

Datos generales

Almazán Triano Victoria Montserrat

Avilés Álvarez Carolina del Carmen

Zamacona Argudo Angel Gabriel

Ingeniería en Energía y Petróleo

6to Semestre

Proyectos VI

Dra. Patricia Yolanda Contreras Pool

Idea del proyecto: El proyecto “*Producción de hidrógeno de Scenedesmus y Coelastrum*” busca evaluar la capacidad de dos especies de microalgas verdes para generar hidrógeno molecular bajo tres condiciones de cultivo: condiciones nutrimentales completas, limitación de azufre y limitación de potasio. El propósito es identificar las fuentes de electrones y protones implicadas en la actividad de la enzima hidrogenasa, responsable de la producción de hidrógeno, y establecer metodologías de seguimiento metabólico que contribuyan al desarrollo de biocombustibles sostenibles a partir de microalgas.

Objetivo general y específicos:

General

Evaluar la producción de hidrógeno molecular en microalgas verdes (*Scenedesmus* y *Coelastrum*) bajo condiciones nutrimentales completas, con limitación de azufre y con limitación de potasio, mediante la implementación de metodologías de seguimiento metabólico, para identificar las fuentes de electrones y protones involucradas en el proceso.

Específicos

- Implementar metodologías de seguimiento para evaluar los cambios metabólicos durante la producción de hidrógeno a partir de microalgas.
- Implementar metodologías de seguimiento para evaluar los cambios metabólicos durante la producción de hidrógeno bajo limitación de azufre.
- Implementar metodologías de seguimiento para evaluar los cambios metabólicos durante la producción de hidrógeno bajo limitación de potasio.

Diseño del proyecto

El proyecto “Producción de hidrógeno de *Scenedesmus* y *Coelastrum*” fue diseñado con el objetivo de evaluar la capacidad de estas microalgas verdes para producir hidrógeno molecular bajo diferentes condiciones nutrimentales: medio completo, limitación de azufre y limitación de potasio. Para ello, se desarrolló una metodología experimental basada en el cultivo controlado de microalgas y el seguimiento metabólico mediante técnicas de laboratorio.

El diseño experimental inició con la preparación y adaptación de los cultivos en medio TAP, manteniendo condiciones controladas de iluminación y temperatura. Posteriormente, se prepararon medios modificados sin azufre y sin potasio para inducir estrés nutricional y analizar el comportamiento metabólico de las microalgas.

Para el monitoreo del crecimiento y composición bioquímica de las microalgas, se realizaron análisis de clorofila, almidón, proteínas, lípidos y carbohidratos mediante espectrofotometría UV-Vis y otros procedimientos de laboratorio. Entre las metodologías empleadas se incluyeron centrifugación, ruptura celular por baño ultrasónico, calentamiento en baño María y extracción química de biomoléculas.

Memorias de cálculo realizadas

Cálculo de clorofila

La concentración de clorofila se determinó mediante lecturas en espectrofotometría UV-Vis a 645 nm y 663 nm, utilizando curvas de calibración elaboradas previamente.

Cuantificación de proteínas

Para proteínas se utilizó el método de Biuret, empleando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar para construir la curva de calibración.

Cuantificación de carbohidratos

Los carbohidratos fueron analizados mediante reactivo DNS y lectura en UV-Vis a 550 nm.

Extracción de lípidos

La extracción lipídica se realizó utilizando cloroformo y metanol en proporción 7:3 para separar compuestos orgánicos presentes en la biomasa.

Simulación

Debido a la naturaleza biotecnológica y experimental del proyecto, no se realizó una simulación computacional formal. Sin embargo, se efectuó una simulación experimental mediante pruebas preliminares de crecimiento y análisis metabólico de las microalgas bajo diferentes condiciones nutricionales.

