

**DISEÑO Y APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE CULTIVO Y COSECHA
DE MICROALGAS PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE VALOR
AGREGADO**

**ANA MARÍA ARDILA ÁLVAREZ
CÓDIGO: 2127796**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUÍMICA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2016

**DISEÑO Y APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE CULTIVO Y COSECHA
DE MICROALGAS PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE VALOR
AGREGADO**

ANA MARÍA ARDILA ÁLVAREZ

CÓDIGO: 2127796

**Trabajo de grado presentado como
requisito para optar al título de
Magister en Ingeniería Química**

Director:

Dr. VIATCHESLAV KAFAROV

Codirector:

MSc. CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUÍMICA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2016

DEDICATORIA

Dedicado a todas las personas especiales que en estos 3 años se fueron a vivir la vida eterna dejando un vacío en mi corazón, Gerardo, Sofía, Margarita, Toya y Rosa.

A mis padres Jorge Eliecer y Lucía, por colaborarme y orientarme a cada momento.

A mi hermano Jorge Eduardo por ayudarme en los momentos que he requerido de su ayuda.

A todos mis compañeros y amigos que me animaron en este camino.

Ana María Ardila Alvarez.

AGRADECIMIENTOS

A dios todo poderoso

A mi familia por su apoyo incondicional.

Al Dr. Viatcheslav Kafarov y MSc. Crisóstomo Barajas Ferreira, por la oportunidad de trabajar en el grupo de investigación CIDES y por su respaldo como directores del proyecto.

Al Doctor Andrés Barajas, por su apoyo y guía durante la realización de este trabajo.

A la universidad Industrial de Santander, especialmente a la escuela de Ingeniería química y su cuerpo docente, por hacer parte activa en el proceso de formación.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GENERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO PARA MEJORAR LA PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y LA PRODUCCIÓN SELECTIVA DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO (PROTEÍNAS, CARBOHIDRATOS, LÍPIDOS Y PIGMENTOS) A ESCALA DE LABORATORIO	24
4.1 INTRODUCCIÓN	24
4.2 METODOLOGÍA	28
4.2.1 Medio de Cultivo y Microalga	28
4.2.2 Bioreactores	29
4.2.3 Mejoramiento del Cultivo	29
4.2.5 Cuantificación de Carbohidratos Totales	32
4.2.6 Cuantificación de Proteínas	32
4.2.7 Cuantificación de Lípidos	33
4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
4.4 RESULTADOS	35
4.4.1 Caracterización de la Biomasa	35
4.4.2 Producción de proteínas	38
4.4.3 Producción de carbohidratos	43
4.4.4 Producción de lípidos	47
4.5 CONCLUSIONES	56

5. INFLUENCIA DE LAS VARIABLES (pH, CONCENTRACIÓN DE FLOCULANTE, AGITACIÓN) EN LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA MEDIANTE LA FLOCULACION A ESCALA LABORATORIO	57
5.1 INTRODUCCIÓN	57
5.2 METODOLOGÍA	61
5.2.1 Diseño experimental	61
5.2.2 Determinación de las mejores condiciones de adición de floculante y ajuste de pH	62
5.2.3 Diseño experimental para el biofloculante FO4990	63
5.2.4 Experimentación para las mejores condiciones de floculación	64
5.2.5 Cálculo de eficiencia de reacción del floculante	64
5.2.6 Cuantificación de lípidos	65
5.3 RESULTADOS	66
5.3.1 Floculación empleando cloruro de aluminio (AlCl ₃)	66
5.3.2 Nannochloropsis sp.	76
5.3.3 Floculación empleando FO4490 como biofloculante	81
5.3.4 Análisis estadístico	85
5.3.5 Extracción de lípidos	91
5.4 CONCLUSIONES	92
6. EFECTO DE LA INMOVILIZACIÓN MICROALGAL EN LA PRODUCTIVIDAD DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO (PROTEÍNAS, CARBOHIDRATOS, LÍPIDOS Y PIGMENTOS) EN POLÍMEROS ORGÁNICOS	93
6.1 INTRODUCCIÓN	93
6.2 METODOLOGÍA	94
6.2.1 Diseño experimental	94
6.2.2 Etapa de inoculación	95
6.2.3 Etapa experimental	96
6.2.4 Consumo de glicerol	96
6.2.5 Consumo de nitrógeno	97

6.2.6 Consumo de fósforo	97
6.2.7 Cuantificación de biomasa	97
6.2.8 Cuantificación carbohidratos	98
6.2.9 Cuantificación de lípidos	98
6.2.10 Cuantificación de proteínas	98
6.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS	98
6.3.1 Consumo de nitrógeno, fósforo y carbono	98
6.3.2 Concentración de carbohidratos	103
6.3.3 Concentración de proteínas	105
6.4 CONCLUSIONES	106
CONCLUSIONES GENERALES	108
BIBLIOGRAFÍA	109
ANEXOS	124

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1a. Biomasa producida [g/L] para cada uno de los tratamientos.	36
Figura 1b. Biomasa producida [g/L] para cada uno de los tratamientos.	37
Figura 2. Diagrama de Pareto para la producción de proteínas	40
Figura 3. Superficie de respuesta para la producción de proteínas.	41
Figura 4. Diagrama de Pareto de la extracción de proteínas	41
Figura 5. Superficie de respuesta para la producción de proteínas en carbonato de amonio vs nitrato de sodio	42
Figura 6. Diagrama de Pareto para la producción de carbohidratos	44
Figura 7. Superficie de respuesta para la producción de carbohidratos.	45
Figura 8. Diagrama de Pareto de la extracción de carbohidratos	46
Figura 9. Superficie de respuesta para la producción de carbohidratos	47
Figura 10. Diagrama de Pareto para la producción de lípidos	49
Figura 11. Superficie de respuesta para la producción de lípidos.	50
Figura 12. Diagrama de Pareto de la extracción de lípidos	51
Figura 13. Superficie de respuesta para la producción de lípidos.	52
Figura 14. Composición porcentual de metabolitos de <i>C. vulgaris</i> durante los 15 días de cultivo. La fuente de carbono es el acetato de sodio	54
Figura 15. Composición porcentual de metabolitos de <i>C. vulgaris</i> durante los 15 días de cultivo. La fuente de carbono es el carbonato de amonio	55
Figura 16. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH antes de la adición de floculante.	67
Figura 17. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH después de la adición de floculante.	68
Figura 18. Comparación de la eficiencia de floculación para los dos métodos de adición de floculante y ajuste de pH.	69

Figura 19. Comportamiento de <i>C. vulgaris</i> en la etapa de floculación para el diseño experimental.	72
Figura 20. Diagrama de Pareto para la biomasa recuperada.	73
Figura 21. Superficie de respuesta para la biomasa recuperada; pH vs Tiempo de cultivo.	74
Figura 22. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH antes de la adición de floculante	76
Figura 23. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH después de la adición de floculante	76
Figura 24. Comparación de la eficiencia de floculación para los dos métodos de adición de floculante y ajuste de pH	77
Figura 25. Proceso de floculación para <i>Nannochloropsis</i> sp., de acuerdo al diseño experimental.	78
Figura 27. Porcentaje de recuperación de biomasa a un volumen de 100 ml durante 15 días de cultivo.	81
Figura 28. Porcentaje de biomasa recuperada en un volumen de 500 ml.	83
Figura 29. Alga obtenida con una concentración de floculante de 3.26 mg/L	84
Figura 30. Diagrama de Pareto de variables significativas	85
Figura 31. Superficie de respuesta. Relación concentración de floculante y agitación inicial	86
Figura 32. Superficie de respuesta. Relación concentración de floculante y agitación final	86
Figura 33. Superficie de respuesta. Relación agitación inicial y agitación final	87
Figura 34. Porcentaje de biomasa a un volumen de 100ml. 15 días	88
Figura 35. Diagrama de Pareto de variables significativas	89
Figura 36. Superficie de respuesta. Relación concentración de floculante y agitación inicial	89
Figura 37. Superficie de respuesta. Relación concentración de floculante y agitación final	90
Figura 38. Superficie de respuesta. Relación agitación final y agitación final	90

Figura 39. Comparación del porcentaje de extracto lipídico en biomasa flocculada y biomasa centrifugada	91
Figura 40. Consumo fuente de nitrógeno a), fósforo b) y Glicerol c) Vs producción carbohidratos [%], tratamiento 3	99
Figura 41. Consumo fuente de nitrógeno a), fósforo b) y Glicerol c) Vs producción lípidos [%], tratamiento 15	100
Figura 42. Consumo fuente de nitrógeno a), fósforo b) y Glicerol c) Vs producción proteínas [%], tratamiento 9	101
Figura 43. Diagrama de Pareto para carbohidratos en el día 12	103
Figura 44. Superficie de respuesta para la concentración de carbohidratos [g/L], glicerol [% v/v] vs fuente de nitrógeno [g/L] para el día 12	104
Figura 45. Diagrama de Pareto para proteínas en el día 12.	105
Figura 46. Superficie de respuesta para la obtención de proteínas, fuente de nitrógeno [g/L] vs glicerol [%v/v] para el día 12	106

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Variables independientes	30
Tabla 2. Diseño experimental para acetato de sodio, nitrato de sodio y fosfato de potasio	30
Tabla 3. Diseño experimental para carbonato de amonio, nitrato de sodio y fosfato de potasio	31
Tabla 4. Máxima producción de biomasa en cada experimento	36
Tabla 5. Máxima producción de proteínas totales con carbonato de amonio para cada experimento	39
Tabla 6. Máxima producción de proteínas totales con acetato de sodio para cada experimento	39
Tabla 7. Máxima producción de carbohidratos totales con carbonato de amonio para cada experimento.	43
Tabla 8. Máxima producción de carbohidratos totales con acetato de sodio para cada experimento	43
Tabla 9. Máxima producción de lípidos totales con acetato de sodio para cada experimento.	48
Tabla 10. Máxima producción de lípidos totales con carbonato de amonio para cada experimento.	48
Tabla 11. Resumen de los mejores tratamientos para cada metabolito de interés (proteínas, clorofilas, carbohidratos y lípidos).	53
Tabla 12. Diseño experimental floculación con $AlCl_3$	61
Tabla 13. Diseño experimental floculación biofluculante FO 4490	63
Tabla 14. Eficiencia al finalizar la floculación para ambos métodos.	69
Tabla 15. Eficiencia de la floculación y pH al finalizar el proceso.	70
Tabla 16. Eficiencia de floculación y cantidad de biomasa recuperada para distintos volúmenes de muestra.	75

Tabla 17. Porcentaje de cenizas presentes en las muestras a volúmenes variados	75
Tabla 18. Diseño de experimentos.	95
Tabla 19. Producción porcentual carbohidratos respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento	99
Tabla 20. Producción porcentual lípidos respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento	100
Tabla 21. Producción porcentual proteínas respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento	102
Tabla 22. Resumen mejores tratamientos y control, producción carbohidratos, proteínas y lípidos, para el mejor día de experimentación (día 12)	102
Tabla 23. Comparación mejores tratamientos día 12 para carbohidratos	104
Tabla 24. Comparación mejores tratamientos día 12 para proteínas	106

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. OTROS RESULTADOS DEL TRABAJO.	125
Anexo B. ESTADÍSTICA	130

RESUMEN

TITULO: DISEÑO Y APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE CULTIVO Y COSECHA DE MICROALGAS PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO¹.

AUTOR: ANA MARIA ARDILA ALVAREZ²

PALABRAS CLAVES: Microalga, Cultivo, Cosecha, Floculación, Inmovilización, Proteínas, Carbohidratos, Lípidos.

DESCRIPCIÓN: En la búsqueda de energías renovables, los biocombustibles de tercera generación se han convertido en una alternativa innovadora que ofrece una amplia variedad de beneficios excepcionales. La biorrefinería se ha identificado en el camino más prometedor para la creación de una industria basada en la biomasa de microalgas para la producción de biocombustibles y productos de alto valor agregado.

En el presente estudio se evaluó diferentes medios de cultivo, variando los nutrientes (nitrógeno, fósforo y carbono) necesarios para la producción de biomasa y metabolitos de valor agregado. Conjuntamente se evaluó los métodos de concentración y cosecha como la inmovilización, centrifugación y floculación, analizando las variables que intervienen en estos procesos (materiales empleados, tiempo del proceso, cantidad de floculante, concentración de inicial de biomasa, pH, agitación), empleando *C. vulgaris* con el fin de obtener la mayor cantidad de biomasa y metabolitos de valor agregado (proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos).

Para el cultivo se obtuvo un aumento del 73% en la producción de biomasa total permite obtener microalgas más robusta, aumentando la productividad de lípidos, proteínas y carbohidratos. Además se emplearon sustancias que son consideradas residuos de otros procesos industriales como es el glicerol, que es reutilizado y presenta un impacto positivo en la producción de biomasa. En la cosecha de microalgas se evaluaron diferentes procesos con el fin de aumentar la de biomasa, sin afectar las características de la misma, reduciendo el tiempo y costos en la recolección de la biomasa. Es por esto que la floculación con el biopolímero FO49990 es el mejor método ya que la recuperación es superior al 90% sin importar el volumen de biomasa con el que se trabaje y esta no se ve afectada con su adicción.

¹ Tesis de Maestría

² Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química, Maestría en Ingeniería Química, Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Codirector: MSc. Crisóstomo Barajas Ferreira.

ABSTRACT

TITLE: DESIGN AND APPLICATION OF A METHODOLOGY OF CULTIVATION AND HARVESTING OF MICROALGAE FOR OBTAINING OF METABOLITES OF ADDED VALUE³

AUTHOR: ANA MARIA ARDILA ALVAREZ⁴

KEYWORDS: microalgae, growing, harvesting, flocculation, Immobilization, proteins, carbohydrates, lipids, *Chlorella vulgaris*.

DESCRIPTION: In the search for renewable energy, the third generation biofuels have become an innovative alternative that offers a wide variety of exceptional benefits. The biorefinery has been identified as the most promising way for the creation of an industry based on biomass of microalgae for the production of biofuels and high added value products.

In the present study we evaluated different culture mediums, varying the nutrients (nitrogen, phosphorus and carbon) required for the production of biomass and metabolites of added value. Jointly was evaluated the methods of concentration and such harvesting as immobilization, centrifugation and flocculation, analyzing the variables involved in these processes (materials used, process time, amount of flocculant, initial biomass concentration, pH, agitation), using *C. vulgaris* in order to get the most biomass and metabolites of added value (proteins, carbohydrates, lipids and pigments).

For cultivation an increase was obtained of 73% in the total biomass production, it allows obtain more robust microalgae, increasing the productivity of lipids, proteins and carbohydrates. Also were used substances that are considered waste from other industrial processes such as glycerol, which is reused and has a positive impact on biomass production.

On microalgae harvesting, different processes were evaluated in order to increase biomass, without affecting the characteristics thereof, reducing time and costs in the biomass collecting. For this reason, the flocculation with the FO49990 biopolymer is the best method since recovery is over 90% regardless of the volume of biomass whit which this working, these are not affected by its addition.

³ Master thesis

⁴ Faculty of Physicochemical Engineering, School of Chemical Engineering. Master in Chemical Engineering. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Codirector: MSc. Crisóstomo Barajas Ferreira.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, alrededor del 80% de la demanda mundial de energía se produce a partir de combustibles fósiles (Chen *et al.*, 2011). La amplia utilización de este tipo de combustibles está asociado con: (i) las alteraciones climáticas (cambios en la cantidad y distribución de la precipitación), (ii) la reducción en la producción de alimentos, (iii) fusión glacial, (iv) aumento del nivel del mar, (v) la extinción de especies y (vi) muchos otros problemas ambientales que aún no se han podido determinar (Wu, *et al.*, 2008); Es por esto que muchos países están centrando su atención en el desarrollo de nuevas fuentes de energía. Entre las diversas fuentes potenciales de energía renovable los biocombustibles son de mayor interés y se espera que desempeñen un papel crucial en la infraestructura global de energía en el futuro. Sin embargo, el éxito de los biocombustibles radica en la selección adecuada de una fuente renovable de materia prima que asegure la sostenibilidad del proceso de producción, mientras limitan la emisión de CO₂ (Lu, *et al.*, 2013). En este orden de ideas, una opción viable para lograr una producción eficiente es a través de la fotosíntesis natural; tales biocombustibles son neutrales al ciclo de carbono, ya que el CO₂ generado por la quema de cualquier combustible producto de la fotosíntesis, no es mayor que el CO₂ tomado por las plantas para crecer (Wu, *et al.*, 2008). En este sentido, el cultivo de microalgas se presenta como una opción con gran potencial e interés no solo para el área de los biocombustibles, sino para otras como: nutrición, acuicultura y farmacéuticos (Christenson & Sims, 2011), debido a que presenta mayor productividad de biomasa (mayor productividad en lípidos y en carbohidratos), y un balance neutral en términos de CO₂, sin emisiones de óxidos de azufre o de plomo (Kim, *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011); en consecuencia, las microalgas son una nueva opción para la obtención de biocombustible en el futuro inmediato. Si bien falta investigar aún más, principalmente en la innovación en los procesos posteriores, para reducir el costo del proceso de producción (Chen, *et al.*, 2010 & Greenwell *et al.*, 2010), sin

embargo hay estudios sobre el incremento del rendimiento de la producción de biomasa de microalgas a través del diseño de fotobiorreactores (Morweise *et al.*, 2010), selección de cepas (Larkum, *et al.*, 2012) y de ingeniería genética de rutas metabólicas (Georgianna, *et al.*, 2012).

Uno de los desafíos actuales es encontrar una metodología de cosecha de biomasa microalgal que permita trabajar con volúmenes de cultivo grandes, los cuales no consuman mucha energía, sean económicamente rentables y recuperen la mayor cantidad de biomasa. Por otra parte, la cosecha de biomasa presenta un cuello de botella cuando se desea llevar a cabo una producción a gran escala (Uduman, *et al.*, 2010), ya que este proceso puede aumentar entre un 20-30% del costo total de producción (Kim, *et al.*, 2005; Granados, *et al.*, 2012), en consecuencia la concentración y cosecha de biomasa es un factor crítico para la viabilidad del proceso, por tal razón, es importante la selección adecuada de las operaciones unitarias, establecer las variables que intervienen en cada una de los procesos para concentrar y posteriormente recuperar la mayor cantidad de biomasa.

El objetivo de este estudio, fue evaluar diferentes métodos de cultivo, variando los nutrientes (nitrógeno, fósforo y carbono) necesarios para su desarrollo y los métodos de concentración y cosecha como la inmovilización, centrifugación y floculación, evaluando las variables que intervienen en estos procesos (materiales empleados, tiempo del proceso, cantidad de floculante, concentración de inicial de biomasa, pH, agitación), empleando *C. vulgaris* con el fin de obtener la mayor cantidad de biomasa y metabolitos de valor agregado (proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las microalgas pueden crecer en una variedad de climas, sólo requieren agua, algunos nutrientes, una fuente de carbono y energía solar. Como tal, los sistemas de cultivo de microalgas (abierto o cerrado) se puede implementar en tierras no cultivables, asimismo tienen el potencial para utilizar aguas residuales como medios de cultivo, que presentan un beneficio en el uso de estos residuos y la producción de biomasa microalgal (Borges, *et al.*, 2011). Las microalgas se pueden cultivar en agua dulce, aguas salobres o agua de mar (Hammouda, *et al.*, 1995), debido a su alta tasa de crecimiento, su biomasa puede ser cosechada durante todo el año, presentando un potencial teórico para convertirse en una alternativa viable para sustituir los combustibles derivados del petróleo en el futuro sin los inconvenientes asociados con los alimentos frente a la discusión de combustible y el uso de la tierra.

El interés en el uso de este tipo de microorganismos es en gran parte debido a su alta eficiencia en la deposición de metabolitos tales como: lípidos, proteínas, carbohidratos y pigmentos; además la biomasa producida puede ser aprovechada para la obtención de diversos tipos de fuentes de energía renovables como: metano (Spolaore, *et al.*, 2006), bio-hidrógeno (Dutta, *et al.*, 2005), bioetanol y biodiesel (Borowitzka, 1997), donde su potencial se relaciona con su alta productividad, por otro lado estos microorganismos se han utilizado como suplemento nutricional para los seres humanos y los animales, como materia prima para productos farmacéuticos y cosméticos (Spolaore, *et al.*, 2006). Estos procesos no implican procesamiento químico significativo de la biomasa, mientras que la producción de biocombustibles requiere más procesos químicos. En la actualidad, numerosos esfuerzos de investigación se centran en el desarrollo de tecnologías para el procesamiento para la producción de biocombustibles.

Uno de los cuellos de botella de la producción de biodiesel a partir de microalgas es la necesidad de concentrar la biomasa producida para después realizar un proceso de extracción de los lípidos (Borowitzka, 1997). La elección del método de concentración depende del tamaño, densidad y la relación costo-beneficio de la materia prima a obtener (Borges, *et al.*, 2011). El proceso de recuperación de la biomasa juega un papel muy importante, se deben hacer una buena elección de las operaciones unitarias involucradas en la cosecha.

Es por esto que una amplia variedad de nuevas tecnologías para el cultivo y procesamiento de biomasa microalgal están surgiendo y otros están siendo adaptados a la biomasa microalgal y los metabolitos de interés. Para aprovechar el potencial de las microalgas, se requiere que las tecnologías para el cultivo y procesamiento de la biomasa sean eficientes desde los puntos de vista técnicos, económicos, ambientales y energéticos.

2. HIPÓTESIS

A partir de la evaluación de los parámetros de producción de microalgas es posible desarrollar una metodología de concentración y cosecha de biomasa que permitan la extracción eficiente de metabolitos de valor agregado.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar y aplicar una metodología de cultivo y cosecha de microalgas para la obtención de metabolitos de valor agregado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar medios de cultivo que mejoren la productividad de biomasa y la producción selectiva de metabolitos de valor agregado (proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos) a escala de laboratorio.
- Evaluar la influencia de las variables (pH, concentración de floculante, agitación) en la concentración de biomasa mediante la floculación a escala laboratorio.
- Evaluar el efecto de la inmovilización microalgal en la productividad de metabolitos de valor agregado (proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos) en polímeros inorgánicos.
- Comparar la influencia de los métodos de cosecha de biomasa (centrifugación, floculación e inmovilización) en la extracción de metabolitos de valor agregado.
- Analizar las variables determinantes y elaborar recomendaciones para un posible escalado del cultivo y cosecha de las microalgas seleccionadas.

4. DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO PARA MEJORAR LA PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y LA PRODUCCIÓN SELECTIVA DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO (PROTEÍNAS, CARBOHIDRATOS, LÍPIDOS Y PIGMENTOS) A ESCALA DE LABORATORIO.

