

PRODUCTIVIDAD DE PIGMENTOS DE VALOR AGREGADO EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 UTILIZANDO COMO MEDIO DE CULTIVO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO ORGÁNICO

**YUDY LORENA CRISTANCHO DELGADO
DAVID LAGOS CELIS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

PRODUCTIVIDAD DE PIGMENTOS DE VALOR AGREGADO EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 UTILIZANDO COMO MEDIO DE CULTIVO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO ORGÁNICO

**YUDY LORENA CRISTANCHO DELGADO
DAVID LAGOS CELIS**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de
INGENIERO QUÍMICO

Directores

Ph.D. **Viatcheslav Kafarov**

M.Sc. **Crisóstomo Barajas**

Codirector

Biólogo. **Andrés Fernando Barajas Solano**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

*A mi madre, Carmenza.
Nadie ha recibido más cariño, más comprensión,
ni un apoyo tan incondicional como el que tú me has dado.
Por ti soy lo que soy.*

*A mi papá, Maxi
Siempre sé que puedo contar contigo.*

*A Francisco,
por su amor, amistad, sentido del humor y paciencia.*

*A mi nonita (q.e.p.d.)
que fue ternura en mi vida,
y parte crucial en la realización de este trabajo.
Quien estoy segura, en estos momentos está orgullosa de mí.*

Yudy

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a:

La Universidad Industrial de Santander.

A la Escuela de Ingeniería Química, especialmente a Lina Jazmín Afanador Díaz y al Ingeniero Jesús Manuel Mendoza, que me orientaron durante todo este proceso que hoy culmina.

Al doctor Viatcheslav Kafarov por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación.

Al ingeniero Crisóstomo Barajas, por sus valiosas orientaciones.

Al mi codirector, Andrés Fernando Barajas, por su invaluable apoyo y guía para culminar este trabajo.

Al laboratorio de biomasa y sus integrantes.

A la familia Quintero Delgado, en donde encontré un segundo hogar; han sido alegría, optimismo y relax para hacer más llevaderos los momentos difíciles.

A Francisco, por todo su tiempo y su adorable disposición para acompañarme durante la elaboración de este trabajo.

Finalmente, esto no habría sido posible sin el apoyo de mis amigos de colegio y universidad, que compartieron, apoyaron, animaron, escucharon, orientaron, enseñaron... en especial Angelita, Delcy, Diana y Elizabeth que me acompañaron en esta época de mi vida.

Yudy Lorena Cristancho D.

A Dios por darme la fuerza, el amor y el poder de culminar este proyecto, y porque Él es bueno y grande para llevar de victoria en victoria a todos aquellos que le aman y le creen.

A mi Padre Misael Lagos Ángel por brindarme su apoyo en todas la áreas de mi vida, y ayudarme en el cumplimiento de este proyecto de vida.

A mi Madre Rosa María Celis, por su apoyo en cada uno de los momentos de mi vida.

Al Biólogo Andrés Barajas, por su colaboración y paciencia en la realización de este trabajo de Grado.

Y a todas las personas que de una u otra forma ayudaron a la realización de este proyecto.

David Lagos Celis

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO TEÓRICO	20
1.1. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS	20
1.1.1. Clorofila	20
1.1.1.1. <i>Clorofila a</i>	21
1.1.1.2. <i>Clorofila b</i>	21
1.1.2. Carotenoides	22
1.2. CRECIMIENTO MICROBIANO	23
1.3. MICROALGAS	24
1.3.1. <i>Chlorella</i> sp.	25
1.4. PARÁMETROS DE CULTIVO	26
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
2.1. CULTIVO	28
2.2. EXTRACCIÓN	29
2.2.1. Recuperación de biomasa microalgal.	30
2.2.2. Extracción de pigmentos	30
2.3. MEDICIONES Y CÁLCULOS	30
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	33
3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
4. CONCLUSIONES	43

RECOMENDACIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura de las moléculas de chl a y chl b.	22
Figura 2. Esquema que representa la curva típica de crecimiento durante el desarrollo normal de un cultivo.	24
Figura 3. Esquema de la metodología experimental.	27
Figura 4. Resumen de concentraciones promedio para el tratamiento con acetato, obtenidas en extracción con (a) Etanol 95% (b) Metanol 90% (c) Metanol 99%. En los cultivos (1) 10 mM Acetato/0,97 mM Nitrato; (2) 10 mM Acetato/0 mM Nitrato; (3) 20 mM Acetato/ 0,97 mM Nitrato.	33
Figura 5. Resumen de concentraciones promedio en el tratamiento con ácido acético obtenidas en extracción con (a) Etanol 95% (b) Metanol 90% (c) Metanol 99%. En los cultivos (4) 2,49 mM Ácido acético/2,78mM Nitrato; (5) 2,49 mM Ácido acético/1,39 mM Nitrato.	34
Figura 6. Productividad de pigmentos extraídos con etanol 95% en todos los cultivos (1) 10 mM Acetato/0,97 mM Nitrato; (2) 10 mM Acetato/0 mM Nitrato; (3) 20 mM Acetato/ 0,97 mM Nitrato (4) 2,49 mM Ácido acético/2,78mM Nitrato; (5) 2,49 mM Ácido acético/1,39 mM Nitrato.	37
Figura 7-B1. Concentración de biomasa en cultivo 1 durante los primeros cinco días.	53
Figura 8-B2. Concentración de biomasa en cultivo 2 durante los primeros cinco días.	54
Figura 9-B3. Concentración de biomasa en cultivo 3 durante los primeros cinco días.	55
Figura 10-B4. Concentración de biomasa en cultivo 4 durante los primeros cinco días.	56
Figura 11-B5. Concentración de biomasa en cultivo 5 durante los primeros cinco días.	57

Figura 12-C1. Efecto de la concentración de Clorofila a utilizando Etanol 95%, Metanol 90% y Metanol 99%.	58
Figura 13-C2. Efecto de la concentración de Clorofila b utilizando Etanol 95%, Metanol 90% y Metanol 99%.	58
Figura 14-C3. Efecto de la concentración de carotenoides totales utilizando Etanol 95%, Metanol 90% y Metanol 99%	59
Figura 15-C4. Efecto de la concentración de clorofila a en los cinco cultivos.	60
Figura 16-C5. Efecto de la concentración de clorofila b en los cinco cultivos.	61
Figura 17-C6. Efecto de la concentración de carotenoides en los cinco cultivos.	62

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Modificación de concentraciones de carbono y nitrógeno en los cultivos.....	29
Tabla 2. Resumen test de homogeneidad y normalidad para chl a en los cinco cultivos.....	39
Tabla 3. Resumen test de homogeneidad y normalidad para chl b en los cinco cultivos.....	39
Tabla 4. Resumen test de homogeneidad y normalidad para (x+c) en los cinco cultivos.....	40
Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) para chl a, chl b y (x+c) según solvente de extracción en los cinco cultivos.....	41
Tabla 6. Prueba de Tuckey para carotenoides totales en el cultivo 2.	42
Tabla 7. Prueba de Tuckey para clorofila b en el cultivo 4.....	42
Tabla 8-A1. Preparación de las soluciones Stock.....	51
Tabla 9-A2. Modificaciones de nitrógeno hechas a los cultivos mediante la manipulación de la cantidad de solución de nitrato de sodio (stock 1).	52

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Medio BOLD BASAL.....	51
ANEXO B. Datos experimentales	53
ANEXO C. Análisis estadístico	58

RESUMEN

TITULO: PRODUCTIVIDAD DE PIGMENTOS DE VALOR AGREGADO EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 UTILIZANDO COMO MEDIO DE CULTIVO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO ORGANICO.*

AUTORES: Yudy Lorena Cristancho, David Lagos Celis.**

PALABRAS CLAVES: *Chlorella vulgaris*, pigmentos fotosintéticos, cultivo mixotrófico, etanol, metanol, clorofila a, clorofila b, carotenoides.

DESCRIPCIÓN

El estudio de los pigmentos fotosintéticos ha sido de gran importancia en los últimos años en la producción de cultivos energéticos, industria alimentaria y cosmética.

Dada la importancia de estos pigmentos como la clorofila *a*, la clorofila *b* y los carotenoides, se realiza el presente trabajo con el objetivo de determinar el mejor solvente para extracción de los mismos en cultivo de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

En la etapa experimental se midió la concentración de pigmentos en cinco diferentes cultivos mixotróficos, utilizando etanol 95%, metanol 90% y metanol 99% como solventes de extracción. Los cultivos se desarrollaron en medio Bold Basal, variando entre uno y otro la concentración de nitrógeno (N) y fuente de carbono en el medio, así: 10 mM Acetato/0,97 mM Nitrato; 10 mM Acetato/0 mM Nitrato; 20 mM Acetato/0,97 mM Nitrato; 2,495 mM Ácido acético/1,39 mM Nitrato; 2,495 mM Ácido acético/2,78 mM Nitrato.

Los resultados destacan el etanol al 95% como el mejor solvente de extracción para todos los pigmentos medidos en los cultivos realizados. La mayor productividad de la clorofila *a* y *b* clorofila y carotenoides totales se obtuvo en medio de cultivo 0 mM Nitrato y 10 mM de acetato.

Este trabajo hace parte del proyecto “Bioprospección de Microalgas Colombianas para la producción de biodiesel” código 2008D32006-6710 financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, con la participación de la Universidad Industrial de Santander, el Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL y la Corporación Instituto de Morrosquillo.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Ph.D. Viatcheslav Kafarov y M.Sc. Crisóstomo Barajas. Codirector: Biólogo Andrés Fernando Barajas.

ABSTRACT

TITLE: PRODUCTIVITY OF VALUE-ADDED PIGMENTS IN *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803 USING DIFFERENT SOURCES OF ORGANIC CARBON AS CULTURE MEDIA.*

AUTHORS: Yudy Lorena Cristancho, David Lagos Celis.**

KEYS WORDS: *Chlorella vulgaris*, photosynthetic pigments, mixotrophic culture, ethanol, methanol, chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids.

DESCRIPTION

The study of photosynthetic pigments has been very important in recent years in the production of energy crops, food and cosmetic industries.

Given the importance of these pigments such as chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids, this work is done in order to determine the best solvent for extraction of the same in growing *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

The pigments concentration change in *Chlorella* biomass was studied with different extraction solvents and culture media. The algal strain investigated was *Chlorella vulgaris* UTEX 1803; it's cultivation was performed in bold basal medium, with sodium nitrate (NaNO₃) as nitrogen (N) source, acetic acid (CH₃COOH) and sodium acetate (CH₃COONa) as carbon (C) sources. Five mixotrophic cultures were carried out with different C and N concentrations in medium: 10 mM Acetate/0,97 mM Nitrate; 10 mM Acetate/0 mM Nitrate; 20 mM Acetate/0,97 mM Nitrate; 2,495 mM Acetic acid/1,39 mM Nitrate; 2,495 mM Acetic acid/2,78 mM Nitrate. The pigments measured were chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids. Ethanol 95%, methanol 90% and 99% were used as solvent extracting.

Results highlight the ethanol 95% as the best extractor agent for all pigments measured in all cultures performed. The higher productivity of chlorophyll a, chlorophyll and total carotenoids were obtained in culture medium 0 Mm Nitrate and 10 mM acetate.

This work is part of the "Bioprospecting Colombian Microalgae for biodiesel production" code 2008D32006-6710 funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development, with the participation of the Universidad Industrial de Santander, the Colombian Petroleum Institute ICP-ECOPETROL and Morrosquillo Institute Corporation.

* Research project

**Physical-Chemical Engineering College. Chemical Engineering Department. Advisors: Ph.D. Viatcheslav Kafarov and M.Sc. Crisóstomo Barajas. Ph.D student research assistant: Andrés Fernando Barajas.

INTRODUCCIÓN

La producción a gran escala de cultivos energéticos para la producción de biodiesel a partir de microalgas como *Chlorella vulgaris*, no solo produce lípidos, sino una gran cantidad de metabolitos que pueden ser utilizados en otros procesos [1-3].

Entre estos metabolitos, los pigmentos fotosintéticos como la clorofila son esenciales en muchos productos de uso diario, se utiliza no solo como aditivos en productos farmacéuticos y cosméticos, sino también como agente colorante natural, además posee propiedades antioxidantes y antimutagénicas [4]; sin embargo, aun conociendo su valor, estos pigmentos no son aprovechados debido a que son extraídos junto con los lípidos.