Los resultados preliminares permitieron evaluar la eficacia de los métodos de cultivo y análisis. Se observó que *Scenedesmus* presentó mayores concentraciones de clorofila, mientras que ambas especies mostraron incrementos en el contenido de almidón conforme avanzaron los días de cultivo. Estos resultados permitieron validar las metodologías de seguimiento metabólico implementadas.

Asimismo, la preparación de medios TAP modificados y las curvas de calibración desarrolladas permitieron establecer condiciones estandarizadas para las siguientes etapas del proyecto.

Características

Describir los componentes definitivos que se emplearán en el desarrollo del proyecto, como resultado de los resultados de simulación. Incluir los costos de fabricación del prototipo.

El desarrollo del proyecto contempla la integración de diversos componentes y procedimientos experimentales que permiten llevar a cabo el cultivo, monitoreo y análisis de microalgas de manera controlada. A partir de las

pruebas preliminares y análisis realizados en laboratorio, se pudieron identificar los elementos necesarios para el procesamiento de muestras, la caracterización de la biomasa y la obtención de datos experimentales que permitirán continuar con el desarrollo del proyecto.

Componentes del sistema:

- Medio de cultivo TAP modificado: Se empleó un medio nutritivo específico para el crecimiento de microalgas, el cual fue preparado y esterilizado previamente para garantizar condiciones adecuadas de cultivo. Este medio permitirá mantener las microalgas en condiciones controladas y realizar ensayos bajo limitación de nutrientes.
- Microalgas cultivadas: Se trabajó con cultivos de microalgas mantenidos en laboratorio, de los cuales se realizaron tomas periódicas de muestra para analizar su crecimiento y la composición de la biomasa.
- Recipientes de cultivo: Se utilizaron frascos y recipientes de laboratorio para mantener los cultivos de microalgas y facilitar la toma de muestras para los análisis posteriores.
- Espectrofotómetro UV-Vis: Equipo utilizado para la cuantificación de compuestos presentes en la biomasa, como clorofila, carbohidratos, proteínas y lípidos, mediante mediciones de absorbancia a diferentes longitudes de onda.
- Centrifugadora: Utilizada para la separación de la biomasa microalga del medio de cultivo, permitiendo concentrar las muestras y facilitar los procesos de análisis posteriores.
- Baño ultrasónico: Empleado para favorecer la ruptura celular de las microalgas, permitiendo la liberación de los compuestos intracelulares necesarios para los análisis químicos.
- Baño maría: Utilizado para aplicar tratamientos térmicos a las muestras durante los procesos de extracción y preparación para los análisis espectrofotométricos.
- Autoclave: Equipo utilizado para la esterilización de material de laboratorio y medios de cultivo, garantizando condiciones adecuadas y evitando contaminación en los experimentos.
- Liofilizadora: Equipo utilizado para deshidratar muestras mediante congelación y sublimación, conservando sus propiedades químicas y biológicas. Se usa para preservar materiales sensibles al calor.
- Incubadora: Equipo que mantiene condiciones controladas de temperatura para el crecimiento y desarrollo de microorganismos, células o reacciones biológicas en laboratorio.
- Shaker Scorpio: Agitador orbital empleado para mezclar y homogenizar muestras de forma constante, favoreciendo procesos como cultivos microbiológicos y reacciones químicas.
- Cromatografía en columna: Técnica de separación de compuestos basada en la diferencia de afinidad de las sustancias entre una fase móvil y una fase estacionaria dentro de una columna. Se utiliza para purificar y analizar mezclas.
- Material de laboratorio (micropipetas, tubos Eppendorf y tubos Falcon): Herramientas de precisión utilizadas para la toma, manipulación y almacenamiento temporal de las muestras antes de su análisis.

Estos componentes permiten realizar de manera sistemática la preparación de muestras, la extracción de biomoléculas y el análisis de la biomasa microalga, generando información preliminar sobre la composición y comportamiento de los cultivos. Los resultados obtenidos servirán como base para las siguientes etapas del

proyecto relacionadas con el estudio del potencial de las microalgas en procesos de producción de hidrógeno.