4.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los factores más importantes para lograr una producción a escala comercial, económica y ambientalmente factible de microalgas es el desarrollo de sistemas de cultivo sostenibles y rentables (Borowitzka, 1999; Richmond, 2004). El diseño del sistema de cultivo influye en las condiciones experimentadas por las células, que a su vez determinan la productividad (Greenwell *et al.*, 2010). La mejora de la productividad es la clave para alcanzar la viabilidad económica a gran escala de los cultivos (Lee, 2001).

El cultivo de microalgas se ha llevado a cabo de forma natural o artificial, desde lagos y estanques abiertos hasta fotobiorreactores altamente complejos y controlados. Un biorreactor es un recipiente en el que los organismos vivos se cultivan y realizan conversiones biológicas (por ejemplo, la biomasa o la formación de producto), en el cual obtienen energía de la luz, como las algas, plantas y ciertas células microbianas (fototrofas), se utilizan para llevar a cabo reacciones metabólicas y así obtener productos como carbohidratos, proteínas, lípidos y pigmentos (Mata *et al.*, 2010). El diseño de sistemas de cultivo de microalgas, tiene como objetivo general: lograr una productividad por área de cultivo, conversión eficiente de la energía de la luz al producto, consistencia, fiabilidad de la producción y rentabilidad (Ugwu *et al.*, 2008).

Para el crecimiento de microalgas, se necesita de varios parámetros como por ejemplo, la temperatura, la intensidad de la luz, el pH y la concentración de nutrientes, los cuales deben mantenerse dentro de los límites fisiológicos de la

microalga. El sistema del bioreactor es crítico en la provisión y el mantenimiento de un entorno de crecimiento favorable (Pulz, 2001), por lo tanto, el diseño del reactor requiere el conocimiento de los aspectos de la fisiología de las microalgas, tales como la morfología, las necesidades de nutrientes y la tolerancia al estrés de las especies a ser cultivadas.

La aireación es de suma importancia en los sistemas de cultivo de microalgas, ya que está directamente relacionada con otros parámetros clave como la luz y el suministro de nutrientes. Una buena mezcla mantiene las células en suspensión, determina el régimen de luz-oscuridad por las células moviéndose a través de un gradiente óptico, asegura una distribución eficiente de nutrientes, mejora el intercambio de gases, reduce el sombreado mutuo en el centro del reactor, disminuyendo la fotoinhibición en la superficie (Ugwu et al., 2008), por otra parte una mala mezcla afecta la transferencia de nutrientes y gases disueltos mediante la reducción de la capa límite entre la superficie de las células y partículas de gas y el líquido, debe ser continua para evitar la sedimentación de la biomasa (Grima, et al., 2003) y puede representar la entrada principal de energía en el mantenimiento del reactor.

Una temperatura adecuada para el cultivo es entre 16 y 27 °C dependiendo de la cepa. La temperatura de crecimiento también afecta la composición bioquímica de las células (Barsanti et al., 2006; Suh, et al., 2003); para el caso de microalgas como *Nannochloropsis*, *Chlorella* o *Scenedesmus sp*, se ha encontrado que temperaturas entre 20 °C y 25 °C son óptimas para la producción de lípidos, mientras que mayores temperaturas reducen sensiblemente la cantidad de lípidos (Converti et al., 2009; Xin et al., 2011).

La iluminación se divide en dos componentes: la irradiación, la cual se refiere al flujo de luz por unidad de área a la cual están expuestas las microalgas, y el fotoperiodo, el cual es la cantidad de horas durante el día en la que las microalgas

son sometidas a dicha irradiación (Barsanti *et al.*, 2006; Watanabe, 2005). Las microalgas utilizan sólo la luz en intervalo comprendido entre 300 a 700 nm, región del espectro conocida como la radiación fotosintéticamente activa. En el caso del fotoperiodo, normalmente se utilizan ciclos de iluminación constantes que se expresan en horas de Luz/Oscuridad (LO) que van desde 12:12 LO hasta 18:6 LO pasando por valores intermedios como 14:10 cuando se emplea irradiación artificial (Barsanti *et al.*, 2006).

Aunque estos microorganismos pueden utilizar de manera eficiente la luz, el crecimiento en cultivos a gran escala es lento debido a la limitada penetración de la luz causada por el espesor de la columna de agua y la alta densidad de células (Estévez *et al.*, 2013); en vista de estas desventajas asociadas al cultivo autótrofo una alternativa viable para algunas especies es el uso de cultivos mixotrófico, en la que el CO₂ y una fuente de carbono orgánico se asimilan de forma simultánea (Lee, 2004); sin embargo, aunque el cultivo es económicamente viable, se requiere una fuente de carbono de bajo costo y de las concentraciones más favorables (Lee., 2004 & Richmond, 1986), ya que con ciertos cambios en los nutrientes del medio pueden aumentar las tasas de crecimiento (Chisti, 2008; Liang, *et al.*, 2009) o pueden ser inhibidores y tóxicos para las algas (Jeon *et al.*, 2006; Estévez *et al.*, 2013; Bholá *et al.* 2011). El nitrógeno constituye uno de los nutrientes que más afecta el crecimiento celular en la microalga y la producción de lípidos (Borowitzka 1999). Cambios en la concentración de nitrógeno en el medio puede incrementar la productividad en la composición de la biomasa (Sánchez *et al.* 2000), especialmente los pigmentos y proteínas, el nitrógeno en forma de nitrato se asimila en las células de la microalga y se emplea como fuente de nutrientes para mejorar el crecimiento (Devi, *et al.*, 2012). El fosfato constituyente del ATP aporta la energía para las actividades metabólicas contribuyendo con el crecimiento de la microalga, mientras que el carbono se considera un factor clave que rige el modelo de crecimiento en el mecanismo autotrófico.

C. vulgaris es capaz de emplear tanto glucosa ($C_6H_{12}O_6$), acetato ($C_2H_3O_2$), glicerol ($C_3H_5(OH)_3$), como fuentes de carbono (Syrett, *et al.* & Zhu, *et al.*, 2014), los beneficios se asocian con un aumento significativo en la tasa de crecimiento y la productividad debido a la alta incorporación de carbono orgánico dentro de la cepa, en particular en la formación de metabolitos tales como lípidos, polisacáridos y proteínas (Estévez *et al.*, 2013); esto es particularmente importante, ya que se han reportado aumentos de hasta cinco veces en comparación con los cultivos de microalgas autótrofos (Lee, 2004). Otra ventaja de los cultivos mixotróficos es el uso de luz, que induce y regula la producción de macromoléculas de alto valor, tales como pigmentos y ácidos grasos (Li, *et al.*, 2007), además reduce la producción de CO_2 en comparación con cultivos heterótrofos (Goulding, *et al.*, & Estévez *et al.*, 2013). Se ha demostrado que *C. vulgaris* puede oxidar y utilizar carbono inorgánico como fuente energía para el crecimiento en la oscuridad (Huang, *et al.*, 2010), causando cambios en el ciclo del ácido tricarboxílico, debido a que la acetil-CoA no se deriva a partir de piruvato (Bouarab, *et al.*, 2004).

Durante varias décadas se han llevado a cabo investigaciones sobre el crecimiento de microalgas de diferentes especies en presencia de acetato (Quiao, *et al.*, 2009; Estévez, *et al.*, 2013), sin embargo su uso es problemático debido a que su efecto es dependiente de la concentración (Hage, *et al.*, 2001). Algunos autores como Jeon, *et al.*, (2006) y Estévez *et al.*, (2013), encontraron que las concentraciones por encima de 1 g/L pueden causar la inhibición del crecimiento debido a la intoxicación de las algas, mientras que las concentraciones más bajas estimulan el crecimiento y la acumulación de lípidos (Degrenne, *et al.*, 2010; Quiao, *et al.*, 2009). Por otra parte, la acumulación de lípidos y el crecimiento de microalgas se ven afectados por otros factores, tales como la concentración de nutrientes, la aireación de CO_2 , la temperatura, la intensidad de la luz, etc. La concentración de nitrógeno y fósforo presentes en el agua son considerados como factores fundamentales y tienen influencia directa sobre el crecimiento de microalgas y la acumulación de lípidos (Feng, *et al.*, 2012).

En estudios realizados por Zhu *et al.*, (2014) se ha evidenciado el efecto de la privación de nutrientes individuales como nitrato, fosfato y hierro para mejorar el contenido de lípidos en las microalgas, para ello, se analizó la actividad fotosintética y la composición de la biomasa en respuesta a estos cambios (Zhu, *et al.*, 2014). Se determinó que el contenido de lípidos puede aumentar debido al estrés generado por la limitación en algunos nutrientes esenciales como el nitrógeno y fósforo (Gao, *et al.*, 2013). El agotamiento de nitrógeno cambia el flujo de carbono celular para la síntesis de lípidos a partir de la síntesis de proteínas, puede aumentar de 20 % a 40 % en virtud de la privación de nitrógeno (Illiman, *et al.*, 2000). Sin embargo, un alto contenido de lípidos producidos bajo la limitación de nutrientes se asocia generalmente con la baja productividad de biomasa. En general, es necesaria una fuente alterna de nitrógeno para mantener una alta tasa de crecimiento de las células y el logro de alta densidad celular (Gao, *et al.*, 2013; Illiman, *et al.*, 2000).

Después de realizar una revisión bibliográfica pertinente se evidenció la necesidad de evaluar diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo simultáneamente, por este motivo se propone un diseño de cultivos mixotróficos con el fin de mejorar la producción de biomasa y metabolitos de valor agregado de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 mediante la modificación de estos nutrientes en el medio de cultivo Bold Basal.

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Medio de cultivo y microalga. *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 fue adquirida de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA); la microalga se cultivó en medio de cultivo Bold Basal modificado (MBBM). Cada litro de medio de cultivo está compuesto por: macronutrientes (Moles) NaNO_3 ($2,94 \times 10^{-3}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

($3,04 \times 10^{-4}$), NaCl ($4,28 \times 10^{-4}$), K_2HPO_4 ($4,31 \times 10^{-4}$), KH_2PO_4 ($1,29 \times 10^{-3}$), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ($1,70 \times 10^{-4}$) y micronutrientes (g/L) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ($3,07 \times 10^{-5}$), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ($7,28 \times 10^{-6}$), MoO_3 ($4,93 \times 10^{-6}$), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ($6,29 \times 10^{-6}$), $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ($1,68 \times 10^{-6}$), H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-4}$), EDTA ($1,71 \times 10^{-4}$), KOH ($5,53 \times 10^{-4}$), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ($1,79 \times 10^{-5}$). Esta se mantuvo en crecimiento en el medio Bold Basal (MBB) (Andersen, 2005) y condiciones de temperatura de $25^\circ C \pm 2^\circ C$, $pH \pm 7$, aireación continua, sin ningún suministro complementario de CO_2 e iluminado con lámparas fluorescentes con un ciclo de luz-oscuridad 12-12 horas, durante 15 días de cultivo.

4.2.2 Bioreactores. Se usaron biorreactores rectangulares de vidrio con medidas de 20 cm largo, 20 cm altura, 10,5 cm ancho y un volumen correspondiente a 2 L. En el extremo inferior de cada uno de los reactores se encuentra un sistema de suministro de aire continuo por burbujeo (tubo-difusor) con el fin de proveer aire a los cultivos y garantizar que todas las células estén expuestas a la luz y los nutrientes del medio.

4.2.3 Mejoramiento del cultivo. El objetivo para el cultivo es diseñar medios de cultivo que mejoren la productividad de biomasa y la producción selectiva de metabolitos de valor agregado como las proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos a escala de laboratorio y se desarrolló bajo las siguientes condiciones.

Primero se plantean cultivos mixotróficos con diferentes concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo (Tabla 1), manteniendo la concentración de los demás componentes del medio (macronutrientes y micronutrientes) constantes según las especificaciones del Medio Bold Basal (MBB). Con la ayuda de software STATISTICA 7.0, se realizó el diseño de experimentos. El diseño

experimental está fundamentado en una composición central no factorial 3^3 de 17 experimentos, cada uno con su original y dos replicas (Tabla 2 y 3).

Tabla 1. Variables independientes

Acetato de sodio (mM)	Carbonato de amonio (mM)	Nitrato de sodio (mM)	Fosfato de potasio (mM)
10	1,074	0,98	0,57
20	2,149	1,96	1,15
30	3,22	2,94	1,7

Se realizaron cultivos con acetato de sodio a tres concentraciones diferentes, de igual manera se modificó la cantidad de solución de nitrato de sodio y fosfato de potasio establecidas para el medio Bold Basal. Posteriormente se realizó un segundo montaje en el cual se empleó como fuente de carbono carbonato de amonio, manteniendo constante las concentraciones de nitrato y fosfato igual a la primera experimentación realizada.

Tabla 2. Diseño experimental para acetato de sodio, nitrato de sodio y fosfato de potasio.

Tratamientos	Acetato de sodio (mM)	Nitrato sodio (mM)	Fosfato de potasio (mM)
1	10	2,94	0,57
2	10	0,98	1,72
3	30	2,94	1,72
4	30	0,98	0,57
5	20	1,96	1,15
6	10	2,94	1,72
7	10	0,98	0,57
8	30	2,94	0,57

Tabla 2. Continúa...

9	30	0,98	1,72
10	3,27	1,96	1,15
11	36,73	1,96	1,15
12	20	3,6	1,15
13	20	0,32	1,15
14	20	1,96	0,19
15	20	1,96	2,11

Tabla 3. Diseño experimental para carbonato de amonio, nitrato de sodio y fosfato de potasio.

Tratamientos	Carbonato de amonio (mM)	Nitrato sodio (mM)	Fosfato de potasio (mM)
1	1,07	2,94	0,57
2	1,07	0,98	1,71
3	3,22	2,94	1,71
4	3,22	0,98	0,57
5	2,15	1,96	1,15
6	1,07	2,94	1,72
7	1,07	0,98	0,57
8	3,22	2,94	0,57
9	3,22	0,98	1,72
10	0,35	1,96	1,15
11	3,95	1,96	1,15
12	2,15	3,6	1,15
13	2,15	0,32	1,15
14	2,15	1,96	0,19
15	2,15	1,96	2,11

4.2.4 Cuantificación de la biomasa. Para cada uno de los tratamientos se tomó 5mL de muestra durante los días 0, 2, 5, 7, 10, 15 de cultivo. La concentración de biomasa se estimó por lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm (densidad óptica) en un espectrofotómetro. La densidad óptica (DO) fue

correlacionada contra una curva estándar de la cantidad de biomasa (g/L) de acuerdo a la ecuación de calibración determinada a partir de la biomasa seca del laboratorio:

$$C_B = 1,316 \times A_{500} + 0,173$$

4.2.5 Cuantificación de carbohidratos. Se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Se tomó 1 mL de medio de cultivo, a este se le adicionan 0,5 mL de fenol al 5% y 2,5 mL de ácido sulfúrico al 95%, seguidamente se homogeniza. Por último la muestra se midió en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 480 nm, 485 nm y 490 nm para identificar xilosa, arabinosa, glucosa y fructosa presentes en la biomasa. Se calculó el contenido de carbohidratos de las muestras en mg de carbohidrato/L.

4.2.6 Cuantificación de proteínas. El proceso de cuantificación de proteínas inició con la extracción de las mismas por medio del método de Rausch (1981) empleado por Chen & Vaidyanathan (2012). En el proceso se centrifugó una alícuota (10 mL) del medio de cultivo a 3400 rpm durante 20 minutos. Al pellet se le adicionó 1 mL 1 M de NaOH y se extrajo a 80°C por 10 minutos con agitación ocasional. Después de enfriar se centrifugó por segunda vez y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. La extracción alcalina fue repetida 3 veces. La última extracción fue calentada a 100°C por 10 minutos para extraer completamente las proteínas. Las tres extracciones fueron combinadas y mezcladas antes del análisis.

El contenido de proteínas totales en el extracto fue estimado usando el método de proteínas por reacción de Folin (Lowry *et al.*, 1951), empleado por Dorey *et al.*, 1998. Este consistía en tomar 1 mL de las muestras extraídas en un tubo de

ensayo de vidrio forrado con aluminio, al cual se le agregó 1,4 mL d solución Lowry (A-B-C), con un vórtex se mezcló durante 3 min y luego se dejó incubar por 20 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adicionó 0,2 mL del reactivo de Folin en solución con agua, el cual se dejó reaccionar por 30 minutos con agitación ocasional.

Finalmente la concentración de proteínas en la muestra se estimó por lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm y a partir de la correlación contra una curva de calibración de solución de proteínas estándar (solución de albúmina de suero bovino con concentración máxima de 2 g/L) se calculó el contenido de proteínas en mg de BSA/L.

4.2.7 Cuantificación de lípidos. La cuantificación de lípidos se estimó siguiendo el procedimiento de Chen *et al.*, (2012), que consiste, en realizar la lisis celular, seguida, de la saponificación de los lípidos, extracción de FA, y la formación de complejos de Cu-FA. Para cada experimento realizado, se tomó 0,05 g de biomasa de los días 5, 10 y 15 de cultivo. Esta biomasa se resuspendió en 100 µl de Tris-HCl (1M, pH 8,0). Seguidamente, se añadió 2.400 µl de reactivo de saponificación (25% de metanol en 1M NaOH) y se añadió aproximadamente 250 mg de perlas de vidrio de 0,1 mm. Posteriormente, se realizó la ruptura celular mediante la agitación con vórtex vigorosa durante 3 min. Luego, se añaden otros 2.500 µl de del reactivo de saponificación. Después, la mezcla se saponifica en baño maría a 90°C durante 30 min y se agitó con vórtex cada 5 min para hidrolizar los enlaces éster de los lípidos de membrana y triglicéridos (Wawrik, *et al.*, 2010). Después de la saponificación, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se tomaron 3.000 µl de la mezcla saponificada y se añadieron a un tubo Eppendorf que contenía 4.500 µl de una mezcla disolvente de cloroformo y metanol (2:01). Después de agitación durante 2 min, las muestras se centrifugan a 5.000 rpm durante 2 min. A continuación, se tomó un volumen de 2.500 µl de la fase orgánica

y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf que contenía reactivo de cobre (9 vol. AQ. 1 TEA M, 1 vol. Ácido acético 1 M, 10 vol. 6,45 p/v de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$). Después de este paso, 1.500 μl de la fase orgánica se transfirió cuidadosamente a una cubeta de cuarzo y se midió la absorbancia a 260 nm usando un espectrofotómetro.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la influencia de las variables de estudio, sobre los datos obtenidos en el diseño de experimentos, se realizaron los diagramas de Pareto determinando la influencia significativa positiva o negativamente de éstas variables en la producción de metabolitos, es decir, algunas de las variables mencionadas anteriormente tienen mayor incidencia sobre las otras de acuerdo al metabolito que se esté analizando; esta significancia se aprecia cuando las variables cruzan el umbral (línea punteada de color rojo) con un valor $p < 0,05$ (ANEXO B).

Los diagramas de superficie de respuesta se realizaron de acuerdo a los datos arrojados por los diagramas de Pareto manteniendo constante en cada uno, las mejores condiciones acetato de sodio, nitrato de sodio y fosfato de potasio, para observar el efecto que tienen las interacciones entre las variables significativas con respecto a cada uno de los metabolitos evaluados. En el diagrama se diferencian dos zonas que representan la mayor (Gama de rojos) o menor (Gama de verdes) producciones cuantificadas.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Caracterización de la biomasa. En la Tabla 4 y las Figura 1a y b se evidencia la máxima la producción de biomasa (g/L) para cada experimento en función de la concentración de carbonato de amonio, acetato de sodio, nitrato de sodio y fosfato de potasio para los diferentes cultivos. La concentración inicial de la biomasa para todos los cultivos fue de 0,2 g/L (día 0).

Se observa que el tratamiento T15 con 2,149 mM de carbonato de amonio, 1,960mM de nitrato de sodio, 2,107 mM de fosfato de potasio obtuvo la mayor producción de biomasa con una concentración de 2,165 g/L al día 10 de cultivo, para acetato de sodio la mayor producción de biomasa se presentó al igual que el carbonato de amonio en el tratamiento 15 con una concentración de 20 mM, se obtuvo una producción de 3,55 g/L, este resultado es superior (2 g/L) al reportado por Yanna *et al.* (2009) empleando glucosa al 1% (p/v) como fuente de carbono. Devi *et al.* (2012) reportaron una concentración máxima de biomasa de 1,69 g/L en un cultivo con mecanismo heterotrófico el cual combinó la modificación de carbono, fósforo y nitrógeno; también indicaron que los nitratos y los fosfatos tienen efectos positivos en el crecimiento de la microalga. Los estudios de Li *et al.*, (2007) reportaron que la concentración de la biomasa se duplicó cuando el nitrógeno en el medio se agotó.

En el presente estudio las mayores producciones de biomasa se observan con una concentración de 1,96 mM de nitrato de sodio. La absorción de fósforo bajo diferentes medios de cultivo mostró una tendencia representativa, altas concentraciones de fosfato (2,11 mM) producen mayor cantidad de biomasa. Cabe mencionar que se empleó una sola fuente de carbono para el medio de cultivo, que corresponde al carbonato de amonio o el acetato de sodio correspondiente a cada diseño experimental para el crecimiento autotrófico. Los estudios de Liling *et al.*, (2011) reportaron baja producción de biomasa cuando se emplea una única

fuelle de carbono. Por otro lado Yanna *et al.*, (2009) reportaron indicaron baja productividad de la biomasa en el crecimiento autotrófico en comparación al heterotrófico o mixotrófico.