La clorofila *a* y la clorofila *b* son las más conocidas y las más abundantes. Se encuentran en todos los organismos fotosintéticos (plantas, ciertos protistas, cianobacterias y algas. La clorofila *b* se diferencia de la clorofila *a* por tener sustituido el grupo metilo (-CH₃) del carbono tres en el segundo anillo pirrólico, por un grupo aldehído (-CHO), diferencia que es suficiente para causar un cambio notable en la coloración como también en el espectro de absorción de esta molécula [5].

Los carotenoides son pigmentos fotosintéticos como el rojo, el naranja y el amarillo, encontrados en los tejidos vegetales, en algas y en microorganismos, también son responsables de los colores de las plumas de alguna aves [6]; estos se clasifican en dos grupos en carotenos y xantofilas, los carotenos no contienen carbono e hidrogeno mientras que las xantofilas contienen además oxigeno (por ejemplo la luteína) [7].

Uno de los retos más importantes en el análisis de pigmentos ha sido la cuantificación de las clorofilas en los alimentos frescos y procesados; la determinación de la cantidad de la clorofila presente en las plantas verdes y organismos del agua se ha hecho indispensable, por eso la importancia de buscar el mejor solvente para extraer y determinar la mayor cantidad de pigmentos [8].

En este trabajo se evaluará el efecto de los solventes para la obtención de pigmentos fotosintéticos clorofila a, clorofila b, y carotenoides utilizando tres tipos de solventes (Etanol 95%, Metanol 90% y Metanol Puro), y así, determinar cuál es el mejor extractante.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Para que la energía lumínica pueda ser aprovechada por los sistemas vivos, primero debe ser absorbida y son los pigmentos fotosintéticos los encargados de esta tarea [9-10]. Estos pigmentos están presentes en organismos fotosintetizadores (fotosintéticos) como son plantas, algas y algunas bacterias [11]; a pesar de no ser producidos por animales y humanos, son fundamentales para el funcionamiento de su organismo [12-13].

Los pigmentos son funcionalmente importantes en los organismos fotosintéticos no solo por capturar la energía lumínica necesaria para la reducción del carbono, además, algunos sirven para proteger el organismo [14]. Se dividen en dos grupos, las clorofilas, y los carotenoides [14-15].

Teóricamente, la concentración de clorofilas depende de factores como la especie de algas, la composición taxonómica y la función de la clorofila. Además, la variabilidad de la clorofila puede ser fuertemente influenciada por los cambios fisiológicos en la pigmentación intracelular en respuesta a las cambiantes condiciones de crecimiento (luz, nutrientes, temperatura) y es relativamente insensible a los cambios en el contenido de pigmento intracelular [16].

1.1.1. Clorofila.

Es el pigmento natural más abundante [17], y se encarga de proveer a las plantas con su color verde característico, además es considerada una de las sustancias de mayor valor para la vida [18-19]. La principal función de la clorofila es capturar la luz solar y redireccionar esta energía al centro de reacción donde se utiliza

posteriormente para la conversión del carbono y el agua en hidratos de carbono con liberación de oxígeno [20].

Es esencial en muchos productos de uso diario, se utiliza no solo como aditivos en productos farmacéuticos y cosméticos, sino también como agente colorante natural, además posee propiedades antioxidantes y antimutagénicas [21].

Hay dos tipos principales de clorofila, las cuales difieren entre sí en su estructura molecular, como en sus propiedades de absorción específica. Estas son la clorofila a (*chlorophyll a, chl a*) y la clorofila b (*chlorophyll b, chl b*) [22].

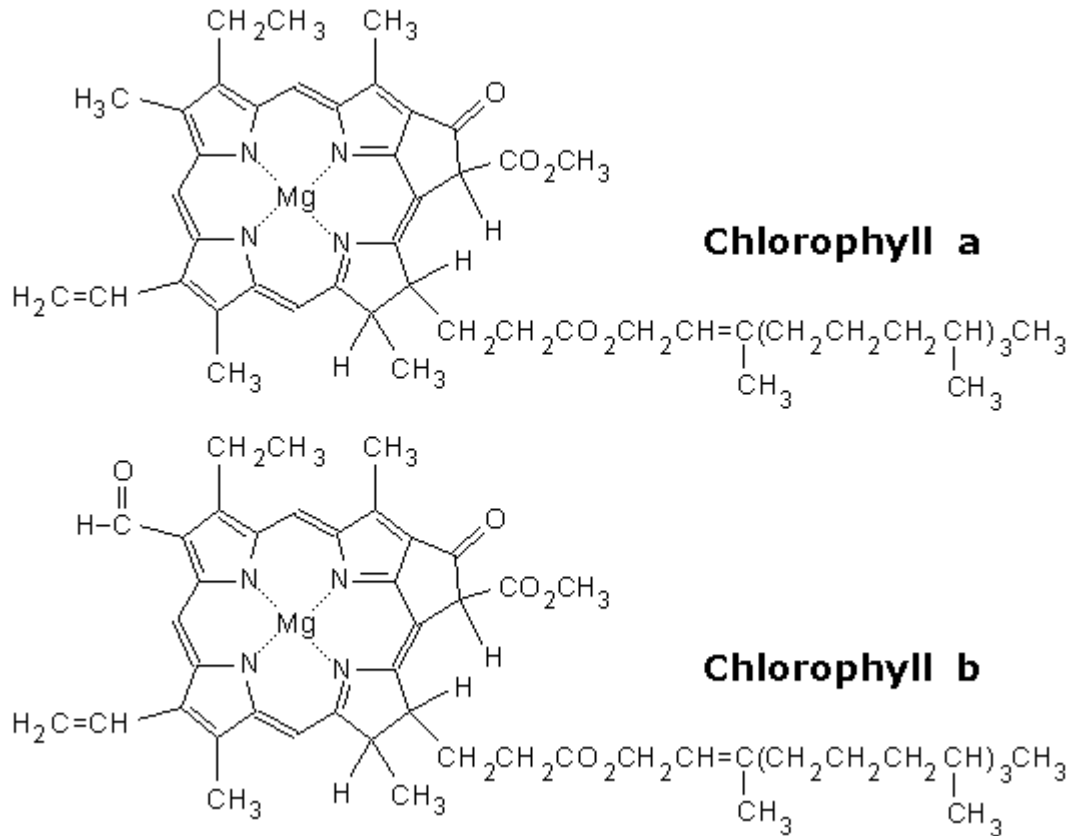
1.1.1.1. Clorofila a.

La chl a se encuentra en todas las algas fotosintéticas; en promedio, el 1,5% de materia orgánica de las algas es la chl a [23-24]. En su estructura contiene un ión de magnesio suspendido en un anillo de porfirina que contiene nitrógeno. Unido al anillo hay una larga cadena de hidrocarburos, formando un hidrófobo.

1.1.1.2. Clorofila b.

La chl b está confinada solo a las algas verdes y verde-azules [25-26]. Aunque no está directamente implicada en la transducción de energía fotosintética, es de gran importancia pues amplía la gama de luz que se puede usar en la fotosíntesis; cuando una molécula de clorofila b absorbe luz, la energía es finalmente transferida a una molécula de chl a, que luego se transforma en energía química durante el curso de la fotosíntesis [26]. Estructuralmente, la chl a difiere de la chl b en tener un grupo -CH₃ en lugar del grupo -CHO, como se muestra en la figura 1[18].

Figura 1. Estructura de las moléculas de chl a y chl b.



Fuente: Food info: Chlorophyll [18].

1.1.2. Carotenoides.

Estos colorantes amarillos y rojos en general consisten de una cadena larga de hidrocarburo, por esto son compuestos insolubles en agua, pero sí en solventes grasos. Se dividen en Carotenos (menos del 10%) que son hidrocarburos insaturados y en Xantofilas que son derivados oxigenados de los anteriores. [25, 27].

Los carotenoides (x+c) juegan un papel importante en la protección de la membrana lipídica de los daños de oxidación al eliminar el exceso de energía capturada por la clorofila [28]. Esta función protectora es la que los hace esenciales para la salud humana (basados en el entendimiento de nutrición de vitamina A (retinol) y β -caroteno).

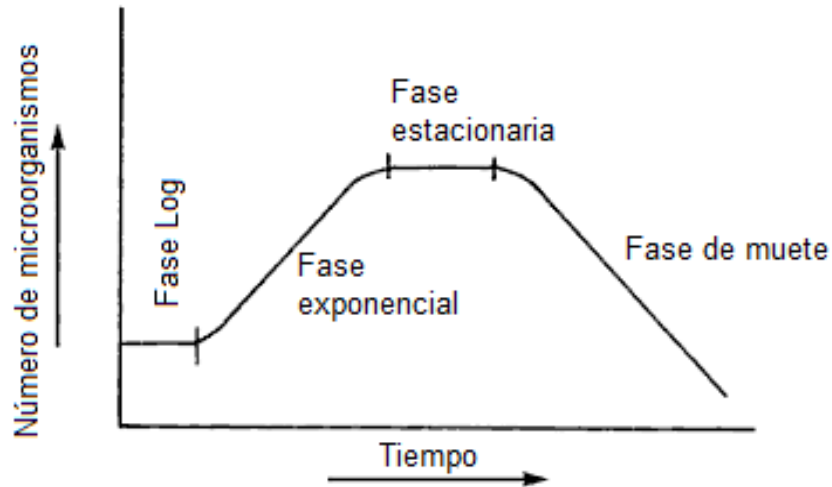
La biosíntesis de carotenoides en microalgas depende de la especie, además está regulado por el estado del microorganismo, dependiendo notablemente del estrés impuesto por las condiciones ambientales, tales como las desviaciones de los valores normales de salinidad, temperatura, concentración de metales pesados y, sobre todo la disponibilidad de nitrógeno, y el aumento de intensidad de la luz [21].

1.2. CRECIMIENTO MICROBIANO

En un cultivo discontinuo de microorganismos en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro (4) fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano [29]; fase logarítmica o de adaptación, fase exponencial, fase estacionaria, y fase de muerte, como se aprecia en la figura 2.

En la **fase logarítmica** los microorganismos se adaptan al nuevo entorno, tomando los nutrientes necesarios para iniciar el proceso de división. La población se mantiene temporalmente sin aumento; la duración de esta fase depende del inóculo. Seguida de esta fase, el microorganismo atraviesa el **periodo exponencial**, donde las células se multiplican regularmente a ritmo constante y el grado de desarrollo es máximo. En esta etapa los microorganismos consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio, y su velocidad de crecimiento depende de las condiciones ambientales como, temperatura y composición del medio de cultivo, y varía de un microorganismo a otro [30-31].

Figura 2. Esquema que representa la curva típica de crecimiento durante el desarrollo normal de un cultivo.



Fuente: Introducción a la Microbiología VERA GARCÍA [30]

Los microorganismos entran en **fase estacionaria** principalmente debido al agotamiento de nutrientes, o porque los productos de desecho liberados durante la fase exponencial se han acumulado y hace el medio inhóspito. Esto lleva a que se produzca un equilibrio entre el índice de supervivencia y mortalidad. Posteriormente, los microorganismos comienzan a morir más rápidamente que las células nuevas, periodo conocido como **fase de muerte**. Como se puede observar en la figura 2, el número de células desciende en forma exponencial [30-31].

1.3. MICROALGAS

Estos organismos son claves en el equilibrio planetario, ya que determinan en gran medida la dinámica del dióxido de carbono en la tierra y además, constituyen la base de las cadenas alimenticias en los océanos [32].

Se consideran maquinarias fotosintéticas generadoras de pigmentos con una adaptación eco-fisiológica y plasticidad bioquímica única; lo que les permite la bio-conversión directa de la energía solar en compuestos químicos, bajo una variedad de condiciones medioambientales y a una velocidad mayor que cualquier otra fuente vegetal [33].

Su importancia industrial radica en que poseen un gran potencial como fuente de carbohidratos, proteínas, lípidos, pigmentos y otros bio-productos formados a través del proceso fotosintético sobre sustancias inorgánicas simples como dióxido de carbono, compuestos nitrogenados y fosforados [34].

Por ser organismos unicelulares, su biomasa entera posee los productos de interés, a diferencia de las plantas superiores en las que los productos recuperables se encuentran en órganos específicos, lo que dificulta su extracción. Debido a esto, la inducción fisiológica para la producción de compuestos de interés comercial como pigmentos, lípidos, proteínas, enzimas y biopolímeros es fácilmente realizable [35-38].

1.3.1. *Chlorella* sp.

Chlorella sp. es actualmente el alga verde más investigada y más publicada [39-48]. Comparada con otras algas, *C. vulgaris* tiene una mayor concentración de clorofila, lo que le proporciona una capacidad fotosintética mayor que otras algas, y mucho mayor que los cultivos terrestres [49]. *C. vulgaris* puede dividirse en cuatro células cada veinte (20) horas [50].