Pruebas

Especificar las pruebas realizadas al prototipo. Incluir evidencia fotográfica.

Durante el desarrollo del proyecto se realizaron diversas pruebas experimentales y metodológicas con el propósito de evaluar el crecimiento, comportamiento metabólico y composición bioquímica de las microalgas *Scenedesmus* y *Coelastrum*. Estas pruebas permitieron establecer condiciones adecuadas de cultivo, validar metodologías de análisis y obtener información preliminar sobre el potencial de ambas especies para la producción de hidrógeno.

1. Pruebas de cultivo y adaptación de microalgas

La primera etapa experimental consistió en el establecimiento y mantenimiento de los cultivos de *Scenedesmus* y *Coelastrum* en medio TAP bajo condiciones controladas de laboratorio. Se realizaron tomas periódicas de muestra para monitorear el crecimiento celular y evaluar el estado fisiológico de las microalgas.

Durante esta etapa se prepararon y esterilizaron medios TAP modificados sin azufre y sin potasio, los cuales serían utilizados posteriormente para inducir condiciones de estrés nutricional. Asimismo, se monitoreó constantemente el pH de los cultivos, ajustándolo a valores cercanos a 8 para evitar afectaciones en el crecimiento de las microalgas.

También se realizaron procesos de concentración de biomasa mediante decantación y precipitación química utilizando hidróxido de sodio (NaOH), especialmente en muestras de *Scenedesmus*, con el objetivo de incrementar la cantidad de biomasa disponible para posteriores análisis bioquímicos y pruebas de producción de hidrógeno.

2. Pruebas de calibración y espectrofotometría UV-Vis

Con el objetivo de asegurar resultados confiables en los análisis bioquímicos, se realizaron pruebas de calibración del espectrofotómetro UV-Vis y elaboración de curvas estándar para clorofila, almidón y proteínas.

Para la cuantificación de almidón se compararon diferentes tipos de estándares, específicamente almidón de maíz y almidón de papa. Después de analizar las curvas de calibración obtenidas, se determinó que el almidón de maíz presentaba una respuesta más estable y reproducible, por lo que fue seleccionado como estándar oficial para los análisis posteriores.

En el caso de la clorofila, las muestras fueron tratadas con acetona al 80% y posteriormente analizadas mediante lecturas espectrofotométricas a 645 nm y 663 nm. Estas pruebas permitieron monitorear la actividad fotosintética y el crecimiento de las microalgas durante el cultivo.

Asimismo, para proteínas se utilizó el método de Biuret empleando albúmina sérica bovina (BSA) como proteína patrón para generar curvas estándar y calcular concentraciones proteicas en las muestras analizadas.

3. Pruebas de ruptura celular y procesamiento de biomasa

Con el propósito de facilitar la extracción de biomoléculas presentes en las microalgas, se realizaron diferentes pruebas de procesamiento de biomasa. Entre ellas el uso de baño ultrasónico, el cual permitió romper parcialmente

la pared celular y favorecer la liberación de compuestos intracelulares.

Posteriormente, las muestras fueron sometidas a calentamiento en baño María a temperaturas de entre 90 °C y 100 °C durante distintos periodos de tiempo dependiendo del análisis requerido. Estas pruebas permitieron optimizar la extracción de carbohidratos y mejorar la eficiencia de las metodologías analíticas implementadas.

También se realizaron múltiples procesos de centrifugación para separar biomasa y sobrenadantes, permitiendo obtener muestras más concentradas y adecuadas para los análisis posteriores.

4. Pruebas de cuantificación de carbohidratos

Para el análisis de carbohidratos se aplicó el método basado en reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico). Primero, la biomasa fue tratada con NaOH y sometida a calentamiento para favorecer la liberación de azúcares presentes en las células microalgales. Posteriormente, se añadía el reactivo DNS y la mezcla se calentaba nuevamente antes de realizar la lectura en el espectrofotómetro UV-Vis a 550 nm.