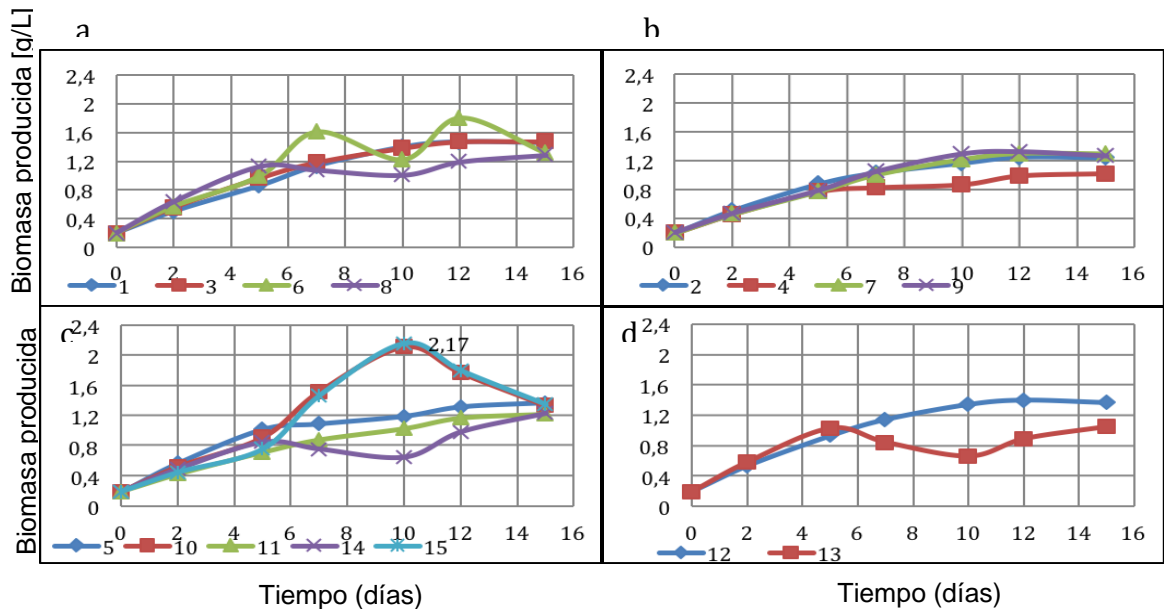
Tabla 4. Máxima producción de biomasa en cada experimento

Acetato de sodio															
T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
g/L	2,80	3,06	2,61	2,31	2,44	2,50	2,51	3,07	2,50	2,92	2,56	2,75	2,38	3,71	3,72
Días	10	10	15	15	10	10	10	10	15	10	15	10	10	10	10

Carbonato de amonio															
T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
g/L	1,47	1,25	1,48	1,02	1,38	1,81	1,30	1,29	1,33	2,12	1,23	1,40	1,06	1,24	2,17
Días	12	12	15	15	15	12	12	15	12	10	15	12	15	15	10

Figura 1a. Biomasa producida [g/L] para cada uno de los tratamientos.

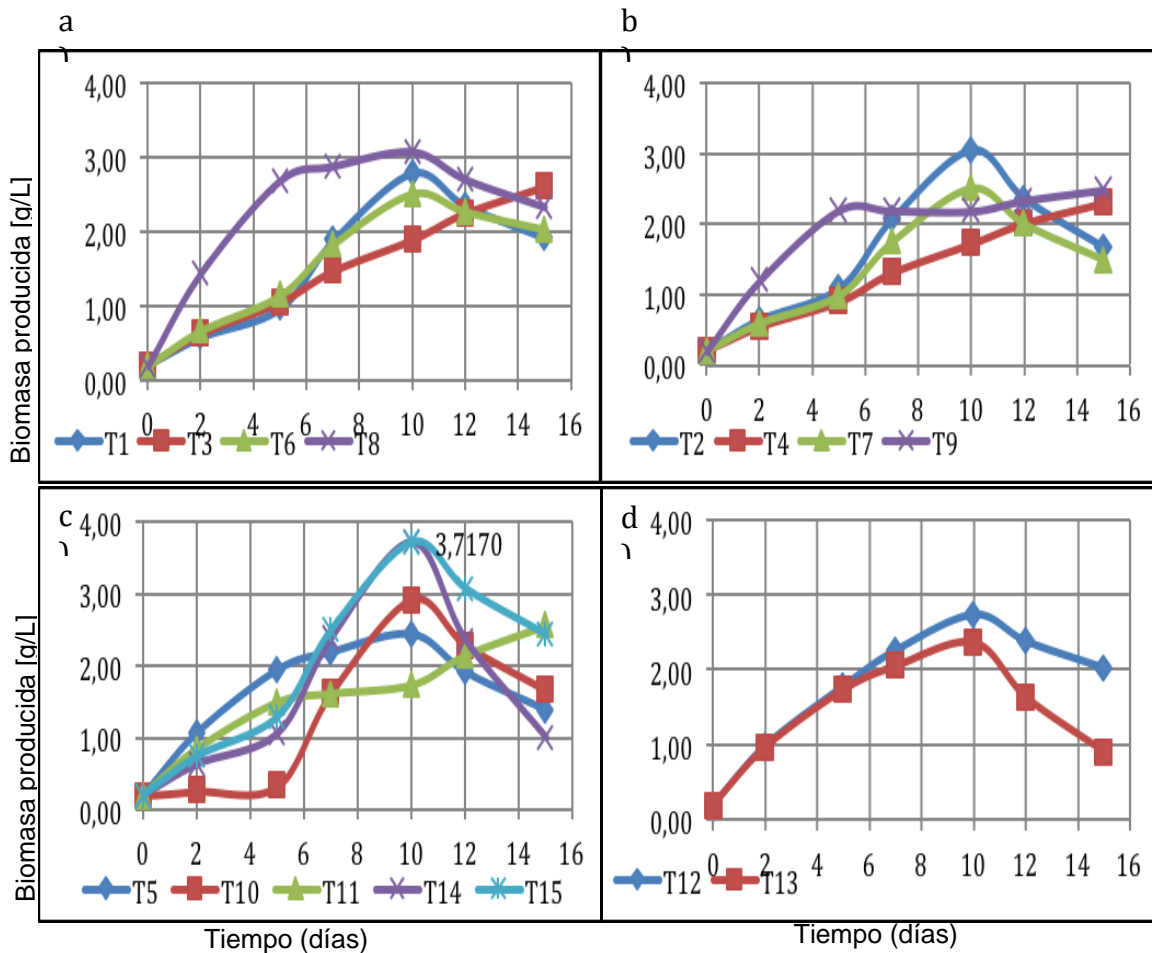
a. Carbonato de amonio como fuente de carbono.



Cada gráfica posee una concentración de nitrato de sodio específica: a). 2,94 mM; b). 0,98 mM; c). 1,96 mM; d). 0,32 y 3,6 mM.

Figura 1b. Biomasa producida [g/L] para cada uno de los tratamientos.

b. Acetato de sodio como fuente de carbono.



Cada gráfica posee una concentración de nitrato de sodio específica: a). 2,94 mM; b). 0,98 mM; c). 1,96 mM; d). 0,32 y 3,6 mM.

4.4.2 Producción de proteínas. Durante los primeros días de cultivo algunos tratamientos presentaron baja producción debido a que las microalgas presentan cambios en la composición interna producido por la adaptación al nuevo medio de cultivo. El contenido de proteínas totales se incrementa a partir del día 2 de cultivo, obteniéndose el mayor porcentaje de proteínas al día 7 (Tabla 5) por el tratamiento T₈ con 3,223 mM carbonato de amonio: 2,94 mM nitrato de sodio: 0,574 mM fosfato de potasio obteniendo una concentración de proteínas totales de 0,370 g/L correspondiente al 34,3% de la biomasa.

Mientras que en la Tabla 6, se observa que el mejor porcentaje para proteínas es del 60% de la biomasa total y corresponde a 0,63 g/L para el tratamiento T₃ con 30 mM acetato, 2,94 mM nitrato y 1,72 mM de fosfato. La mayor producción de proteínas totales se observó en los tratamientos con concentraciones de nitrato de sodio de 2,94 mM.

La producción de proteínas resulta ser más eficiente que la obtenida por Yanna *et al.* (2009) donde la máxima producción corresponde al 32%, empleando glucosa al 1% (p/v), Sin embargo Uslu *et al.* (2011) reportaron un aumento en el contenido de proteínas de 8% a 54% mediante el aumento en la concentración de nitrógeno. Se cumple para acetato de sodio pero con carbonato de amonio la producción de proteínas es del 34%. Los estudios de Porras & Prada (2012) reportaron un rendimiento del 54% (p/p), cultivada en medio Bold Basal. En la Tabla 5 se observa que la mayoría de tratamientos obtuvieron un contenido superior al 28% de proteínas en la biomasa al emplear un cultivo bifásico de nitrógeno con nitrato de sodio y carbonato de amonio. Los estudios realizados por Uslu *et al.* (2011) indicaron que la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo causó una reducción en el contenido de proteínas (53,5 a 5,6%). Otros autores como Bulut (2009), cultivaron medios con deficiencia de nitrógeno y fósforo, reportando el menor contenido de proteínas en *C. vulgaris* del 13,01% en el cultivo con menor concentración de nitrógeno.

Tabla 5. Máxima producción de proteínas totales con carbonato de amonio para cada experimento

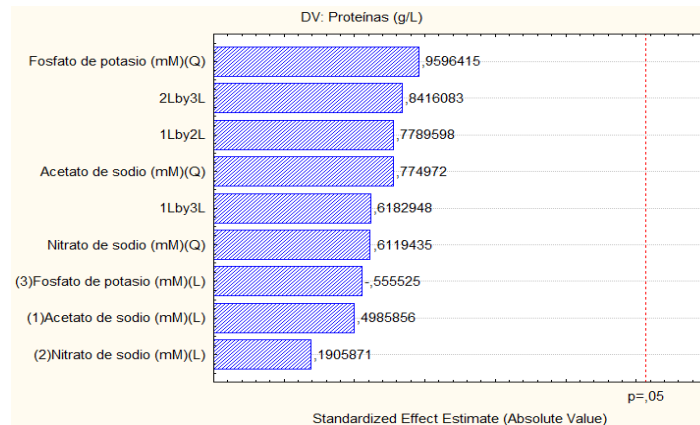
T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
g/L	0,17	0,149	0,326	0,231	0,268	0,279	0,098	0,37	0,319	0,286	0,371	0,381	0,293	0,210	0,292
%	33,8	29	33,7	22,7	24,4	21,2	20,3	34,3	25,1	30,9	31,4	33,1	32,7	24,5	32,9
Día	2	2	5	15	7	15	15	7	15	5	12	7	12	5	5

Tabla 6. Máxima producción de proteínas totales con acetato de sodio para cada experimento

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
g/L	0,264	0,160	0,626	0,522	0,435	0,494	0,113	0,197	0,104	0,113	0,065	0,170	0,291	0,311	0,135
%	27	25	60	40	23	22	19	14	9	42	4	8	18	13	18
Día	5	2	5	7	12	12	2	2	2	2	5	15	12	12	2

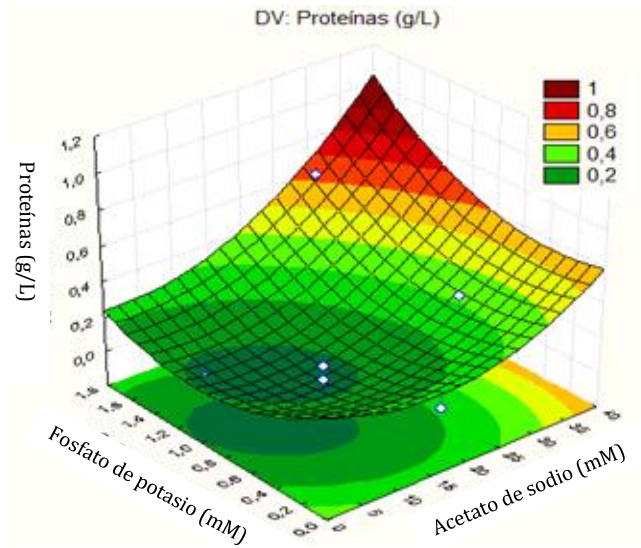
En el diagrama de Pareto para la producción de proteínas (Figura 2), se observa que en los experimentos cultivados no hay variables significativas para la producción de este metabolito. Esto se debe a que el modelo propuesto no es selectivo para la producción de proteínas ya que, las concentraciones de nutrientes proporcionadas al cultivo no son apropiadas.

Figura 2. Diagrama de Pareto para la producción de proteínas



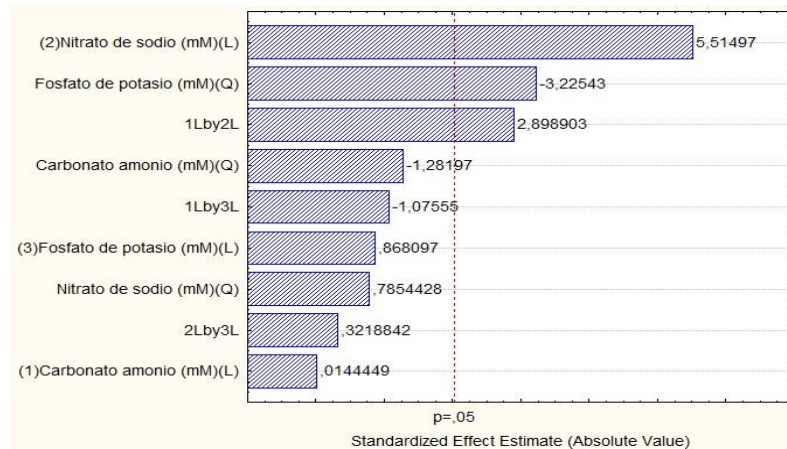
La superficie de respuesta para la producción de proteínas (Figura 3) muestra, que la mayor producción (1g/L), se obtiene con 36,73 mM de acetato; 3,6 mM de nitrato y 2,11 mM de fosfato. Sin embargo, pueden obtenerse concentraciones superiores de proteínas usando concentraciones más altas de acetato, nitrato y fosfato. Fábregas *et al* realizó estudios en los que se evidenció una variación en la concentración de nitrato de sodio influye en la producción de proteínas, de manera que la producción de este metabolito siempre es alta usando nitrato como fuente de nitrógeno pero es proporcional a la concentración que se utilice de este nutriente (Fábregas *et al*).

Figura 3. Superficie de respuesta para la producción de proteínas.



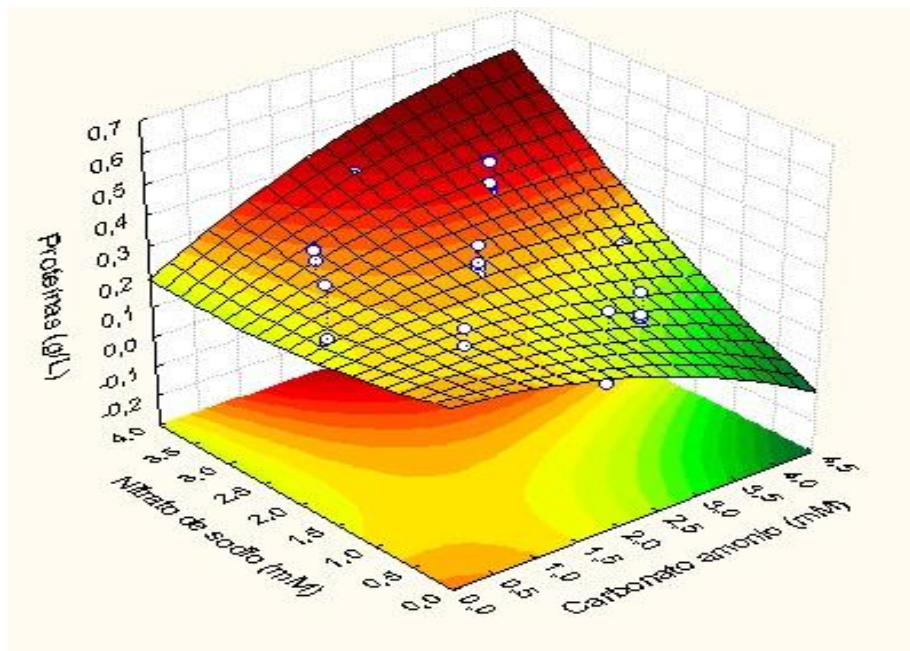
En el diagrama de Pareto en la producción de proteínas (Figura 4) se observa que la concentración de nitrato de sodio – carbonato de amonio en el medio de cultivo de *C. vulgaris* ejercen una influencia significativa en la producción de proteínas.

Figura 4. Diagrama de Pareto de la extracción de proteínas



La Figura 5 permite observar que la concentración de carbonato de amonio y nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo son directamente proporcionales a la producción de proteínas totales en la biomasa. Esta observación concuerda con los estudios realizados por Converti *et al.* (2009) y Ördög *et al.* (2011) que reportaron un incremento en la concentración de proteínas los días con mayor reserva de nitrógeno, pero cuando el nitrógeno se convierte en un limitante, sus concentraciones disminuyeron debido a la disminución de la síntesis de proteínas. La mayor concentración de proteínas producidas fue 0,5 g/L con concentraciones de 3,947 mM de carbonato de amonio, 3,6 mM de nitrato de sodio y 1,147 mM de fosfato de potasio.

Figura 5. Superficie de respuesta para la producción de proteínas en carbonato de amonio vs nitrato de sodio



4.4.3 Producción de carbohidratos. La Tabla 7 y 8 se presenta la máxima producción de carbohidratos (g/L) en función de la concentración de carbonato de amonio, acetato de sodio, nitrato y fosfato en el medio de cultivo. La concentración inicial de carbohidratos para todos los cultivos presentó una concentración uniforme de 0,03 g/L (día 0). Se observa que el tratamiento T2 con 1,074 mM de carbonato de amonio, 0,98 mM de nitrato y 1,721 mM fosfatos alcanzó la mayor producción de azúcares, obteniendo una concentración de 0,82 g/L que corresponde al 66,1% de la biomasa en el día 15 de cultivo. En la tabla 8 se aprecia que el mayor porcentaje de producción de carbohidratos se encuentra en el día 15 de cultivo con un 73% de la biomasa total, este porcentaje corresponde a 1,02 g/L para el tratamiento T5 con 20 mM acetato, 1,96 mM nitrato y 1,15 mM fosfato.

Tabla 7. Máxima producción de carbohidratos totales con carbonato de amonio para cada experimento.

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
g/L	0,658	0,82	0,421	0,323	0,295	0,56	0,648	0,252	0,632	0,709	0,37	0,357	0,575	0,343	0,486
%	45,2	66,1	28,5	31,6	21,4	42,6	59,8	23,4	49,8	52,9	30,1	26,5	54,5	52,1	35,8
Día	15	15	15	15	15	15	12	7	15	15	15	10	15	10	15

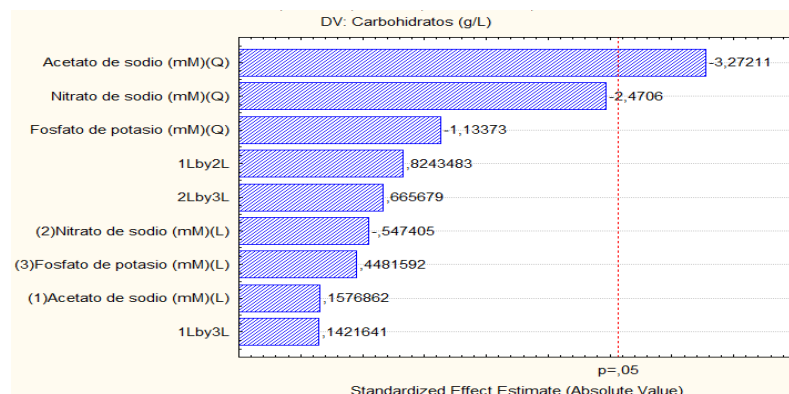
Tabla 8. Máxima producción de carbohidratos totales con acetato de sodio para cada experimento.

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
g/L	0,319	1,183	0,234	1,353	1,017	0,544	0,847	0,792	1,037	1,193	0,562	0,507	0,675	0,535	0,346
%	33	50	37	67	73	27	57	34	44	72	38	21	41	53	27
Día	5	12	2	12	15	15	15	15	12	15	5	12	12	15	5

La producción de carbohidratos es mayor a la reportada por Dragone *et al.* (2011) donde el rendimiento máximo fue de 41%, empleando urea como fuente de nitrógeno para el medio de cultivo de *C. vulgaris*, así mismo el rendimiento resultó ser mayor al obtenido por los experimentos realizados por Brennan & Owende (2010) quienes reportaron eficiencias del 55% (p/p) de azúcares totales en la biomasa, lo que resulta en un incremento del 11% y 18% aproximadamente con carbonato de amonio y acetato de sodio. Yanna *et al.* (2009) reportaron un porcentaje de carbohidratos del 44% empleando glucosa al 1% en el medio como fuente de carbono. Los estudios de Xin *et al.* (2010) mencionaron que la deficiencia del fósforo tiene como resultado un cese de la división celular y la síntesis de carbono es encaminada al almacenamiento de energía como carbohidratos por tal motivo su porcentaje aumenta.

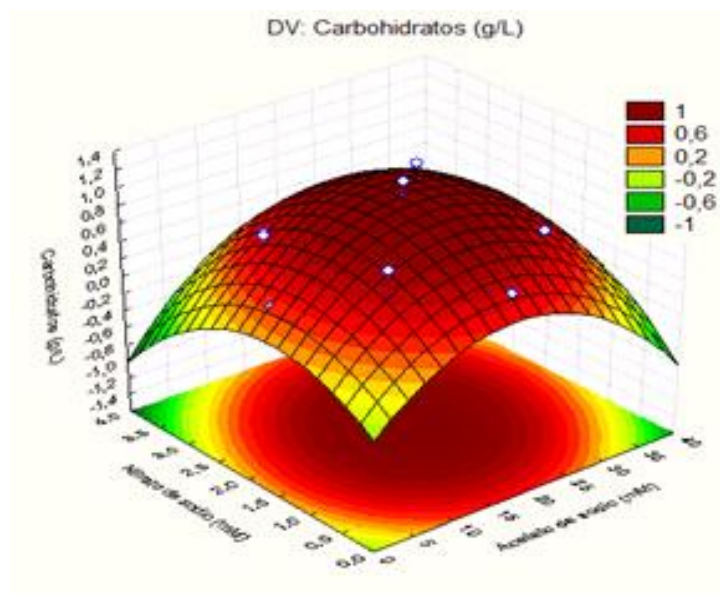
En la Figura 6, se observa que la variable acetato de sodio, es significativa para la producción de carbohidratos, mientras que las demás variables no representan variaciones importantes para este metabolito. Aunque el valor es negativo (-3.27211) esto significa que a menor concentración de acetato de sodio, la producción de carbohidratos se hace mayor (Figura 6); obteniendo concentraciones de hasta 1 g/L.

Figura 6. Diagrama de Pareto para la producción de carbohidratos



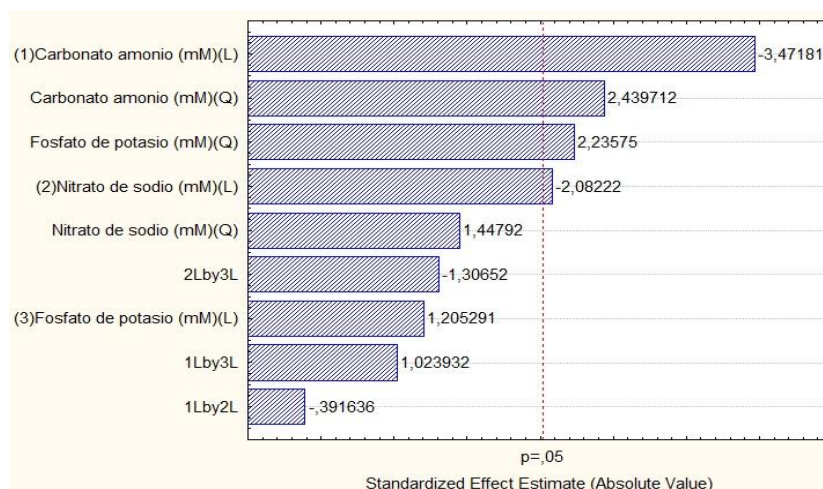
La Figura 7, muestra que el modelo propuesto es selectivo para la producción de carbohidratos. Sin embargo, es necesario suministrar concentraciones promedio de acetato (20 mM), nitrato (1,96 mM) y fosfato (1,08 mM) para obtener altas concentraciones de este metabolito. Según Estevez, *et al.*, (2013) el uso de acetato de sodio es problemático debido a que su efecto es dependiente de la concentración. Algunos autores como Quiao y Wang, (2009); Jeon *et al.*, (2006) y Degrenne *et al.*, (2010) encontraron que las concentraciones por encima de 1g/L pueden causar la inhibición del crecimiento debido a intoxicación. Vale la pena resaltar que cuando el nitrógeno se agota del medio de cultivo, la célula utiliza el nitrógeno restante en enzimas y estructuras celulares esenciales y una parte del contenido de dióxido de carbono se convierte en lípidos y carbohidratos (Fábregas, *et al.*, 1989).

