #253005 "Obtención biotecnológica y microencapsulación de aminoácidos, péptidos y ácidos grasos poliinsaturados y su aplicación en la industria alimentaria"



Figura 2 Logos de empresas del grupo OLEOMEX

Actualmente Microalgas Oleas cuenta con apoyos del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECYTJAL) en la convocatoria del Programa de Desarrollo de

Prototipos(PRODEPRO) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en el Programa de estímulos a la investigación, desarrollo tecnológico e innovación (PEI). El objetivo del PRODEPRO es apoyar proyectos que tienen el objetivo de desarrollar productos nuevos a lo largo de distintas fases de su desarrollo, todo esto con el objetivo final de consolidar sector industrial de Jalisco y posicionar al estado como líder en desarrollo de prototipos, apoyo a proyectos y competitividad a nivel nacional(COECYTJAL, 2018). Por otro lado, el PEI busca fomentar la inversión en proyectos de innovación tecnológica que terminen traduciéndose en oportunidades de negocio.



Figura 3 Logo de grupo OLEOPALMA

El área de ficología de los laboratorios de Microalgas Oleas, que se encuentra en el edificio 3 del parque tecnológico ITESO tiene una colección de 65 organismos diferentes, entre estos uno de los que más problemas ha presentado en su cultivo es *P. Tricornutum*, este llevaba alrededor de un año siendo sembrada en los laboratorios, en los meses anteriores habían tenido problemas para mantener los cultivos de esta, pasaron de tener rendimientos similares a los mostrados por la literatura a tener una cuarta parte de estos o menor y que muchos de los cultivos simplemente no presentaran crecimiento, esta situación en conjunto con el potencial de la cepa para producción de PUFAs y la experiencia de otros empleados con la cepa los llevo a proponer el proyecto.

Microalgas Oleas también cuenta con una planta de producción en el área de chapala, esta está en la carretera Morelia-Guadalajara entre San Cristóbal Zapotitlán y San Luis Soyatlan,

en la figura 4 se muestra un mapa con la ubicación, en esta instalación se cuenta con un laboratorio, un cuarto de producción de inóculos, 5 reactores tipo raceway (2 de ellos en invernadero) de entre 1,000 a 3,000 L, un invernadero para cultivos en bolsa(50 litros), un grupo de fotobiorreactores verticales de 28 litros y un foto biorreactor horizontal(FBRH) de 1,300 litros, el ultimo ultimo se utilizara para este proyecto.

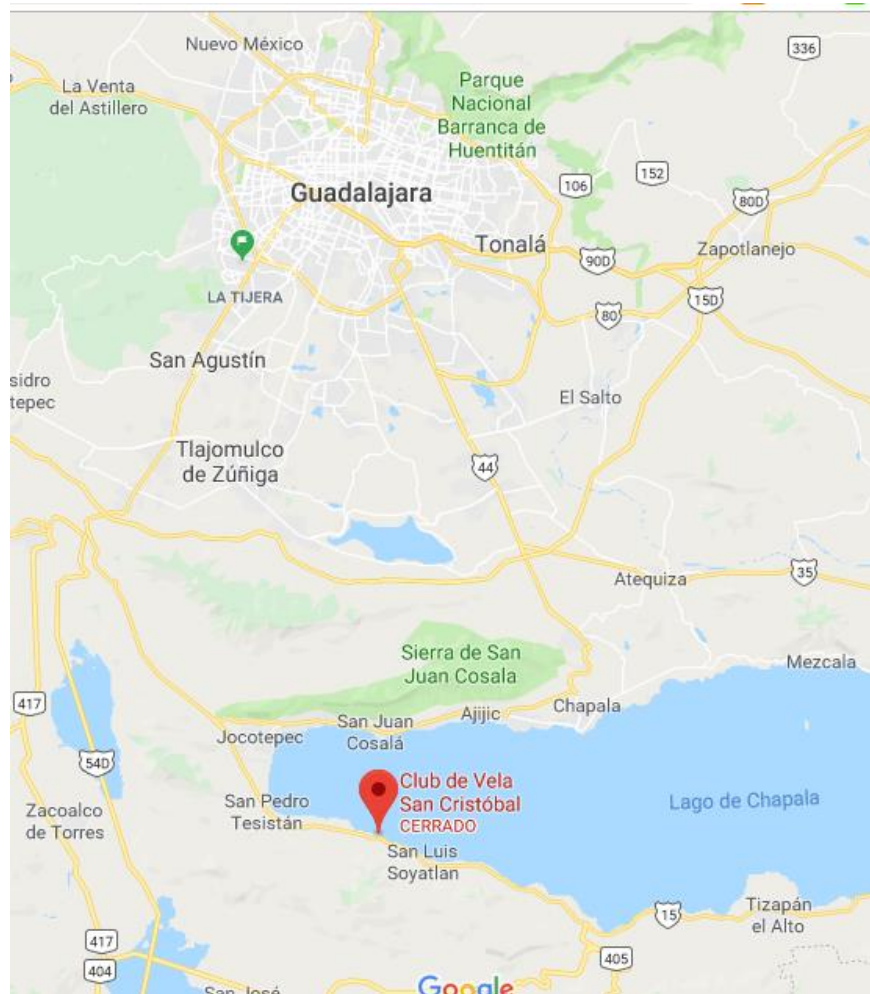


Figura 4 Ubicación de la planta de producción en Tuxcueca

2. Desarrollo

2.1. Sustento teórico y metodológico

El medio de cultivo es donde se da casi todo lo necesario para que el organismo crezca, este puede ser líquido, semisólido o sólido, mantener los organismos dentro de este permite tener una concentración mucha mayor a la que usualmente se encuentran en la naturaleza,

por lo tanto, los medios de cultivo deben ser ricos en nutrientes, mientras que simulan las condiciones preferidas por el organismo. Existen distintos componentes de los medios de cultivo para algas, generalmente se dividen en macronutrientes y micronutrientes, en la mayoría de los casos se agregan otras sales para mantener el nivel de salinidad. Los macronutrientes usualmente son sustancias que forman la mayor parte del organismo y su dieta, estos normalmente son nitrógeno, fosfato, silicatos y carbono, este último puede venir del aire o puede agregarse como por una sal, los micronutrientes son otras sustancias que el organismo necesita, pero en mucha menor medida, usualmente son minerales y vitaminas (Lavens P., 1996). Encontrar el balance en la concentración de los nutrientes es una la parte vital para un bioproceso, cada organismo tiene distintos requerimientos y excederse de determinada concentración puede tener efectos negativos en el crecimiento, existe un punto óptimo para cada uno de los nutrientes y el conjunto de estos en el medio de cultivo, en la siguiente sección se presenta los datos encontrados en la literatura sobre los requerimientos nutricionales para *P. tricornutum*.

Al investigar en la literatura el efecto de la fuente de nitrógeno (118 mmol de N/L) y al no incluir o incluir tris(hidroximetil)aminometano (Tris)(1g/L) en el crecimiento y la producción de ácidos grasos al, se utilizó nitrato de sodio, cloruro de amonio y urea, se observó mayor producción de biomasa al utilizar urea o nitrato como fuente de nitrógeno, aunque la cantidad de ácidos grasos por gramos de biomasa sea mayor en el control y al utilizar amonio, se obtiene mayor cantidad de ácidos grasos por litro de cultivo al utilizar urea o nitrato, se obtuvo mayor producción con urea. Agregar Tris permitió usar amonio como fuente de nitrógeno y aumento la producción de ácido grasos para la urea (W. Yongamanitchai 1991).

En otra investigación por Yongamanitchai se analizó el efecto de la concentración de nitrógeno(Nitrato) en concentraciones entre 0.25 a 1.5 g/L las concentraciones entre 1 y 1.5 g/L presentaron la mayor producción de ácido grasos por litro (W. Yongamanitchai 1991). También se analizó el efecto de la concentración de fosfato en un rango de 0.05 a 0.5 g/L de sales de fosfato(8.9 a 88.9 mg/L de fosfato), el efecto en este rango es poco, pero se observó una mejor producción entre 0.1 y 0.5 g/L. (W. Yongamanitchai 1991). La

concentración de sulfato de magnesio en un rango de 0.5 a 5 g/L no presentó un efecto significativo en la producción de biomasa (W. Yongamanitchai 1991).

En otro texto se encontró que en un rango de 0 a 100 mg/L de silicio se tiene poco efecto en el crecimiento y la producción de ácidos grasos, a concentraciones mayores parece tener un efecto tóxico, Zhao reporta que el silicio no es esencial para el crecimiento, pero ayudo en situaciones de estrés (Zhao P, 2013).

Existen otros factores aparte de los nutrientes que afectan el crecimiento de un organismo, algunos dependen del medio de cultivo (pH, salinidad, etc.) y otros de distintas condiciones ambientales o del reactor (temperatura, intensidad lumínica, configuración del reactor, agitación, etc.), en la siguiente sección se encuentra el resultado de la investigación bibliográfica con respecto a estos factores para *P. tricornutum*.

Yongamanitchai reporta que en las concentraciones de cloruro de sodio desde 0 a 24 g/L, se observó que se disminuye la producción de biomasa y ácido grasos al aumentar la concentración (mayor producción sin cloruro de sodio en el medio) (W. Yongamanitchai 1991). Ying Liang analizó la tasa específica de crecimiento en un rango de 0 a 90 g/L la tasa mayor se encontró en la concentración de 20 g/L (Ying Liang, 2014).

Se report en la literatura que la temperatura recomendada es de 23 °C para el crecimiento de *P. tricornutum*, Yongamanitchai analizó el crecimiento en un rango de 14 a 26 °C, reporta mayor concentración de biomasa y ácidos grasos a 23°C y Monika Bojko reporta que a mayores niveles de oxígeno disuelto que se relaciona con la biomasa producida a los 23°C. Se reporta un mejor crecimiento al tener un pH inicial de 7.6, también se investigó el porcentaje de dióxido de carbono en la aireación en un rango de 1 a 15% V/V, se encontró un mejor crecimiento con 1% de dióxido de carbono (W. Yongamanitchai 1991)

En otra fuente de la literatura se comparó el efecto de distintos reactores con sus diferentes tipos de agitación y aireación (columna de burbuja, *airlift* con tubo concéntrico y *airlift* dividido) se alcanzó mayor concentración de biomasa al alcanzar estado estacionario en el de columna de burbuja (Sanchez A.,2003).

Existe una variedad de estudios que muestran como utilizar microplacas para pruebas de toxicidad e inhibición(Chen M., 2012), las condiciones de cultivo en microplaca será

diferente a las de un biorreactor a grande escala con respecto a parámetros cruciales para el crecimiento por ejemplo el perfil de luz, la agitación y la transferencia de gases, estas son algunas de las causas por las cuales la productividad volumétrica de cultivos de menor escala no puede ser directamente escalada (La productividad volumétrica es uno de los principales factores para determinar la viabilidad de cualquier sistema biológico usado en la industria).

Es necesario conocer la composición del producto en las distintas etapas del desarrollo del producto, en la etapa de laboratorio para asegurarse de que las mejoras obtenidas van en verdad encaminadas a lograr los objetivos propuestos y al tener el proceso a nivel industrial para verificar que el producto obtenido mantiene las mejoras o rendimientos y que en efecto es el producto buscado.

Existen una gran diferencia al cultivar un organismo en el laboratorio y en una planta de producción, dentro de un laboratorio se tiene mayor control sobre las condiciones (limpieza, luz, contaminación), pero los elevados costos no permiten subir en gran medida la escala (Lavens P., 1996), el cambio de reactores con extremo control de condiciones en sistemas cerrados a sistemas de mucha mayor escala en muchos casos abiertos es complicado y presentar bajas en los rendimientos por lo que debe ser acompañado de determinación de factores óptimos para los nuevos sistemas de cultivo (Marques M., 2010). Los modelos estadísticos de diseño de experimentos (DOE) tienen el objetivo de averiguar si algún factor influye en una variable de interés y, si existe influencia de algún factor, cuantificar la influencia, los experimentos realizados deben llevarse a cabo con replicas para poder decir hacer el análisis con certeza (Marin J., S.F.).

2.2. Planeación y seguimiento del proyecto

- Descripción del proyecto

Para mitigar el problema de crecimiento en laboratorio y llevar los cultivos a escala industrial se dividió el proyecto en 5 secciones principales, dos experimentos con medio de cultivo, una etapa de validación de estos experimentos, escalamiento en laboratorio y escalamiento en planta, en la tabla 1 y figura 5 se muestran la fecha de inicio y final de cada una de estas etapas y su duración, se incluyen otras actividades como el mantenimiento de las cepas utilizadas.

Tabla 1- Fecha tentativa de las actividades

Tarea	Fecha de inicio	Fecha final	Duración (Días)
Semana de investigación	13/08/2018	20/08/2018	7
Presentación de proyecto	21/08/2018	22/08/2018	1
Primera mejora	22/08/2018	06/09/2018	15
Segunda mejora	06/09/2018	21/09/2018	15
Validación de la mejora	21/09/2018	01/10/2018	10
Escalamiento en laboratorio	16/09/2018	11/10/2018	25
Escalamiento en planta	11/10/2018	15/11/2018	35
Reporte final	15/11/2018	19/11/2018	4
Presentación final	26/11/2018	30/11/2018	4
Mantenimiento de cultivos en lab	13/08/2018	30/11/2018	109
Aislamiento de cepas	13/08/2018	30/11/2018	109

el crecimiento de los cultivos y su monitoreo en microplaca con pozo de 400 μ L en un ciclo de luz 12-12, se mantuvieron a la par cultivos con el medio F/2 sin modificar como control. El experimento se llevó a cabo del 24/08/18 al 03/09/18

Tabla 2- Puntos para primer experimento

Factor	[Menor]	[Mayor]
PO4	62 μ M	620 μ M
NaCl	10 g/L	20 g/L
Si	20 μ M	80 μ M
Fuente de N	Urea	Nitrato

Tablas 3-Formula de F/2

NaNO ₃	880 μ M
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	36 μ M
Na ² SiO ₃ ·9H ₂ O	106 μ M

Para preparar F/2 también se agrega una solución de metales traza y de vitaminas.