Estas pruebas permitieron cuantificar el contenido de carbohidratos presentes tanto antes como después de los tratamientos experimentales, ayudando a identificar cambios metabólicos relacionados con las condiciones de cultivo y producción de hidrógeno.

5. Pruebas de cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando el método de Biuret. Para ello, se prepararon muestras patrón con diferentes concentraciones de BSA y posteriormente se analizaron junto con las muestras de biomasa microalgal.

Durante estas pruebas se observaron cambios de coloración de azul a morado dependiendo de la concentración de proteínas presentes en cada muestra. Los resultados permitieron construir curvas de calibración y determinar las concentraciones proteicas de las microalgas bajo diferentes condiciones experimentales.

6. Pruebas de extracción y análisis de lípidos

Las pruebas de extracción de lípidos se realizaron utilizando mezclas de cloroformo y metanol en proporción 7:3. La biomasa previamente liofilizada fue sometida a agitación e incubación a 45 °C para favorecer la disolución de compuestos orgánicos presentes en las células.

Posteriormente, el sobrenadante obtenido fue separado y dejado en evaporación para eliminar los solventes y recuperar únicamente los lípidos extraídos. Además, se realizaron pruebas de separación mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel, hexano, acetato de etilo y metanol como fases móviles.

Durante la cromatografía se observaron distintas coloraciones en las fracciones obtenidas, lo cual indicó la separación exitosa de diferentes compuestos presentes en los extractos lipídicos de las microalgas.

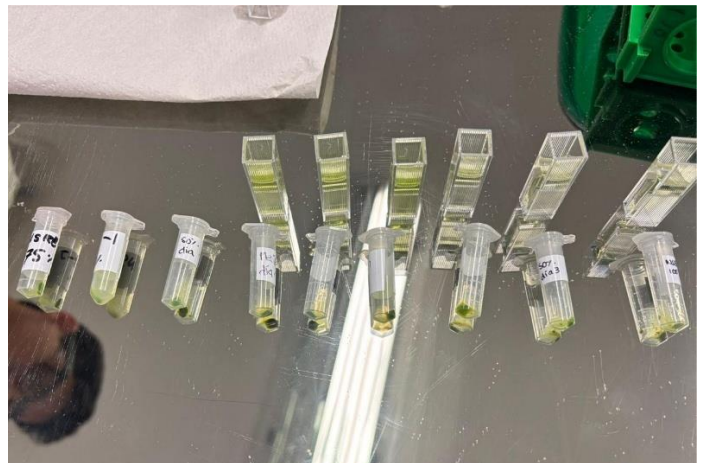
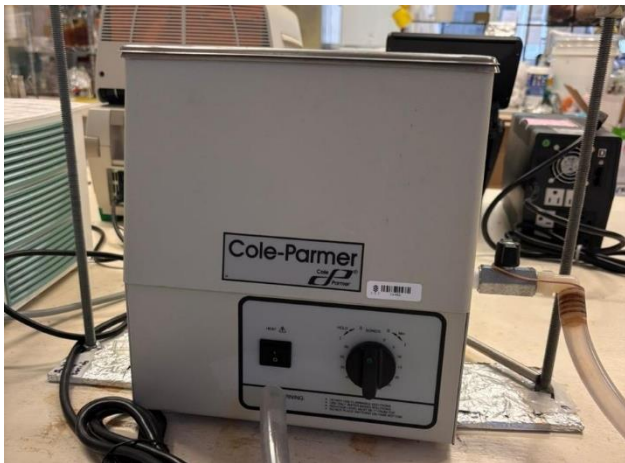
7. Pruebas de biomasa seca