Figura 7. Superficie de respuesta para la producción de carbohidratos.



Para el carbonato de amonio el diagrama de Pareto en la producción de carbohidratos (Figura 8) se puede observar que las variables que ejercen un efecto positivo en la producción de azúcares en la biomasa fueron las concentraciones de carbonato de amonio y fosfato de potasio.

Figura 8. Diagrama de Pareto de la extracción de carbohidratos



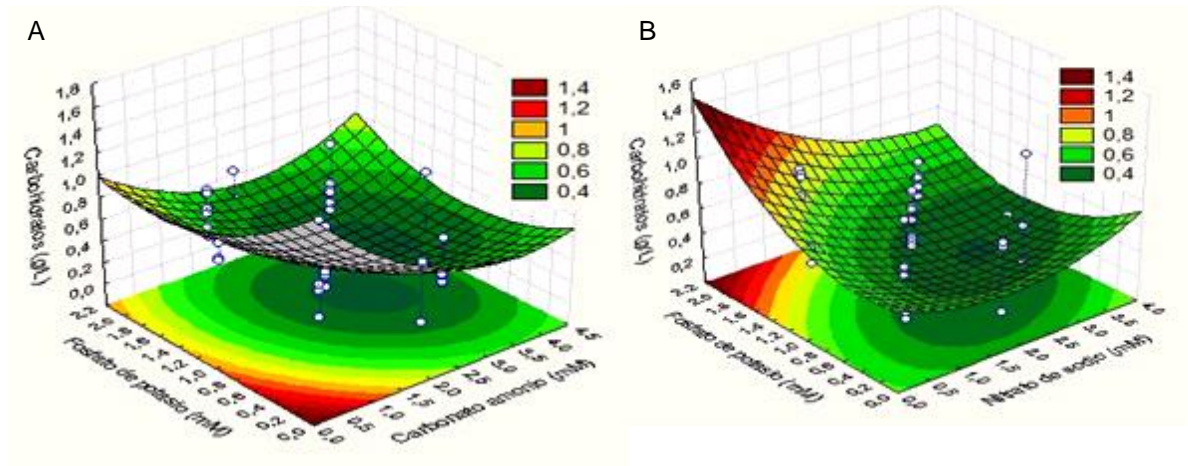
En la Fig. 8, la presencia o ausencia de fosfato de potasio causan una diferencia significativa. Por otro lado las interacciones nitrato – fosfato, carbonato – nitrato y carbonato – fosfato no representan una influencia positiva en su producción.

Las Fig. 9A y 9B (superficie de respuesta) permite observar que la concentración de carbonato de amonio y fosfato de sodio son directamente proporcionales en la producción de azúcares totales en la biomasa, así mismo, el fosfato y el nitrato son inversamente proporcionales.

Figura 9. Superficie de respuesta para la producción de carbohidratos

Carbonato de amonio vs fosfato de potasio.

Nitrato de sodio vs Fosfato de potasio



Como se muestra en la Fig. 9A, la máxima concentración de azúcares producidos fue 1,4 g/L a concentraciones de 0,351 mM de carbonato de amonio, 0,187 mM de fosfato de potasio y 3,6 mM de nitrato de sodio.

En la Fig. 9B, la máxima concentración fue 1,4 g/L a concentraciones de 0,32 mM de nitrato de sodio, 2,107 mM de fosfato de potasio y 3,947 mM de carbonato de amonio.

4.4.4 Producción de lípidos. En la Tabla 9 se observa que la concentración de lípidos correspondiente al 0,34% es 0,0081 g/L para el tratamiento T₁₃ 20 mM acetato, 0,32 mM nitrato y 1,15 mM fosfato. En la Tabla 10 se observa que los tratamientos T₁₃ con 2,149 mM de carbonato, 0,32 mM de nitrato 1,147 mM de fosfato inicial, y T₁ con 1,074 mM de carbonato, 2,94 mM de nitrato 0,574 mM de fosfato, se obtuvieron los mayores contenidos de concentración lipídica de los tratamientos del 0,3% y 0,28% de contenido lipídico respectivamente. Dicho

porcentaje corresponde con una producción de 0,0031 g/L (T₁₃) y 0,0041 g/L (T₁). El bajo porcentaje obtenido es atribuido a las condiciones del medio de cultivo con dos fuentes de nitrógeno en este caso el carbonato de amonio y el nitrato de sodio y a la forma en que la microalga se adapta a las condiciones de cultivo.

Los carbohidratos y los lípidos suelen ser las principales reservas de energía, por lo cual la alteración en la concentración de estos puede ser un indicativo de la forma en que el organismo percibe su entorno y la forma en que se adapta a él (Chen, *et al.*, 2013). El porcentaje de lípidos obtenido es bajo comparado con estudios realizados por Porras & Prada, en los cuales se alcanzan presencias de éste metabolito del 21% con un medio de cultivo Bold Basal modificado con nitrato de sodio y acetato de sodio (Porras & Prada, 2012).

Tabla 9. Máxima producción de lípidos totales con acetato de sodio para cada experimento.

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
%	0,19	0,22	0,25	0,21	0,26	0,26	0,28	0,24	0,25	0,22	0,28	0,33	0,34	0,33	0,32
g/L	0,0019	0,0024	0,0026	0,0043	0,0049	0,0030	0,0028	0,0065	0,0058	0,0051	0,0049	0,0092	0,0081	0,0122	0,0118
Día	5	5	5	12	12	5	5	12	12	12	10	10	10	10	10

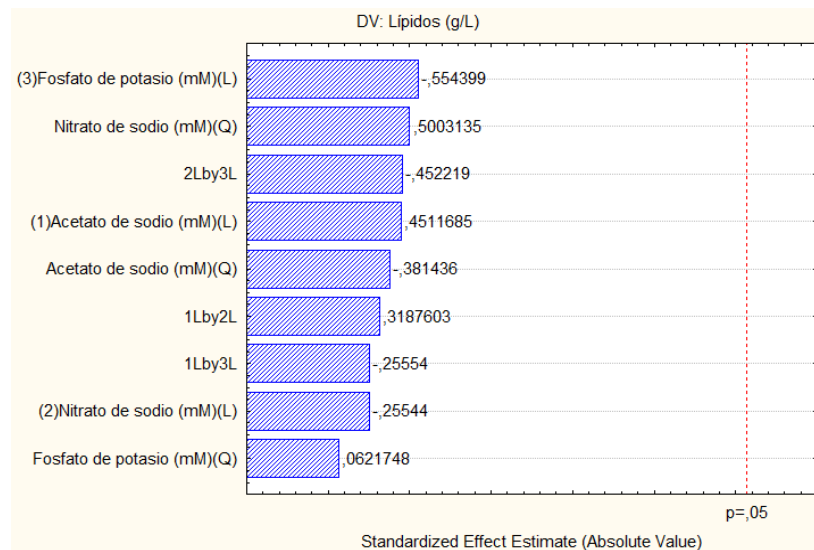
Tabla 10. Máxima producción de lípidos totales con carbonato de amonio para cada experimento.

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
%	0,28	0,23	0,22	0,23	0,24	0,23	0,26	0,23	0,25	0,24	0,23	0,26	0,3	0,21	0,24
g/L	0,0041	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004	0,003	0,003	0,003
Día	15	15	15	10	15	10	5	15	15	15	15	15	15	15	15

En el estudio la disminución de la concentración de nitrato de sodio en el medio un 89% en relación a los valores óptimos del medio Bold basal, incrementó el contenido de lípidos en *C. vulgaris* de 0,16 a 0,3%, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Converti *et al.* (2009), los cuales reportaron un incremento de 5.90 a 16.41% del contenido de lípidos al limitar el nitrato de sodio el 75 % en relación a la concentración del tratamiento de control.

En la Figura 10, se observa que no hay variable significativa para la producción de lípidos; la concentración de los nutrientes estudiados no representan variaciones importantes para este metabolito. Además, La superficie de respuesta (Figura 11), demuestra que la mayor producción de lípidos posible es de 0,014 g/L, y se obtendría con altas concentraciones de acetato (36,73 mM), nitrato (3,6 mM) y bajas concentraciones de fosfato (0,19 mM).

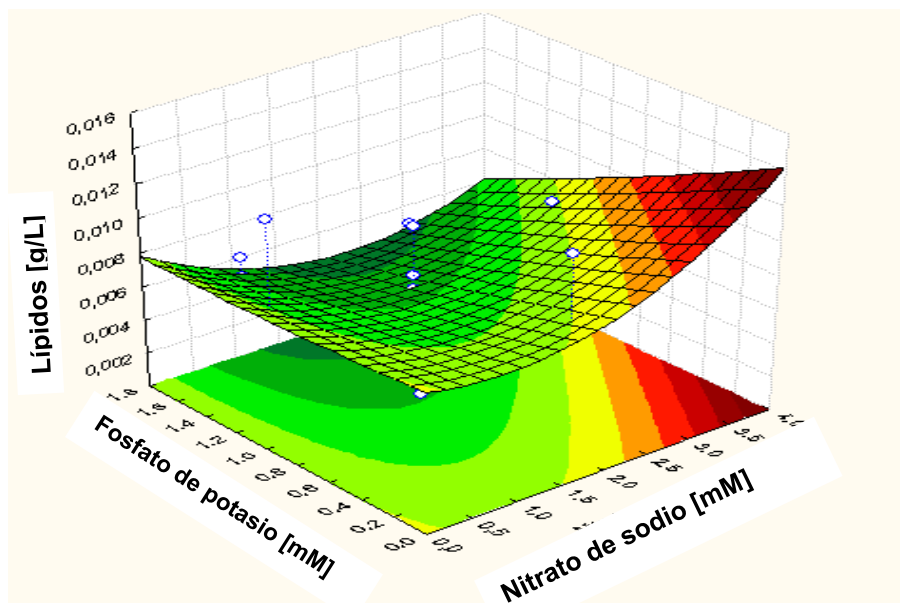
Figura 10. Diagrama de Pareto para la producción de lípidos



En estudios realizados por Estévez *et al.* 2013, se demostró que la regulación apropiada de la cantidad de carbono (en este caso acetato de sodio) y nitrógeno no sólo puede aumentar la producción de biomasa, sino también promover la deposición de ciertos metabolitos tales como lípidos (Estévez, *et al.* 2013). Los resultados obtenidos en esta investigación respaldan esta afirmación de manera que, para este estudio altas concentraciones tanto de acetato como de nitrato favorecen la formación de lípidos; sin embargo, la variación simultánea de acetato, nitrato y fosfato provocaron una disminución general de este metabolito comparada con otros estudios realizados por Porras & Prada (2012).

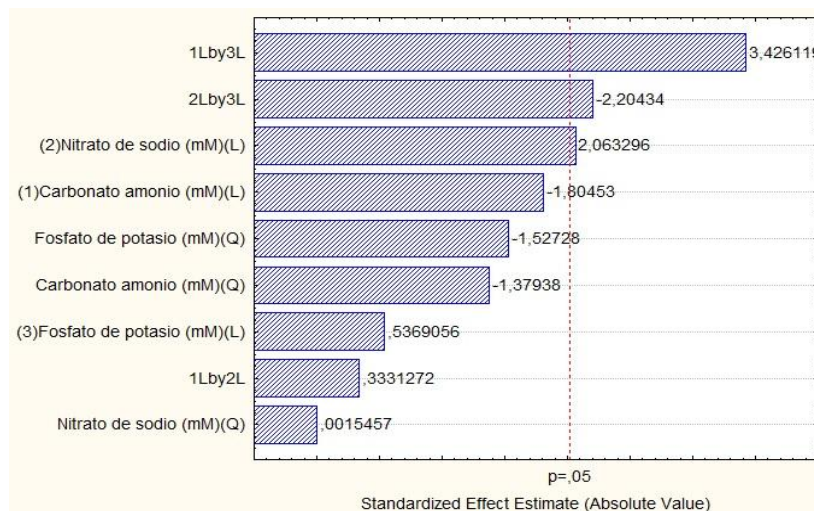
La limitación de fosfato provoca acumulación de altas cantidades de lípidos; sin embargo, el crecimiento celular deficiente conduce a una baja producción de este metabolito. Por lo tanto, es importante establecer medio y condiciones de cultivo apropiadas de cultivo para obtener una producción óptima de lípidos (Chun, W. *et al.*, 2013).

Figura 11. Superficie de respuesta para la producción de lípidos.



En el diagrama de Pareto en la producción de lípidos (Figura 12) se puede observar que las variables que ejercen una influencia significativa fueron las interacciones carbonato de amonio – fosfato de potasio, nitrato de sodio – fosfato de potasio y la concentración de nitrato de sodio.

Figura 12. Diagrama de Pareto de la extracción de lípidos

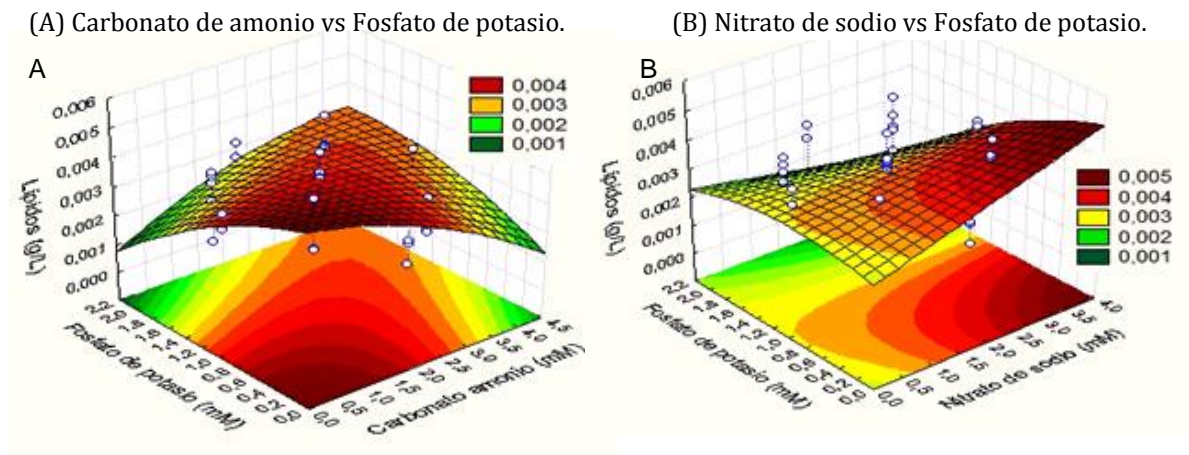


La superficie de respuesta de la Fig. 13A y 13B permite observar que la concentración de fosfato de sodio es inversamente proporcional a la producción de lípidos. En la fig. 15A se observa que la concentración de carbonato de amonio como fuente de carbono en el medio de cultivo es inversamente proporcional a la producción de lípidos totales en la biomasa. La máxima concentración de lípidos (Fig. 13A) fue 0,004 g/L con concentraciones de 0,351 mM de carbonato, 0,187 mM de fosfato y 3,6 mM de nitrato.

La superficie de respuesta de la Fig. 15B permite observar que la concentración de nitrato en el medio de cultivo tiene una relación directa con dicha producción.

Esta observación contradice los resultados obtenidos por Converti *et al.* (2009), Li *et al.* (2007) y Widjaja *et al.* (2009) que reportaron disminución de la actividad enzimática e incrementos en la fracción de lípidos en *C. vulgaris* al reducir el contenido de nitrógeno en el medio. La máxima concentración de lípidos (Fig. 13B) fue 0,005 g/L con concentraciones de 3,6 mM de nitrato, 0,187 mM de fosfato y 0,351 mM de carbonato de amonio.

Figura 13. Superficie de respuesta para la producción de lípidos.



Las respectivas modificaciones de nitrato, fosfato, acetato de sodio y carbonato de amonio en el medio de cultivo permite variar considerablemente la proporción en los metabolitos celulares de interés (carbohidratos, proteínas, clorofilas y lípidos), esto nos permite separar y seleccionar los tratamientos que cumplan con mejorar la producción de los metabolitos deseados (Tabla 11) y de esta manera cumplir el objetivo establecido para este proyecto.

Tabla 11. Resumen de los mejores tratamientos para cada metabolito de interés (proteínas, clorofilas, carbohidratos y lípidos).

TRATAMIENTO	DÍA	METABOLITO	CONCENTRACIÓN [g/L]	PORCENTAJE [g/g]	NUTRIENTES DEL MEDIO		
					Acetato [mM]	Nitrato [mM]	Fosfato [mM]
3	5	PROTEÍNAS	0,63	60%	30	2,94	1,72
5	15	CARBOHIDRATOS	1,02	73%	20	1,96	1,15
13	10	LÍPIDOS	0,01	0,34%	20	0,32	1,15

TRATAMIENTO	DÍA	METABOLITO	CONCENTRACIÓN [g/L]	PORCENTAJE [g/g]	NUTRIENTES DEL MEDIO		
					Carbonato [mM]	Nitrato [mM]	Fosfato [mM]
8	7	PROTEÍNAS	0,37	34,33%	3,223	2,94	0,574
2	15	CARBOHIDRATOS	0,82	66%	1,074	0,98	1,721
13	15	LÍPIDOS	0,0081	0,3%	2,147	0,32	1,15

Las Figuras 14 y 15, muestran el porcentaje de recuperación proteínas, carbohidratos, clorofilas y lípidos para cada una de las pruebas del diseño experimental. Se observa que los mayores porcentajes de producción de proteínas se obtuvieron alrededor del día 2 del cultivo; sin embargo, el porcentaje más alto de proteína fue del 60% en el día 5 con acetato de sodio como fuente de carbono; para carbonato de amonio los mayores porcentajes de producción de proteínas se obtuvieron alrededor del día 5, sin embargo el porcentaje de proteínas más alto es en el día 7 con un 34,32%, para carbohidratos en cambio, los mayores porcentajes de producción se encuentran alrededor del día 15 de cultivo, con un 73% de carbohidratos con acetato de sodio y un 66% con carbonato de amonio. Vale la pena resaltar que de los metabolitos estudiados, los mayores porcentajes fueron de carbohidratos. También se evidencia una disminución general en la producción de las clorofilas, observándose que la producción más alta de este metabolito fue del 10% de la biomasa total en el día 15 para acetato de sodio y del 7,5% de la biomasa en el día 12 para carbonato de amonio. Finalmente, se puede apreciar

que la mayor producción de lípidos se obtuvo en el día 10, alcanzando producciones hasta del 0,4% de la biomasa total al décimo día, no obstante, los porcentajes de lípidos fueron significativamente bajos con relación a los otros metabolitos estudiados.

Figura 14. Composición porcentual de metabolitos de *C. vulgaris* durante los 15 días de cultivo. La fuente de carbono es el acetato de sodio.