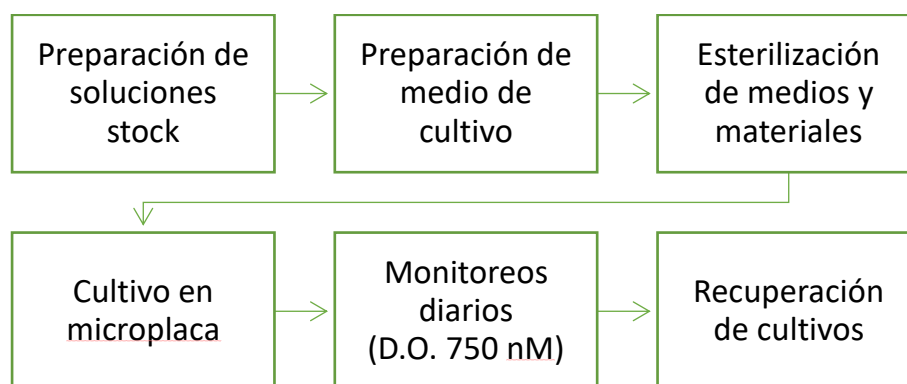


Figura 6 Diagrama de flujo general para primer experimento

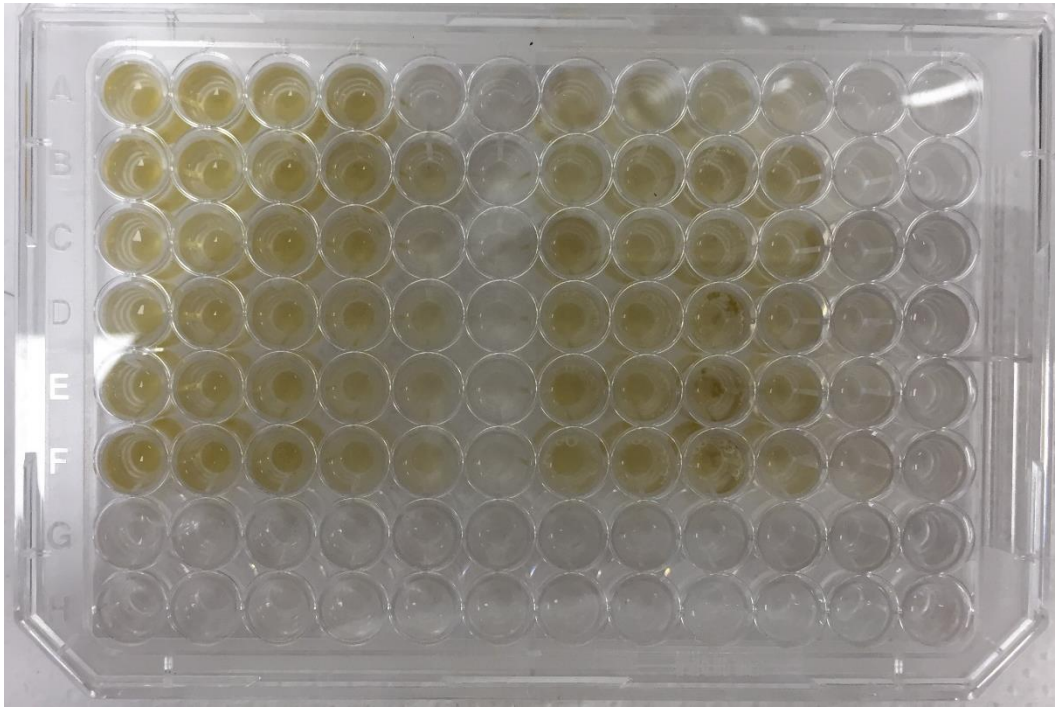


Figura 7 Microplaca con cultivo de *P. tricornutum*

Segundo experimento:

Se hicieron dos superficies de respuesta con la concentración de cloruro de sodio (10 y 15 g/L) y de bicarbonato de sodio (0, 0.5, 1, 2, 4, 8 g/L) utilizando F/2 modificado y la otra con Kaluna como control, cada concentración se hizo por duplicado, el cultivo y monitoreo se hicieron en microplaca con pozo de 400 μ L. Experimento del 06/09/18 al 18/09/18

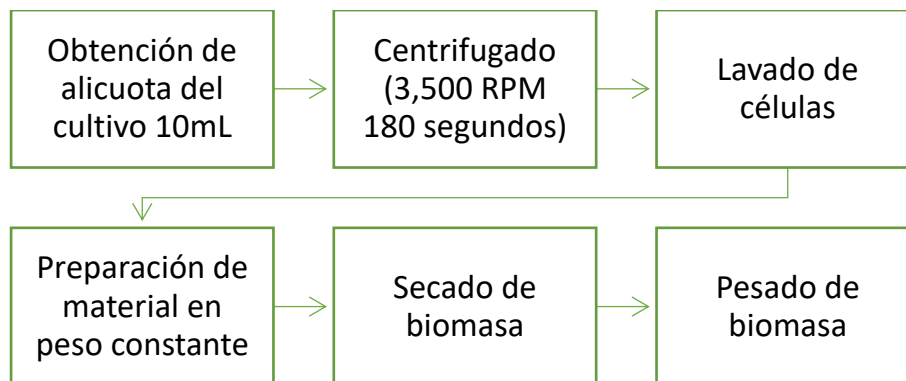


Figura 8 Diagrama de proceso para obtención de peso seco



Figura 9 Cultivo en microplaca de P. tricornutum

Validación/escalamiento en laboratorio

Para la validación se crecieron cultivos con los medios que presentaron mejores resultados en los otros experimentos y además de evaluar la D.O. se midió el peso seco, conteo celular con cámara Neubauer y monitoreo al microscopio. Los cultivos fueron escalando su volumen desde 0.4 mL hasta alcanzar 2000 mL en el laboratorio.

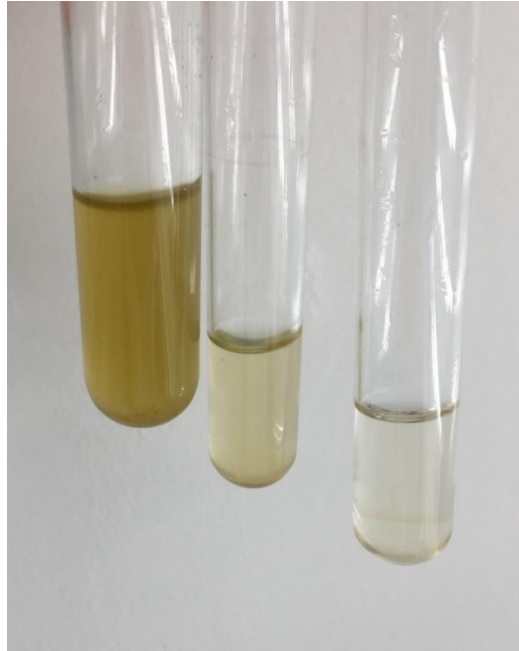


Figura 10 Acercamiento a cultivo de 4 mL

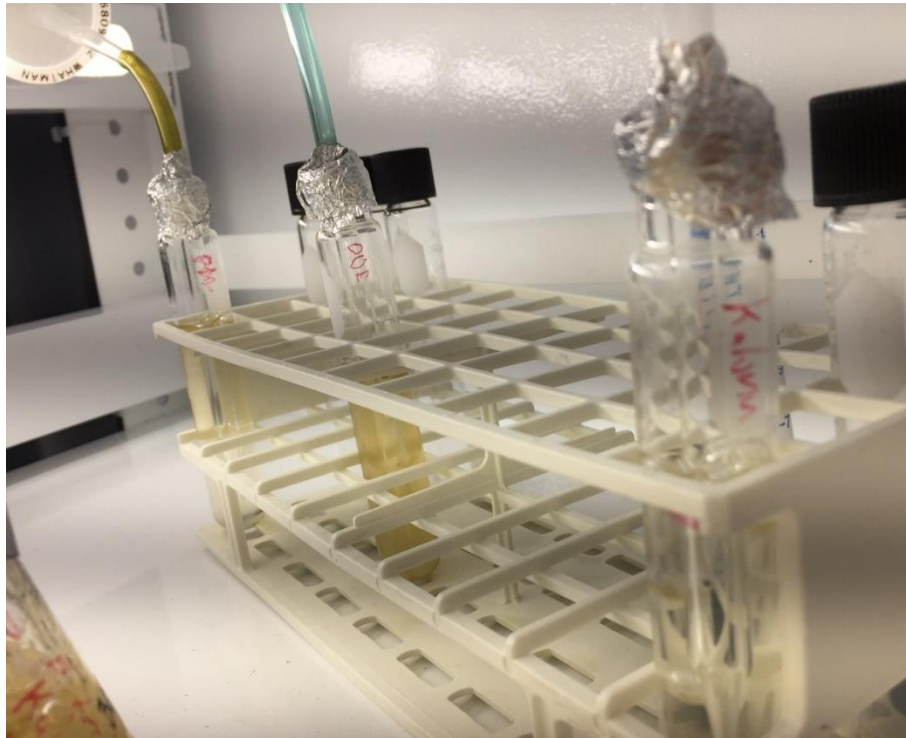


Figura 11 Cultivos de 4mL en aereación

En las figuras 10 y 11 se muestran cultivos de *P. tricornutum* con alrededor de 4 mL, estos se crecieron a partir de la microplaca después de recuperar el cultivo utilizando una pipeta y agregar medio fresco después.



Figura 12 Inoculo para cultivos de 200mL

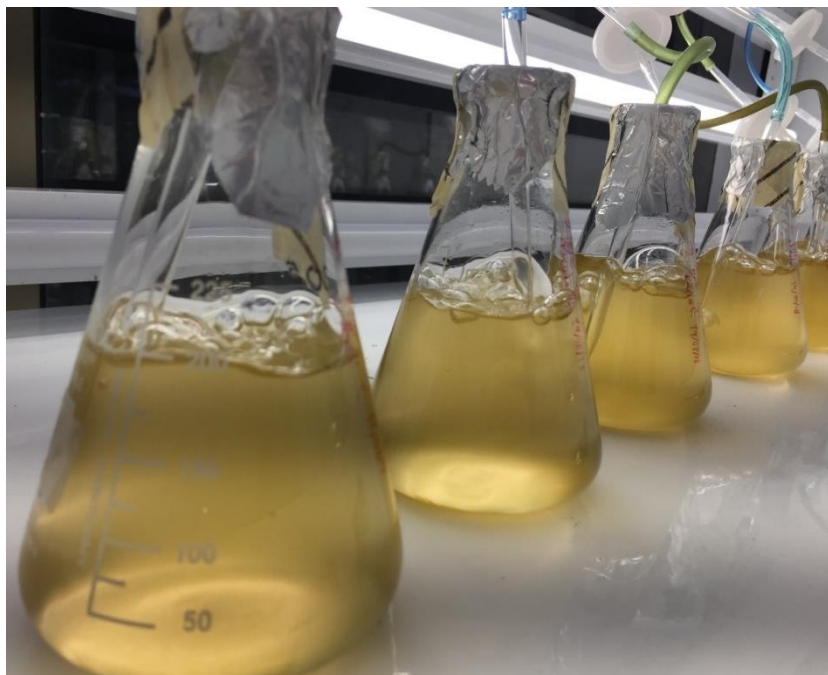


Figura 13 Acercamiento a cultivos de 200 mL

Los cultivos de la figura 12 fueron sobras de otros experimentos del área de ficología, se aprovecharon para pasar cultivos de 200 mL como los de la figura 13, a pesar de esto se siguió escalando los cultivos de menor volumen.

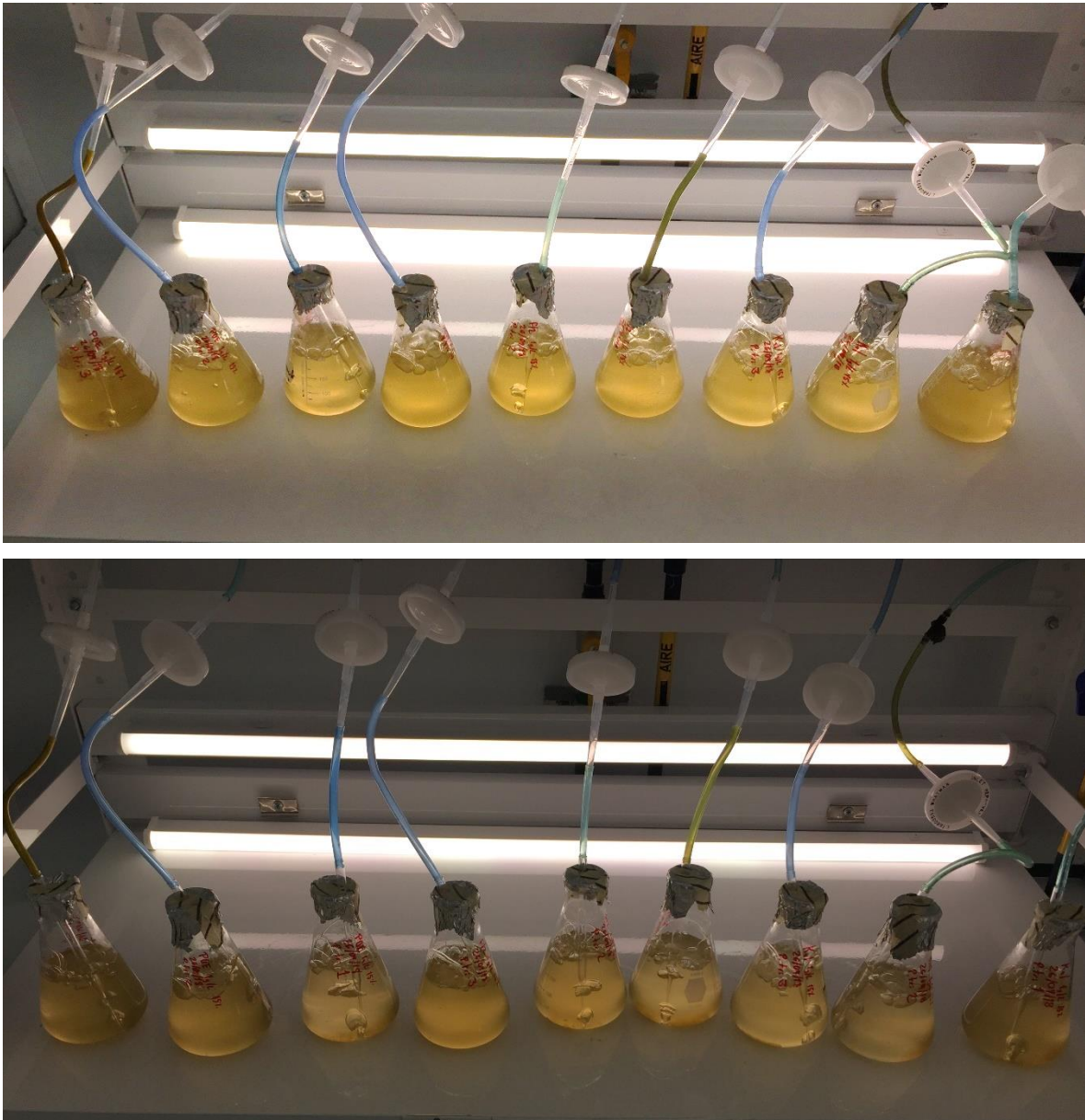


Figura 14 Cultivo perdiendo densidad celular

Los cultivos de 200 mL empezaron a perder densidad celular tres días después de iniciar el cultivo diferencia entre parte superior(inicio del cultivo) y la parte inferior(después de tres días) de la figura 14, en esta caso la muerte del cultivo se atribuyó problemas con el sistema de aireación.