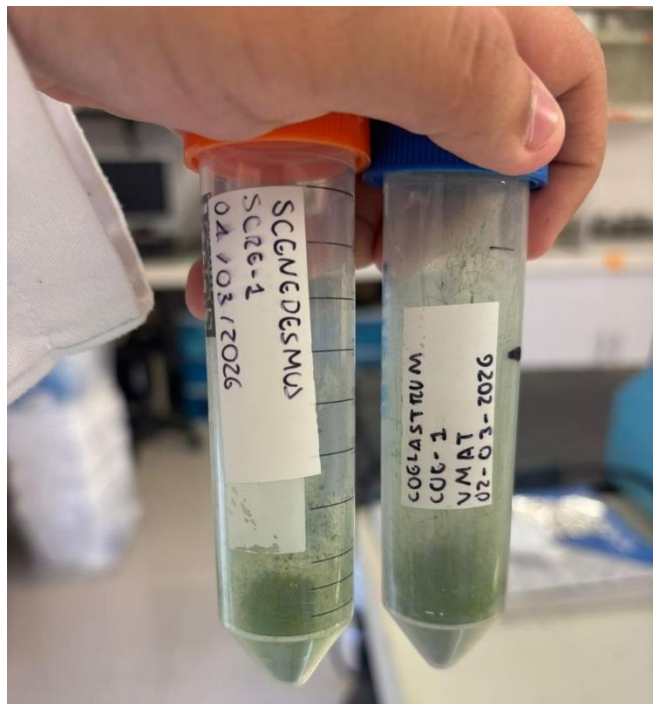
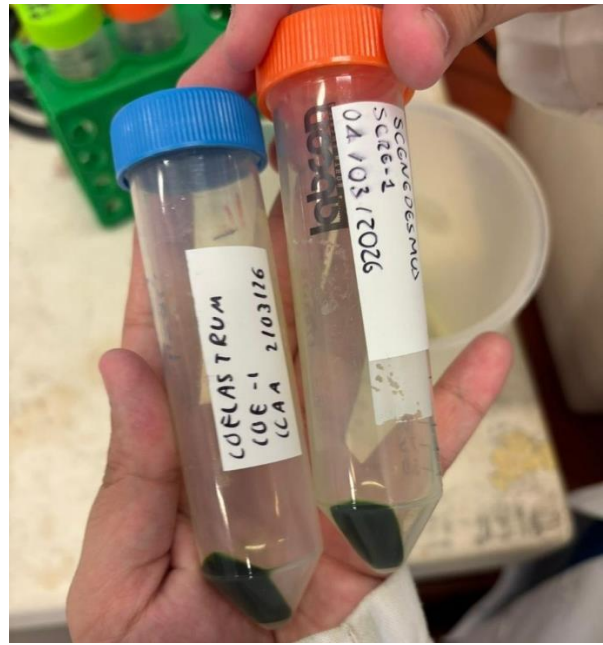
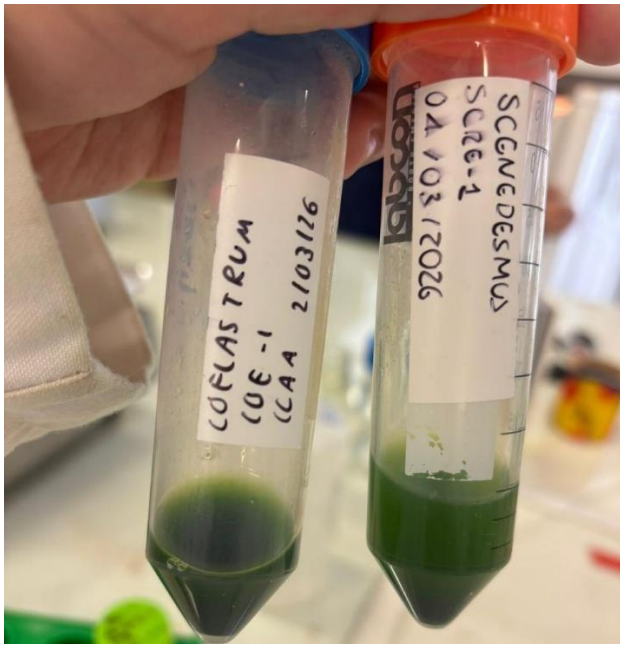
Con el objetivo de determinar la cantidad de biomasa producida por las microalgas, se realizaron pruebas de

filtración y secado utilizando filtros previamente acondicionados en horno.