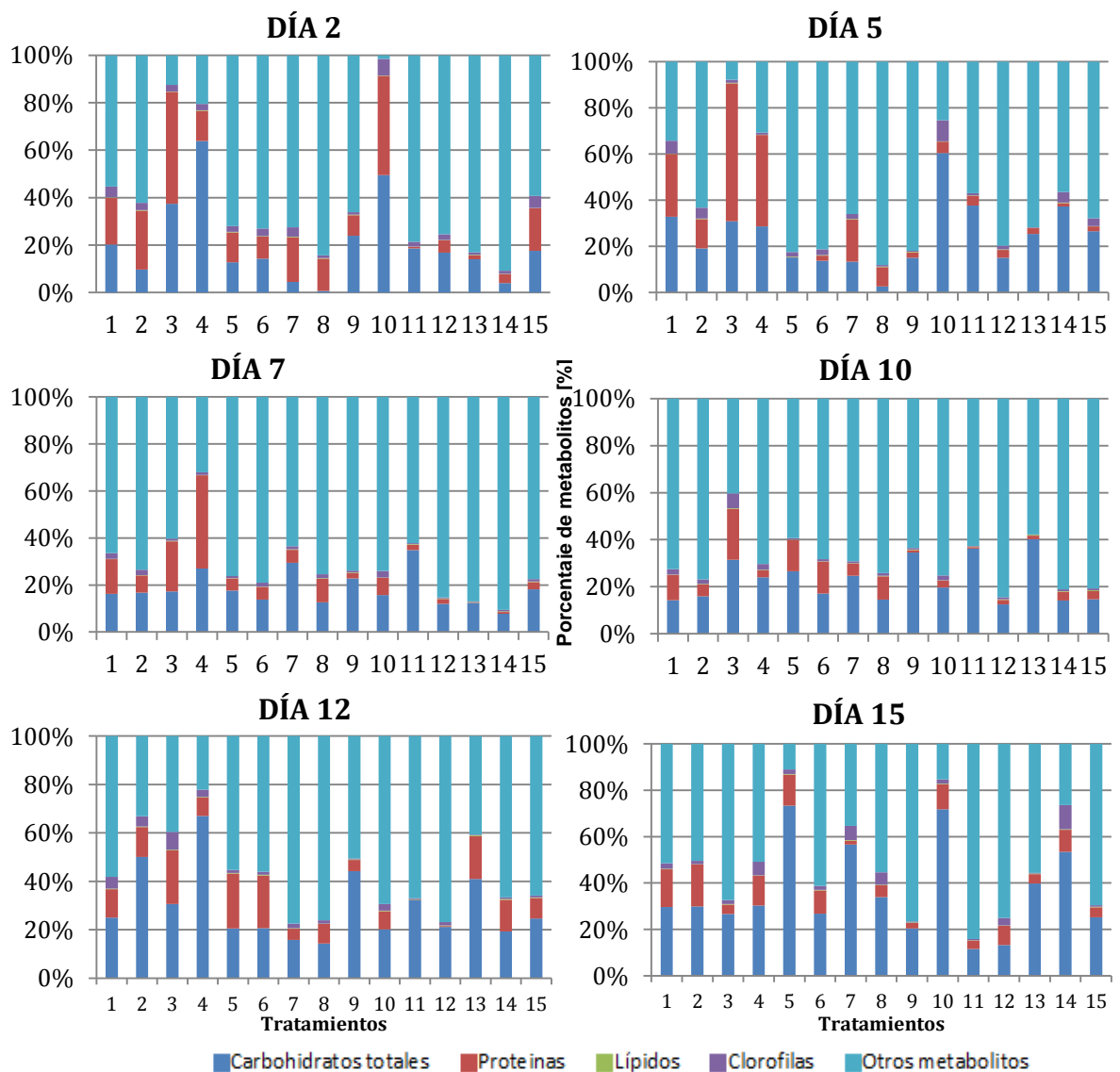
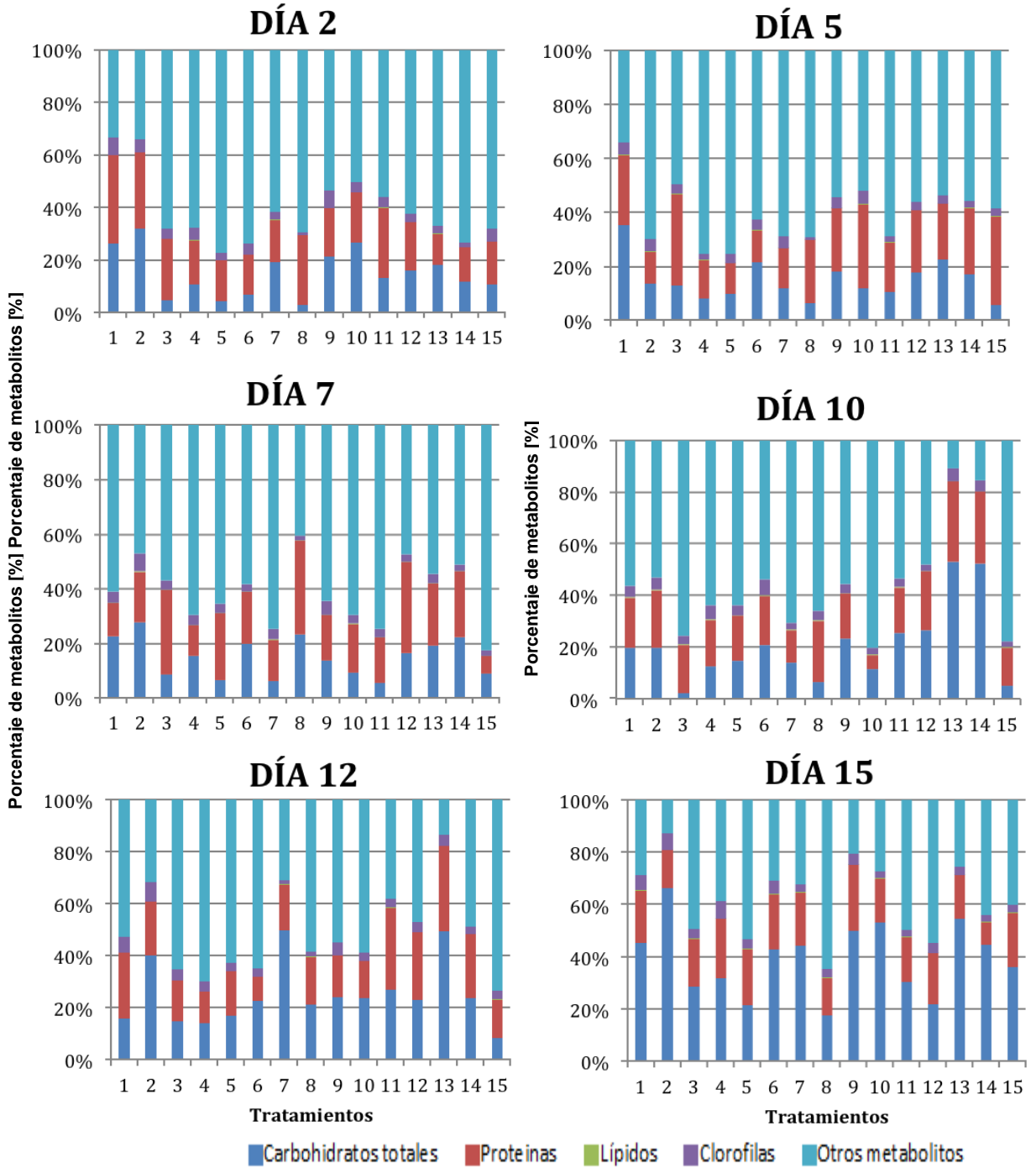


Figura 15. Composición porcentual de metabolitos de *C. vulgaris* durante los 15 días de cultivo. La fuente de carbono es el carbonato de amonio.



4.5 CONCLUSIONES

- El mejor porcentaje de proteínas obtenido fue del 60% y corresponde a 0,63 g/L para el tratamiento 3 con 30 mM acetato, 2,94 mM nitrato y 1,72 mM fosfato en el día 5 de cultivo. Mientras que con carbonato de amonio el mayor porcentaje de proteínas es de 34% en la biomasa se obtuvo en el día 7 de cultivo con una concentración de 3,223 mM de carbonato de amonio, 2,94 mM de nitrato de sodio y 0,574 mM de fosfato.
- El mayor porcentaje de producción de este metabolito se encuentra en el día 15 de cultivo con un 73% de la biomasa total, este porcentaje corresponde a 1,02 g/L para el tratamiento 5 (20 mM acetato, 1,96 mM nitrato y 1,15 mM fosfato). Mientras que para el trabajo con carbonato de amonio el mayor contenido de carbohidratos es de 61% de la biomasa con una concentración de 1,074mM de carbonato de amonio, 0,98 mM de nitrato y 1,721 mM de fosfato.
- Se alcanzó una concentración de lípidos del 0,34% correspondiente a 0,0081 g/L para el tratamiento 13 (20 mM Acetato, 0,32 mM Nitrato y 1,15 mM Fosfato). A pesar que el diseño no es selectivo para lípidos.

5. INFLUENCIA DE LAS VARIABLES (pH, CONCENTRACIÓN DE FLOCULANTE, AGITACIÓN) EN LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA MEDIANTE LA FLOCULACION A ESCALA LABORATORIO

5.1 INTRODUCCIÓN

El concepto de biorrefinería se ha identificado como el camino más prometedor para la creación de una industria basada en la biomasa de microalgas para la producción de biocombustibles y productos de alto valor agregado basado en la composición de especies promisorias, una biorrefinería basada en microalgas debe tener en cuenta varias cuestiones para su sostenibilidad como las necesidades de agua, costos de producción, los impactos ambientales y la eficiencia del proceso (González-Delgado, et al., 2011).

En el cultivo, se evalúa la composición química de la biomasa, que está relacionada con el diseño del medio de cultivo; donde factores como la concentración de los nutrientes presentes en el medio juegan un papel fundamental en la optimización de la producción de biomasa (Bhola *et al.* 2011).

La recolección de biomasa es un paso crítico en la producción de biocombustibles ya que determina la calidad final de los extractos, el requerimiento energético y la sostenibilidad de los proceso de producción (Issarapayup. *et al.*, 2009). La recolección probablemente es el componente de más alto costo en la producción de biomasa de microalgas (Pruvost, *et al.*, 2011), esto es debido a las bajas densidades celulares (típicamente en el 0,3-0,5 g L⁻¹ rango) y a el pequeño tamaño de las células de microalgas (típicamente <40 μ m) (Fernández, *et al.*, 2003), lo que resulta en una baja separación o una deshidratación deficiencia. La selección apropiada de las técnicas de recolección es fundamental para la cosecha de biomasa, para que el proceso sea económica y ambientalmente sostenible. No existe ningún método universal para la recolección de microalgas,

pero los procesos de separación o en combinación son los utilizados; como son la floculación, flotación, filtración, sedimentación y la inmovilización de células. Factores tales como la tensión, la densidad de células, condiciones de cultivo, medio de crecimiento y valor de los productos determinan tanto el costo y facilidad de recolección (Issarapayup. *et al.*, 2009). En general, el proceso debe ser capaz de: maximizar el peso seco de la biomasa recuperada (varía con las especies de microalgas, concentración de biomasa y tamaños de celda), minimizar el costo de operación, mantenimiento (incluido el consumo de energía) y el rendimiento de los extractos.

La recolección de microalgas en general, se puede dividir en un proceso de dos etapas:

- Cosecha en masa: el propósito es separar las microalgas de la biomasa suspendida. Por este método, el sólido total puede alcanzar de 2-7% usando floculación, flotación o sedimentación por gravedad (Halim, *et al.*, 2011).
- Espesamiento: El propósito de esta cosecha es concentrar el lodo, con filtración y centrifugación usualmente aplicada en este proceso. Este paso necesita más energía que una cosecha en masa.

Usualmente, procesos de centrifugación, filtración, sedimentación, floculación y coagulación son empleados, dependiendo del diámetro de partícula de las células de las microalga que oscila entre (3-30 μm) (Brennan, *et al.*, 2010 & Grima, *et al.*, 2003).

La filtración emplea un medio permeable a través del cual la suspensión es forzada a pasar empleando un gradiente de presión, el medio permeable retiene las células mientras que el medio líquido pasa a través de él. La filtración puede

ser superficial, en donde se forma una torta de sólidos en el medio filtrante, o tangencial en donde la suspensión fluye tangencialmente al medio permeable y es recirculado con el objetivo de concentrar la suspensión celular. Sin embargo puede llegar a ser poco eficiente, no más del 90%, debido a la baja densidad que alcanzan los cultivos microalgales, adicionalmente puede llegar a ser un proceso costoso (Grima, *et al.*, 2003; Uduman, *et al.*, 2010; Christenson, *et al.* 2011). La filtración puede ser un proceso eficiente para microalgas como *Coelastrum proboscideum* y *S. platensis* pero en el caso de microalgas más pequeñas como *Scenedesmus*, *Dunaliella*, o *Chlorella* la filtración no es un proceso eficiente (Mata, *et al.*, 2010).

La centrifugación es uno de los métodos más rápidos, fáciles y de mayor consumo de energía dependiendo del volumen de proceso para cultivar algas. La pasta de algas tradicionalmente obtenida contiene el 90% menos en peso de agua dependiendo de las características del alga (Converti, *et al.*, 2009; Fernandez, 2000).

La recolección de la biomasa puede llegar a representar entre el 20-30% del costo total de la producción. Un proceso posterior a la recolección suele ser necesario debido a la gran cantidad de agua presenta en la pasta obtenida, y es una deshidratación que suele hacerse mediante un secado al sol, cuyos inconvenientes son la contaminación, largos tiempos de exposición, pérdida de las propiedades de la biomasa son asociados; secado por aspersion, liofilización, y secado en lecho fluidizado pueden ser aplicados pero su costo aumenta considerablemente en el proceso (Brennan, *et al.*, 2010).

La sedimentación por gravedad es comúnmente aplicada para separar microalgas en agua y tratar deshechos en agua. La densidad y radio de las algas induce a la sedimentación influenciada por el asentamiento característico de los sólidos suspendidos. Una mejora para la recolección de microalgas por sedimentación

puede realizarse a través de laminillas separadoras y tanques de sedimentación. La floculación es frecuentemente usada para aumentar la eficiencia de la sedimentación por gravedad. El éxito de remover sólidos por sedimentación por gravedad depende de la alta densidad de las partículas de las microalgas (Tang, *et al.*, 2011).

La floculación y coagulación suele ser una operación en el cual las microalgas suelen llevar cargas negativas que previenen su agregación en suspensión. Dicha superficie cargada puede ser neutralizada o reducida por la adición de un floculante adecuado al medio de cultivo, que sea económico, no tóxico y efectivo a bajas concentraciones. Sales metálicas multivalentes como cloruro férrico (FeCl_3), sulfato de aluminio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) y sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) suelen ser usados. El aluminio es efectivo para algas como *Scenedesmus* y *Chlorella* (Kulczycki, *et al.*, 1981). Es válido aclarar, que el uso de floculantes metálicos suele ser muy poco recomendable si la biomasa recolectada tiene fines alimenticios. También existen floculantes poliméricos con el Quitosano, un polímero de acetilglucosamida, ha probado ser un floculante no tóxico y óptimo para varios tipos de algas. La floculación igualmente puede llevarse a cabo simplemente por el cambio del pH del medio de cultivo (Grima, *et al.*, 2003; Lee, *et al.*, 2010). Los factores que afectan la cosecha por floculación son la dosificación del floculante, la concentración de las células, fuerza iónica, material orgánico extracelular (EOM) y el pH de los medios de cultivo (Garzón-Sanabria *et al.*, 2012; Uduman *et al.*, 2010). Actualmente la floculación es un método ampliamente utilizado para el tratamiento de agua y se ha aplicado con éxito para las microalgas de agua dulce. Una ventaja de esta técnica, es que al finalizar la cosecha, las células de las microalgas permanecen intactas y vivas, en cambio en la centrifugación a altas velocidades, suelen romper las células resultando en el medio.

Debido a que factores como el pH, la concentración de biomasa y la cantidad de floculante empleado influyen en la eficiencia de la floculación de las microalgas y

en la extracción (Garzón-Sanabria *et al.*, 2012; Wu, *et al.*, 2012 & Henderson, *et al.*, 2008), el objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la floculación con sal metálica $AlCl_3$ y el polímero FO4990 en la concentración de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp.*

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Diseño experimental. Para el desarrollo del diseño, las microalgas se cultivaron con un inóculo de 1 g/L y 2,5 g/L de biomasa húmeda para *C. vulgaris* y *Nannochloropsis sp* respectivamente. La experimentación se llevó a cabo con las condiciones del diseño experimental. Se realizaron mediciones de absorbancia y pH, además se midió la concentración en peso seco con cada medición de densidad óptica para corroborar la linealidad entre ambas (Griffiths, *et al.*, 2011).

Para el diseño experimental se tomó como referencia los datos de Garzón-Sanabria *et al.*, (2012), y se realizó con el programa STATISTICA 7.0, basado en una composición central, factorial 3^3 de 17 experimentos (Tabla 12). Este fue realizado para evaluar el efecto de la variables de tiempo de cultivo 5, 10 y 15 días, pH 4, 7 y 10 y concentración de floculante 50, 100 y 150 mg/L.

Tabla 12. Diseño experimental floculación con $AlCl_3$

Tratamiento	Tiempo Cultivo (días)	Dosis de floculante (mg/L)	pH
1	1,63	100	7
2	5	50	4
3	5	50	10
4	5	150	4
5	5	150	10
6	10	16,3	7

Tabla 12. Continúa...

7	10	100	1,9
8	10	100	7
9	10	100	7
10	10	100	7
11	10	100	12,02
12	10	183,6	7
13	15	50	4
14	15	50	10
15	15	100	4
16	15	100	10
17	18,3	100	7

5.2.2 Determinación de las mejores condiciones de adición de floculante y ajuste de pH. Debido a que el pH afecta la floculación (Gregory, *et al.*, 2001), se realizó una experimentación preliminar para determinar si las mejores condiciones de floculación se dan al estabilizar el pH antes o después de agregar el floculante. Se utilizó como agente floculante una solución de 40 g/L de cloruro de aluminio (AlCl_3) y se adiciono alícuotas de 50, 100 y 150 mg/L a muestras de 100mL, cada una con tres réplicas. El pH se ajustó a 4, 7 y 10 con HCl 1 M y NaOH 1 M. La experimentación se realizó tanto para la adición de floculante antes del ajuste de pH, como para la adición después del ajuste.

Se mezclaron las muestras con agitación magnética durante 2 minutos a 500 rpm seguido por un mezclado más lento durante 15 minutos a 60 rpm, para asegurar la hidrólisis del floculante y formación de agregados (Wu *et al*, 2012, & Rwehumbiza, *et al*, 2012). Terminada la etapa anterior, se midió el pH y se tomaron muestras de 10 mL para medir densidad óptica en un espectrofotómetro a 500 nm para *C. vulgaris* y a 750 nm para *Nannochloropsis sp* en intervalos de 1 hora durante un tiempo de 5 horas.

5.2.3 Diseño experimental para el biofloculante FO4990. Los floculantes poliméricos son los más usados, sin embargo estos pueden contener trazas tóxicas y por lo tanto también contaminar la biomasa de microalgas (Bratby, J., 2006). Una alternativa más segura es el uso de floculantes basados en biopolímeros catiónicos naturales (Garzón-Sanabria *et al.*, 2013), ya que estos son capaces de interactuar con la carga superficial negativa de las células de microalgas.

Para el diseño de experimentos se tomó como referencia el trabajo realizado por Garzón-Sanabria, *et al.*, (2013) (Tabla 13), con el fin de analizar cómo afecta la concentración de floculante, agitación inicial y agitación final en el proceso de floculación con un biopolímero.

Para el procedimiento se tomó 100mL de biomasa (1 original y 2 réplicas) por cada experimento; se adicionó la cantidad de floculante a cada muestra a partir de una solución fresca de FO4990 con una concentración de 1 g/L. El tiempo de agitación inicial y final (40 segundos y 5 minutos respectivamente) se mantuvieron constantes durante todos los experimentos. Durante 5 horas cada hora se tomó una muestra para corroborar la concentración de biomasa el uso de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm siguiendo una curva de concentración previamente desarrollada en el laboratorio.

Tabla 13. Diseño experimental floculación biofloculante FO 4490

Tratamiento	Concentración Floculante mg/L	Agitación Inicial (rpm)	Agitación Final (rpm)
1	20	500	32,6
2	20	500	200
3	10	250	100
4	20	918	200
5	30	250	100

Tabla 13. Continúa...

6	10	250	300
7	30	250	300
8	10	750	300
9	10	750	100
10	30	750	100
11	20	81,67	200
12	30	750	300
13	3,26	500	200
14	20	500	367,3
15	36,73	500	200

Para determinar la eficiencia de la floculación se utiliza la siguiente fórmula:

$$Eficiencia(\%) = \left(1 - \frac{Absorvancia\ final}{Absorvancia\ inicial}\right) \times 100$$

La concentración de biomasa recuperada se determina por el balance:

$$Biomasa\ recuperada\ (g/L) = Biomasa\ inicial - Biomasa\ final$$

5.2.4 Experimentación para las mejores condiciones de floculación.

Determinadas las mejores condiciones de floculación halladas mediante el desarrollo del diseño experimental, se evaluó el escalamiento del proceso en volúmenes de cultivo de 250, 500 y 1000 mL. Al volumen de 1000 mL se le separó la biomasa floculada del sobrenadante por medio de decantación para llevarla al proceso de extracción de lípidos.

5.2.5 Cálculo de eficiencia de reacción del floculante.

Ya que se requirió el uso de floculante y otros compuestos para ajustar el pH los cuales contienen hidróxidos, sales metálicas, y otros componentes químicos, se realizó el procedimiento de cenizas para determinar la influencia de los mismos en el

proceso. Para el procedimiento primero se pesaron crisoles vacíos, luego se tomaron muestras de sobrenadante y de biomasa floculada para depositarlas en los crisoles y pesarlos nuevamente; también se tomaron muestras de control con biomasa y sobrenadante sin floculante. Las muestras se llevaron al horno por 24 horas a 105 °C y luego a un horno mufla para la obtención de cenizas; en este procedimiento primero se dejó calentar las muestras a 105 °C por 12 minutos, luego a 250 °C por 30 minutos y por último a 575 °C por 180 minutos. Finalmente las cenizas se pesaron y se realizó el correspondiente balance:

$$\%Cenizas = \frac{(Masa\ del\ crisol + Masa\ de\ las\ cenizas) - (Masa\ del\ crisol)}{(Masa\ de\ la\ muestra\ inicial)}$$

5.2.6 Cuantificación de lípidos. Para la determinación del contenido lipídico, se usó la técnica de extracción sólido líquido o Soxhlet (Soxhlet, F. 1879). El equipo de extracción, consta de un matraz, un tubo Soxhlet y un condensador. El proceso se realizó para una muestra original y una réplica, la biomasa recuperada por floculación se llevó al horno durante 24 horas y a 105 °C para su secado. La biomasa ya seca fue macerada, pesada y envuelta en un cartucho de papel filtro e introducida al tubo Soxhlet. El matraz vacío fue pesado y llenado con 250 mL de n-Hexano como solvente y fue montado en una manta de calentamiento (ELECTROTHERMAL) junto con el tubo Soxhlet y el condensador. El tiempo total del proceso fue de 16 horas regulando el flujo de agua utilizada y manteniendo la temperatura a 69 °C. Una vez terminado, el matraz que contenía una mezcla de extracto lipídico y solvente se llevó a un proceso de evaporación para recuperar el solvente y concentrar el extracto en el matraz. El matraz con el extracto lipídico fue pesado y posteriormente; este contenido se retiró del matraz y se guardó en recipientes herméticamente sellados para su posterior caracterización.

Para determinar el porcentaje de extracto lipídico se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%Extracto\ lipido = \frac{Masa\ final\ del\ matr\ -\ Masa\ inicial\ de\ matr\}{Masa\ inicial\ de\ la\ muestrra}$$

El proceso también se realizó con biomasa sin floculante pre-concentrada por centrifugación (UNIVERSAL 320 R) a 3400 rpm durante 15 minutos. La extracción se realizó con el mismo procedimiento descrito para las muestras con floculante.

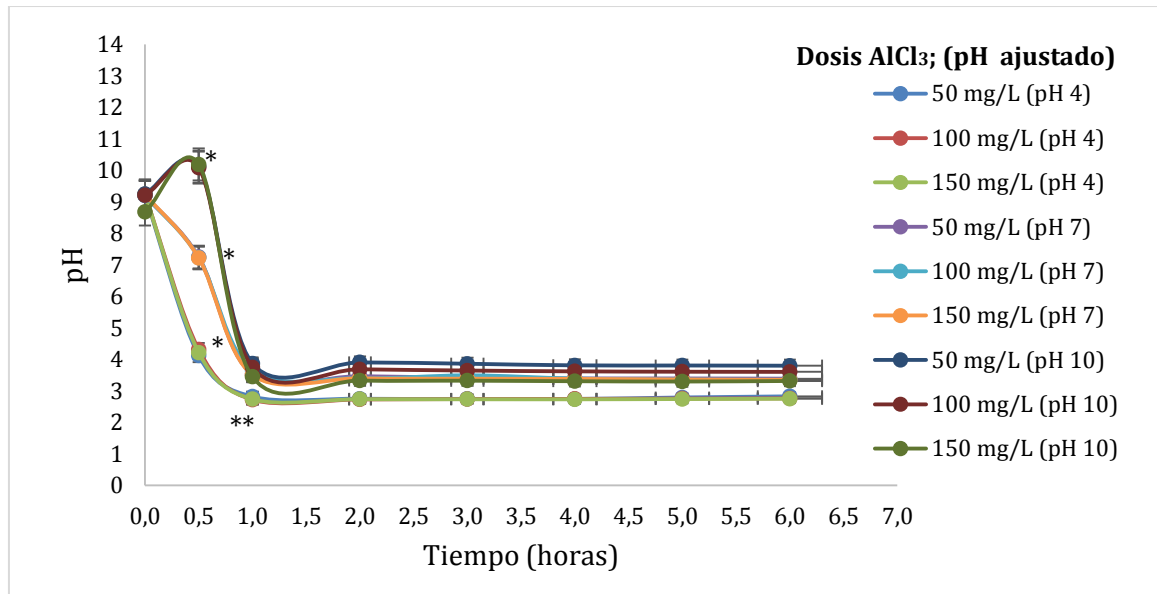
5.3 RESULTADOS

5.3.1 Floculación empleando cloruro de aluminio (AlCl₃). Para el proceso de cosecha se propuso un primer experimento en el cual se determinó las mejores condiciones de adición de floculante y ajuste de pH.