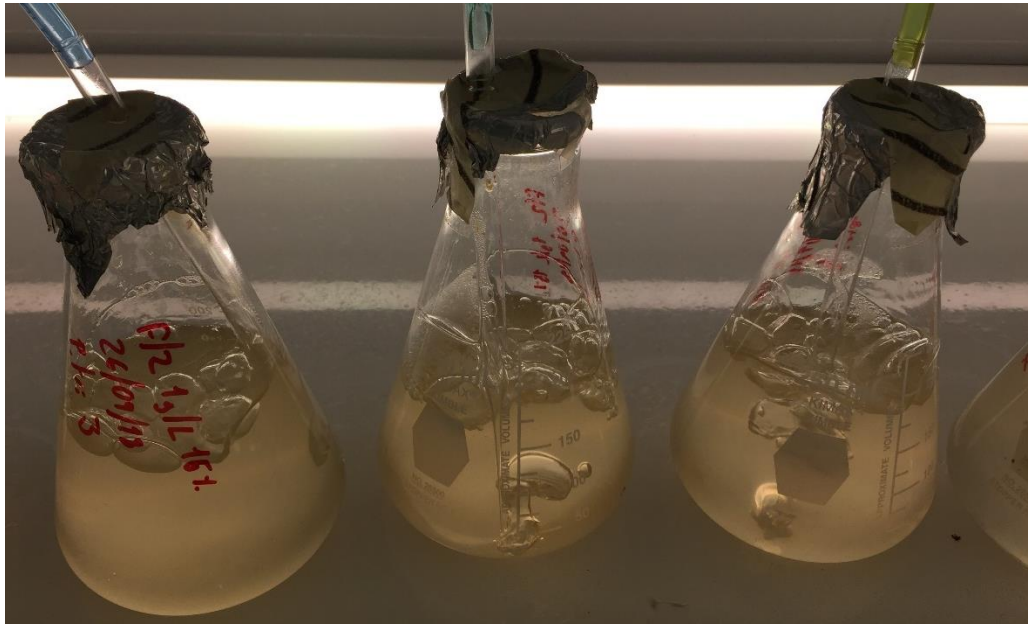


Figura 15 Cultivo después de 4 días perdiendo densidad celular("Caído")



Figura 16 Cultivos de 400 mL(De izquierda a derecha 3 de cada un medio Kaluna, F/2 normal y F/2 optimizado)

En la figura 13 se observan cultivos no viables antes de ser remplazados por los cultivos de la figura 16, estos recipientes de 400 mL presentaron un mejor crecimiento, en los cultivos subsecuentes se utilizaron en lugar de los matraces de 200 mL.



Figura 17 Cultivos de 400 mL al alcanzar fase estacionaria(3 de cada uno, de izquierda a derecha medio Kaluna, F/2 y F/2 optimizado)

En la figura 1 se observan los cultivos al alcanzar su etapa de crecimiento estacionario, hay un notoria diferencia en el color entre estos.

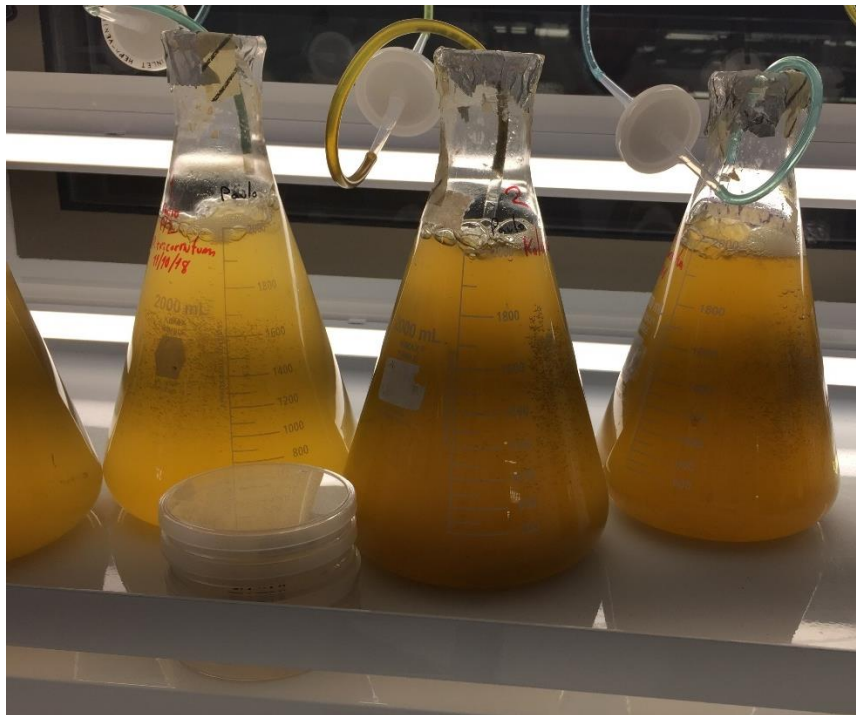


Figura 18 Cultivos de 2L(Medio Kaluna)

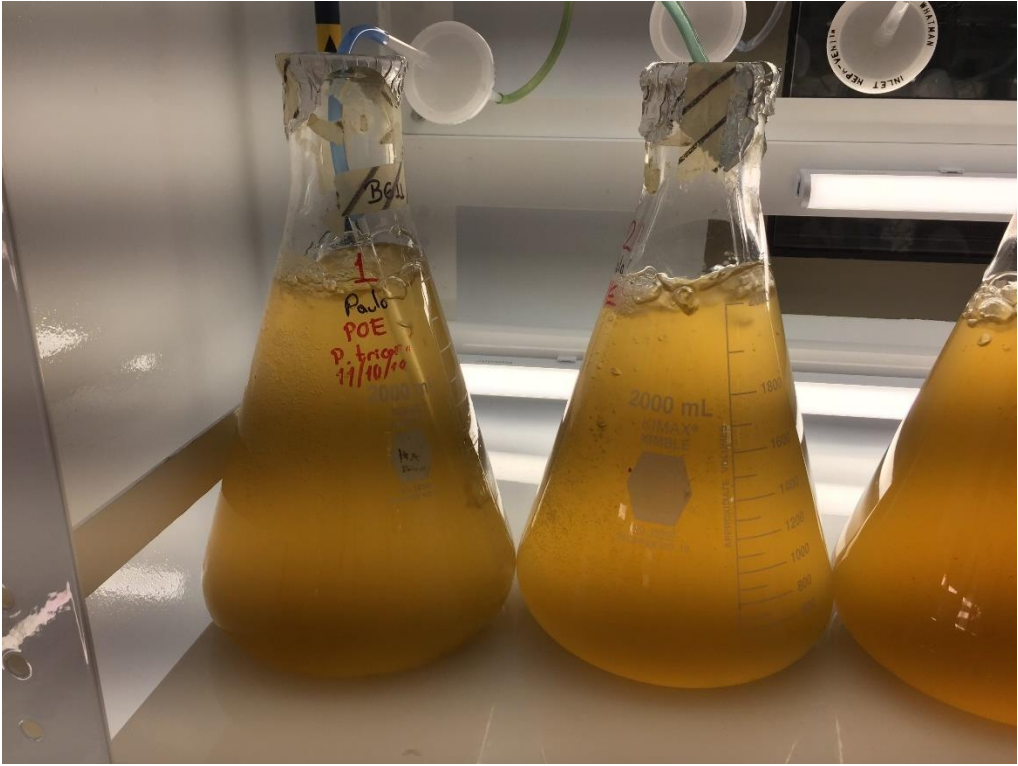


Figura 19 Cultivos en matraz de 2L

Escalamiento en planta

Para el escalamiento en planta se seleccionaron los mejores inóculos del laboratorio para continuar el escalamiento, en estos cultivos se monitoreo la D.O. al menos una vez al día, se inició con cultivos de 4.5 L en el cuarto de producción de la planta, después de estos se pasó a cultivos de 16 L aun el cuarto de producción, la escala final fue de bolsas con 50 L en el invernadero. También se llevó a cabo una caracterización básica del fotobiorreactor horizontal (FBRH), se tomaron mediciones de longitud y flujo del sistema, estas se usaron para calcular volúmenes y otros parámetros importantes.



Figura 20 Cultivos en garrafón de 4 L y matraces de 1L



Figura 21 Cultivos de 4L en cuarto de producción de la planta



Figura 22 Cultivos de 16 L en cuarto de producción en planta



Figura 23 Cultivos de 50 L en invernadero de planta



Figura 24 Fotobiorreactor(FBR) horizontal completo con cultivo de P. purpureum



Figura 25 Acercamiento a codos del FBRH



Figura 26 Acercamiento a tubería de FBRH



Figura 27 Tanque del FBRH



Figura 28 FBRH con cultivo de P. purpureum "cayendo"

Otras actividades en la empresa:

Durante el periodo del PAP se ayudó en área de ficología, entre las actividades está el monitoreo de las cepas de la colección, aislamiento de muestras, preparación de medios de cultivo y resiembra de cultivos viejos, también se ayudó en la planta para el monitoreo de los cultivos en el cuarto de producción, reactor tipo raceway, bolsas de cultivo y FBRH.

3. Resultados del trabajo profesional

3.1. Primer experimento

3.1.1. Análisis del diseño de experimentos factorial completo

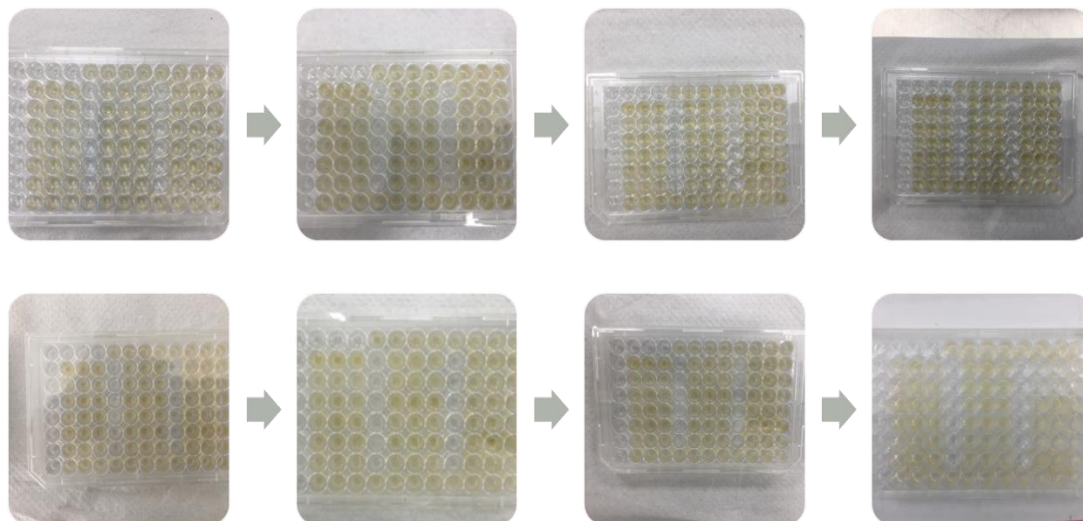


Figura 29 Progresión de microplaca del primer experimento

Se calculo la tasa de crecimiento en el cultivo a partir de la densidad optica(D.O.) y al analizar el diseño de experimentos(DOE) factorial en minitab se observó que los factores con efecto significativo en el crecimiento fueron la fuente de nitrógeno y el efecto combinado de la fuente de nitrógeno y la concentración de silicio, parece que las interacciones entre fuente de nitrógeno y otros factores no dejan ver los efectos principales, en algunos casos otro de los factores tiene el efecto contrario al usar la otra fuente de nitrógeno por lo que se evaluara el efecto de los otros factores utilizando solo nitrato de sodio que fue la mejor fuente. Hubo una formulación que supero a todas las demás, esta fue la 1(Tabla 3) en el DOE, y presento un crecimiento 48% mayor a las del control.

Tablas 3-Formulación del mejor medio(formulación 1)

NaNO ₃	880 μM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	72 μM
Na ² SiO ₃ ·9H ₂ O	20 μM

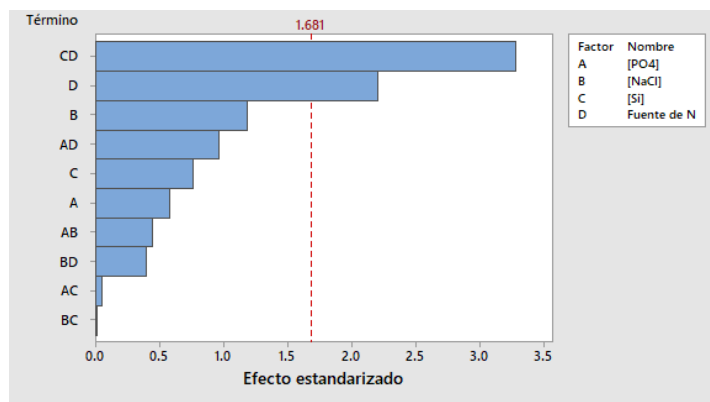


Figura 30 Gráfico de Pareto de efecto estandarizado(alfa=0.1) para DOE completo del primer experimento

En el gráfico de Pareto de efecto estandarizados se observa que factores tienen un efecto significativo en el crecimiento de *P. tricornutum*, aquellos que pasan la línea punteada (llegan al lado derecho de la línea punteada) tienen un efecto significativo con un nivel de confianza del 90%, a la vez los organiza por magnitud de arriba para el mayor hacia abajo, también se presenta el efecto combinado o interacciones hasta dos niveles de los factores. Vemos que el único factor individual en tener un efecto significativo fue la fuente de nitrógeno y la fuente de nitrógeno en combinación con la concentración de silicio también afectan de forma significativa

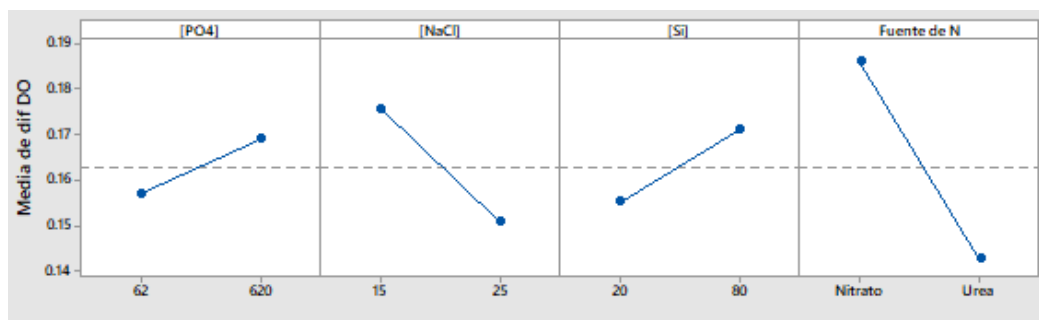


Figura 31 Gráfico de efecto principal del DOE completo del primer experimento

En el gráfico de efecto principal se muestra la media de la variable de respuesta para cada uno de los factores, en este se puede ver cual de los puntos es el mejor para cada uno de los factores, en esa caso los efectos combinados o interacciones de los factores no dejan

ver el efecto verdadero de todos los factores, pero en este gráfico extraemos que la fuente de nitrógeno con mejor crecimiento fue e nitrato de sodio.