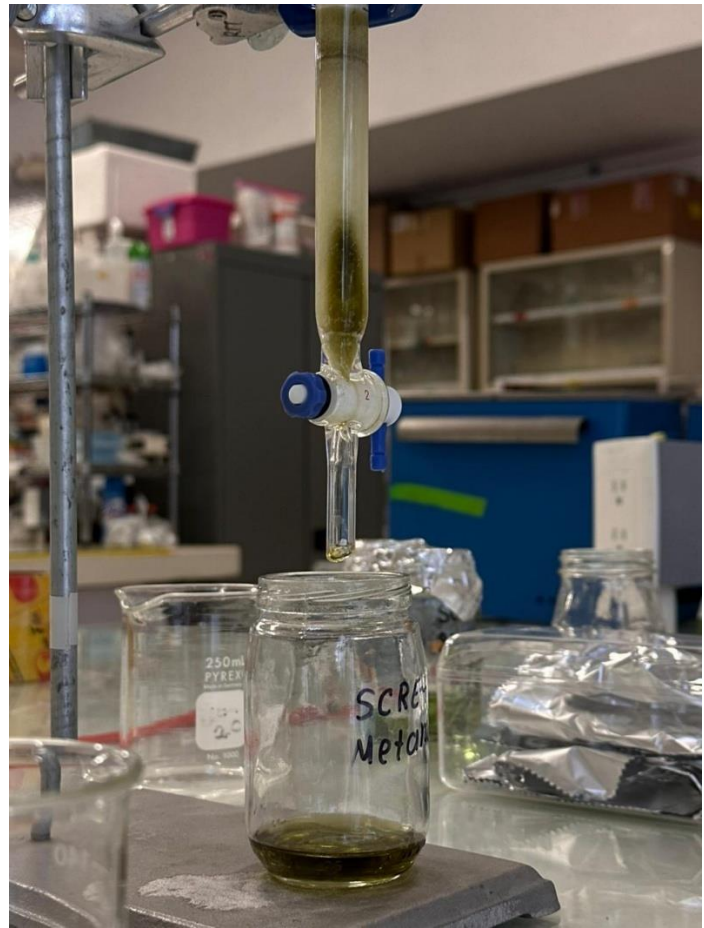
Los filtros fueron pesados antes y después de la filtración de las muestras para calcular la masa seca de biomasa retenida. Posteriormente, las muestras fueron nuevamente secadas para eliminar humedad residual y garantizar resultados más precisos en la cuantificación.

8. Evidencia fotográfica de las pruebas









Resultados

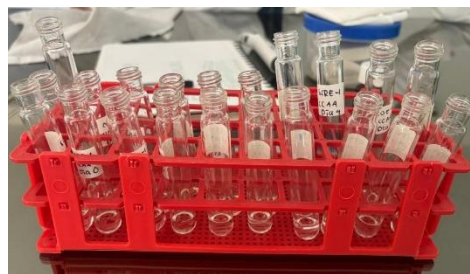
Los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto permitieron establecer metodologías experimentales confiables para el análisis bioquímico y metabólico de las microalgas *Scenedesmus* y *Coelastrum*, así como evaluar su crecimiento y comportamiento bajo condiciones nutrimentales completas. Durante esta primera etapa se logró mantener cultivos estables de ambas especies en condiciones controladas de laboratorio, observándose un crecimiento adecuado y una buena adaptación al medio TAP utilizado en los experimentos.