Ya en los años 60, fue notable el éxito obtenido con la producción comercial del género *Chlorella* en Japón y Taiwán como alimento natural [51]. Actualmente es utilizada no sólo para complementos alimenticios, sino también en alimentos

procesados, aditivos alimentarios, aditivos para medicamentos, alimentos marinos, aditivos para forrajes y fertilizantes. [50, 52].

1.4. PARÁMETROS DE CULTIVO

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las algas son: cantidad y calidad de nutrientes, luz, pH, turbulencia, salinidad y temperatura [53]. Así mismo, existen tres (3) componentes que influyen en el desarrollo de la microalga: un recipiente adecuado, el medio en el cual las algas puedan crecer y aireación.

En cuanto al medio, las algas necesitan elementos nutritivos de forma inorgánica, pero se debe recordar que no todas las algas tienen los mismos requerimientos nutritivos, y por ello estos deben ser tenidos en cuenta antes de iniciar el cultivo masivo de un alga determinada.

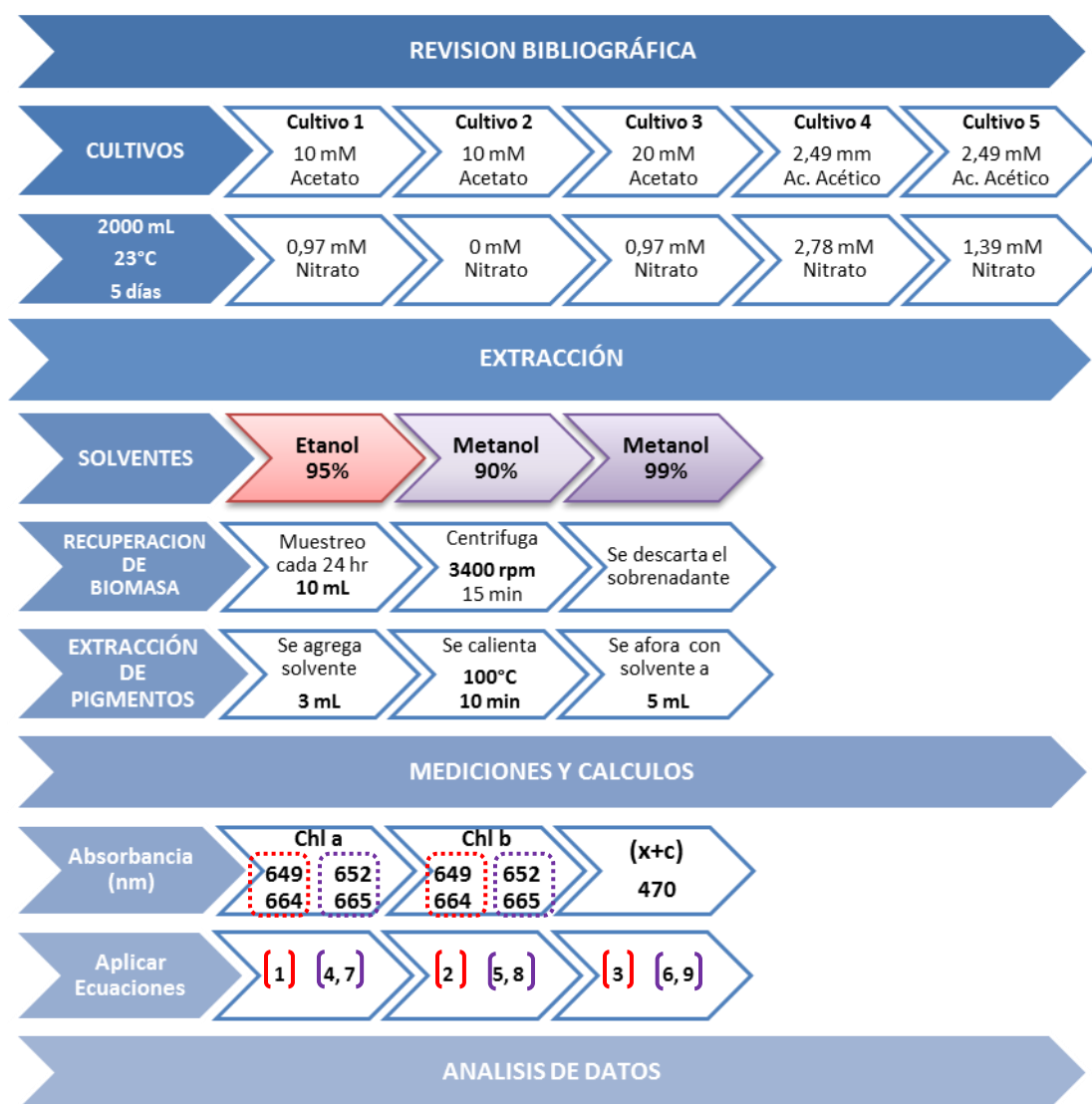
Según el procedimiento mediante el cual las algas obtienen sus alimentos, las podemos clasificar en autótrofos, heterótrofos, mixtrofos.

Los estudios realizados sobre cultivo de algas verdes, en particular *C. vulgaris* [54-55] confirman su capacidad de crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas, como mixotróficas; sin embargo, se ha mostrado una mayor productividad de biomasa en el cultivo mixotrófico [54], razón por la cual ha sido seleccionado este método de cultivo para el desarrollo del presente estudio.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para la realización del presente trabajo se aplicó la metodología ilustrada en la figura 3, la cual es ampliada a continuación.

Figura 3. Esquema de la metodología experimental.



Fuente: Los autores

Se inició realizando un estudio exhaustivo de métodos existentes e investigaciones realizadas en el campo de cultivo algal y la extracción de sus pigmentos fotosintéticos. Se seleccionó el alcance y los métodos y procedimientos a aplicar. Seguidamente se aplicó la metodología a una serie de cultivos de prueba, permitiendo ajustar las variables (tiempo y temperaturas).

2.1. CULTIVO

La especie en estudio fue *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, obtenida de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, Tex, USA). La cepa se mantuvo en crecimiento en medio Bold Basal (BB) que contiene, en gramos por litro: NaNO_3 , 2.94×10^{-3} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.04×10^{-4} ; NaCl , 4.28×10^{-4} ; K_2HPO_4 , 4.31×10^{-4} ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.70×10^{-4} ; H_3BO_3 , 1.85×10^{-4} ; KOH , 5.53×10^{-4} y 1 mL de solución de metales. Se mantuvo pH neutro, temperatura 23°C y aireación constante de 2 psi, sin suministro de CO_2 .

Posteriormente, los cultivos mixotróficos se montaron adicionando en cada fotobiorreactor 20 mL de los respectivos macronutrientes, 2 mL de micronutrientes (Solución Stock. ANEXO 1), 500 mL de agua destilada y 800 mL de inóculo, hasta alcanzar una densidad óptica mayor o igual a 0,800 a 500 nm.

Finalmente, se modificó la cantidad de solución de nitrato de sodio (N) (Tabla 9-A2) establecida para el medio BB, hasta alcanzar las concentraciones mostradas en la tabla 1. Además, se suministró carbono orgánico en forma de acetato de sodio o ácido acético hasta alcanzar las diferentes concentraciones expuestas a continuación.

Tabla 1. Modificación de concentraciones de carbono y nitrógeno en los cultivos.

		Fuente de Nitrógeno			
		Nitrato de sodio [mM]			
		0	0,97	1,39	2,78
Fuente de Carbono	Ácido acético [mM] ¹			2,495	2,495
	Acetato de sodio [mM] ²	10	10		
			20		

Todos los cultivos se desarrollaron en fotobiorreactores tubulares de burbuja ascendente. Para su montaje se usaron botellas plásticas de 14 cm de diámetro, 35 cm de altura con una capacidad de 2,5 litros y un volumen final de trabajo de 2 litros. Se les acopló un sistema de aireación por burbujeo (tubo-difusor) con dos fines, la inyección de aire al cultivo y la mejora en homogeneidad que permite que todas las células estén expuestas a la luz y los nutrientes del medio. Se empleó luz blanca procedente de bombillas fluorescentes tubulares marca Philips de 32 vatios, ubicados horizontalmente en la parte anterior y posterior de cada botella a 5 centímetros, y en la parte superior a 1 metro de distancia. Los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12:12 horas.

2.2. EXTRACCIÓN

La extracción se llevó a cabo en dos etapas, la recuperación de la biomasa microalgal por centrifugación, y la extracción de pigmentos con los solventes.

¹ Concentraciones de ácido acético que presentan mayor productividad de Biomasa en *C. Vulgaris* [55].

² Concentraciones de acetato de sodio que presentan mayor productividad de Biomasa en *C. Vulgaris* [56].

2.2.1. Recuperación de biomasa microalgal.

Diariamente se tomó alícuotas triplicadas (10 mL) de cada uno de los ocho fotobiorreactores (por cada cultivo), se mezcló y dividió en 9 tubos de ensayo (8 mL c/u). Se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos (Centrifuga Power Spin TM MX, velocidad variable 1000 a 3400 rpm, rotor para 24 tubos de 2 a 10 mL). Se descartó el sobrenadante para eliminar el medio presente.

2.2.2. Extracción de pigmentos.

Se agregó 3 mL de solvente a la biomasa decantada, y se procedió a calentar la solución a 100°C durante 10 minutos por inmersión en agua caliente. Posterior enfriamiento, se aforó a 5 mL con solvente.

Se centrifugó nuevamente, a 3400 rpm durante 10 minutos (Centrifuga Power Spin TM MX, velocidad variable 1000 a 3400 rpm, rotor para 24 tubos de 2 a 10 mL) para separar la biomasa despigmentada y así evitar ruido en las lecturas de absorbancia de los extractos. Este paso se realizó con cada uno de los tres solventes, a tres muestras por solvente.

En una producción a gran escala, este proceso de extracción permitiría obtener dos productos valiosos, por un lado los extractos de pigmentos, y por otro, biomasa despigmentada rica en lípidos, lista para una extracción lipídica más sencilla que en presencia de pigmentos.

2.3. MEDICIONES Y CÁLCULOS

Para la determinación de concentraciones de pigmentos se aplicó el método espectrofotométrico [50]. Se midió el espectro de absorción (absorbancia A) de los extractos, en un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300 Merck), a 664, 649 y

470 nanómetros (nm) para los extractos con etanol 95%; y a 665, 652 y 470 nm para los extractos con metanol 90% y metanol 99%.

Posteriormente se aplicaron las ecuaciones (1-9) [50] teniendo en cuenta el solvente usado para la extracción. Donde, c_a es la concentración de chl a en la muestra, c_b es la concentración de clorofila b, y $c_{(x+c)}$, concentración de carotenoides totales. Y están dadas en $\mu\text{g/ml}$ de extracto:

Etanol con 5%(v/v) agua:

$$c_a (\mu\text{g/ml}) = 13.36A_{664.1} - 5.19A_{648.6} \quad (1)$$

$$c_b (\mu\text{g/ml}) = 27.43A_{648.6} - 8.12A_{664.1} \quad (2)$$

$$c_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 2.13c_a - 97.64c_b)/209 \quad (3)$$

Metanol con 10% (v/v) agua:

$$c_a (\mu\text{g/ml}) = 16.82A_{665.2} - 9.28A_{652.4} \quad (4)$$

$$c_b (\mu\text{g/ml}) = 36.92A_{652.4} - 16.54A_{665.2} \quad (5)$$

$$c_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 1.91c_a - 95.15c_b)/225 \quad (6)$$

Metanol (solvente grado analítico):

$$c_a (\mu\text{g/ml}) = 16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4} \quad (7)$$

$$c_b (\mu\text{g/ml}) = 34.09A_{652.4} - 15.28A_{665.2} \quad (8)$$

$$c_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 1.63c_a - 104.96c_b)/221 \quad (9)$$

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se comparó el desempeño de tres solventes en la extracción de chl a, chl b y carotenoides totales en biomasa de *C. vulgaris*; Se usó análisis de varianza factorial (ANOVA) utilizando el software STATISTICA 7, para 5 niveles de cultivo (0,97 mM N y 10 mM acetato, 0,00 mM N y 10 mM acetato, 0,97 mM N y 20 mM acetato, 2,78 mM N y 2,495 mM ácido acético, 1,39 mM N y 2,49 mM ácido acético) y tres niveles de solvente (etanol 95%, metanol 90% y metanol 99%). Adicionalmente, se analizó la influencia de la concentración de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre la productividad de dichos pigmentos fotosintéticos en cultivos mixotróficos.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los resultados de la extracción de pigmentos realizada a los cultivos de *C. vulgaris*, con etanol 95%, metanol 90% y 99% son mostrados en los set de figuras 4 y 5.