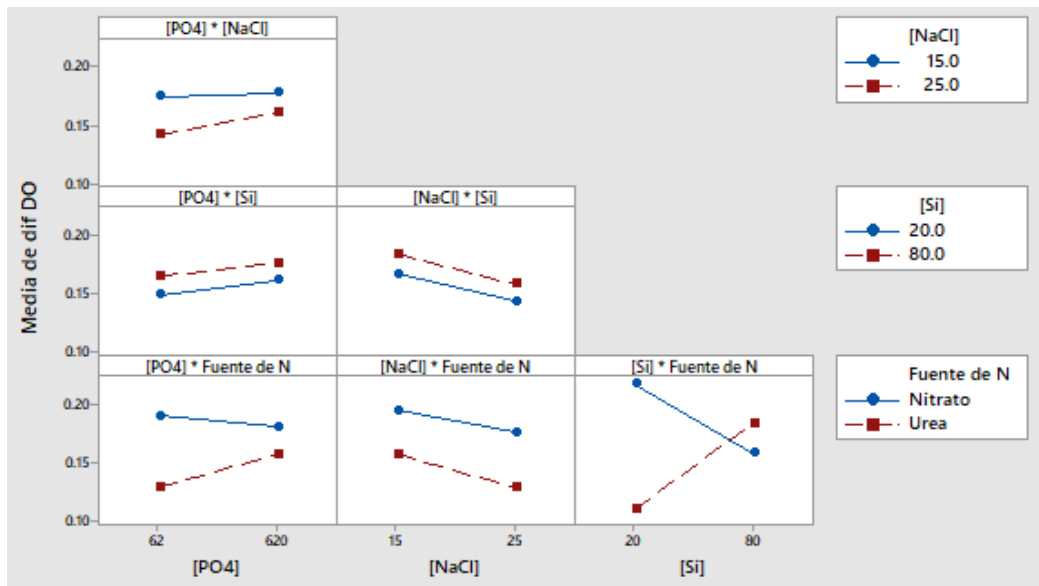


Figura 32 Gráfico de interacción del DOE completo del primer experimento

En el gráfico de interacciones se observa la en conjunto el efecto de dos factores para ver si hay un efecto combinado con algún de ellos, entre más diferente sean la línea azul con cuadros al final a la línea roja con cuadros la interacción de estos factores es mayor. En este caso sabemos que hay un efecto significativo por la interacción de concentración de silicio y la fuente de nitrógeno, y se observa con claridad en el gráfico, para los otros factores relacionados con la fuente de nitrógeno no hay efecto significativo pero parece hacer ruido en ellos por lo que se evaluó solamente los datos de nitrato como fuente de nitrógeno.

3.1.1. Análisis de diseño de experimentos factorial utilizando solo nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

Al analizarse únicamente los resultados de nitrato puede observarse mejor los efectos principales, vemos que no solo la fuente de nitrógeno y el efecto combinado de la fuente de nitrógeno y el silicato tienen un efecto significativo con un nivel de confianza del 90% sobre el crecimiento, también la concentración de silicatos por si sola y el efecto combinado de la concentración de fosfatos con la concentración de silicatos tienen un efecto estadísticamente significativo para el crecimiento. Al utilizar el optimizador de repuesta de minitab se obtiene que la formulación 1 (Fuente de nitrógeno= Nitrato de sodio,

Concentración de fosfato=620 μM , Concentración de cloruro de sodio=15 g/L y concentración de silicato=20 620 μM) genera el mayor crecimiento.

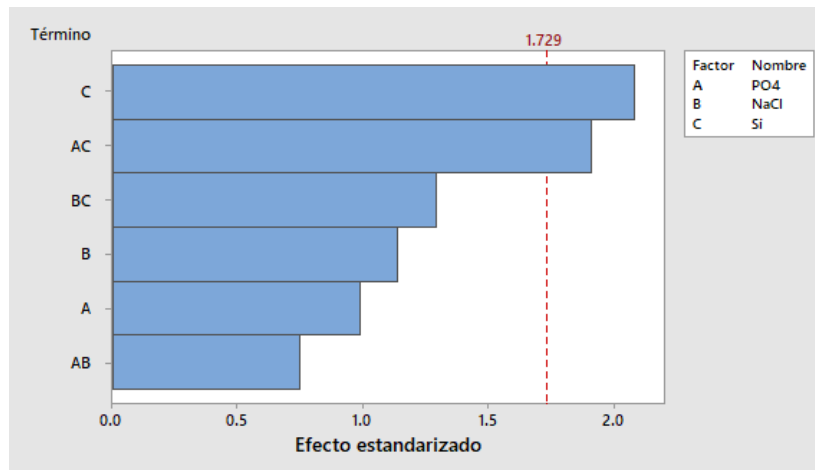


Figura 33 Diagrama de Pareto de efecto estandarizado(alfa=0.1) para DOE de nitrato del primer experimento

Al analizar únicamente los datos de nitrato otros factores aparecen como significativos con nivel de confianza del 95%, estos son la concentración de silicio y a interacción entre silicio y fosfato.

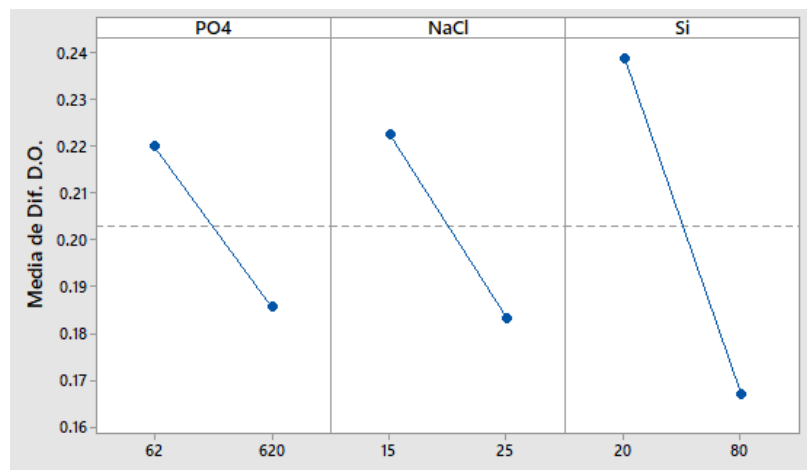


Figura 34 Gráfico de efecto principal para primer experimento DOE de nitrato

Al ver el gráfico de efecto principal vemos que las concentraciones de fosfato, cloruro de sodio y silicio en los puntos menores dan el mayor crecimiento.

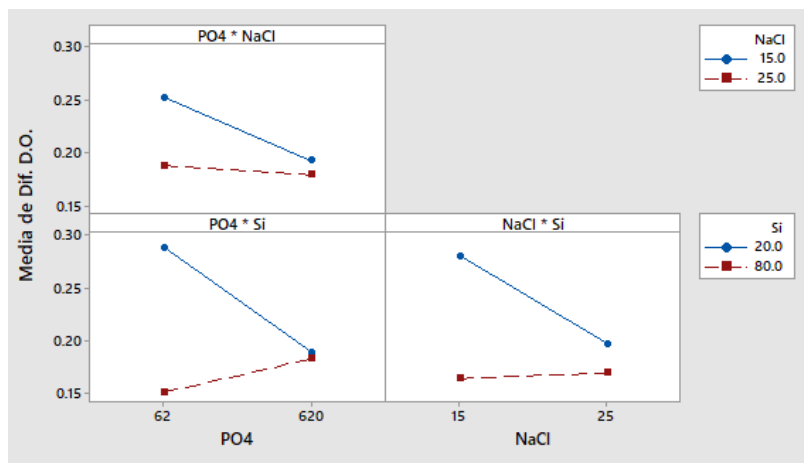


Figura 35 Gráfico de interacción del DOE de nitrato del primer experimento

El gráfico de interacciones se observan diferencias entre las líneas, pero en todos los casos los puntos mayores se encuentran por debajo de los puntos menores en cuanto al crecimiento por lo que se concluye que los puntos menores tienen mayor crecimiento.

3.1.2. Curva de crecimiento

En la figura 35 se observa la curva de crecimiento de la D.O. promedio los medios de cultivo con mejor crecimiento y el control, cada uno de los puntos tiene barras que representan un intervalo de confianza, con un nivel de confianza del 95%, cuatro de las formulaciones pasaron al control pero solo una tiene una diferencia significativa con el control esta es la formulación 1 y mostró un crecimiento 48% mayor al control.

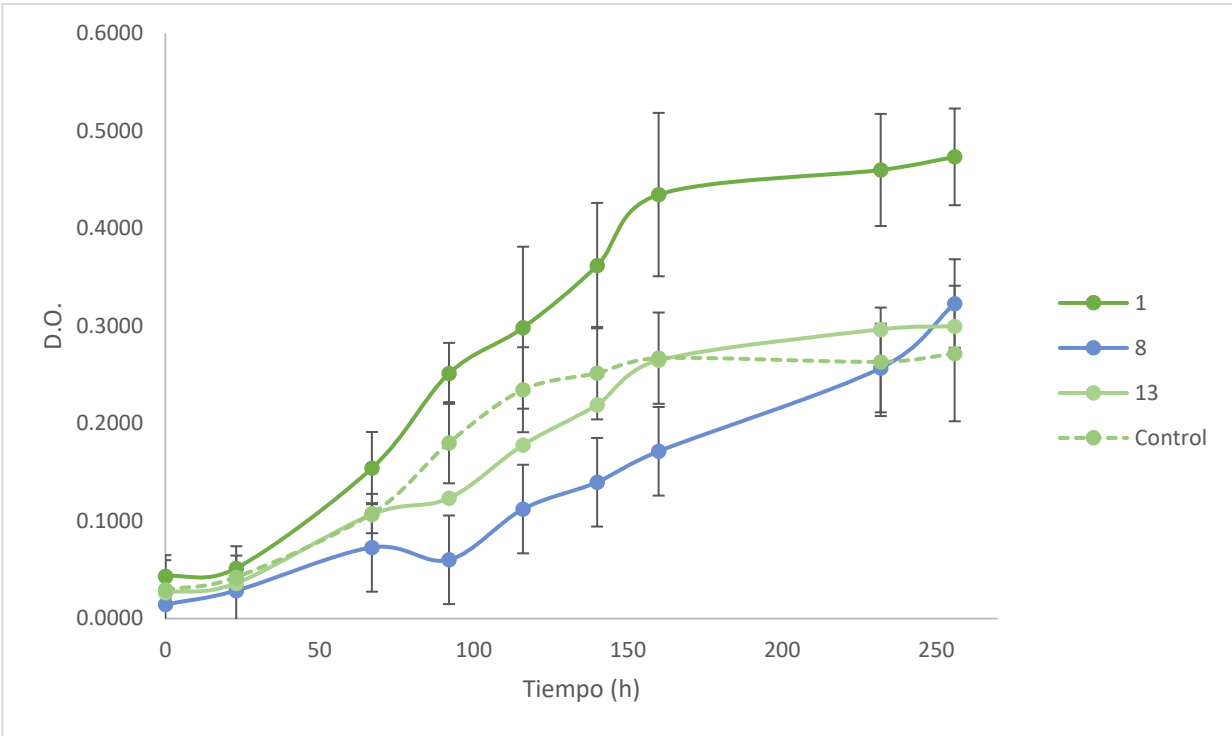


Figura 36 Curva de crecimiento de los mejores medios de cultivo del primer experimento.

3.1.3. Intervalo de confianza

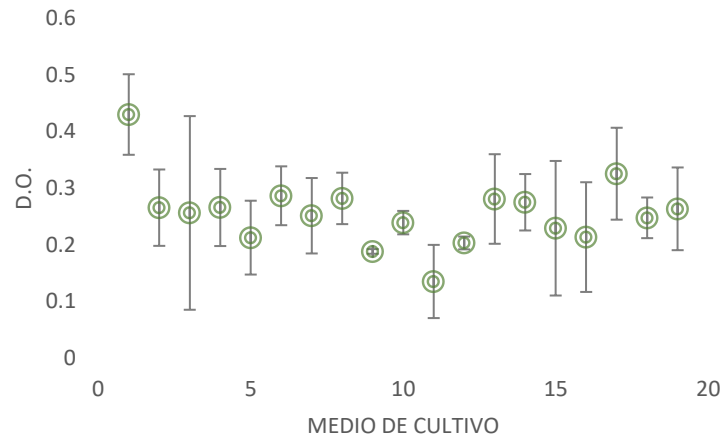


Figura 37 Intervalo de confianza de D.O. final de todas las formulaciones del primer experimento

El gráfico de intervalo de confianza muestra la media de cada uno de los medios de cultivo y las barras de error se alargan dos desviaciones estándar para mostrar un intervalo de confianza para la media con un 95% de confianza.

3.2. Segundo experimento

3.2.1. Superficie de respuesta.

Para evaluar el mejor punto para la concentración de cloruro de sodio y bicarbonato de sodio se calculó la tasa de crecimiento (μ /miu) y se hicieron gráficos de superficie superficies (una para cada medio de cultivo), en los que se determinó el punto más alto, en ambos medio de cultivo el punto más alto fue en 1 g/l de bicarbonato de sodio y 15 g/l de cloruro de sodio.

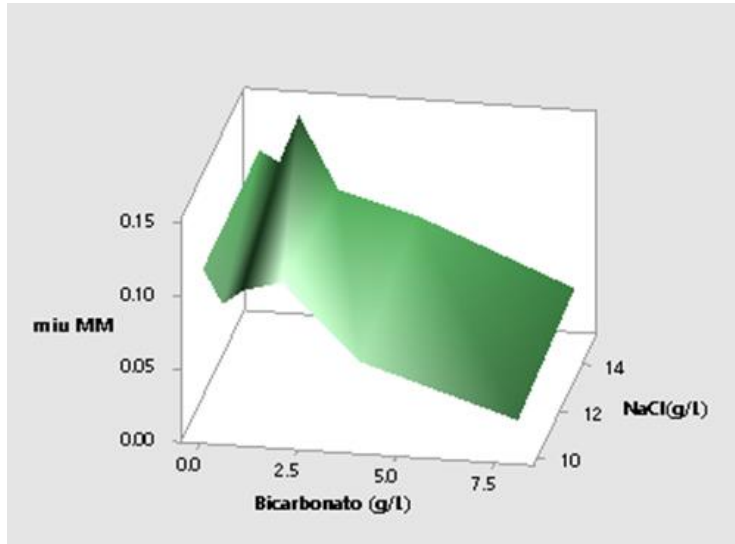


Figura 38 Gráfico de superficie de miu en función de cloruro de sodio y bicarbonato de sodio para F/2 optimizado.