En primera instancia se realiza un procedimiento en el cual primero se fijó el pH (Figura 16), se evidencia que en el momento de incorporar el floculante las muestras se acidifican debido a una fuerte formación de hidróxidos de aluminio de especie catiónica que son generados en medios ácidos; a medida en que aumenta el pH se producen hidróxidos menos cargados positivamente (Duan, *et al.*, 2003), por eso el AlCl₃ reduce un poco menos el pH en las muestras que fueron fijadas a valores más alcalinos. Las muestras no presentaron variaciones importantes de pH después de la primera hora, cuando se inició el proceso de floculación.

- Ajuste de pH; * * Adición de AlCl_3 .

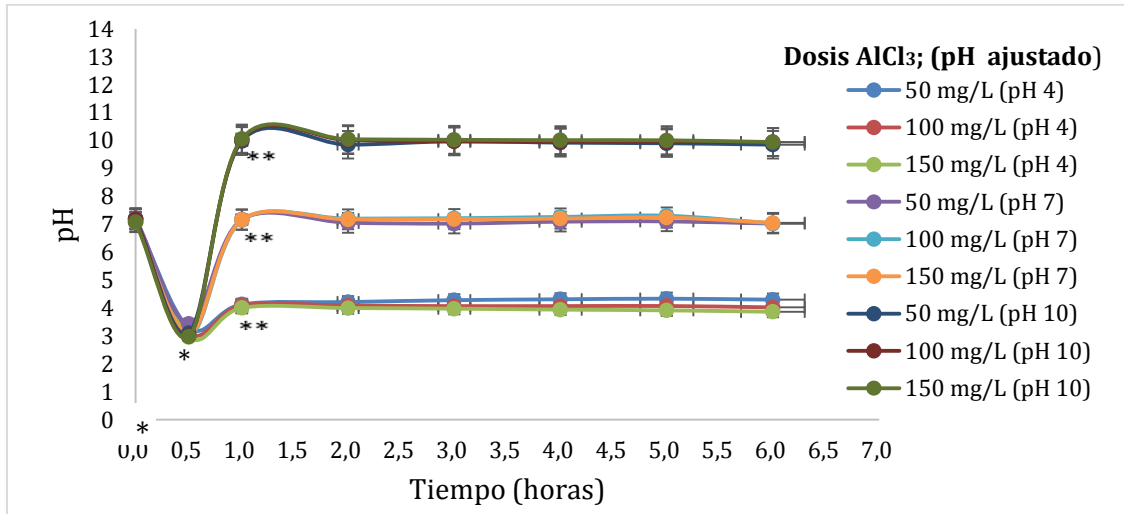
Figura 16. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH antes de la adición de floculante.



En segunda instancia se adicionó primero el floculante, como muestra la Figura 17, el pH disminuyó en proporciones iguales en todas las muestras debido a que el pH inicial era el mismo para todo el muestreo; luego se ajustó el pH a las condiciones establecidas para dar inicio a la floculación y no hubo cambios significativos durante el transcurso del proceso.

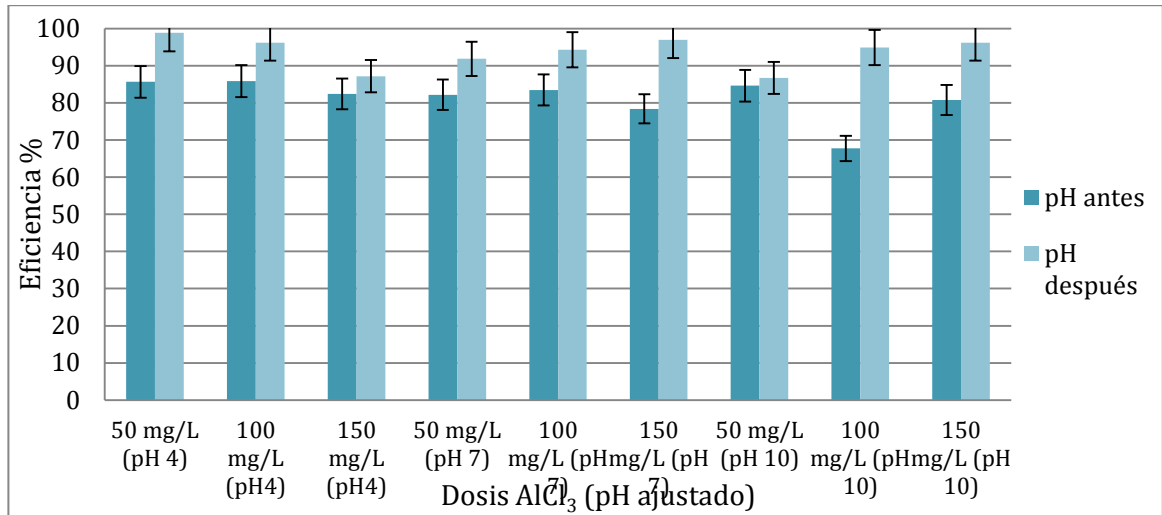
- Adición de AlCl_3 ; * * Ajuste de pH.

Figura 17. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH después de la adición de floculante.



En ambos métodos se ve que, sin importar que valor tenga el pH al momento de empezar la floculación, siempre permanecerá estable. El mejor método entonces, fue determinado por la mejor eficiencia de floculación. La Figura 18, muestra que la recuperación de biomasa es más efectiva si primero se incorpora el floculante y luego se ajusta el pH en todos los experimentos. Actualmente no se ha reportado ninguna otra investigación de este tipo ya que convencionalmente el pH se ajusta antes de adicionar el floculante.

Figura 18. Comparación de la eficiencia de floculación para los dos métodos de adición de floculante y ajuste de pH.



Para las pruebas en las que se ajusta el pH después, se evidencia (Tabla 14) que se obtienen eficiencias desde un 87,2 % hasta un 98,9 %, y para el ajuste del pH antes, se reportaron valores en el rango del 67,8 %, hasta 85,9 %, por lo tanto el diseño de experimentos se realizó acondicionando el pH después, dadas sus eficiencias más altas.

Tabla 14. Eficiencia al finalizar la floculación para ambos métodos.

	pH 4			pH 7			pH10		
AlCl ₃ (mg/L)	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Eficiencia % (pH antes)	85,7	85,9	82,4	82,2	83,5	78,4	84,6	67,8	80,8
Eficiencia % (pH después)	98,9	96,2	87,2	91,9	94,3	96,9	86,8	94,9	96,2

Después de esta primera etapa, se desarrolló el diseño experimental para floculación con $AlCl_3$, con el diseño planteado, el cual las variables a estudiar fueron la concentración inicial de biomasa, la concentración de floculante y el pH, manteniendo constante la agitación del proceso.

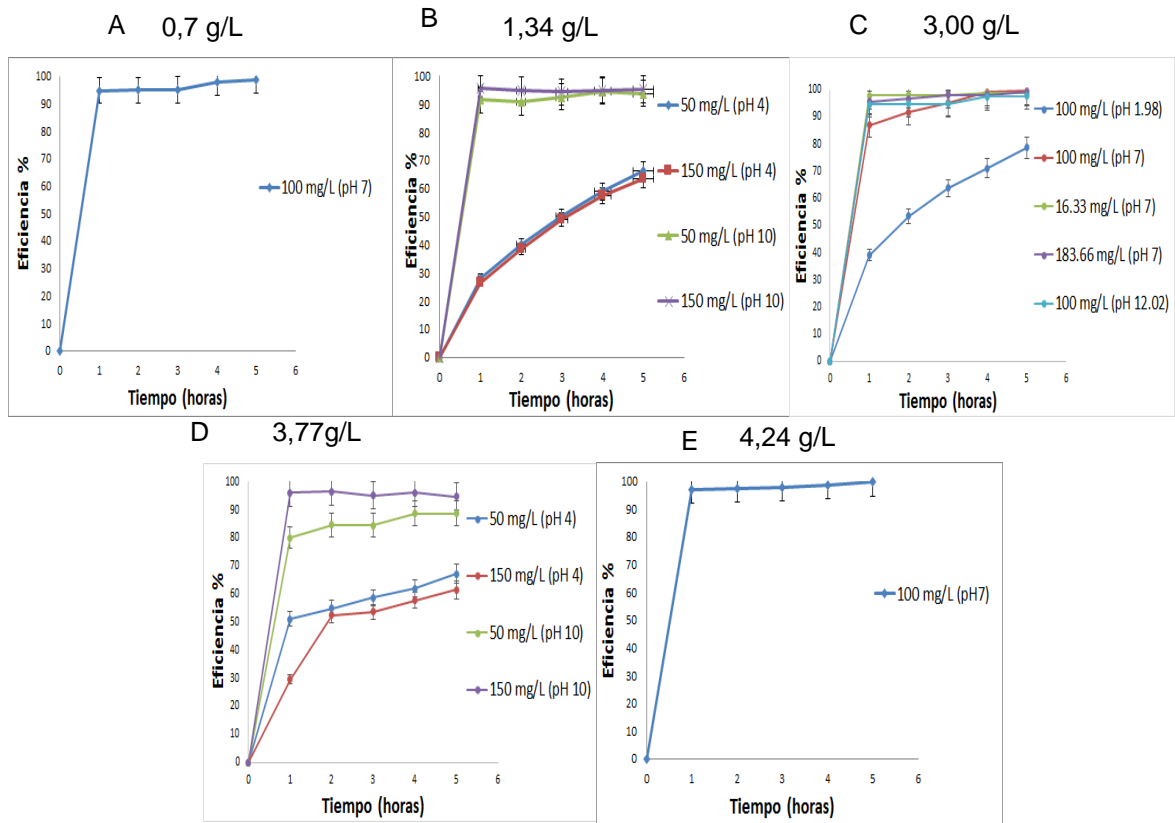
Con las variables estudiadas se lograron varios experimentos con eficiencias por encima del 95 %; según los datos encontrados (Tabla 15), los resultados más relevantes son la prueba 8 con una recuperación del 99,5 %, y la prueba 17 con un 99,7 % de eficiencia; ya que las condiciones de pH y concentración de floculante fijadas inicialmente son las mismas para ambas, se tomó como mejor la prueba 17 debido a tener mejor floculación. Para todas las pruebas el valor de pH al finalizar el proceso permaneció casi constante con respecto al pH fijado al inicio de la floculación.

Tabla 15. Eficiencia de la floculación y pH al finalizar el proceso.

Prueba	Concentración de la biomasa (g/L)	$AlCl_3$ (mg/L)	pH	Eficiencia (%)
1	0,7	100	7,0	98,6
2	1,34	50	4,0	66,2
3		50	4,0	63,3
4		150	10,0	93,8
5		150	10,0	95,2
6		16,3	7,0	98,9
7	3,00	100	2,0	78,6
8		100	7,0	99,5
9		100	7,0	99,5
10		100	7,0	99,5
11		100	11,8	97,7
12		183,6	7,0	99,1
13	3,77	50	4,0	67,2
14		50	4,0	61,4
15		100	10,0	88,8
16		100	10,0	94,7
17	4,24	100	7,0	99,7

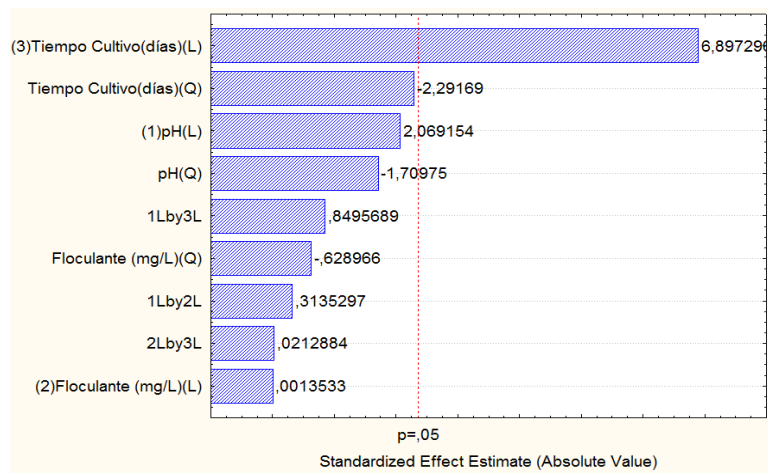
Según los resultados, las mayores eficiencias se obtienen empleando un pH entre neutro y básico (7-10) (Tabla 15). En los experimentos con pH 7 (Figura 19; (A), (C), (E)), los altos valores de eficiencia se deben a que en este caso la floculación se da por neutralización de cargas y también por una rápida formación de hidróxidos precipitados (Henderson, *et al.*, 2008). En pH 10 (Figura 19; (B), (C), (D)), se da una alta remoción de células debido a que el uso de base para el ajuste de pH a estos valores, forma hidróxidos polinucleares de aluminio, que son producto de la neutralización de la sal de aluminio y que reducen las cargas positivas de las partículas coloidales de hidróxido que puedan estar presentes, lo que contribuye a la formación de hidróxidos precipitados (Duan, *et al.*, 2003). Este planteamiento es consistente con la experimentación realizada por Lindgren, *et al.*, (2002), para la neutralización de aluminio adicionando base, cuyas pruebas evidenciaron que por este método los sólidos sedimentables se forman a pH 7 y a valores más altos. También hay que tener en cuenta los estudios realizados por Henderson *et al.* (2008), quienes demostraron que no se necesita la neutralización de cargas para obtener eficiencias por encima del 90 %, por lo tanto la sedimentación se desarrolla principalmente por floculación de barrido; estas pruebas también se realizaron utilizando aluminio como coagulante para *C. vulgaris*. La eficiencia se ve disminuida en los pH ácidos (Figura 19; (B), (C), (D)), debido a que se encuentran muy por debajo del valor donde las cargas son cero y probablemente tampoco se encuentran a un valor de carga en donde la desestabilización de las células sea suficiente para dar altos valores de eficiencia.

Figura 19. Comportamiento de *C. vulgaris* en la etapa de floculación para el diseño experimental.



En el análisis estadístico se evalúa la influencia de las variables propuestas en el diseño experimental para recuperar la mayor cantidad de biomasa, para esto se desarrolló el diagrama de Pareto en la Figura 20.

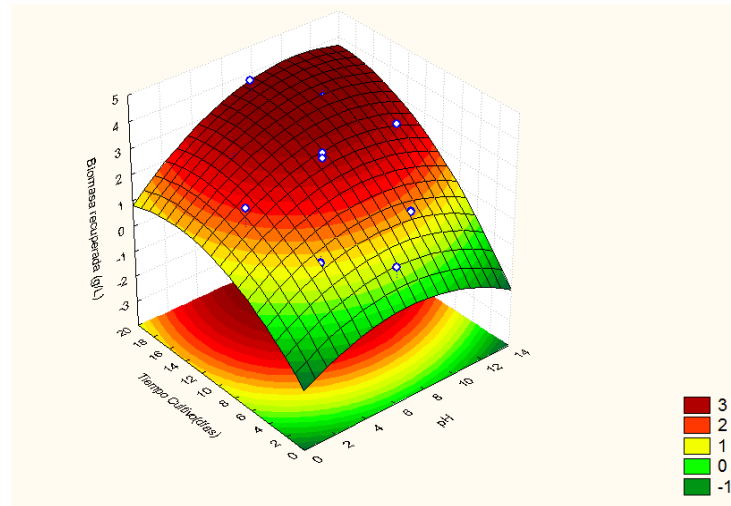
Figura 20. Diagrama de Pareto para la biomasa recuperada.



La variable más significativa es la concentración de la biomasa (g/L), con esto se deduce que es el factor más importante en la cantidad de biomasa recuperada. Esto explica el hecho que la eficiencia en las pruebas del diseño de experimentos tenga una tendencia distinta a la de las pruebas realizadas para la determinación de las mejores condiciones de ajuste de pH y adición de floculante, ya que en este último no se evaluó la variable de tiempo de cultivo.

La superficie de respuesta (Figura 21) muestra que la mayor recuperación de biomasa para el diseño experimental se da en los tiempos más grandes y a un pH aproximadamente entre 7 y 14.

Figura 21. Superficie de respuesta para la biomasa recuperada; pH vs Tiempo de cultivo.



Como ya se mencionó, la mejor eficiencia de floculación fue la evaluada al día 18 de cultivo, a un pH de 7 y a una concentración de floculante de 100 mg/L. Comparando este resultado con la superficie de respuesta se encuentran en concordancia la cantidad de floculante empleado y el tiempo de cultivo; además el pH se encuentra en el rango obtenido.

Una vez evaluadas las mejores condiciones se escaló el volumen de trabajo y se demostró que el proceso es fácilmente escalable a volúmenes más mayores de 100 mL sin que haya cambios significativos en la eficiencia de floculación. La Tabla 16 muestra que los valores de eficiencia son casi invariantes para todos los volúmenes evaluados y con una recuperación de más del 99%.

Tabla 16. Eficiencia de floculación y cantidad de biomasa recuperada para distintos volúmenes de muestra.

Volumen (mL)	Eficiencia (%)	Biomasa recuperada (g/L)
100	99,7	4,2
250	99,5	4,2
500	99,5	4,2
1000	99,6	4,2

Una vez evaluada la floculación en diferentes volúmenes, se procedió a determinar la influencia en el contenido de cenizas originadas por los metales e hidróxidos presentes en la floculación. El contenido de cenizas (Tabla 17) no se ve afectado en diferentes volúmenes de muestra, el aumento de las cenizas en comparación con la muestra de control, es debido al uso de floculante para el proceso y de hidróxido de sodio para el acondicionamiento de pH. Se encontró mayor cantidad de cenizas en la biomasa que en el sobrenadante de las muestras floculadas, debido a la precipitación de hidróxidos responsables de la sedimentación de las células.

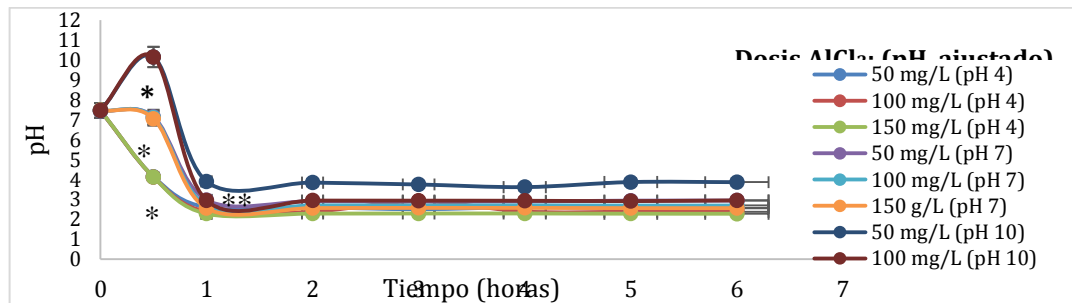
Tabla 17. Porcentaje de cenizas presentes en las muestras a volúmenes variados.

		Muestra floculada	Muestra de control %
		% cenizas	cenizas
100 mL	Sobrenadante	0,18	0,02
	biomasa	0,40	0,08
250 mL	Sobrenadante	0,15	0,02
	biomasa	0,32	0,08
500 mL	Sobrenadante	0,16	0,02
	biomasa	0,35	0,08
1000 mL	Sobrenadante	0,16	0,02
	biomasa	0,30	0,08

5.3.2 *Nannochloropsis* sp. Con el fin de validar el proceso anteriormente descrito, se utilizó una cepa nueva *Nannochloropsis* sp. Los resultados demuestran que el pH permanece constante a lo largo del proceso de floculación, por lo tanto el método escogido para el desarrollo del diseño fue el que obtuvo mayor eficiencia (Fig. 22; Fig. 23).

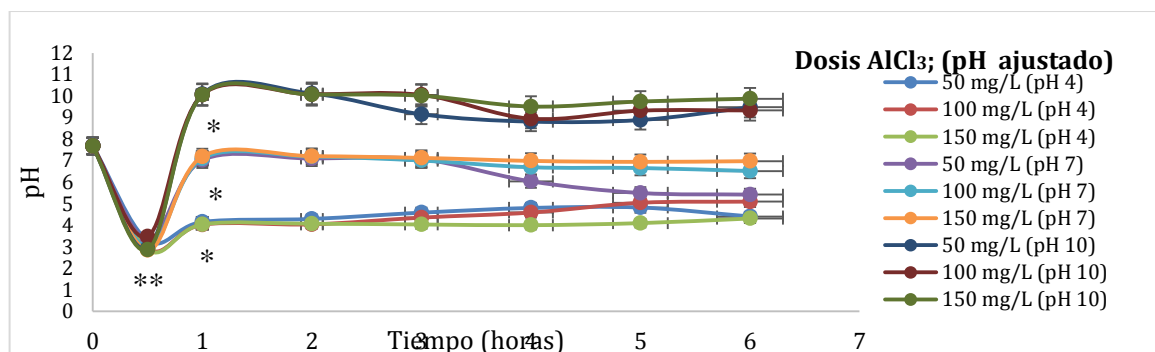
- Ajuste de pH; * * Adición de $AlCl_3$.

Figura 22. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH antes de la adición de floculante.