Clorofila	645 nm	663 nm
- Coe-1 > Coe-2 Dia 2	0.0645	0.0554
- SCRE-1 > Coe-2 Dia 2	0.1516	0.1118
- SCRE-1 > Coe-2 Dia 3	0.0606	0.0581
- SCRE-1 > Coe-2 Dia 4	0.0384	0.4251
- SCRE-1 > Coe-2 Dia 4	0.4812	0.2353
- Coe-1 > Vichuaz Dia 4	0.1542	0.0429
- Coe-1 > Vichuaz Dia 3	0.0554	0.1094
- SCRE-1 > Vichuaz Dia 1	0.0605	0.1106
- SCRE-1 > Coe-2 Dia 4	0.0826	0.0609
- Coe-1 > Coe-2 Dia 1	0.02	0.007
- Coe-1 > Vichuaz Dia 2	0.034	0.035
- SCRE-1 > Vichuaz Dia 5	0.0161	0.0095
- Coe-1 > Coe-2 Dia 5	0.0651	0.0774
- Coe-2 > Coe-2 Dia 4	0.0551	0.4787
- SCRE-1 > Vichuaz Dia 2	0.0507	0.068
- Coe-1 > Vichuaz Dia 1	0.0068	0.0066
- SCRE-1 > Coe-2 Dia 0	0	0.0241
- Coe-1 > Coe-2 Dia 0	0.0552	0.0183
- Coe-1 > Vichuaz Dia 0	0.0189	0.0251
- SCRE-1 > Vichuaz Dia 0	0.0135	
almidon (600nm)	0.0174	
- SCRE-1 > Vichuaz Dia 0	0.0174	
- SCRE-1 > Coe-2 Dia 0	0.0110	
- Coe-1 > Vichuaz Dia 0	0.0163	
- Coe-1 > Coe-2 Dia 0	0.0139	
- SCRE-1 > Vichuaz Dia 1	0.0376	
- Coe-1 > Coe-2 Dia 1	0.0765	
- Coe-1 > Vichuaz Dia 1	0.0190	
- Coe-1 > Coe-2 Dia 1	0.0156	
- Coe-1 > Vichuaz Dia 2	0.0760	
- SCRE-1 > Coe-2 Dia 2	0.0655	

Mediante el monitoreo periódico de las muestras utilizando espectrofotometría UV-Vis, fue posible analizar las variaciones en las concentraciones de clorofila y almidón presentes en la biomasa. Los resultados mostraron que *Scenedesmus* presentó mayores concentraciones de clorofila en comparación con *Coelastrum*, lo cual indica una mayor actividad fotosintética durante el periodo de cultivo. Asimismo, ambas especies mostraron incrementos en el contenido de almidón conforme avanzaron los días de monitoreo, principalmente hacia las últimas etapas del cultivo, evidenciando acumulación de reservas energéticas dentro de las células microalgales.

Otro resultado importante fue la correcta estandarización de los métodos de análisis empleados en el laboratorio. Durante las pruebas de calibración se compararon distintos tipos de almidón para la elaboración de curvas estándar, determinándose que el almidón de maíz presentaba una respuesta más estable y reproducible que el almidón de papa. Esto permitió seleccionarlo como estándar para las posteriores cuantificaciones de carbohidratos y biomasa. Asimismo, se logró calibrar adecuadamente el espectrofotómetro UV-Vis para el análisis de clorofila, proteínas y carbohidratos, obteniendo curvas de calibración funcionales que facilitarán futuras etapas experimentales.

En relación con los análisis bioquímicos, se realizaron exitosamente pruebas de extracción y cuantificación de proteínas, lípidos y carbohidratos presentes en las microalgas. Para el análisis de proteínas se utilizó el método de Biuret, empleando albúmina sérica bovina (BSA) como proteína patrón para construir curvas de calibración y determinar concentraciones proteicas en las muestras estudiadas. Durante las lecturas se observaron cambios de coloración relacionados con la concentración de proteínas presentes en cada muestra, lo que confirmó el correcto funcionamiento de la metodología utilizada.



De acuerdo con el cronograma inicial, durante la semana del **09 al 13 de febrero** se realizaron las curvas de calibración de clorofila y almidón mediante espectrofotometría UV-Vis, además de la preparación y esterilización de medios de cultivo y material de laboratorio. Posteriormente, en la semana del **16 al 20 de febrero** se llevó a cabo la recolección de biomasa y procesos de precipitación para concentrar las microalgas y facilitar los análisis posteriores.