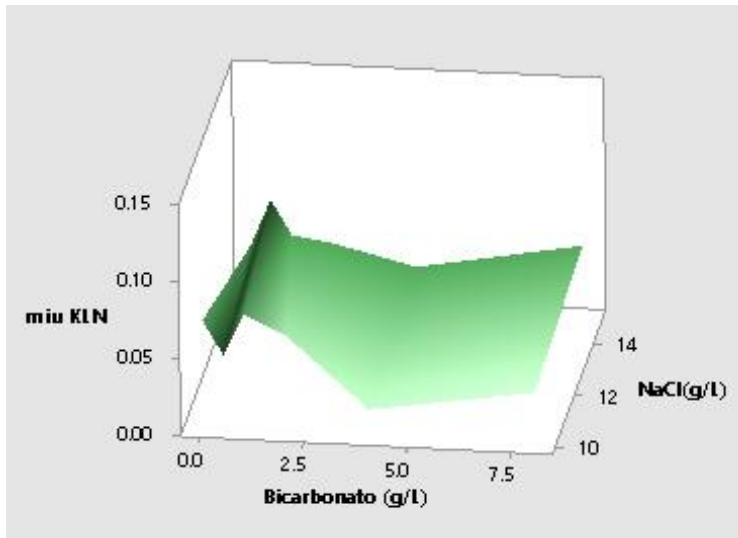


Figura 39 Gráfico de superficie de miu en función de cloruro de sodio y bicarbonato de sodio para Kaluna

3.2.2. ANOVA de un solo factor

Con los datos obtenidos para la superficie de respuesta se hicieron tres ANOVAs de un solo factor en la primera se comparó la diferencia entre los medios de cultivo usados (F/2 optimizado y Kaluna), en la segunda se vio el efecto la concentración de cloruro de sodio y por último de la concentración de bicarbonato de sodio. En la figura 39 se observa que hay una diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento por el medio utilizado, el

medio de cultivo F/2 optimizado que de ahora en adelante llamaremos POE presento un mayor crecimiento que kaluna

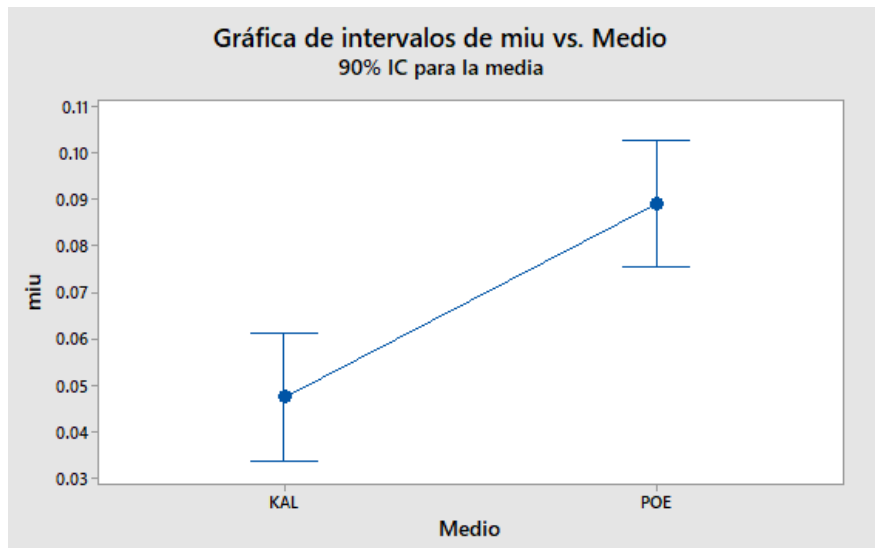


Figura 40 Intervalo de confianza de 90% para comparación del efecto de los medios de cultivo

Con respecto a los otros factores no se observó una diferencia significativa en las concentraciones de cloruro de sodio usadas, pero se tomó 15 g/L como por la ligera diferencia en la media, en cuanto al bicarbonato de sodio no hay una diferencia estadísticamente significativa en el rango de 0 a 2 g/L, de igual forma se tomó el punto más alto como el mejor (1 g de bicarbonato de sodio por litro), a partir de los 2 g/L se observa un decremento en el crecimiento para ambos medio de cultivo, se cree que el aumento observado a partir de los 8g/L de bicarbonato de sodio en Kaluna es por la precipitación de las sales.

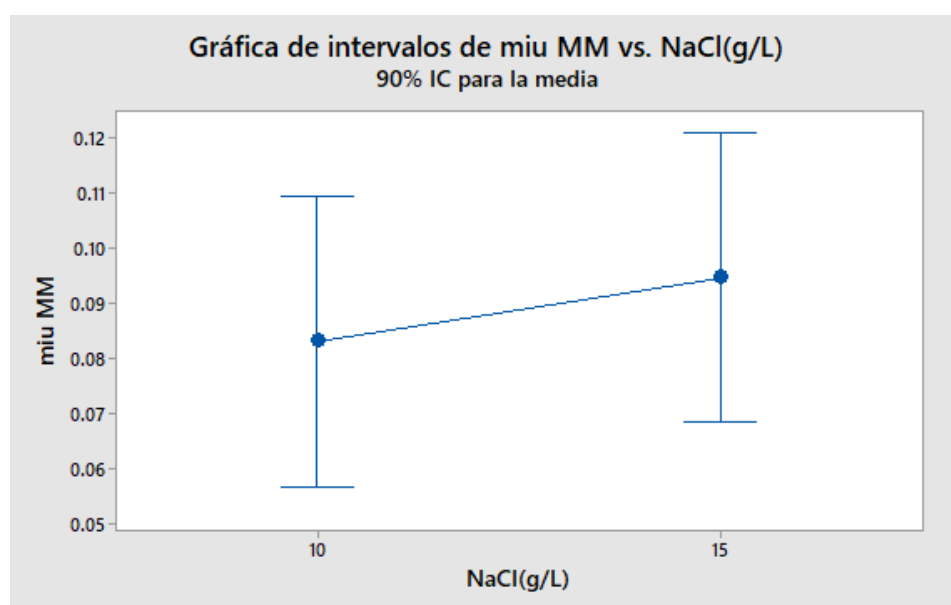


Figura 41 Intervalo de confianza para concentración de cloruro de sodio en POE

La concentración de bicarbonato de sodio con una tasa específica de crecimiento más alta fue 1 g/L, no hay una diferencia significativa entre el rango de 0 a 2 g/L pero a partir de 4g/L la diferencia es suficiente para tener ser estadísticamente significativa, a pesar de no tener

diferencia significativa con el cero, en conjunto con los datos obtenidos y lo extraído de la literatura se toma 1g/L como el mejor punto.

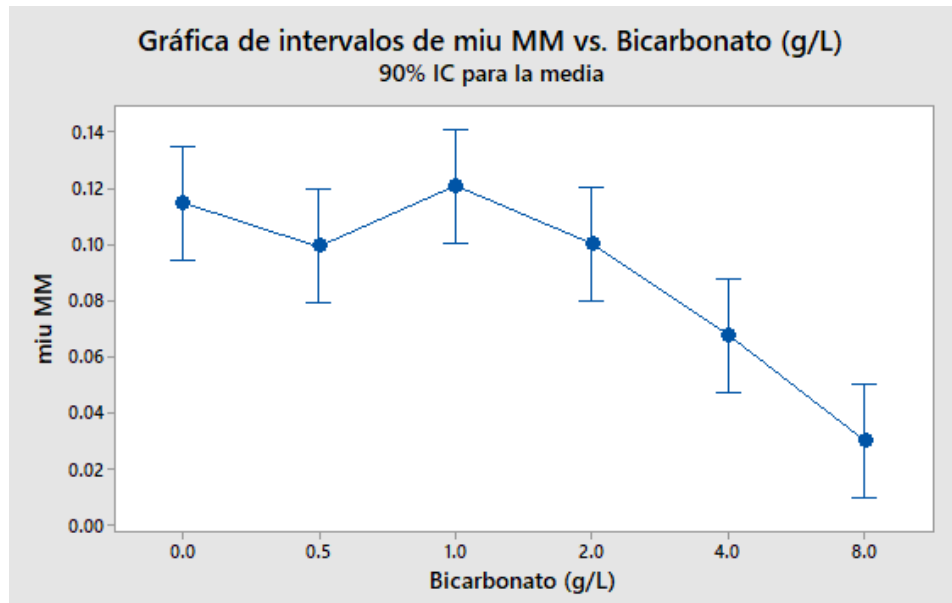


Figura 42 Intervalo de confianza de concentración de bicarbonato de sodio para POE

En kaluna no se observó una diferencia significativa en la concentración de cloruro de sodio, se toma el 10 como mejor punto al tener una media ligeramente más alta y necesita menos sales.

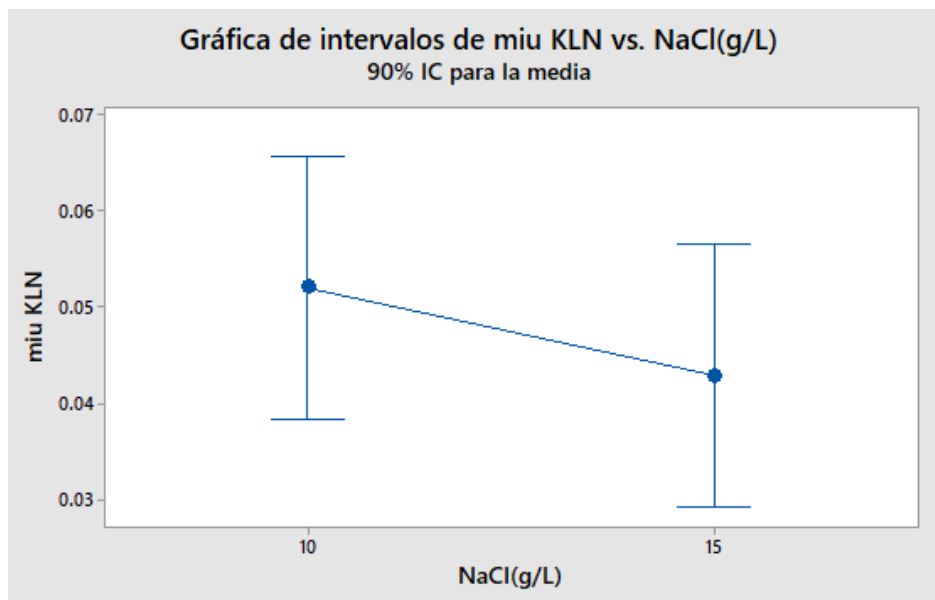


Figura 43 Intervalo de confianza para concentración de cloruro de sodio en kaluna

3.2.3. Curva de crecimiento

En las curvas se puede observar que la formulación seis alcanzó la mayor D.O., esta corresponde a POE con 1 g/L de bicarbonato de sodio y 15g/L de cloruro de sodio, esto va de acuerdo con los datos obtenidos por las ANOVAs de un solo factor y las superficies de respuesta.

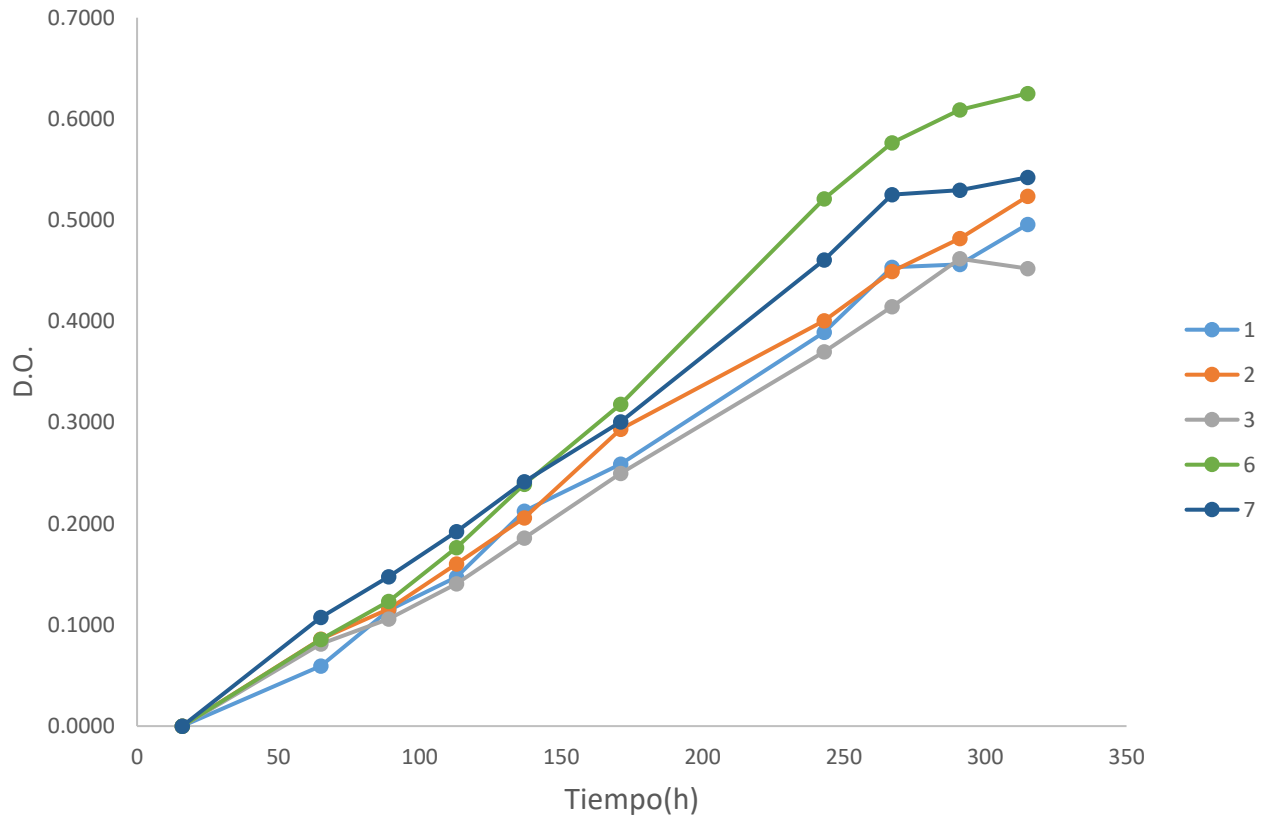


Figura 44 Curva de crecimiento de los mejores medios del segundo experimento

3.3. Validación

3.3.1. Peso seco

Kaluna presentó el mejor rendimiento de gramos de biomasa por litro día (g de biomasa/ L Día), pero no hay una diferencia estadísticamente significativa contra F/2, POE presenta el rendimiento más bajo de todos esto no concuerda con los resultados obtenidos en los dos experimentos, POE parecía presentar el mayor crecimiento, al repetir el experimento de validación se repitió la tendencia por lo que los datos de la validación se consideran correctos. POE presento un rendimiento 11% menor a F/2 y kaluna uno 6% mayor, la diferencia no es de una magnitud lo suficiente para tener una diferencia significativa entre kaluna y F/2 y entre F/2 y POE tampoco existe, pero kaluna si fue mayor que POE con una diferencia estadísticamente significativa(Figura 43). Se necesita determinar la productividad de lípidos para determinar el mejor medio de cultivo para pasar la producción a escala industrial.