Figura 4. Resumen de concentraciones promedio para el tratamiento con acetato, obtenidas en extracción con (a) Etanol 95% (b) Metanol 90% (c) Metanol 99%. En los cultivos (1) 10 mM Acetato/0,97 mM Nitrato; (2) 10 mM Acetato/0 mM Nitrato; (3) 20 mM Acetato/ 0,97 mM Nitrato.

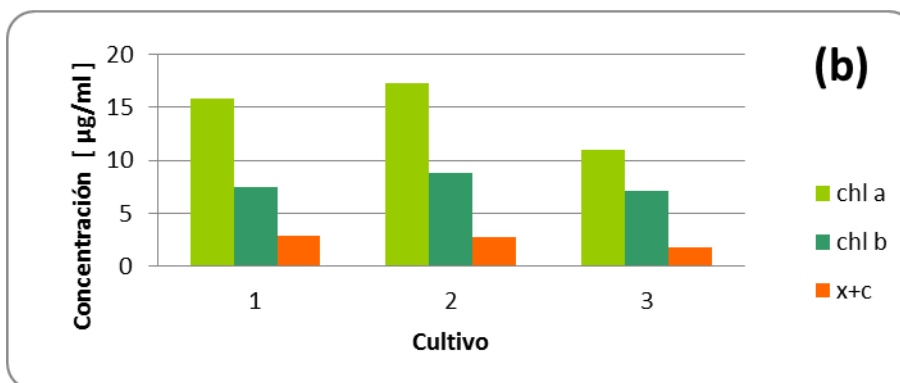
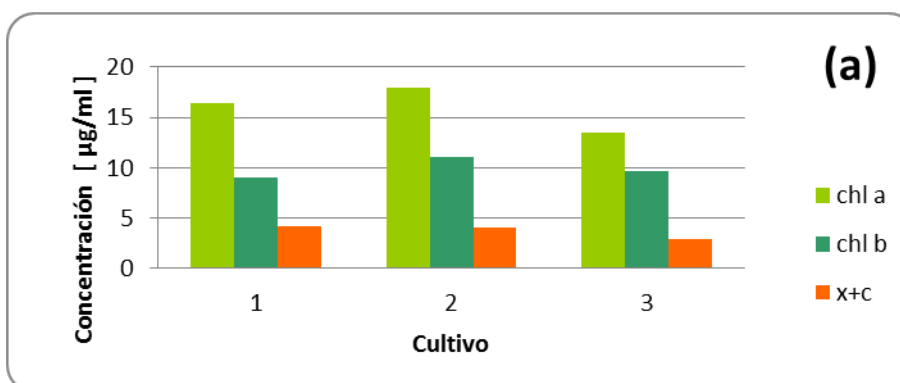


Figura 4. (Continuación)

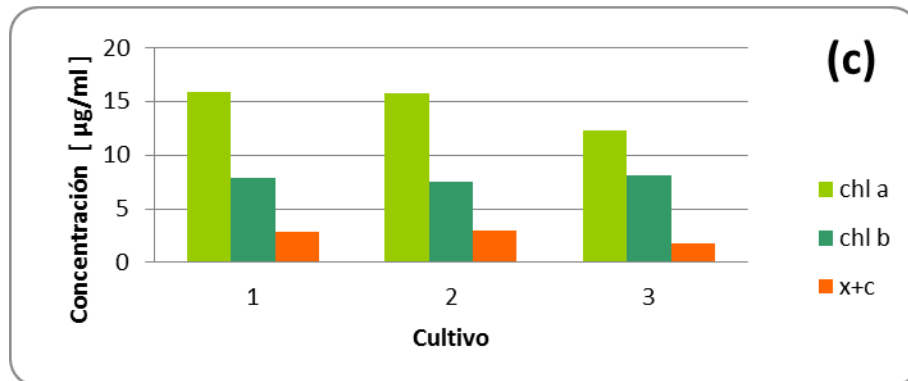


Figura 5. Resumen de concentraciones promedio en el tratamiento con ácido acético obtenidas en extracción con (a) Etanol 95% (b) Metanol 90% (c) Metanol 99%. En los cultivos (4) 2,49 mM Ácido acético/2,78mM Nitrato; (5) 2,49 mM Ácido acético/1,39 mM Nitrato.

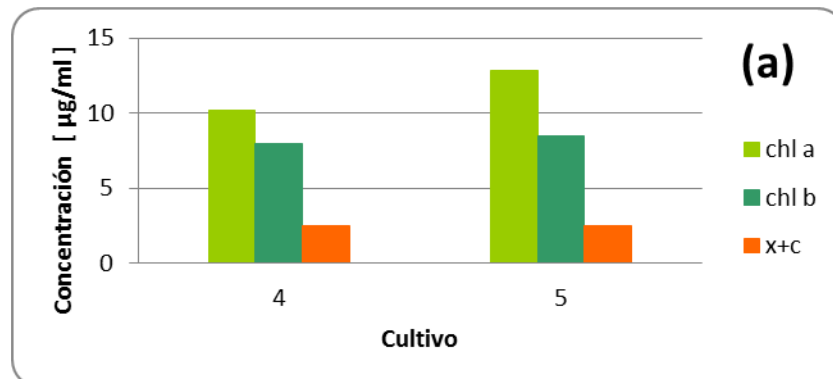
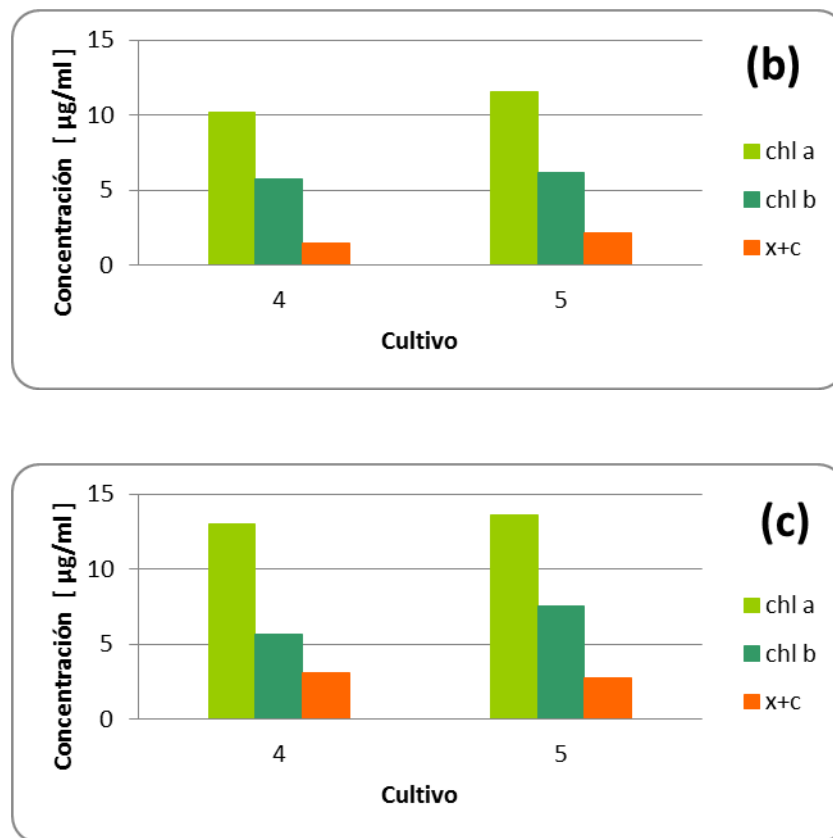


Figura 5. (Continuación)



Fuente: Los autores

En la figura 4 se puede apreciar el tratamiento con acetato, para el cual la mejor extracción de chl a se realizó con etanol 95% (fig. 4a). Por otro lado, para el tratamiento con ácido acético, mostrado en la figura 5 la mejor extracción fue hecha con metanol 99% (fig. 5c). Teniendo en cuenta lo anterior, se puede deducir que para extracción de chl a en cultivos inyectados con acetato el mejor extractante es el etanol 95% y para cultivos con ácido acético el metanol 99% sería la mejor opción.

En el caso de la clorofila b (chl b) es evidente que la mejor extracción se encuentra en la figura 4a para el tratamiento con acetato y en la figura 5a para el tratamiento con ácido acético, de lo que se puede inferir que es etanol 95% el solvente que presenta mejor desempeño para este pigmento.

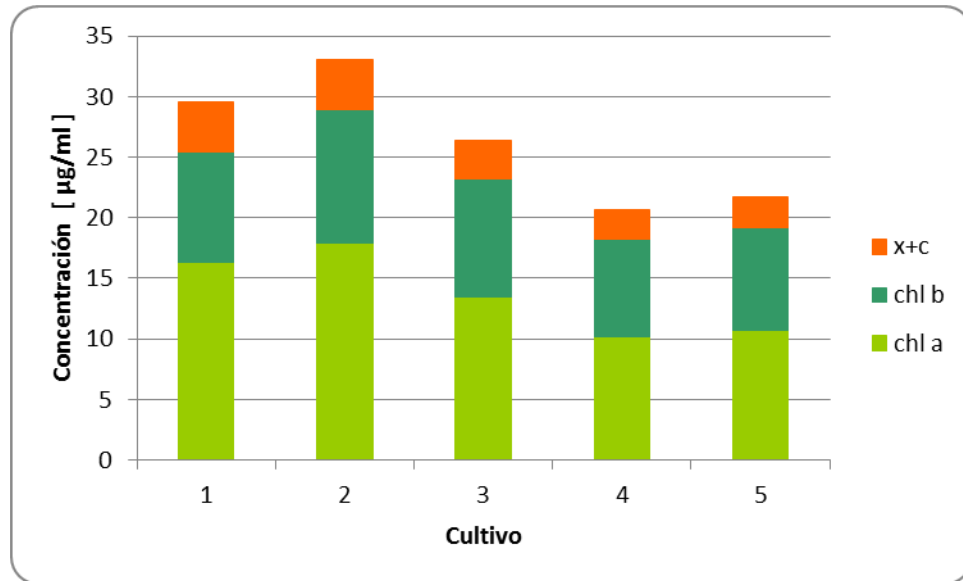
La extracción de carotenoides se comportó de la misma manera que la de chl a, obteniéndose los mejores resultados con etanol 95% para los cultivos de acetato (fig. 4a), y con metanol 99% para los cultivos de ácido acético (fig. 5c).

Se observa que el metanol a 90% de su concentración es el solvente menos deseable, presentando una diferencia de hasta 2,190 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] en promedio -en el caso de la clorofila b con el solvente más eficiente-. Esto puede deberse a la degradación de los pigmentos que se presenta con más incidencia en solventes de menor estabilidad [57].

Teniendo en cuenta la influencia de los diferentes solventes sobre el resultado de la productividad de los pigmentos, a continuación se analizan las modificaciones de la metodología de cultivo en dicha producción fotosintética para la extracción realizada con etanol 95%.

La variación tanto de fuente y concentración de carbono orgánico como de concentración de nitrógeno en el medio, afectó la producción de pigmentos en el cultivo. Los resultados de dichas modificaciones se enseñan a continuación en la figura 6.

Figura 6. Productividad de pigmentos extraídos con etanol 95% en todos los cultivos (1) 10 mM Acetato/0,97 mM Nitrato; (2) 10 mM Acetato/0 mM Nitrato; (3) 20 mM Acetato/ 0,97 mM Nitrato (4) 2,49 mM Ácido acético/2,78mM Nitrato; (5) 2,49 mM Ácido acético/1,39 mM Nitrato.



Fuente: Los autores

De acuerdo a la productividad de pigmentos observada en la figura 6 se puede inferir que la concentración nitrógeno inyectado al medio tiene relación con la producción de los pigmentos en *C. vulgaris*. Encontrando una disminución en las productividades conforme un aumento en la concentración de nitrato en el medio. De esta manera, los valores más bajos de extracción se presentaron en el cultivo cuatro, con 100% Nitrógeno disuelto; y el más alto en el cultivo dos, con 0% Nitrógeno disuelto. Este comportamiento se debe a que la escasez de Nitrógeno obliga al microorganismo a consumir rápidamente el carbono presente en el medio, creciendo y concentrando metabolitos en menor tiempo [58].

Comparando la productividad del tratamiento con acetato (cultivos 1-3) y el tratamiento con ácido acético (cultivos 4-5), se deduce que los cultivos con

acetato produjeron productividades mayores a las arrojadas por los cultivos con ácido acético, esto, por dos posibles causas: la influencia del nitrógeno cuyas concentraciones son considerablemente menores en los cultivos de acetato; y el hecho de que la asimilación del ácido acético al disociarse disminuye el pH del medio, lo cual tiene el potencial de inhibir el crecimiento celular [55].