Durante la semana del **23 al 27 de febrero** se realizó la cuantificación de clorofila y almidón mediante lecturas espectrofotométricas, permitiendo obtener datos preliminares sobre el crecimiento y comportamiento metabólico de *Scenedesmus* y *Coelastrum*. Más adelante, en la semana del **02 al 06 de marzo**, se efectuaron pruebas de extracción de lípidos, proteínas y carbohidratos utilizando distintos métodos de procesamiento y extracción química de biomoléculas presentes en la biomasa.

En la semana del **09 al 13 de marzo** se desarrolló la evaluación bioquímica mediante análisis en UV-Vis para proteínas, lípidos y carbohidratos. Posteriormente, durante la semana del **16 al 20 de marzo** se realizaron actividades de filtración, secado y cuantificación de biomasa y lípidos, incluyendo el uso de filtros y procesos de evaporación de solventes para recuperar compuestos orgánicos.

Durante la semana del **23 al 27 de marzo** se llevó a cabo la cuantificación de proteínas mediante el método de Biuret y la elaboración de curvas de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Posteriormente, en la semana del **13 al 17 de abril**, se realizó una nueva extracción de lípidos y preparación de muestras para análisis adicionales de proteínas y carbohidratos.

Finalmente, durante la semana del **27 de abril al 07 de mayo** se desarrolló la cromatografía en columna para la separación de compuestos presentes en los extractos lipídicos obtenidos de *Coelastrum*, utilizando distintas mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol como fases móviles.

Sin embargo, con base en las actividades realizadas y los resultados obtenidos a lo largo de las semanas, el cronograma inicial tuvo que ajustarse ligeramente para adaptarse al tiempo real requerido por las metodologías experimentales y al avance del proyecto. Debido a ello, actualmente se manejan dos cronogramas: uno correspondiente a las actividades ya realizadas y otro enfocado en las actividades programadas para las siguientes etapas relacionadas directamente con la producción de hidrógeno.

****De acuerdo con el cronograma semanal, durante la semana del 11 al 15 de mayo se iniciará la etapa experimental de producción de hidrógeno mediante fermentación anaerobia. En esta fase se trabajará con la eliminación de oxígeno presente en los medios de cultivo mediante inyección de nitrógeno para generar condiciones anaerobias adecuadas para las microalgas.**

Posteriormente, se trabajará bajo tres condiciones experimentales:

- Condiciones de cultivo completas
- Condiciones de cultivo bajo limitación de azufre
- Condiciones de cultivo bajo limitación de potasio

Asimismo, durante esta etapa se realizará un monitoreo bioquímico diario mediante muestras de 2 mL para

cuantificar clorofila y almidón antes, durante y después del proceso de producción de hidrógeno. Finalmente, en la semana del **10 de junio** se contempla realizar el análisis comparativo del comportamiento metabólico de *Scenedesmus* y *Coelastrum* bajo las distintas condiciones nutrimentales evaluadas.

Actividades	Plan										
Descripción	09-13 feb	16-20 feb	23-27 feb	02-06 mar	09-13 mar	16-20 mar	23-27 mar	13-17 abr	27 abr - 7 may	11-15 maj	10-jun
Re siembra de cultivos (<i>Scenedesmus</i> y <i>Coelastrum</i>)											
Inducción de condiciones anaerobias (activación de hidrogenasa)											
Condiciones de cultivo completas											
Condiciones de cultivo bajo limitación de S											
Condiciones de cultivo bajo limitación de K											
Monitoreo bioquímico (lípidos, proteínas, carbohidratos)											
Monitoreo de producción de H ₂ (sensores y cromatografía de gases)											
Análisis comparativo y conclusiones (factibilidad científica y tecnológica)											
Participación en Expotrónica											