Tabla 5-Datos de peso seco a los 8 días

Medio de cultivo	Peso seco (g/L)	Eficiencia (g/L día)
P1	0.775	0.097
P2	0.705	0.088
P3	0.825	0.103
F1	0.860	0.107
F2	0.825	0.103
F3	0.905	0.113
K1	0.865	0.108
K2	0.955	0.119
K3	0.935	0.117

Tabla 6-Promedio D.O., células/mL, peso seco y eficiencia

	D.O.	celulas/mL	Peso seco promedio (g/L)	Eficiencia promedio (g/L día)
Promedio P	0.517	3.62E+07	0.768	0.096
Promedio F	0.579	4.03E+07	0.863	0.108
Promedio K	0.785	6.18E+07	0.918	0.115

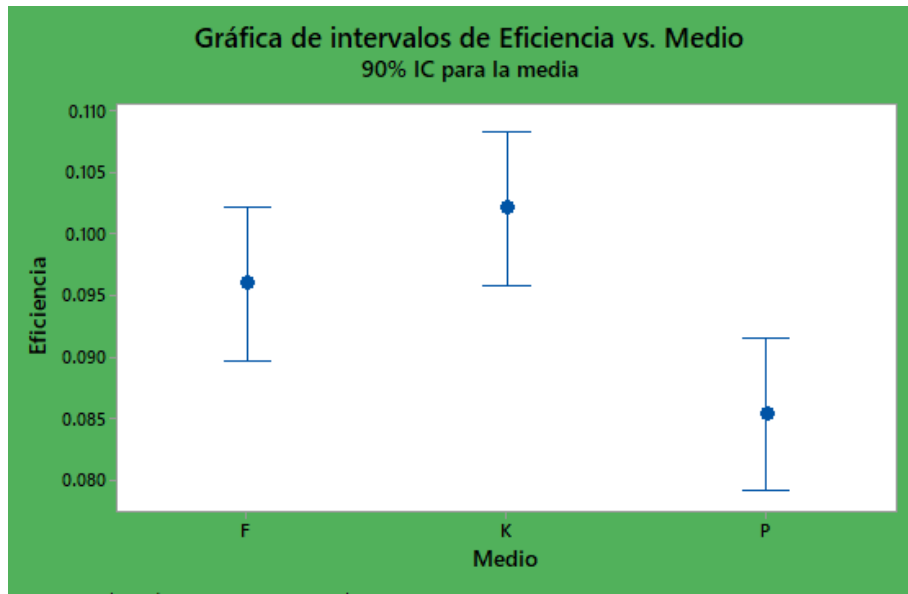


Figura 45 Intervalo de confianza para eficiencia(g/L Día) por medio de cultivo

3.3.2. Curva de crecimiento

Tabla 7- Promedio de D.O. por tiempo y medio de cultivo

Tiempo(h)	0	48	120	144	168	192
P	0.161	0.320	0.437	0.461	0.531	0.517
F	0.155	0.359	0.488	0.527	0.610	0.579
K	0.166	0.317	0.552	0.628	0.707	0.785

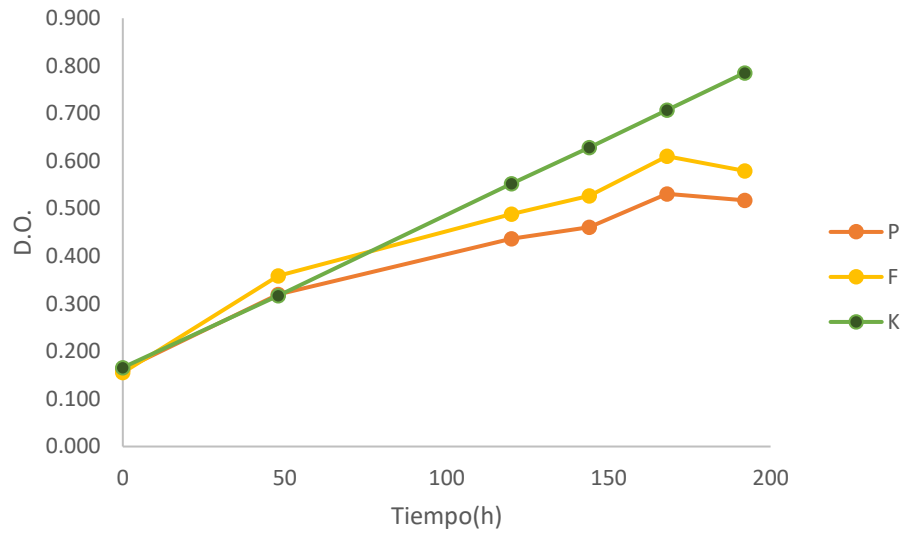


Figura 46 Curva de crecimiento de los cultivos utilizados para validación y peso seco

3.3.3. Diferencias morfológicas

Existe una diferencia clara a simple vista entre algunos de los cultivos, Kaluna presenta un color muchos más oscuro que parece no ser causado únicamente por la densidad celular mayor(Figuras 45, 46 y 47), al secar la biomasa esta diferencia se hace más evidente, después del mismo proceso de secado la biomasa de Kaluna tiene un color y textura diferente,, la biomasa de Kaluna es tiene un tono verdoso y textura quebradiza y seca en lugar de color café y grasoso en como F/2 y POE(Figura 48), finalmente al observar las células al microscopio observamos otra diferencia importante, las células creciendo en kaluna(figura 51) presentan menos vacuolas de grasas que las que crecen en los otros medios(figuras 49 y 50).

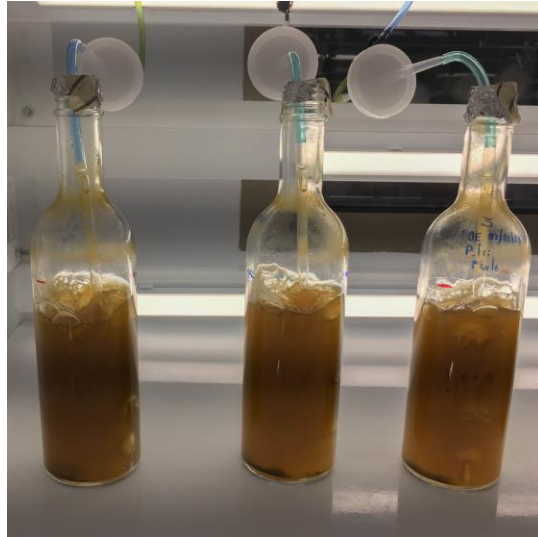


Figura 47 Cultivo de *P. tricornutum* en medio POE después de 8 días de crecimiento

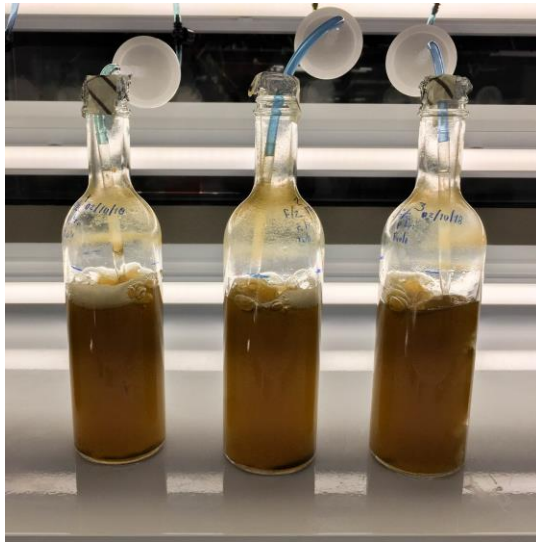


Figura 48 Cultivo de *P. tricornutum* en medio F/2 después de 8 días de crecimiento

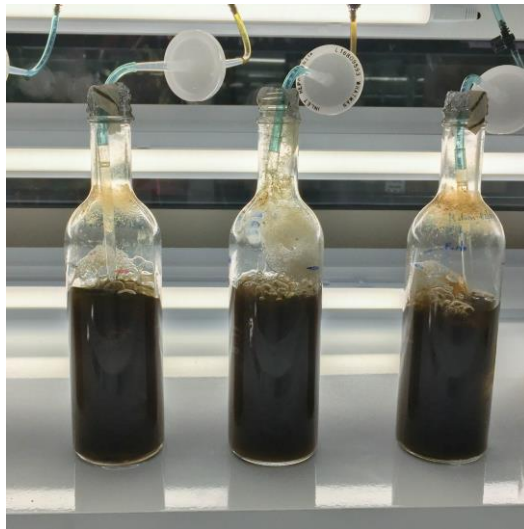


Figura 49 Cultivo de *P. tricornutum* en medio Kaluna después de 8 días de crecimiento



Figura 50 Biomasa seca de los tres medios utilizados, POE parte superior, F/2 mitad y Kaluna en parte inferior

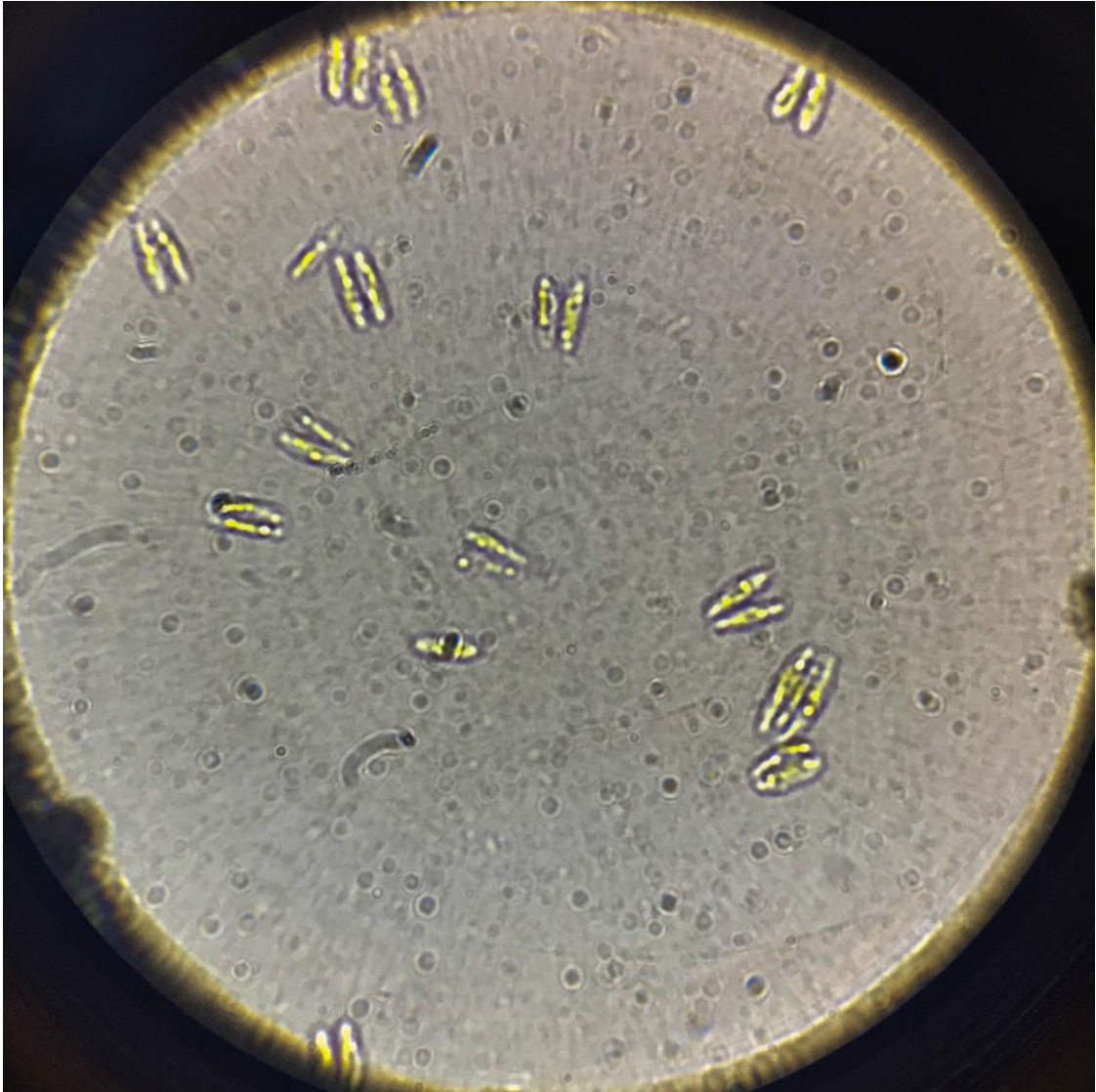


Figura 51 Cultivo de *P. tricorutum* en medio POE después de 8 días de crecimiento al microscopio x100

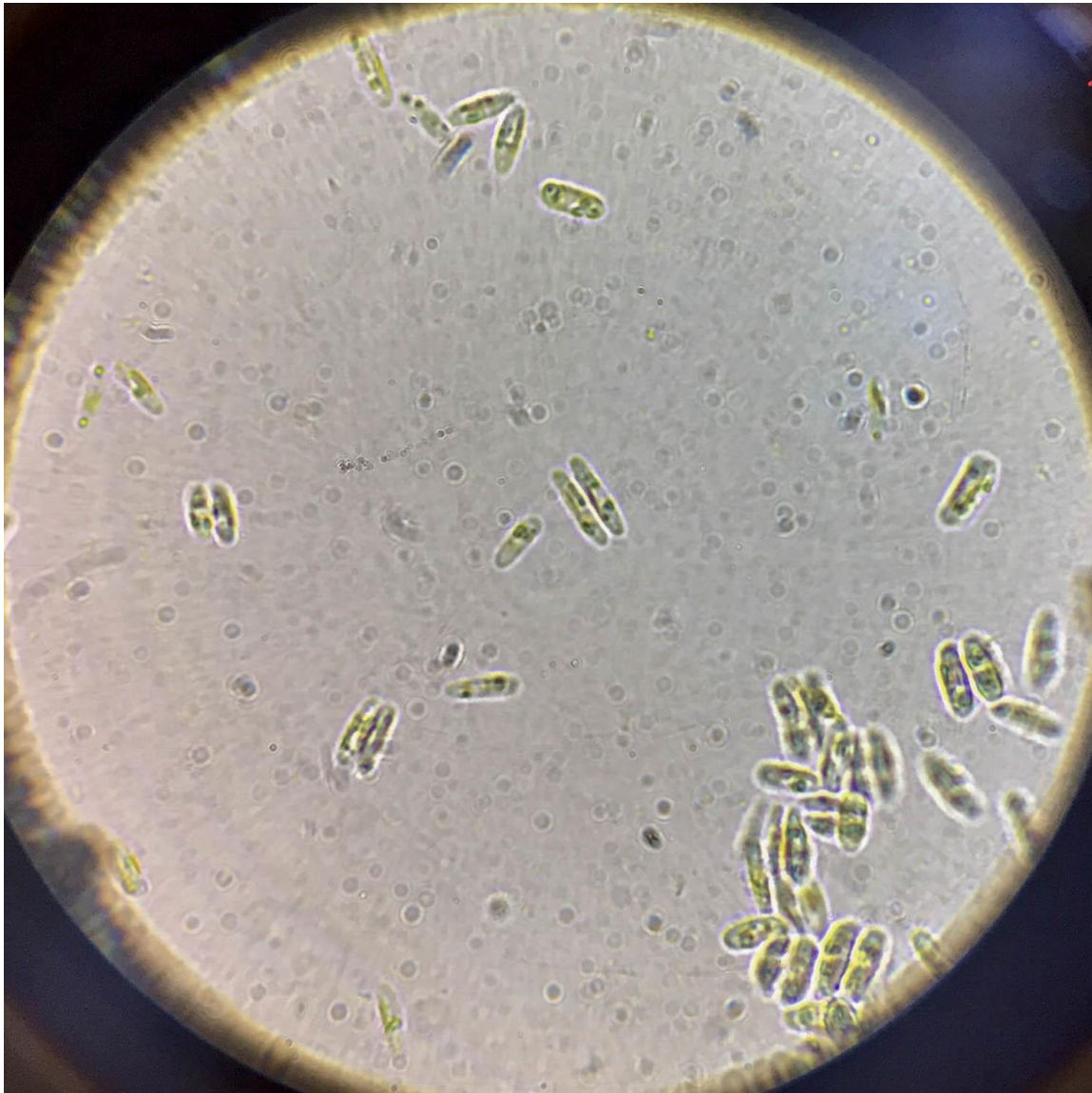


Figura 52 Cultivo de *P. tricornutum* en medio F/2 después de 8 días de crecimiento al microscopio x100