Para el tratamiento con acetato se infiere que las menores concentraciones de este mejoran la productividad de pigmentos. Este contraste es evidente entre los cultivos 1 y 3, los cuales contienen igual cantidad de nitrato, pero difieren en la concentración de acetato en proporción 1:2, mostrando los resultados en el cultivo dos (2) con 10 mM de acetato.

3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en las pruebas de laboratorio, fueron tabulados para luego ser examinados y sometidos a análisis estadístico, y de esta manera corroborar lo anteriormente expuesto. Se agruparon los datos por cultivo y dentro de esta clasificación, nuevamente se agruparon por pigmento y estos a su vez según el solvente extractor.

Se inició el análisis estadístico aplicando un test de normalidad (Shapiro-Wilk) y un test de homogeneidad de varianza (Levene's) para comprobar que los valores de nuestra variable de respuesta –concentración de pigmento- no están dispersos dentro de un mismo tratamiento. El resumen de estos análisis es mostrado en la tabla 2, 3 y 4.

Tabla 2. Resumen test de homogeneidad y normalidad para chl a en los cinco cultivos.

	Shapiro-Wilk			Levene´s	DISTRIBUCION NORMAL	HOMOGENEIDAD DE VARIANZA
	Etanol 95%	Metanol 90%	Metanol 99%			
CULTIVO 1	p=0,092	p=0,500	p=0,249	0,171	SI	SI
CULTIVO 2	p=0,062	p=0,002	p=0,276	0,120	NO	SI
CULTIVO 3	p=0,067	p=0,099	p=0,979	0,025	SI	NO
CULTIVO 4	p=0,391	p=0,083	p=0,266	-	SI	NO
CULTIVO 5	p=0,126	p=0,226	p=0,093	0,111	SI	SI

Fuente: Los Autores - Statistica 7.

Tabla 3. Resumen test de homogeneidad y normalidad para chl b en los cinco cultivos.

	Shapiro-Wilk			Levene´s	DISTRIBUCION NORMAL	HOMOGENEIDAD DE VARIANZA
	Etanol 95%	Metanol 90%	Metanol 99%			
CULTIVO 1	p=0,457	p=0,499	p=0,922	0.408	SI	SI
CULTIVO 2	p=0,106	p=0,470	p=0,126	0,919	SI	SI
CULTIVO 3	p=0,539	p=0,290	p=0,245	0,466	SI	SI
CULTIVO 4	p=0,115	p=0,456	p=0,250	-	SI	NO
CULTIVO 5	p=0,225	p=0,363	p=0,0901	0,186	SI	SI

Fuente: Los Autores - Statistica 7.

Tabla 4. Resumen test de homogeneidad y normalidad para (x+c) en los cinco cultivos.

	Shapiro-Wilk			Levene's	DISTRIBUCION NORMAL	HOMOGENEIDAD DE VARIANZA
	Etanol 95%	Metanol 90%	Metanol 99%			
CULTIVO 1	p=0,530	p=0,239	p=0,243	0,136	SI	SI
CULTIVO 2	p=0,309	p=0,176	p=0,793	0,022	SI	NO
CULTIVO 3	p=0,117	p=0,153	p=0,724	0,205	SI	SI
CULTIVO 4	p=0,307	p=0,499	p=0,013	0,177	NO	SI
CULTIVO 5	p=0,279	p=0,414	p=0,507	0,042	SI	NO

Fuente: Los Autores - Statistica 7.

Paso seguido, para analizar la influencia de los solventes sobre la concentración de pigmentos en cada cultivo, se aplicó un análisis de varianza ANOVA de una línea, cuyos resultados se muestran en la tabla 5 y gráficamente en el ANEXO C (figuras 14-C4, 15-C5, 16-C6).

Se tuvo en cuenta que el manual del software Statistica 7 contempla que la homogeneidad de varianza no es un factor tan fuerte como para no poder aplicar el análisis de varianza ANOVA.

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) para chl a, chl b y (x+c) según solvente de extracción en los cinco cultivos.

	Chl a	Chl b	(x+c)
CULTIVO 1			
Etanol 95%	16.372	9.070	4.147
Metanol 90%	15.858	7.520	2.896
Metanol 99%	15.925	7.877	2.892
ANOVA.	P=0,958	P=0,925	P= 0,245
CULTIVO 2			
Etanol 95%	17.909	11.064	4.100
Metanol 90%	17.257	8.826	2.829
Metanol 99%	15.774	7.499	3.560
ANOVA.	P= 0,560	P= 0,245	P=0,046
CULTIVO 3			
Etanol 95%	13.474	9.685	3.177
Metanol 90%	11.032	7.097	1.917
Metanol 99%	12.259	8.118	2.733
ANOVA.	P=0,509	P=0,0964	P=0,155
CULTIVO 4			
Etanol 95%	10.225	7.975	2.471
Metanol 90%	10.186	5.724	2.477
Metanol 99%	13.006	5.648	3.034
ANOVA.	P=0,282	P=0,035	P=0,348
CULTIVO 5			
Etanol 95%	10.732	8.476	2.536
Metanol 90%	11.575	6.149	2.456
Metanol 99%	13.590	7.507	3.158
ANOVA.	P=0,473	P=0,312	P=0,417

Fuente: Los Autores - Statistica 7.

Se encontró que no existen diferencias significativas en la utilización de los solventes para extracción de los pigmentos propuestos en los cultivos en todos los casos excepto para la extracción de carotenoides en el cultivo 2, y para extracción de clorofila b en el cultivo 4. En estos dos últimos casos se aplicó prueba de Tuckey la cual se muestra en las tablas 6 y 7, las cuales permiten ver que en el caso de los carotenoides para el cultivo 2 las diferencias se encontraron entre metanol 90% y etanol 95%; y en el caso de chl b en el cultivo 4 hay diferencias en la extracción entre etanol y metanoles.

Tabla 6. Prueba de Tuckey para carotenoides totales en el cultivo 2.

	Etanol 95%	Metanol 90%	Metanol 99%
Etanol 95%		0,049	0,139
Metanol 90%	0,049		0,875
Metanol 99%	0,139	0,875	

Fuente: Statistica 7.

Tabla 7. Prueba de Tuckey para clorofila b en el cultivo 4.

	Etanol 95%	Metanol 90%	Metanol 99%
Etanol 95%		0,026	0,022
Metanol 90%	0,026		0,938
Metanol 99%	0,022	0,938	

Fuente: Statistica 7.

Por último se realizó una ANOVA de dos vías para comparar los cultivos. A pesar de encontrarse picos en la ANOVA, para el cultivo 2, las diferencias no fueron significativas entre cultivos (ANEXO C, figuras 11-C1, 12-C2, 13-C3).

4. CONCLUSIONES

- ✓ Se encontró que el mejor solvente para extraer clorofila a, clorofila b y carotenoides totales fue etanol 95% en los cinco cultivos estudiados, superando la extracción total obtenida por el metanol en sus dos concentraciones y mostrando mayor estabilidad del extracto.
- ✓ La cantidad de nitrato de sodio influencia la productividad de pigmentos; observando un aumento, en los cultivos con menor contenido de nitrato, y la máxima productividad en el cultivo con 0% nitrógeno disuelto.
- ✓ Las concentraciones de carotenoides fueron bajas debido a degradación causado por naturaleza química del solvente y a la naturaleza de la especie en estudio.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda para futuras investigaciones el uso de solventes apolares, como la acetona para obtener mayor productividad de carotenoides. Así mismo realizar la investigación con algas de diferente especie conocidas por sus altos contenidos de carotenoides, como *Dunaliella salina* y *Haematococcus pluvialis*.
- La productividad de pigmentos tuvo un máximo claro en este estudio, sin embargo, se recomienda hacer un barrido en el intervalo de relaciones cercanas a la que se encontró como superior. Y realizar las extracciones con etanol en concentraciones cercanas a la usada.
- Se recomienda estudiar la estabilidad de los extractos y la influencia de factores como el extractante usado, pH, temperatura y luz.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 De La Noue, J. Proulx, D. Guay, R. Pouliot, Y. Turcotte, J. (1986). Algal biomass production from wastewaters and swine manure: nutritional and safety aspects. In: Moo-Young, M., Gregory, K.F. (Eds.), *Microbial Mass Proteins*. Elsevier Applied Science, London, pp. 141-165.
- 2 Wilde, E.W. Beneman, J.R. Wcissman, J.C., Till, D.M. (1991). Cultivation of algae and nutrient removal in a waste heat utilization process. *J. Appl. Phycol.* 3, pp. 159-167.
- 3 Lincoln, E. P. Wilkie, A. C. French, B. T. (1996). Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater. *Biomass and Bioenergy*, 10(1), pp. 63-68.
- 4 Venkataraman, L. V. (1986). Blue-green algae as biofertilizer. En *Handbook of microalgal Mass Culture*, Richmond (Ed), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 455-471.
- 5 Goldman, J. 1979b. Outdoor algal mass cultures. II. Photosynthetic yield limitations, *Water res.*, L3, pp. 119-136.
- 6 Soeder, P. (1980). An historical outline of applied algology. En *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond (Ed.), CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida, pp. 25-41.
- 7 Travieso, L.; Benítez Echegoyen, F. (1998). Cultivo de *Arthrospira* sp.: del Laboratorio a Planta Piloto. Curso: Tecnología y aprovechamiento del cultivo heterotrófico de microalgas. Centro de Investigaciones Pesqueras. La Habana. Cuba.
- 8 Albarracín, I. (2007). *Microalgas: Potenciales Productoras de Biodiesel*. Facultad de Ciencias Naturales, UNPSJB, Trelew, Chubut, Argentina. Estación de Fotobiología. Playa Unión. CONICET.
- 9 Alberts, B. Bray, D. Hopkin, k. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. (2004) *Essential Cell Biology*, 2nd Edition. pp. 481.

- 10 Universidad Politécnica de Valencia. La fotosíntesis. Tema 11. Parte 3. [en línea].
<http://www.euita.upv.es/variados/biologia/Temas/tema_11.htm>[citado en Octubre de 2011].
- 11 Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Curso Fisiología Vegetal. [en línea].
<http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap02/02_04.htm> [citado en septiembre de 2011]
- 12 Barbara Demmig-Adams and William W. Adams III. (2002). Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. *Science*. Vol. 289 no. 5601 pp. 2149-2153.
- 13 Glenn E. Bartley and Pablo A. Scolnik. (1995) Plant Carotenoids: Pigments for photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *The Plant Cell*, Vol. 7, pp. 1027-1038.
- 14 Huner, N. P. A., Öquist, G., and Sarhan, F. (1998). Energy balance to light and cold. *Trends Plant Sci.* 6, 224–230.
- 15 Socaciu C. (2008). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, Taylor & Francis Group, 1: 430-431.
- 16 Ramaraj, R. Tsai, D. Honglay, P. (2010). The truth of Chlorophyll-a for biologist to measure the algae biomass.
- 17 Socaciu C. (2008). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, Taylor & Francis Group, 1: 25.
- 18 Food info: 10 years 1999.2009, Chlorophyll. [en línea].
<<http://www.food-info.net/uk/colour/chlorophyll.htm>>[citado en Octubre de 2011].
- 19 Chlorophyll a vs. Chlorophyll b. [en línea].
<<http://www.buzzle.com/articles/chlorophyll-a-vs-b.html>> [citado en Octubre de 2011]
- 20 Raven, Peter H., Ray F. Evert, and Susan E. Eichhorn (1970). *Biology of Plants*. New York: Worth, 6th ed. pp. 119-121.

- 21 Gouveia, L. Veloso, V. Reis, A. Fernandes, H. Novais, J. y Empis, J. (1996). Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 57, pp.157-163.
- 22 Raven, Peter H., Ray F. Evert, and Susan E. Eichhorn (1970). *Biology of Plants*. New York: Worth, 6th ed. pp. 119-121.
- 23 Rowan, K. S. (1989a), "Chlorophylls and derivatives. In: *Photosynthetic pigments of algae* Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 65-111.
- 24 Rowan, K. S. (1989b), "The carotenoids. In: *Photosynthetic pigments of algae*", Cambridge Univ. Press. Cambridge, pp. 112-164.
- 25 Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Curso Fisiología Vegetal. [en línea].
<http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap02/02_04.htm> [citado en septiembre de 2011].
- 26 Shoaf, T. W., Lium, B. W., 1976. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethylsulphoxide. *Limnol. Oceano gr.* 21, pp. 926–928.
- 27 Socaciu C. (2008). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, Taylor & Francis Group, 1: 54.
- 28 Ritz, T. et al. (2000). Efficient light harvesting through carotenoids, *Photosynthesis. Res.* 66: 125
- 29 Becker E. W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge Press University.
- 30 Vera García. (1995). *Introducción a la microbiología*. Editorial Universidad Estatal a distancia, pp. 52 -55.
- 31 Ghasem D. Najafpour. (2007). *Biochemical Engineering and Biotechnology*. First edition, pp. 98-99.
- 32 Schneider, J. C.; Roessler, P. (1994). Radiolabelling studies of lipids and fatty acids in *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), oleaginous marine algae. *J. Phycol.* 30: 594-598.