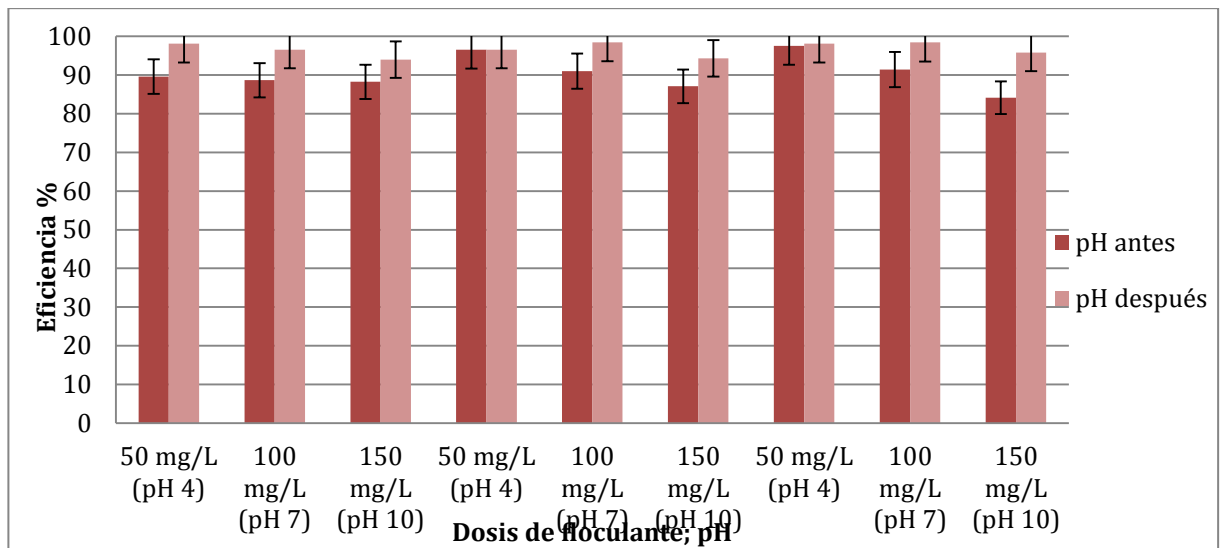
- Adición de $AlCl_3$; * * Ajuste de pH.

Figura 23. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH después de la adición de floculante.



La Figura 24 muestra que se obtiene una mayor eficiencia de floculación ajustando el pH después de añadir el floculante en todos los experimentos del diseño experimental, validando el método empleado en *C. vulgaris*.

Figura 24. Comparación de la eficiencia de floculación para los dos métodos de adición de floculante y ajuste de pH.

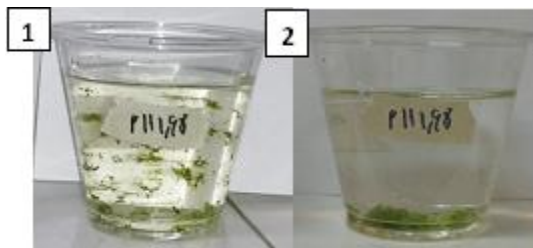


Según las pruebas realizadas para el diseño experimental con *Nannochloropsis*, se presentó floculación espontánea en todos los experimentos. Para las muestras correspondientes a 1,6 y 5 días se intentó medir la floculación por espectrofotometría, pero debido a que las células ya tenían aglomerados desde antes de iniciar la preparación de las muestras y a que la precipitación se daba inmediatamente, no fue posible este procedimiento; por lo tanto para las pruebas de 10, 15 y 18,3 días se llevó a cabo la experimentación de acuerdo al diseño y también se realizaron experimentos sin floculante como control; a todas las pruebas se le hizo registro fotográfico (Figura 25).

Figura 25. Proceso de floculación para *Nannochloropsis* sp., de acuerdo al diseño experimental.

1 Muestra recién agitada; 2 Muestra segundos después de la agitación.

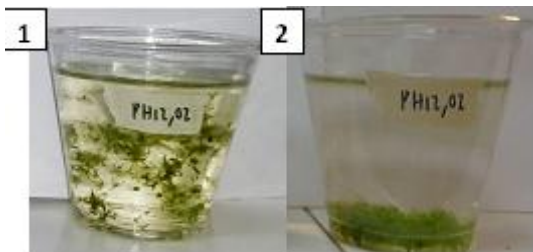
(A) 10 días de cultivo
pH 1,9; sin AlCl_3 .



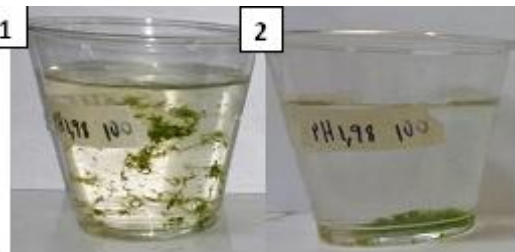
pH 7 sin AlCl_3 .



pH 12,02; sin AlCl_3 .



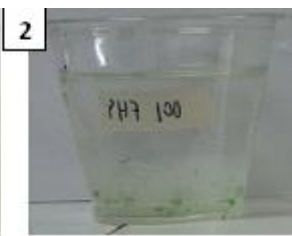
pH 1,9; 100 mg/L AlCl_3 .



pH 7; 16,3 mg/L AlCl_3 .



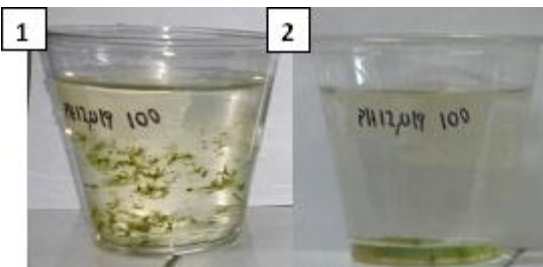
pH 7; 100 mg/L AlCl_3 .



pH 7; 183,6 mg/L AlCl_3 .



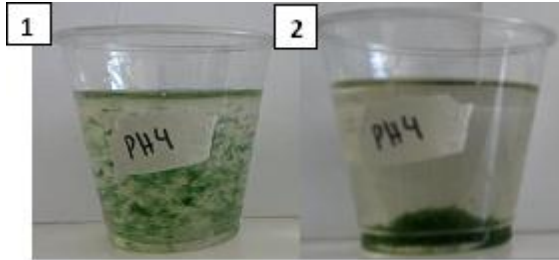
pH 12,02; 100 mg/L AlCl_3 .



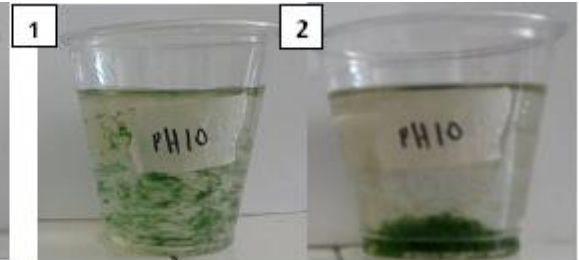
1 Muestra recién agitada; 2 Muestra segundos después de la agitación.

(B) 15 días de cultivo

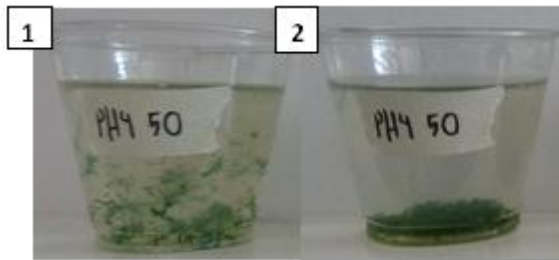
pH 4; sin AlCl_3 .



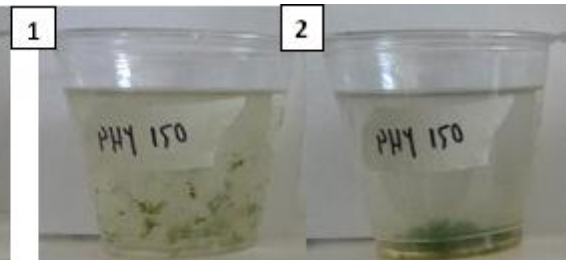
pH 10; sin AlCl_3 .



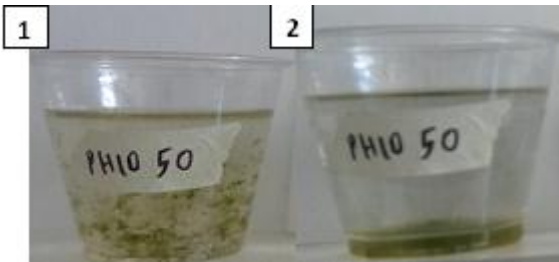
pH 4; 50 mg/L AlCl_3 .



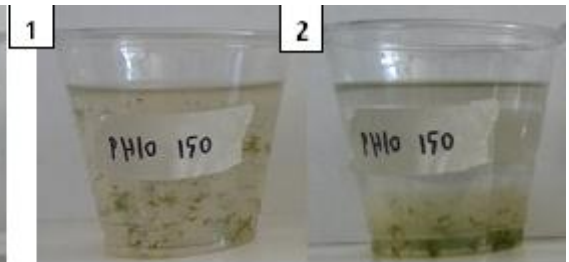
pH 4; 150 mg/L AlCl_3 .



pH 10; 50 mg/L AlCl_3 .

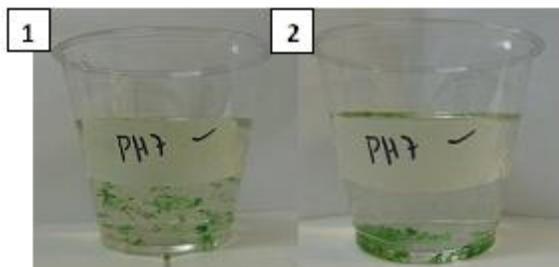


pH 10; 150 mg/L AlCl_3 .

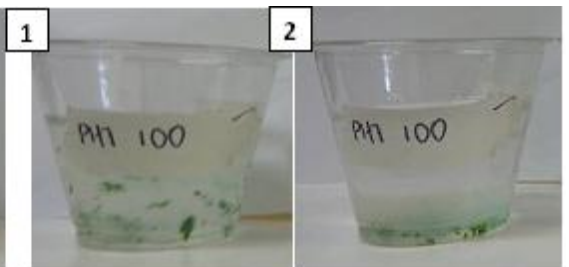


(C) 18,3 días de cultivo

pH 7; sin AlCl_3 .



pH 7 100; mg/L AlCl_3 .

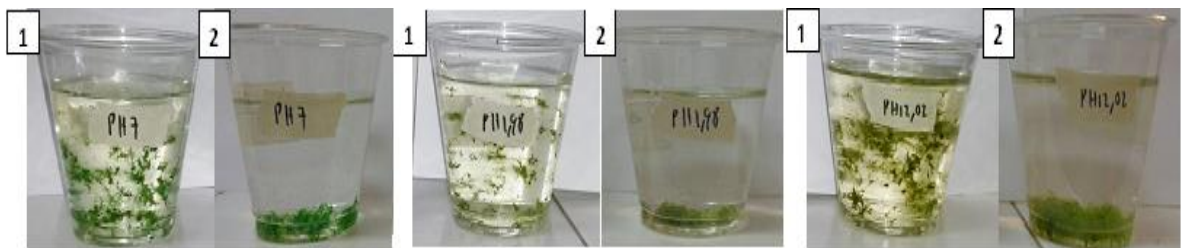


La Figura 26 evidencia que con las muestras de control no fue necesaria la incorporación de floculante y que el pH tampoco tuvo una influencia relevante en el proceso de sedimentación, ya que la precipitación se dio por igual en todos los experimentos.

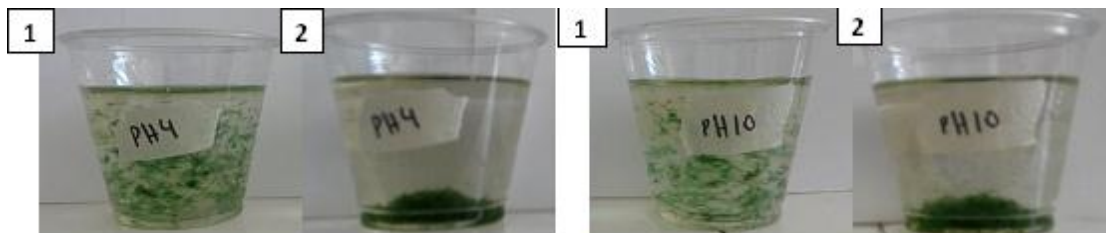
Figura 26. Muestras de control para el diseño experimental.

1 Muestra recién agitada; 2 Muestra segundos después de la agitación.

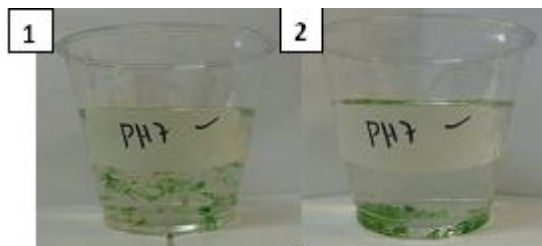
(A) 10 días de cultivo



(B) 15 días de cultivo



(C) 18,3 días de Cultivo



La diferencia de comportamiento de la biomasa utilizada *Nannochloropsis sp.* y *Chlorella vulgaris* utilizada para la determinación de las mejores condiciones de

adición de floculante y ajuste de pH, es evidente. El crecimiento fue distinto para ambos cultivos, ya que en el primero aquí descrito hubo formación de agregados que facilitaron la sedimentación, es decir, la microalga se auto-flocula de manera espontánea y en *C. vulgaris* requiere de un agente floculante para recuperar la biomasa.

5.3.3 Floculación empleando FO4490 como biofloculante. La floculación con el polímero FO4490 se hizo en base a la metodología propuesta, estas pruebas se realizaron durante 5, 10 y 15 días (Figura 27) de crecimiento de biomasa. Se observó que el mayor porcentaje de recuperación de biomasa se da en los experimentos: 2, 3, 8, 9, 13 y 14. Se obtuvo un 90% de recuperación de biomasa en promedio, corroborando lo dicho por Lee *et al.*, (2010) quienes demostraron que utilizar un biofloculante (AM49) es eficaz para la cosecha *C. vulgaris*. Para los 15 días, se observó cuales experimentos eran los que tenían mayor porcentaje de recuperación de biomasa.

Figura 27. Porcentaje de recuperación de biomasa a un volumen de 100 ml durante 15 días de cultivo.

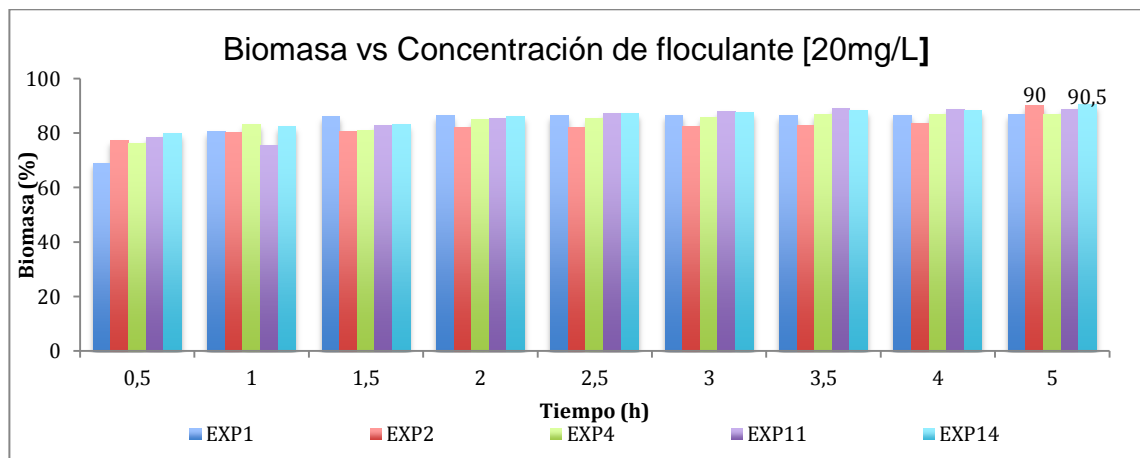
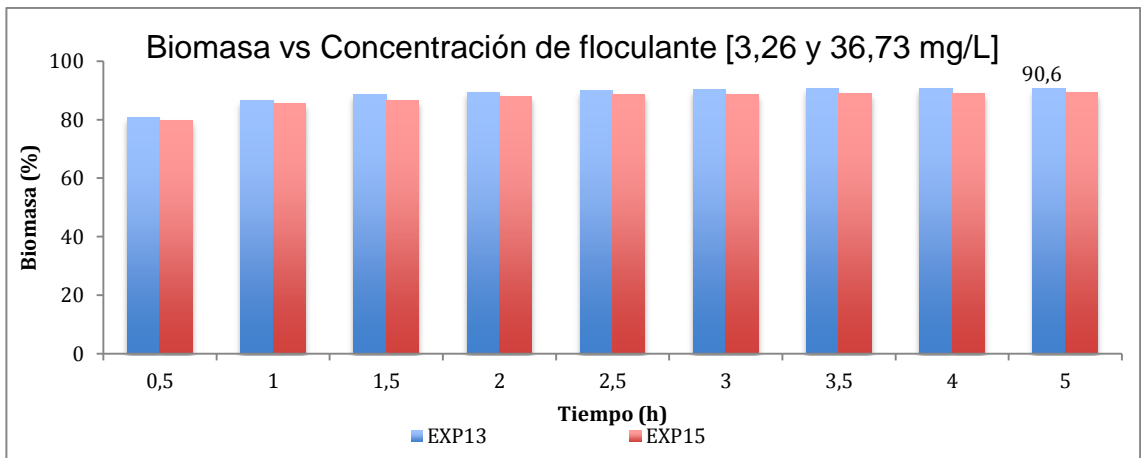
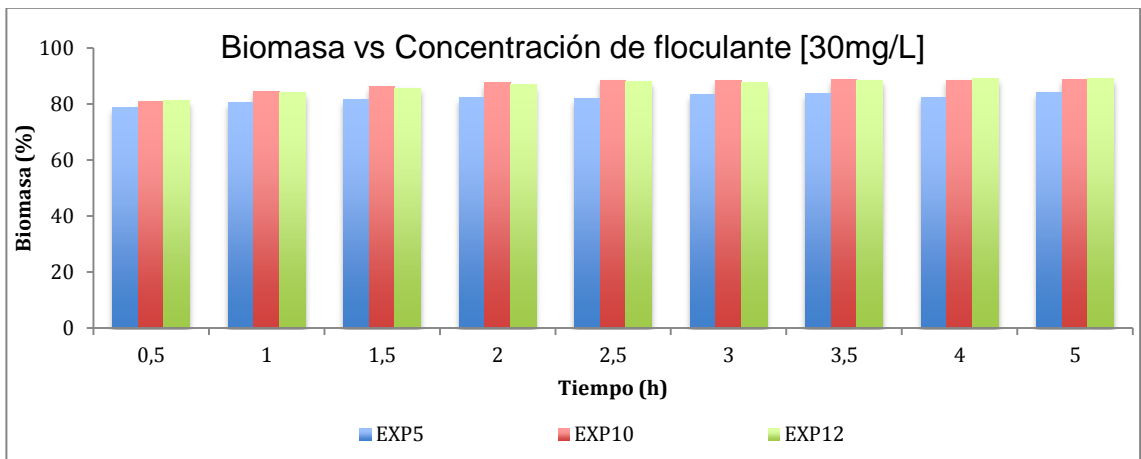
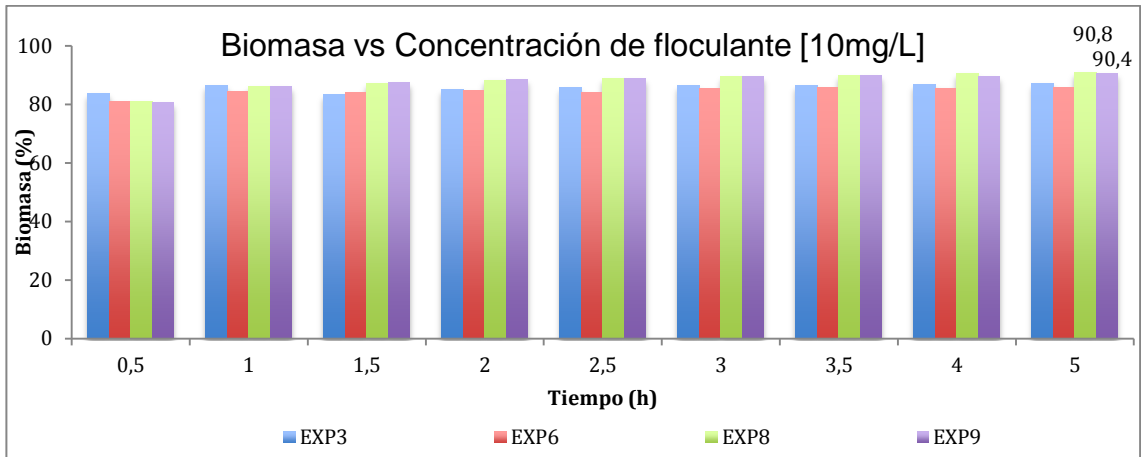
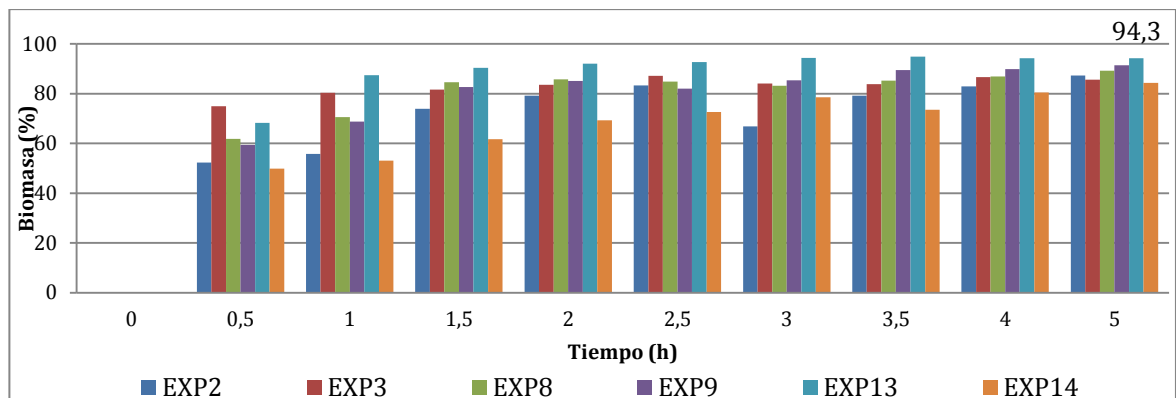


Figura 27. Continúa...