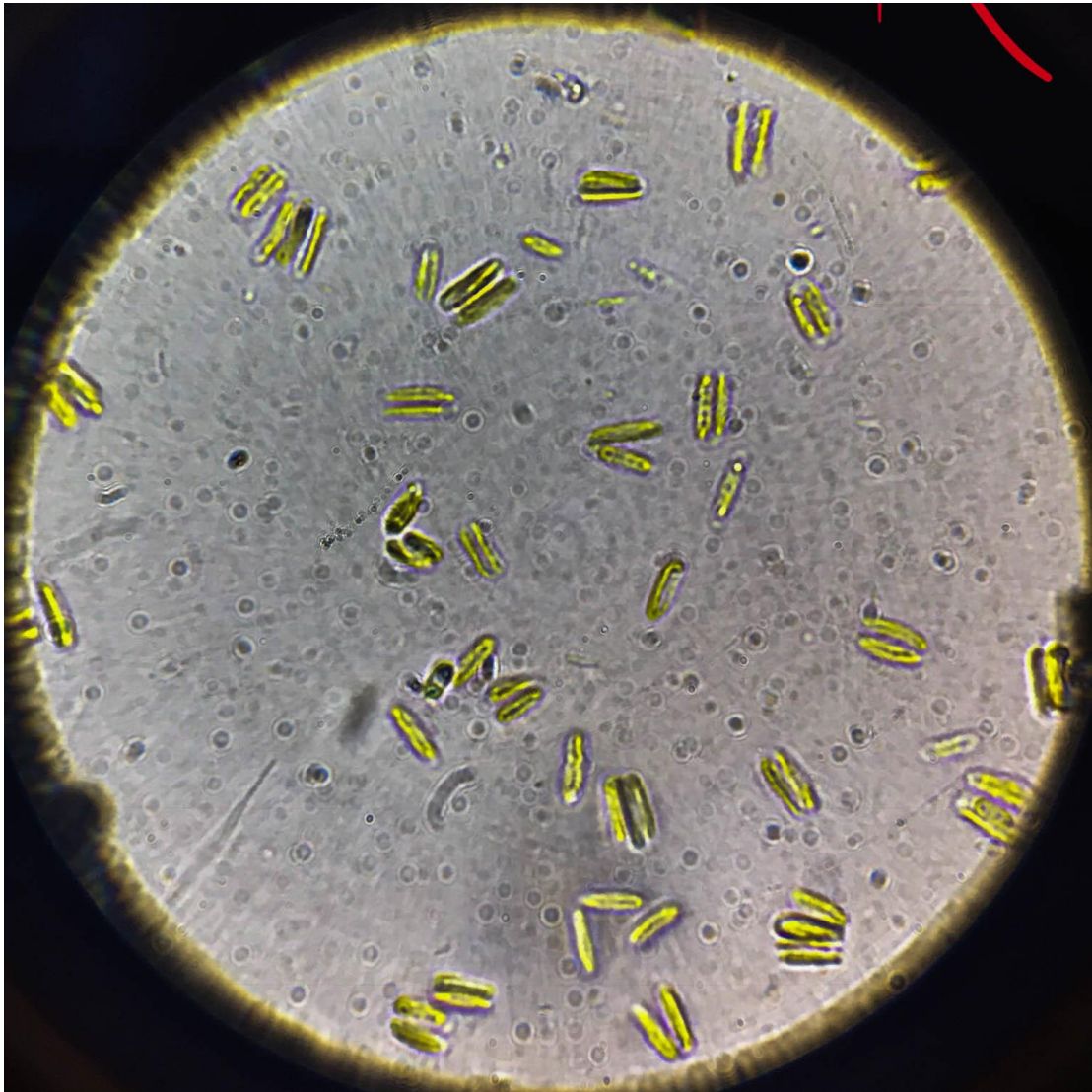


Figura 53 Cultivo de *P. tricornutum* en medio Kaluna después de 8 días de crecimiento al microscopio x100

3.4. Caracterización de Fotobiorreactor(FBR)

3.4.1. Mediciones y volumen

Se dividió el FBR en tres secciones para organizar mejor las medidas y por los cálculos de tiempo de residencia en estas, las divisiones fueron el tanque, la sección de tubería de vidrio y tubería de PVC. Las tablas 1,3 y 5 muestran las mediciones tomadas a distintas secciones del FBR, estos datos se usaron para los calcular el volumen de las distintas secciones en conjunto con los datos del fabricante para otras secciones los volúmenes se muestran en las tablas 2, 4 y 6. El volumen total de reactor es de 1.398 m³, al operar con el tanque al 80% del volumen total se tiene un volumen de 1.312 m³.

Tabla 8.-Mediciones de longitud de tanque

Sección	Longitud	Unidad
Diámetro ext.	0.51	m
Diámetro int.	0.49	m
Grosor pared	0.01	m
Altura	2.3	m
Altura cono	0.40	m
Diámetro Mayor cono	0.51	m
Diámetro menor	0.065	m
Pared cono	0.475	m

Tabla 9.- Volúmenes calculados de tanque

Sección	Volumen	Unidad
Cilindro(100%)	0.434	m3
Cilindro(80%)	0.347	m3
Cono	0.038	m3
Total de tanque	0.472	m3

Tubería de vidrio

Tabla 10.-Mediciones de longitud de tubería de vidrio

Sección	Longitud	Unidad	Cantidad
			x56
Tubería individual	5.5	m	tubos
Tubería total	308	m	-
Tubería diámetro interno	0.0628	m	-

Codo	0.35	m	x27 codos
Codo total	9.44	m	-
Codo diámetro interno	0.0622	m	-

Tabla 11.- Volúmenes calculados de tubería de vidrio

Sección	Volumen	Unidad	Cantidad
Tubería individual	0.01586	m3	x56 tubos
Tubería total	0.8882	m3	-
Codo	0.0012	m3	x27 codos
Codo total	0.0324	m3	-
Volumen total	0.9206	m3	-

Tubería PVC

Tabla 12.-Mediciones de longitud de tubería de PVC

Sección	Longitud	Unidad
Salida FBR a tanque	2.94	m
De tanque a bomba	1.19	m
De bomba a FBR	1.71	m
Longitud total	5.84	m
Diámetro interno	0.065	m
Área interna	0.00106	m2

Tabla 13.- Volúmenes calculados de tubería de PVC

Sección	Volumen	Unidad
Volumen total	0.0062	m3

3.4.2. Bomba

Flujo y velocidad:

La velocidad del flujo a la que se mueve un cultivo es de suma importancia, si se da mucha puede inhibir el crecimiento por estrés mecánico o romper las células, pero si esta no es suficiente podría sedimentarse y reducir el crecimiento, esto significa

que para cada organismo hay un rango en el que crece mejor. Para obtener el flujo de la bomba principal se cronometr  el tiempo en que se tardaba en llenar un volumen de 19L por la salida de la sección de tubería de vidrio al tanque, se tomaron cuatro puntos de frecuencia de la bomba por triplicado, de los promedios de estos puntos se calculó el flujo, la velocidad a través del sistema de tubería, el tiempo de retención en el sistema de tubería y el tiempo de retención en el tanque, los datos experimentales y resultados de los cálculos se pueden observar en la tabla 7. Estos cálculos se utilizaron para graficar y hacer modelos en el rango de 30 a 45 Hz para el flujo (figura y ecuación 1), velocidad en las tuberías (figura y ecuación 2), tiempo de retención en tubería (figura y ecuación 3), tiempo de retención en el tanque (figura y ecuación 4) y número de Reynolds (figura 5).

Tabla 14.- Datos experimentales y resultados de cálculos para flujo, velocidad y tiempo de retención

Datos experimentales para flujo, velocidad y tiempo de retención					Volumen flujo
Hz	45	40	35	30	0.019 m ³
	4.11	6.51	7.65	9.82	Diámetro interno
Segundos	5.16	6.37	7.72	9.44	0.0628 m
	5.75	6.2	6.88	9.84	área transversal de tubería
Promedio	5.007	6.360	7.417	9.700	0.00154 m ²
Flujo (m ³ /s)	0.004	0.003	0.003	0.002	Volumen tubería
Velocidad (m/s)	2.450	1.929	1.654	1.265	0.927 m ³
Tiempo de retención Vidrio(s)	244.20	310.21	361.75	473.12	Volumen tanque
Tiempo de retención tanque(s)	91.43	116.15	135.44	177.14	0.347 m ³

$$Flujo \left(\frac{L}{s} \right) = 0.1187(Frecuencia(Hz)) - 1.6249$$

$$R^2 = 0.985$$

Ecuación 1.- Modelo para calcular flujo

$$Velocidad \left(\frac{m}{s} \right) = 0.0766(Frecuencia(Hz)) - 1.0492$$

$$R^2 = 0.985$$

Ecuación 2.- Modelo para calcular velocidad en tubería.

$$\text{Tiempo de retención tubería}(s) = -14.766(\text{Frecuencia(Hz)}) + 901.04$$
$$R^2 = 0.9718$$

Ecuación 3.- Modelo para calcular tiempo de retención en tubería.

$$\text{Tiempo de retención tanque}(s) = -5.528(\text{Frecuencia(Hz)}) + 337.36$$
$$R^2 = 0.9715$$

Ecuación 4.- Modelo para calcular tiempo de retención en tanque.

Tendencia flujo en función de frecuencia

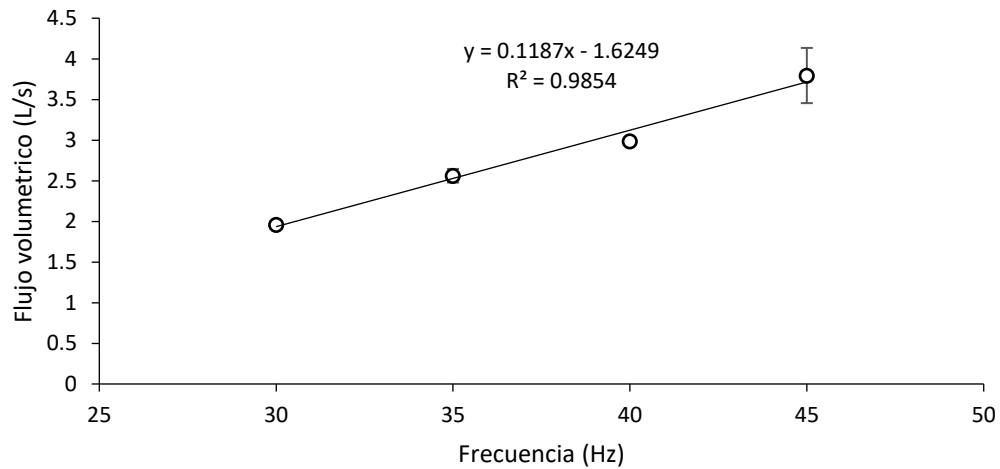


Figura 54 Gráfico de flujo en función de la frecuencia de bomba

Tendencia de velocidad en en función de frecuencia

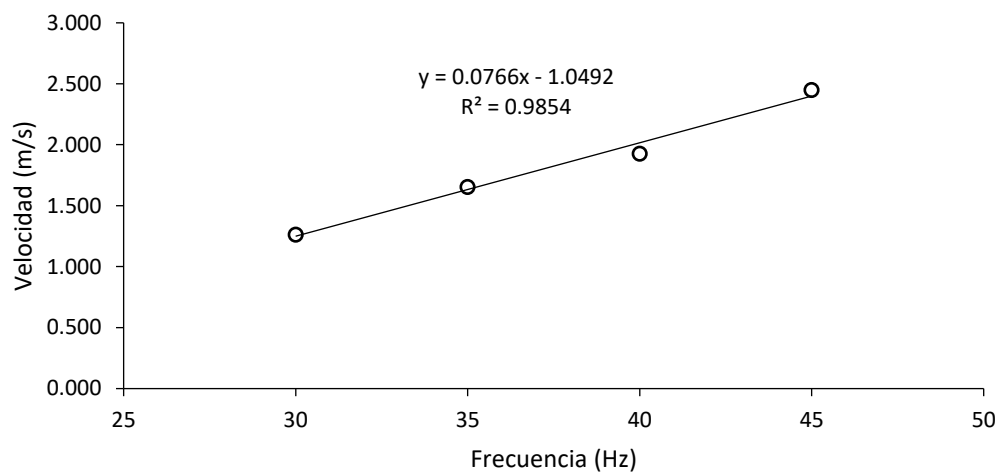


Figura 55 Gráfico de velocidad dentro de tuberías en función de la frecuencia de bomba

Tendencia de tiempo de retención de tubería en función de frecuencia

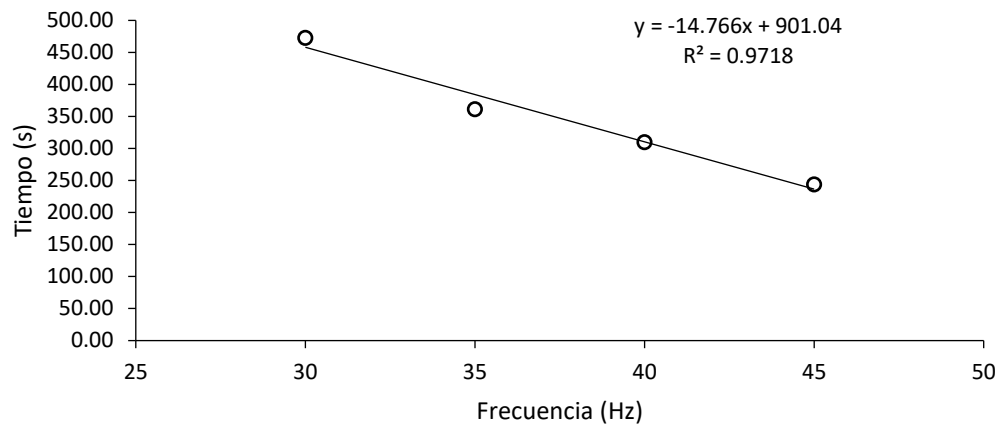


Figura 56 Gráfico de tiempo de retención en tubería en función de la frecuencia de bomba

Tendencia de tiempo de retención de tanque en función de frecuencia

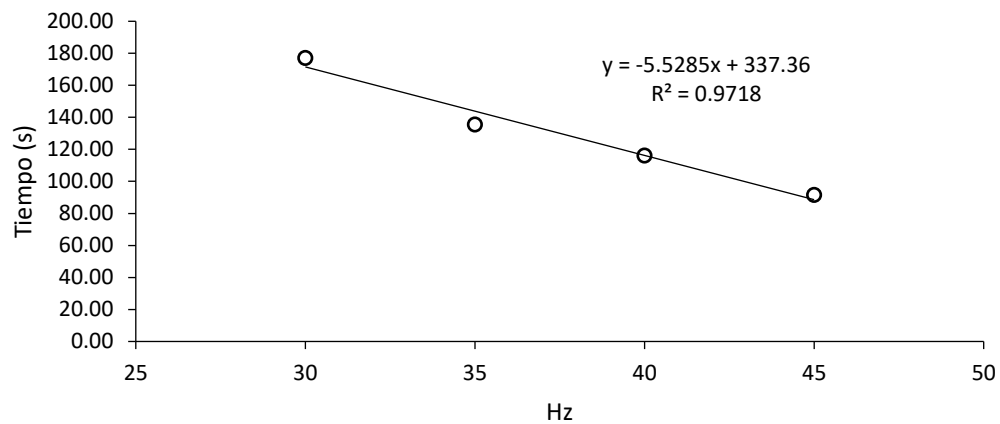


Figura 57 Gráfico de tiempo de retención en tanque en función de la frecuencia de bomba