- 33 Paniagua-Michel, J.; Sasson, A. (1995). Moléculas de microalgas de importancia económica. En manual de métodos ficológicos. K. Alveal y otros (eds). Universidad de Concepción. Concepción. Chile. pp. 297-310.
- 34 Olvera-Ramírez, R; Cañizares-Villanueva, R. O.; Rios-Leal, E. (2000). Extracción de pigmentos naturales a partir de microalgas y cianobacterias y su posible aplicación industrial. Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- 35 Cohen, Z., M. Reungjitchachawali, W. Siangdung & M. Tanticharoen. (1993) Production and partial purification of gamma-linoleic acid and some pigments from *Spirulina platensis* J. appl. Phycol. 5: 109-115
- 36 Romero, T. y Suarez, G. (2001) Resultados orientados al uso de *Chlorella* sp. cultivada en aguas residuales de la Industrial Pesquera Cubana. Compacto ISSN de II Taller Internacional CONYMA.
- 37 Derner, B. R., Ohse, S., Villela, M., Matos de Carvalho, S., Fett, R. (2006) Microalgas, produtos e aplicações. Ciencia Rural, Santa María. Vol. 36, N°6: 1959-1967.
- 38 Romero, T. y Otero, C. (2004). *Chlorella* sp. desarrollada en los efluentes de la industria pesquera para alimentar *Brachionus plicatilis*. Revista Electrónica de Veterinaria (REDVET). Especial Monográfico Acuicultura. Vol. 2.
- 39 Wijanarki A. Dianursanti. Sedjaya A. y Col. (2008). Enhanced *Chlorella vulgaris* Buitenzorg Growth by Photon Flux Density Alteration in Serial Photobioreactors Biotechnology and Bioprocess Engineering, 13: 476-482
- 40 González, L. Cañizares, R. Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. Bioresource Technology, 60: 259-262
- 41 C. de Bashan, L. Moreno, M. Hernández, J. Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Water Research, 36: 2941-2948

- 42 Valderrama, L. Del Campo, C. Rodríguez, C. de Bashan, L. Bashan, Y. (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalgae *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research*, 36:4185-4192
- 43 Travieso, L. Benítez, F. Sánchez, E. Borja, R. Martín, A. Colmenarejo, M.F. (2006). Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. *Ecological Engineering*, 28:158-165.
- 44 Hernández, J. de-Bashan, L. Bashan, Y. (2006). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalgae *Chlorella* sp. coimmobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 190-198.
- 45 Hernández, J. de-Bashan, L. Rodríguez, J. Rodríguez, Y. Bashan, Y. (2009). Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European Journal of Soil Biology*, 45: 88-93.
- 46 Kim, K. Lingaraju, B. Rheume, R. Lee, J. Siddiqui, K. (2010). Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Science & Technology*, 15:391-396.
- 47 Lim, S. Chu, W. Phang, S. (2010). Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology*, 19: 7314-7322.
- 48 Li, Y. Chen, Y. Chen, P. Zhou, W. Martinez, B. Zhu, J. Ruan, R. (2011). Characterization of a microalgae *Chlorella* sp. Well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource technology*, 8: 5138-5144.
- 49 Kanno, Toshihiro. Uyama, Kazie. (2005). *Chlorella vulgaris*: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. Publicado por Woodland Publishing. pp. 63.
- 50 Song, D. Fu, J. Shi, D. (2008). Exploitation of Oil-Bearing Microalgae for Biodiesel. *Chin. Jour. Biotech.* 24: 341-348.

- 51 Soong, P. (1980). Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan, in *Algae Biomass*, Shelef and Soeder (Eds), Elsevier/North. Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 97-113.
- 52 Socaciu C. (2008). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, Taylor & Francis Group, 1: 440.
- 53 Barsanti, L. G. (2006). General Overview. *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*.
- 54 Borowitzka, M. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of biotechnology*, 70: 313-321
- 55 Ardila, A. Rodríguez, S. (2011). Influencia de una fuente de carbono orgánico (ácido acético) en el crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactores a escala laboratorio.
- 56 Hernández, P. Rosas, F. (2011). Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala de laboratorio.
- 57 Bleoju, M. (2007). Master oficial en seguridad y biotecnología alimentaria. Estudio de estabilidad y algunas propiedades tecnológicas de pigmentos sintetizados por *Epicoccum nigrum*.
- 58 Godoy, C. Montoya J. (2011). Influencia en la inyección de CO₂ en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala de laboratorio.

ANEXOS

ANEXO A. Medio BOLD BASAL

Tabla 8-A1. Preparación de las soluciones Stock.

MACRONUTRIENTES		
<i>Soluciones Stock</i>		Para 1 L
(1)	NaNO ₃ (Nitrato de Sodio)	25,0 g
(2)	MgSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de magnesio heptahidratado)	7,5 g
(3)	NaCl (Cloruro de sodio)	2,5 g
(4)	K ₂ HPO ₄ (Fosfato monoácido de potasio)	7,5 g
(5)	KH ₂ PO ₄ (Fosfato diácido de potasio)	17,5 g
(6)	CaCl ₂ .2H ₂ O (Cloruro de calcio dihidratado)	2,5 g
MICRONUTRIENTES		
<i>Soluciones Stock</i>		Para 1 L
<i>Soluciones de elementos de traza (autoclave para disolverse)</i>	(7) ZnSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de zinc heptahidratado)	8,82 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O (Cloruro de manganeso tetrahidratado)	1,44 g
	MoO ₃ (Trióxido de molibdeno)	0,71 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O (Sulfato de cobre pentahidratado)	1,57 g
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O (Nitrato de cobalto hexahidratado)	0,49 g
	(8) H ₃ BO ₃ (Ácido bórico)	11,42 g
	(9) EDTA (Etilen-diaminotetraacetato)	50,00 g
	KOH (Hidróxido de potasio)	31,00 g
	(10) FeSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato ferroso heptahidratado)	4,98 g
	H ₂ SO ₄ (Ácido sulfúrico) [concentrado]	1,0 mL
MEDIO BOLD BASAL		
<i>Soluciones Stock</i>		Para 2 L
Macronutrientes		20,0 mL de cada uno
Micronutrientes		2,0 mL de cada uno

Para la preparación del medio de los cultivos mixotróficos empleados, se modificó la cantidad de Stock 1 (solución de NaNO_3) con el fin de obtener limitaciones de nitrógeno en el medio teniendo como base de referencia el medio Bold Basal. La limitación de nitrógeno se realizó como se muestra en la tabla 9-A2.

Tabla 9-A2. Modificaciones de nitrógeno hechas a los cultivos mediante la manipulación de la cantidad de solución de nitrato de sodio (stock 1).

Cultivo	Stock 1 [mL]	Nitrato de Sodio [mM]	% N
1	7	0,97	35
2	0	0	0
3	7	0,97	35
4	10	1,39	50
5	20	2,78	100

ANEXO B. Datos experimentales

Figura 7-B1. Concentración de biomasa en cultivo 1 durante los primeros cinco días.

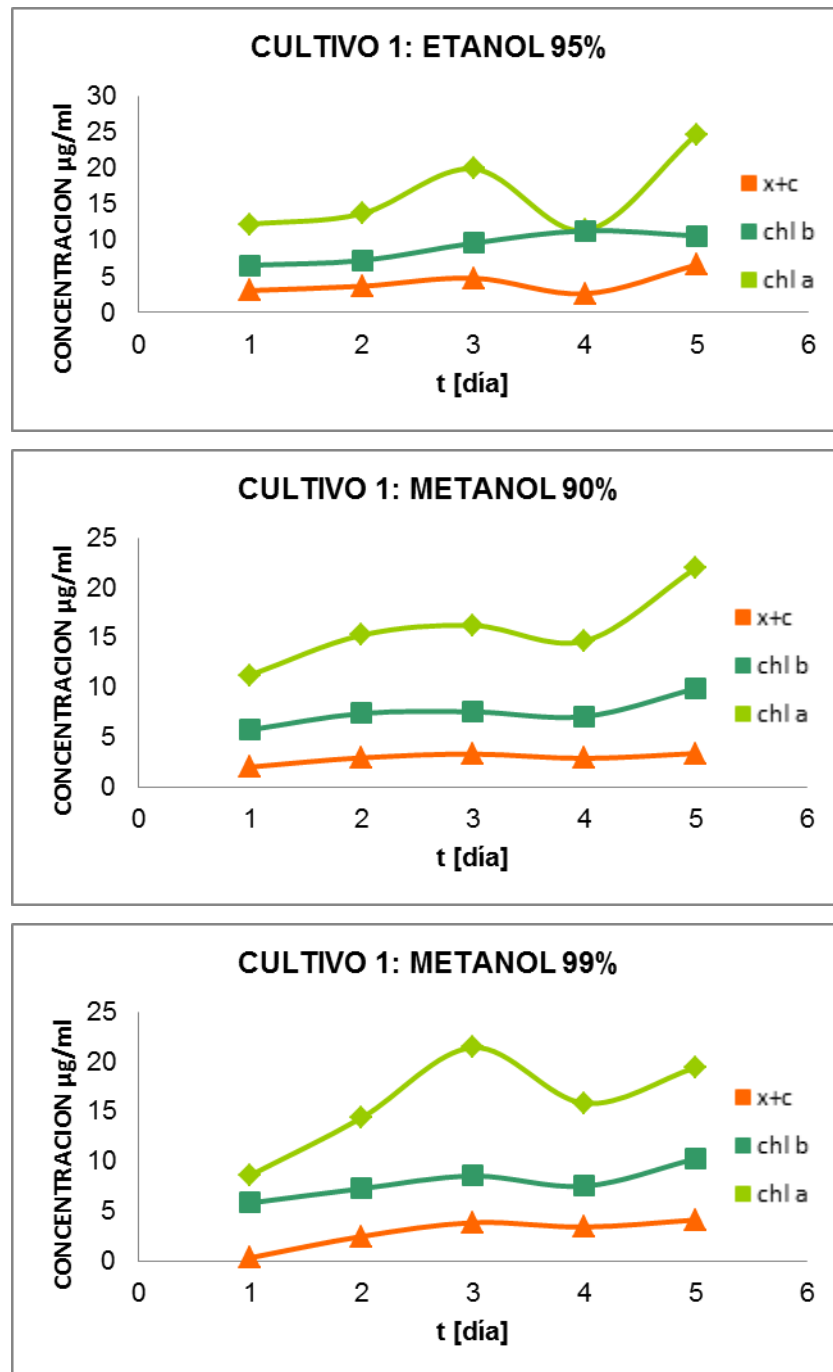


Figura 8-B2. Concentración de biomasa en cultivo 2 durante los primeros cinco días.

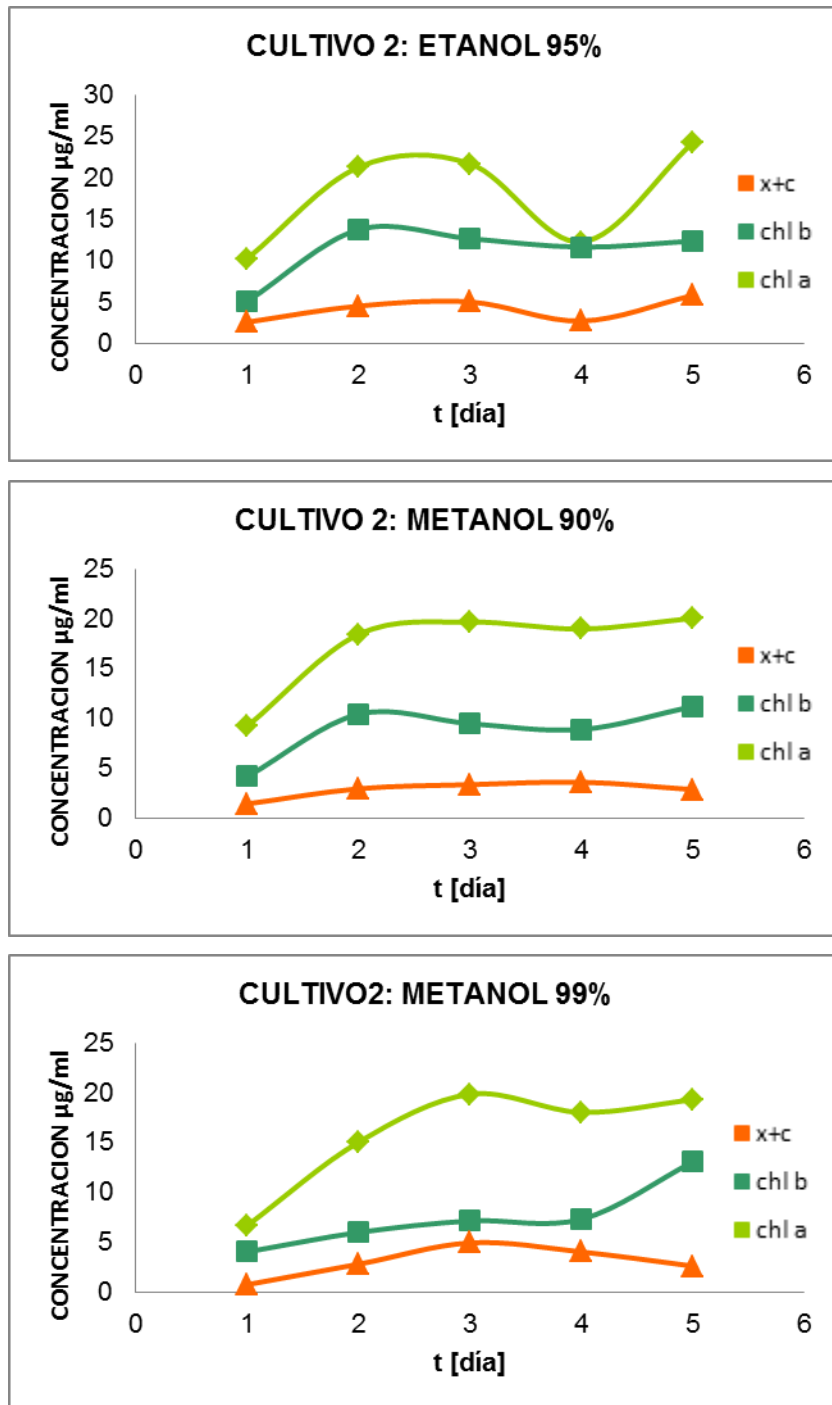


Figura 9-B3. Concentración de biomasa en cultivo 3 durante los primeros cinco días.

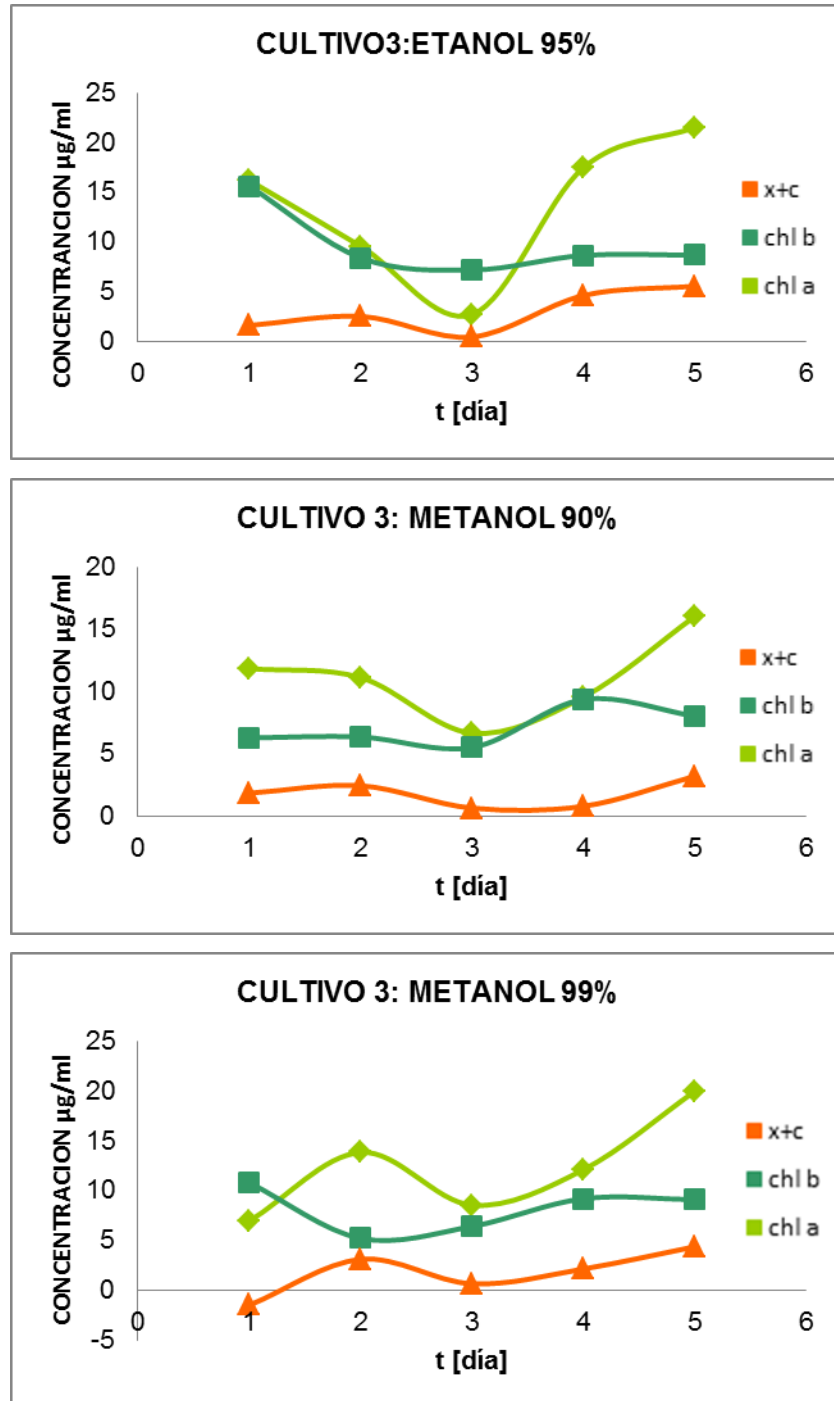


Figura 10-B4. Concentración de biomasa en cultivo 4 durante los primeros cinco días.

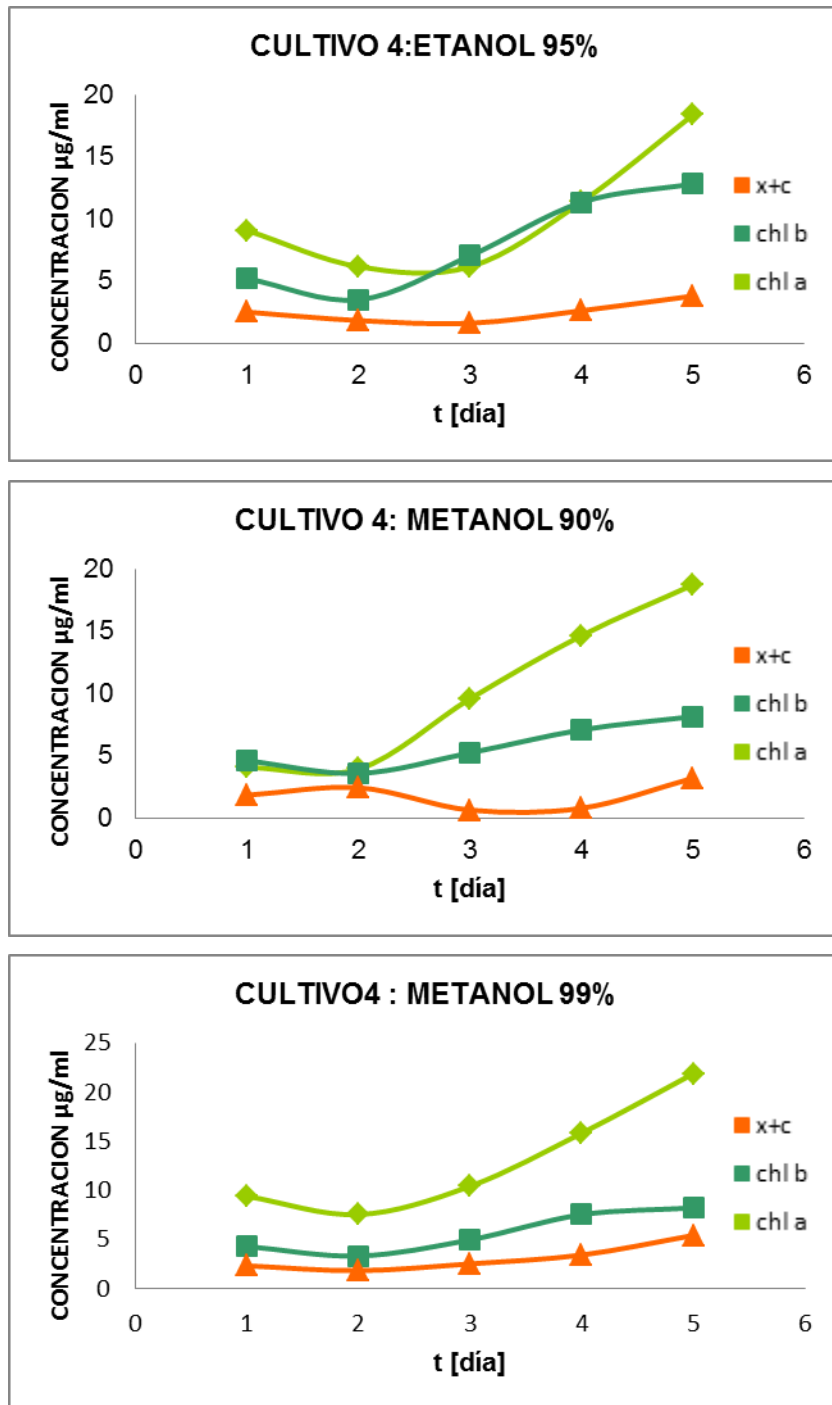
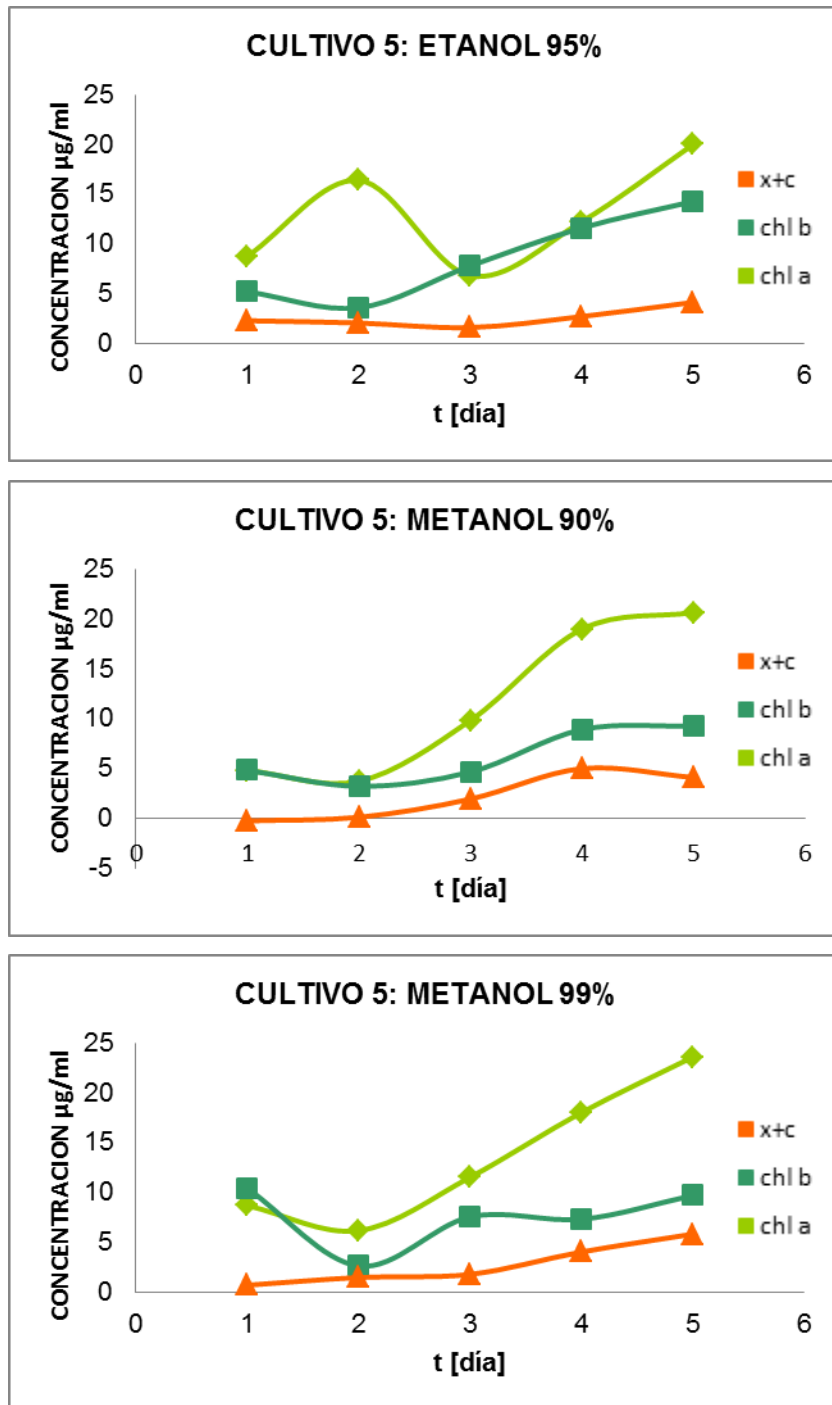


Figura 11-B5. Concentración de biomasa en cultivo 5 durante los primeros cinco días.