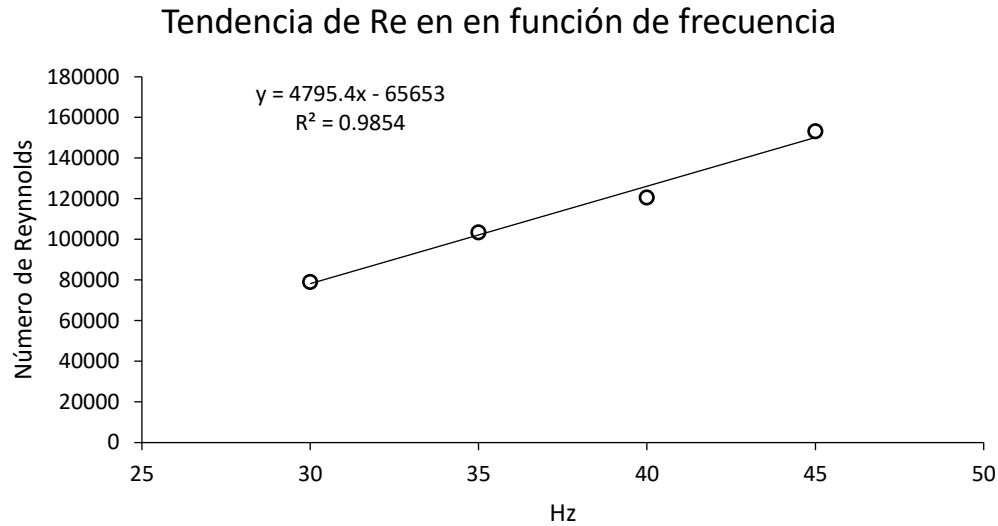


Figura 58 Gráfico de número de Reynolds del tanque en función de la frecuencia de bomba

3.4.3. Agitación

Se determinó el flujo de aire en tres puntos distintos de apertura de la válvula de desfogue de la aireación (en un rango de 0 a 30, a los 45 grados ya no hay salida de aire al tanque) y la velocidad de subida de la burbuja dentro del tanque, el flujo de aire se determinó midiendo el tiempo que tarda el flujo de aire en desplazar determinado volumen de agua, con los flujos determinados aire se hizo un modelo matemático (ecuación 5). La velocidad de burbuja fue de 0.176 m/s y se utilizó para calcular el diámetro de burbuja utilizando un gráfico reportado por Scheid, el diámetro de burbuja fue de 5 cm (Scheid, C., 1999).

$$\text{Flujo de aire}(m^3) = -0.0048(\text{grados de apertura}) + 0.2865$$

$$R^2 = 0.993$$

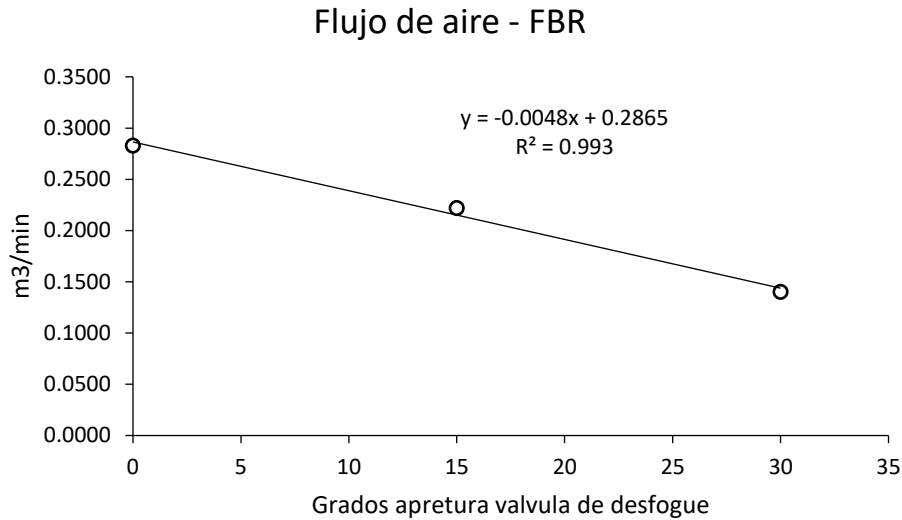


Figura 59 Gráfico de flujo de aire en tanque de FBRH en función de apertura de válvula de desfogue

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto

- Aprendizajes profesionales

Durante el desarrollo de este proyecto se puso en práctica tanto competencias base como técnicas, aunque este fui el único encargado del proyecto me encontré con muchas situaciones en las que el trabajo en equipo fue vital para llegar al objetivo, este fue en especial enriquecedor en la etapa de planeación, después de hacer toda la investigación y planeación se hizo una presentación a todos los empleados y practicantes del laboratorio donde estos dieron sus puntos de vista, consejos y ofrecieron su ayuda para otras dudas desde su área de especialidad, con esto veo lo importante de abordar esta clase desde una perspectiva interdisciplinaria desde antes de iniciar un proyecto para aumentar las probabilidades de éxito, también a la par que se obtuvieron los resultados se trabajó con personas de otras áreas que de nuevo brindaron un apoyo similar en otras dos presentaciones de resultados que hubo durante el desarrollo de proyecto.

La habilidad para investigar fue puesta a prueba a lo largo de todo el proyecto, desde la primera etapa de planeación (donde se practicó más este aspecto), pasando por una serie de problemas al momento de hacer las pruebas y hasta el momento de analizar resultados, en todas las etapas de este proyecto fue necesario seguir con investigación.

El trabajo de planeación de proyecto fue otras de las competencias que en mi caso no había puesto en práctica durante la carrera y fue vital para el desarrollo de este proyecto, al planear las actividades con cierta antelación se pudo aprovechar mucho mejor todos los recursos, las instalaciones del laboratorio, reactivos, otros recursos humanos importantes, pero más que nada el tiempo.

La habilidad para analizar y solucionar problemas se desarrolló en gran medida, en ningún otro proyecto a lo largo de mi vida profesional me había encontrado con uno tan grande que me enfrentara a tantos problemas y con la limitante del tiempo y recursos (principalmente en la planta), estos problemas tenían que solucionarse de forma rápida y efectiva y aunque en muchos de los casos no se logró dar con una solución queda un antecedente para el momento de encontrarse de nuevo con situaciones similares.

Durante los estudios como ingeniero en biotecnología se trabajó en salones y laboratorio, en ambos se habla de como se trabaja en laboratorios y plantas fuera de la universidad, pero esta experiencia trabajando en una planta real me abre un panorama nuevo y más amplio de como funcionan las cosas en la industria.

Aunque en este reporte no se refleje el aspecto económico del proyecto, se estuvo trabajando en esta de forma indirecta, se observó en verdad que tanto cuesta para un empresa el desarrollo de un proyecto de este tipo y que toma llevar un producto al mercado, también un poco de los beneficios que trae trabajar con proyectos de nueva tecnología o innovadores a un empresa.

- Aprendizajes sociales

El impacto social de este proyecto, aunque no es tan evidente, aborda aspectos de seguridad alimenticia, impacto en la biodiversidad y programas de innovación. La obtención de fuentes de alimento alternativas con mayor valor nutrimental, menor impacto ambiental y costo es una necesidad latente, esta necesidad ha generado un área de oportunidad para la biotecnología, la producción de los estratos con alto contenido de PUFAs tiene el potencial de reducir impacto ambiental de pesca excesiva, la obtención de un producto con alto nivel nutricional y la generación de nuevos empleos al generar un producto innovador.

La tendencia a una dieta con menor consumo de carne por una considerable parte de la población también ha generado la necesidad de obtención de suplementos dietarios, los PUFAs

Aunque este proyecto fue principalmente para el beneficio de una empresa privada, los resultados pueden traducirse en beneficios para sectores de la población con menor capacidad para adquirir alimentos como carne o por alguna otra razón no puedan consumir carnes a tener una mejor dieta, recordemos que los PUFAs son esenciales en la dieta humana y al quitar o reducir el consumo de carne en la dieta, además ayudar a reducir la producción de carne a nivel industrial tiene un profundo impacto en la liberación de gases de efecto invernadero en la atmosfera, se reporta que alrededor del 14.5 de los gases de efecto invernadero liberados por actividad humana son por parte de la cría de ganado.

No se cumplió con el objetivo de llevar la producción a nivel industrial, por distintos problemas que dieron a lo largo del proyecto (Se tuvo una seria de problemas con los cultivos y principalmente con el equipo de la planta), pero se sientan buenas bases para esto con el proyecto.

- Aprendizajes éticos

Antes de iniciar este proyecto no tenía muchas expectativas o motivación para emprender un negocio, pero al observar y aprender sobre el proceso que se debe llevar y el impacto que puede tener un proyecto este tipo me siento mucho más motivado para iniciar con proyecto. En verdad la experiencia en general fue agradable, aunque en algunos momentos me llevo a enfrentarme a discusiones personales en un ámbito que debería ser mucho más profesional creo que la práctica en estos aspectos también es importante para la vida profesional.

- Aprendizajes en lo personal

Aquí reitero que el proyecto me abrió el panorama en esta parte del emprendimiento e innovación, también veo que estoy mucho mejor preparado para el mundo laboral de lo que pensaba tanto en las habilidades técnicas como en aspecto ético o de convivencia, dentro de la empresa había personas de distintas áreas de México y otros países, el CEO/Manager de biotecnología es de Chile, estuve trabajando con practicantes de Colombia

y Ecuador, en general mi forma de trabajo estaba a la par de ellos y los resultados y métodos de análisis eran bien recibidos.

4. Conclusiones

No se logró completar al en su totalidad el objetivo principal del proyecto, en parte por distintos obstáculos imprevistos, entre estos la muerte en repetidas ocasiones de algunos cultivos, equipo con fallos y también por la aparición de otras actividades dentro de la empresa, a pesar de todo se logró dar buenas bases para la continuación del proyecto, estas bases son: la optimización de F/2 para el crecimiento de *P. tricornutum*, el rendimiento en peso seco de tres medios potenciales para el cultivo y finalmente se planteó una hipótesis sobre la posibilidad de distintos niveles de producción en los distintos medios de cultivo usados, con la optimización de F/2 se logró una mejora del 48% en la tasa de crecimiento, ya con este medio mejorado se encontró un punto óptimo de crecimiento tomando en cuenta las concentraciones de cloruro de sodio y bicarbonato de sodio por lo tanto se considera que se logró hacer una mejora en la producción de biomasa y PUFAs utilizando *P. tricornutum*. Además, se obtuvo el rendimiento en g/L día para dos medios de cultivo potenciales para uso industrial y su control a escala laboratorio (500 mL) aún se necesita determinar el rendimiento a mayores escalas y el perfil bioquímico del organismo al crecer en los distintos medios de cultivo.

6. Bibliografía

1. COECYTJAL (2018) Convocatoria del Programa de Desarrollo de Prototipos (PRODEPRO). Recuperado el 20/11/18 del sitio: <http://www.coecytjal.org.mx/Plataforma/convocatorias/prototipos/Convocatoria%20PRODEPRO%202018%20VF.pdf>
2. Clarys P., et. al. (2014) Comparison of nutritional quality of the vegan, vegetarian, semi-vegetarian, pesco-vegetarian and omnivorous diet. *Nutrients*, 6, 1318-1332; doi:10.3390/nu6031318
3. Chen M., (2012) Optical microplates for high-throughput screening of photosynthesis in lipid-producing algae. *Lab Chip*. 12(20):3870-4. DOI: 10.1039/c2lc40478h
4. Gupta A., et. al. (2012) Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnol Adv*, DOI: 10.1016
5. Ji XJ., et. al. (2015) Omega-3 biotechnology: a green and sustainable process for omega-3 fatty acids production. *Frontier in bioengineering and biotechnology*, DOI: 10.3389
6. Lavens P. (1996) Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture recuperado el 20/11/18 del sitio: <http://www.fao.org/docrep/003/w3732e/w3732e00.htm#Contents>
7. Marin J. (S.F.) Introducción al Diseño de Experimentos. Recuperado el 30/11/18 del sitio: <http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/jmmarin/esp/Disenno/IntroDE.pdf>
8. Martino S., et. al. (2007), GENETIC AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM (BACILLARIOPHYCEAE) ACCESSIONS. *J. Phycol.* 43, 992–1009, DOI: 10.1111
9. Marques M. et. al.(2010) Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *Journal of chemical technology and biotechnology* 85(9), 1184-1198. DOI: 1002/jctb.2387
10. Monika Bojko et.al. (2013) Temperature effect on growth, and selected parameters of *Phaeodactylum tricornutum* in batch cultures. *ACTA Biochemical Polonia*, 60(4)
11. Owen P. Ajay S. (2005) Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry* 40, 3627–3652. DOI:10.1016
12. Sanchez A. et.al. (2003) Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 16 (1)287–297

13. Scheid, C. et. al. (1999). Fluid dynamics of bubbles in liquid. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 16(4), 351-358.
14. Spruijijit J., et. al. (2017) Socio-economic assessment of Algae-based PUFA production. Public Output report of the PUFACHain, 79 pp
15. Steinrücken P., et. al, (2018) Comparing EPA production and fatty acid profiles of three *Phaeodactylum tricornutum* strains under western Norwegian climate conditions. *Algal*
16. UN. (1992) CONVENIO SOBRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA, recuperado el 02/12/17 del sitio: <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
17. W. Yongamanitchai, O.P. Ward (1991) Crecimiento y producción de ácidos grasos omega 3 por *Phaeodactylum tricornutum* en diferentes condiciones de cultivo. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 57(2) 419-425.
18. Xie D. et. al. (2014) Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99. 1599–1610. DOI 10.1007
19. Ying Liang, Minghui Sun, Chuanyuan Tian, Chunhui Cao and Zebang Li (2014) Effects of salinity stress on the growth and chlorophyll fluorescence of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae) *Botanica Marina*, 57(6):469–476.
20. Zhao P. et. al.(2013) Silicon enhances the growth of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin under green light and low temperature *Scientific reports* DOI: 10.1038
21. Sin autor. (2018) Omega 3 Market Size, Share & Trend Analysis Report By Application (Supplements & Functional Foods, Pharmaceuticals, Infant formulas, Pet & Animal Feed), By Region, And Segment Forecasts. Recuperado el 29/11/18 del sitio: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/omega-3-market>

Anexos

Abreviaturas:

Phaeodactylum tricornutum - *P. tricornutum*

Fotobiorreactor horizontal - FBRH

Ácidos grasos poliinsaturados - PUFAs

Tris(hidroximetil)aminometano - Tris

Diseño de experimentos - DOE

densidad óptica - D.O.

tasa de crecimiento - μ