ANEXO C. Análisis estadístico

Figura 12-C1. Efecto de la concentración de Clorofila a utilizando Etanol 95%, Metanol 90% y Metanol 99%.

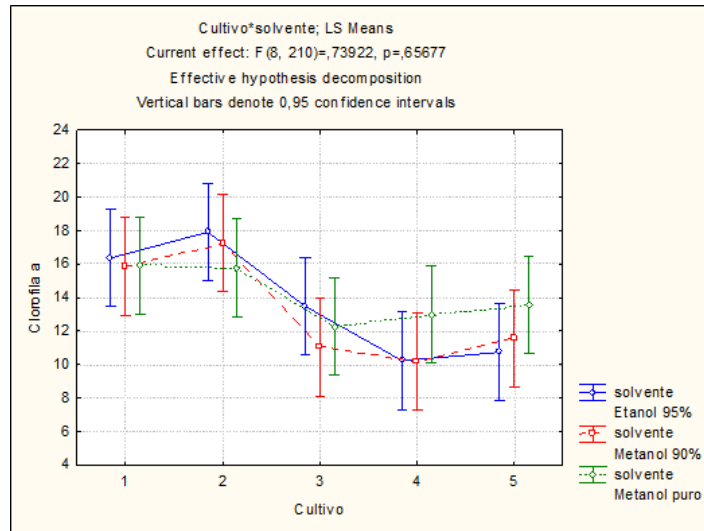


Figura 13-C2. Efecto de la concentración de Clorofila b utilizando Etanol 95%, Metanol 90% y Metanol 99%.

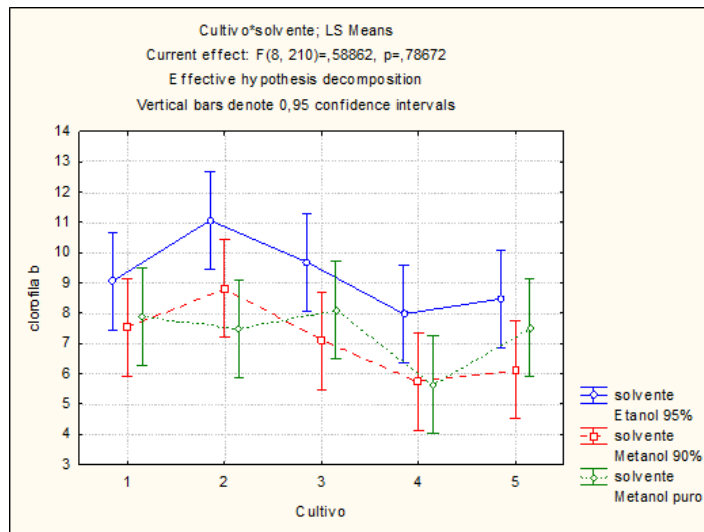


Figura 14-C3. Efecto de la concentración de carotenoides totales utilizando Etanol 95%, Metanol 90% y Metanol 99%.

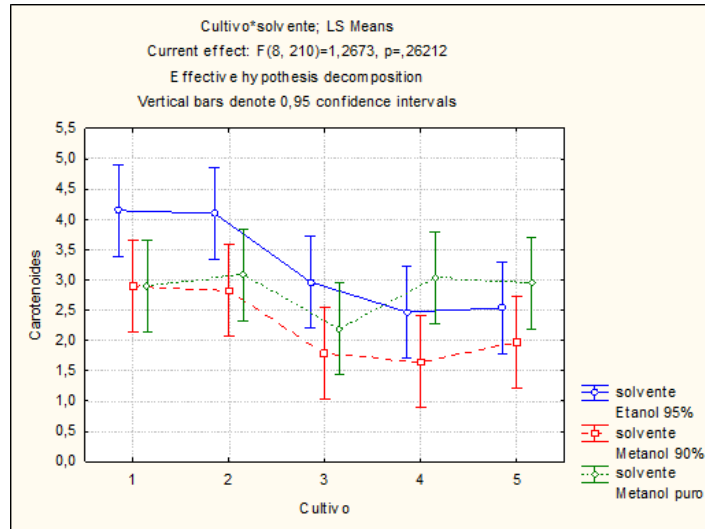


Figura 15-C4. Efecto de la concentración de clorofila a en los cinco cultivos.

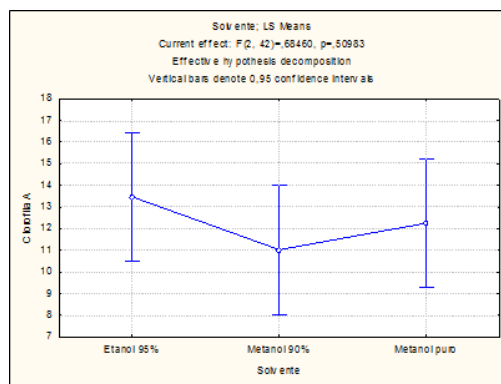
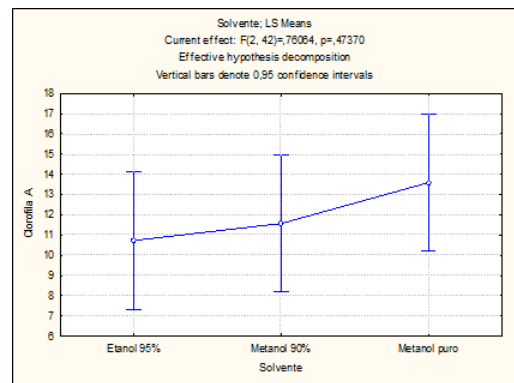
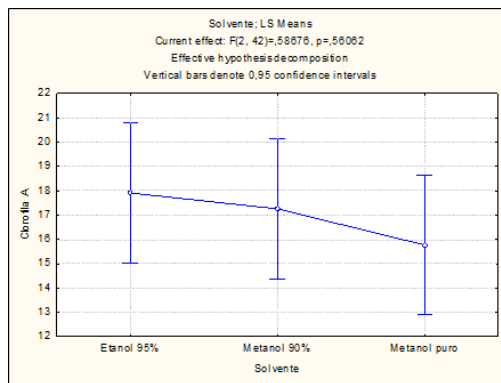
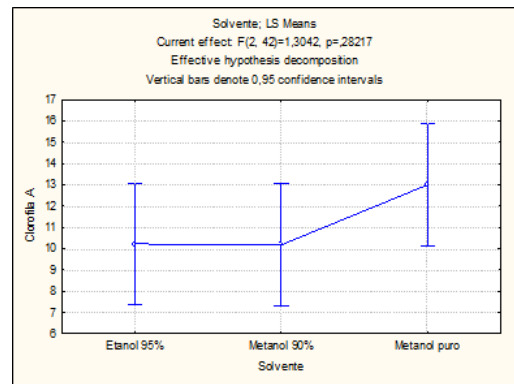
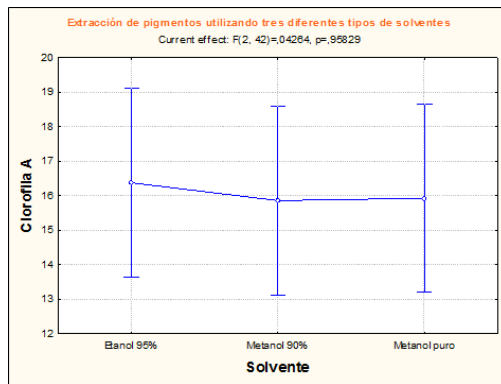


Figura 16-C5. Efecto de la concentración de clorofila b en los cinco cultivos.

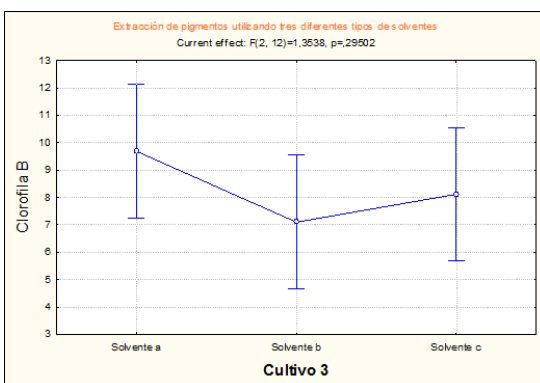
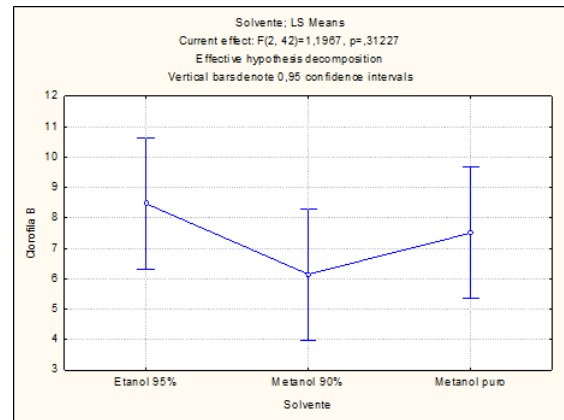
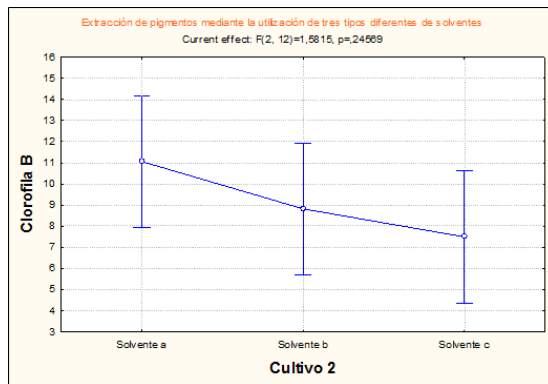
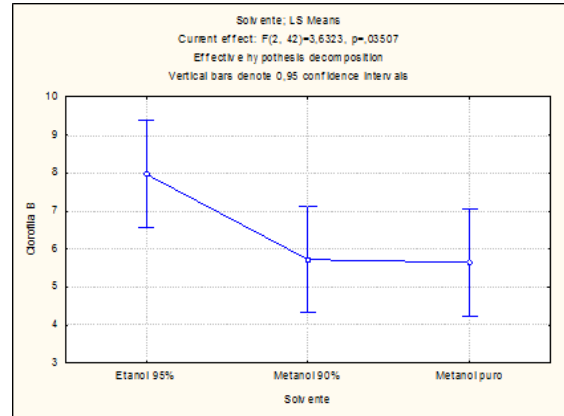
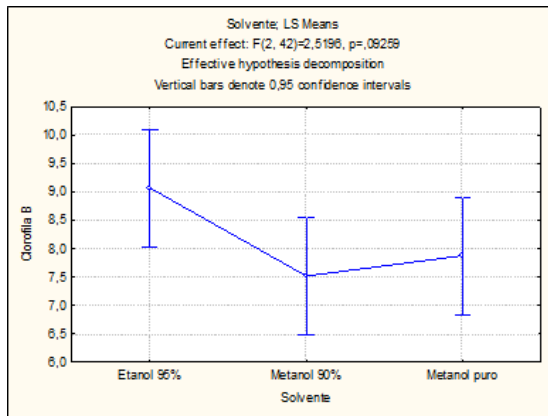


Figura 17-C6. Efecto de la concentración de carotenoides en los cinco cultivos.