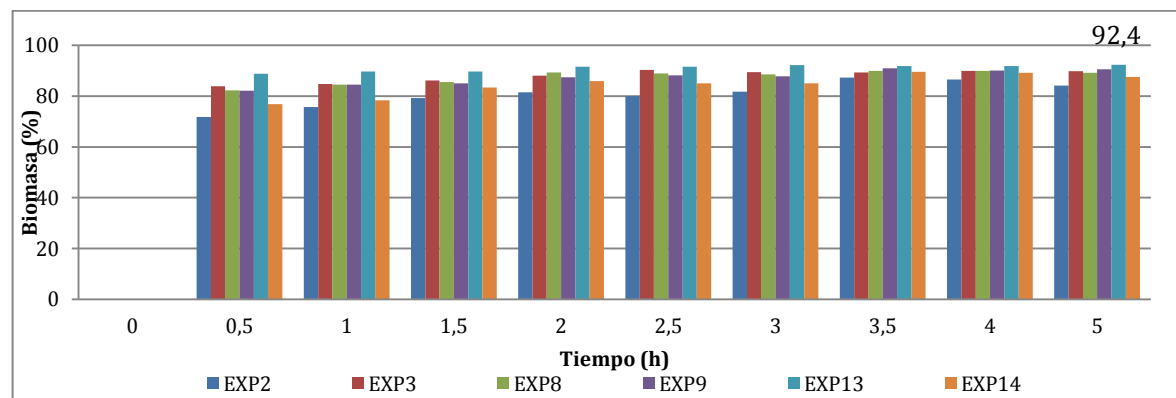


Los experimentos 2, 3, 8, 9, 13 y 14 se escalaron a un volumen de 500mL, como resultado se observó que el experimento con mayor recuperación de biomasa es el experimento 13, que corresponde a una concentración de floculante de 3,26 mg/L, con una agitación inicial de 500rpm y 200rpm de agitación final (Fig. 28a, 28b y 28c). Se concluyó que el floculante FO4990 presenta un alto rendimiento independiente del tiempo de crecimiento de la microalga y el volumen de biomasa. Al aumentar el tiempo de floculación mejora el porcentaje de biomasa floculada llegando a ser estable entre las 2.5 y 3 horas tal como lo muestra Fig. 28a, 28b y 28c.

Figura 28. Porcentaje de biomasa recuperada en un volumen de 500 ml.

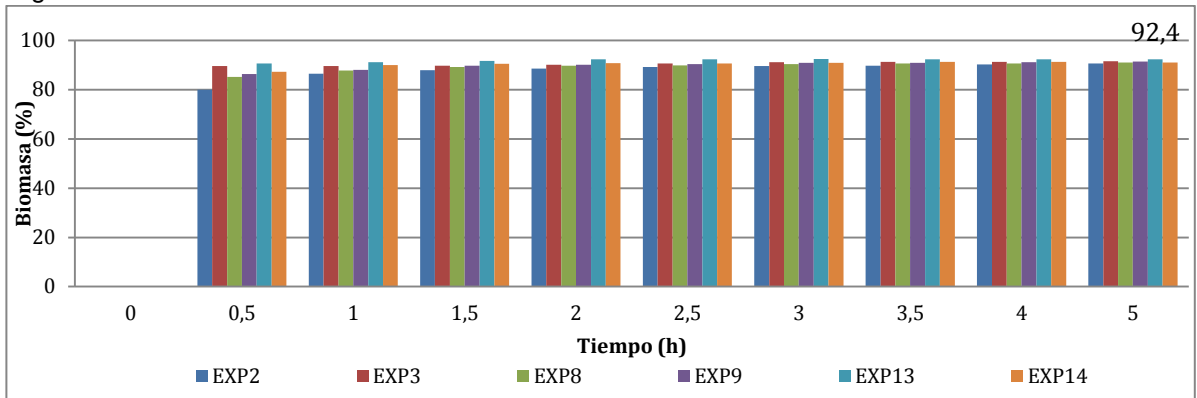


(a) 5 días



(b) 10 días

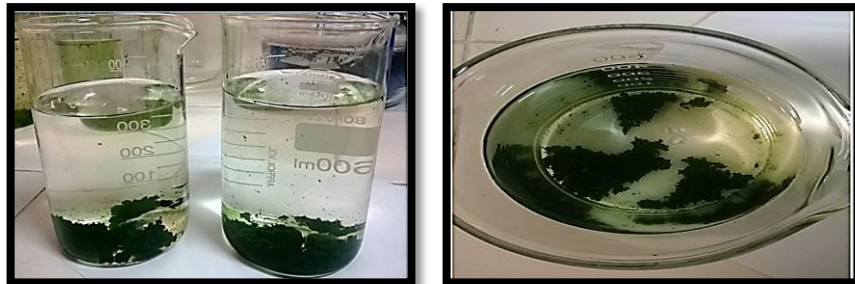
Figura 28. Continúa...



(c) 15 días

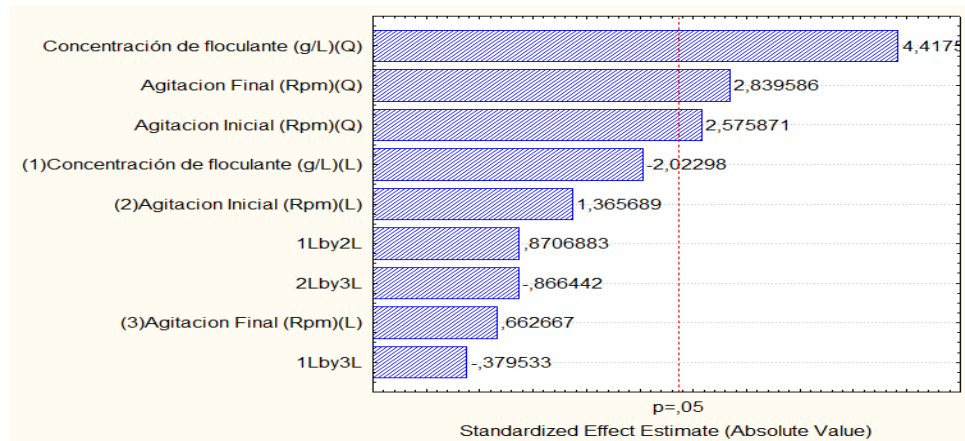
En la Figura 29 se muestra el mejor experimento (experimento 13) después de 2,5 horas desde que se adicionó el floculante y se encontró un rendimiento al 92,4%. Resultados obtenidos en otros estudios reportan porcentajes de recuperación del 90% con polímeros catiónicos entre 20-30 mg/L aplicados a algas de agua marina (Garzon-Sanabria, *et al.*, 2013), de esta forma se comprueba la efectividad de los floculantes poliméricos. Se observó que la cantidad de floculante usada por Garzón-Sanabria *et al.* (2013) es demasiado alta comparada con la obtenida para flocular *C. vulgaris* (3,26 mg/L) debido al medio de cultivo y las características de las cepas.

Figura 29. Alga obtenida con una concentración de floculante de 3.26 mg/L



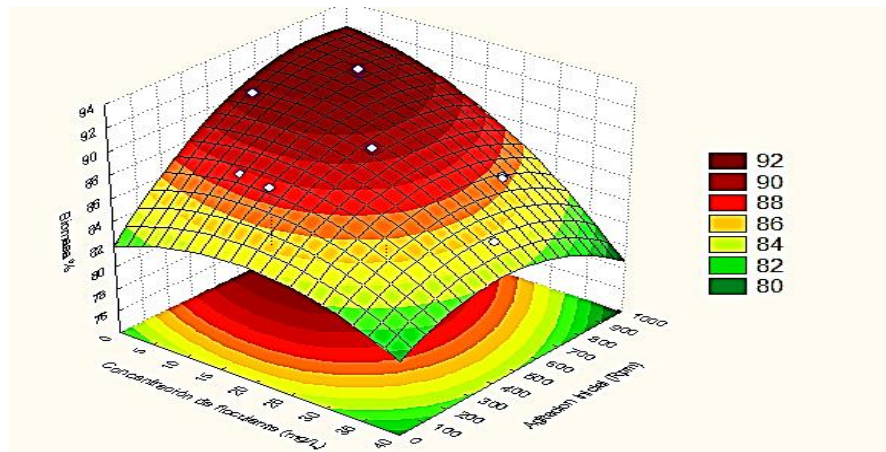
5.3.4 Análisis estadístico. Después de los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico con la ayuda del programa STATISTICA 7.0 se analizó la influencia de variables como agitación inicial, agitación final y concentración de floculante. Se obtuvo los diagramas de Pareto que determinan las variables significativas. Se observó que todas las variables pasan el umbral, es decir, la línea roja ($p=,05$) (Figura 30), según el diagrama de Pareto la concentración de floculante es la variable de mayor importancia en el proceso, aunque las demás variables tienen una influencia significativa en el proceso.

Figura 30. Diagrama de Pareto de variables significativas.



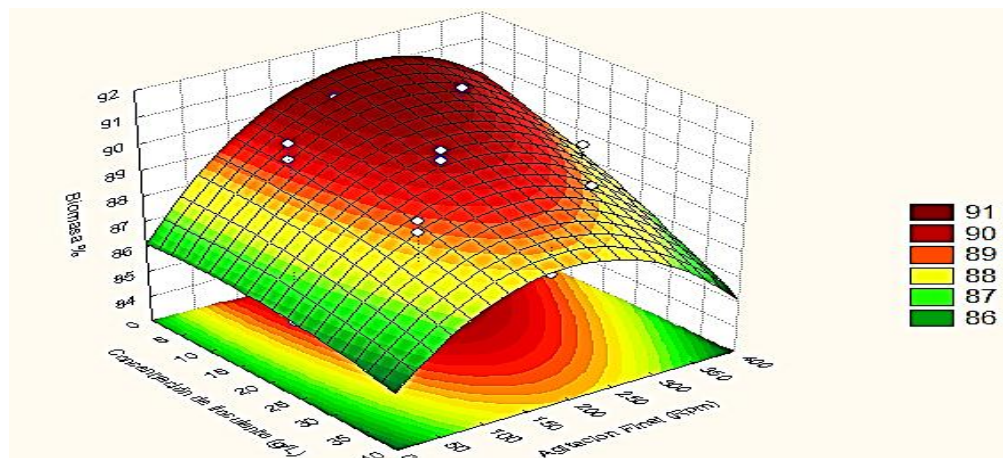
Para la superficie de respuesta figura 31, se observó que al efectuar una agitación inicial mayor a 500 rpm y una concentración de floculante menor a 10 mg/L el porcentaje de recuperación de biomasa es mayor al 90%. Se demostró que el biopolímero catiónico FO4990 en dosis bajas pueden inducir la floculación eficiente *C. vulgaris*.

Figura 31. Superficie de respuesta. Relación concentración de floculante y agitación inicial.



En la Figura 32, se observa que las mejores condiciones de floculación están a una agitación final de 200 rpm y una concentración de floculante menor a 10 mg/L, logrando una eficiencia superior del 90% en la recuperación de biomasa.

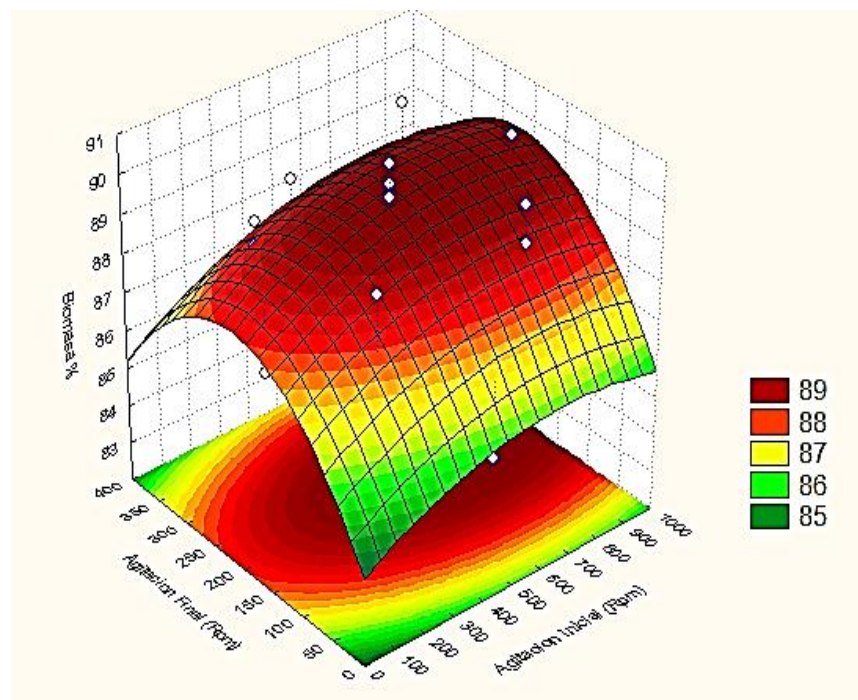
Figura 32. Superficie de respuesta. Relación concentración de floculante y agitación final.



La relación entre las variables de agitación para recuperación de biomasa más alta se presenta cuando las agitaciones iniciales son mayores a 500 rpm y las agitaciones finales próximas a 200 rpm, obteniendo una eficiencia en la separación de la microalga de su medio de cultivo de 90% (Figura 33). Corroborando lo propuesto por *Garzón-Sanabria et al* (2013), para la agitación inicial y final en el proceso de floculación.

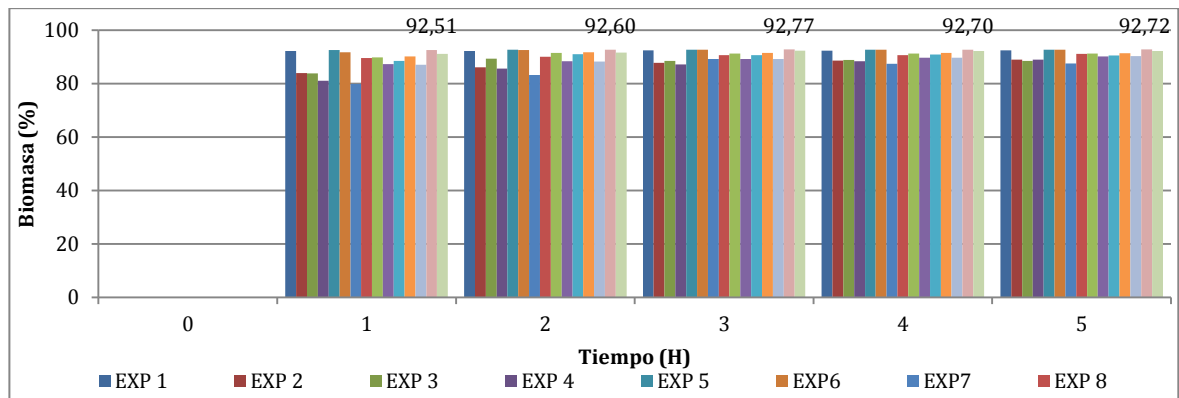
Una vez determina el mejor intervalo de floculación con biopolímero FO4490 se propuso un nuevo diseño de experimentos en donde se emplean las mejores variables encontradas en la primera fase experimental. Este nuevo intervalo es de 1; 7,5; 15 (g/L) concentración de floculante, 500, 650, 800 rpm de agitación inicial y 150, 200 y 250 rpm agitación final.

Figura 33. Superficie de respuesta. Relación agitación inicial y agitación final



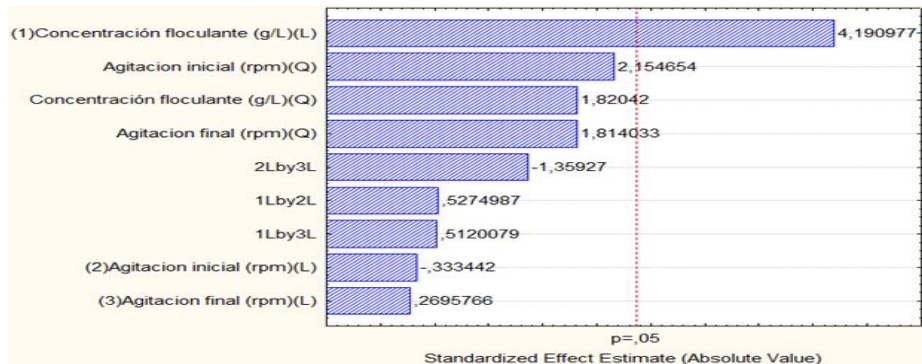
En la Figura 34 se muestra que el mejor experimento es la prueba 16 que contiene 15 g/L de floculante, una agitación inicial de 800 rpm y 150 rpm de agitación final. Desde que se adicionó el floculante se encontró un rendimiento superior al 90%, permitiendo así la mayor recuperación de biomasa.

Figura 34. Porcentaje de biomasa a un volumen de 100ml. 15 días.



Después de los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico donde se evaluó la influencia de variables como agitación inicial, agitación final y concentración de floculante. Se observó que la concentración de floculante pasó el umbral, es decir, la línea roja ($p=,05$), lo que representa el diagrama de Pareto (figura 35) es que la concentración de floculante es la variable de mayor importancia en el proceso, aunque las demás variables tienen una influencia significativa en el proceso

Figura 35. Diagrama de Pareto de variables significativas.



La superficie de respuesta (Fig. 36-37-38) prueba lo anteriormente dicho en el diagrama de Pareto en el cual la concentración de floculante es la variable de mayor importancia en el proceso, ya que, a mayor concentración de biofloculante mayor es la biomasa recuperada. Estas grafica demuestran que la agitación final e inicial (en las velocidades estudiadas) no son importantes, es decir, puede ser más rápido o más lento, lo que va a importar es la concentración del floculante,

Figura 36. Superficie de respuesta. Relación concentración de floculante y agitación inicial.

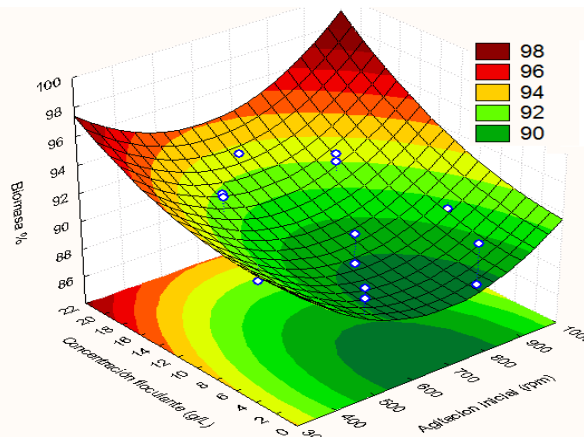


Figura 37. Superficie de respuesta. Relación concentración de floculante y agitación final.

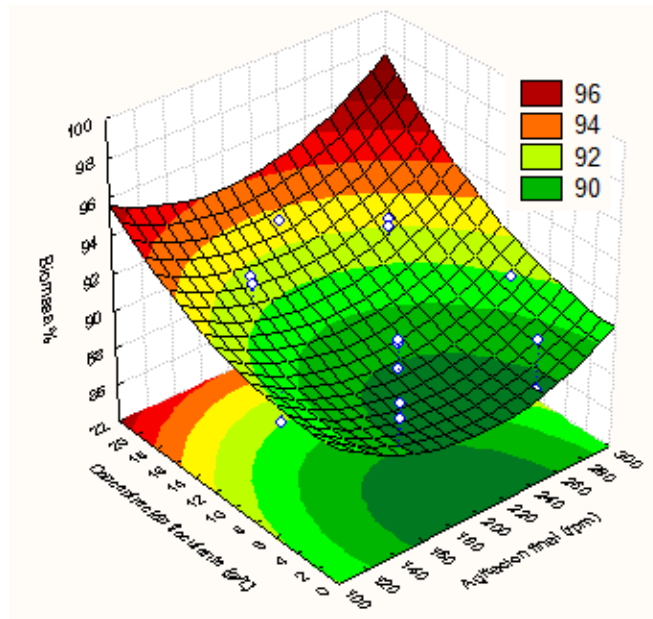
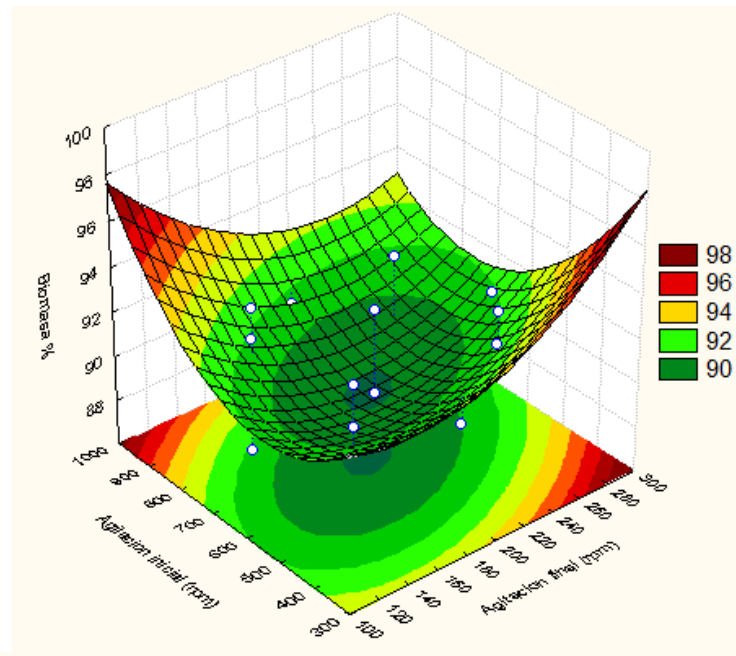
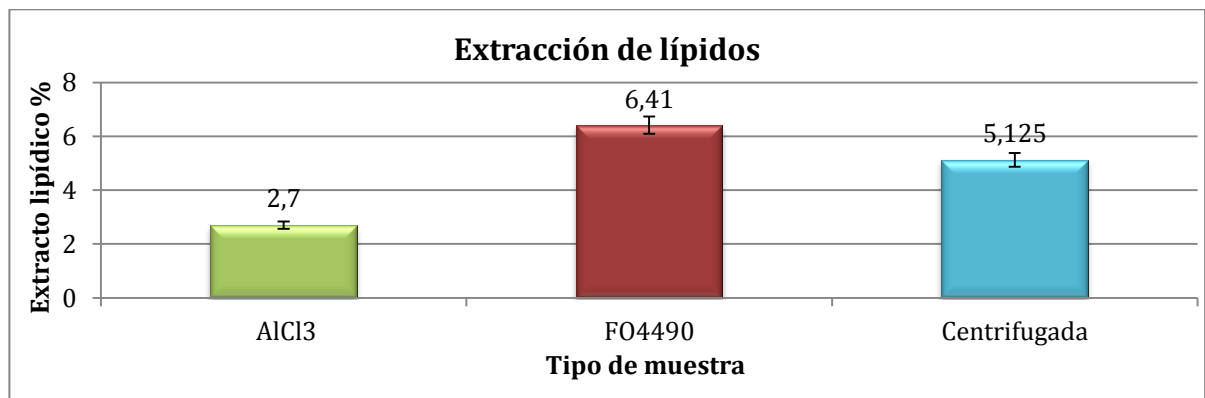


Figura 38. Superficie de respuesta. Relación agitación inicial y agitación final.



5.3.5 Extracción de lípidos. Al comparar la extracciones en biomasa centrifugada y floculada (Figura 39), se determinó que la muestra centrifugada alcanza un porcentaje de extracto lipídico (5,125%) en comparación con la muestra floculada con $AlCl_3$ (2,7%) y la muestra floculada con FO4490 (6,41%). Estos resultados son similares a los hallados por *Lee et al.*, (2010), para *C. vulgaris* cuyo valor de extracto lipídico para una muestra centrifugada fue aproximadamente del 4% en peso. Con estos resultados hay que tener en cuenta que la cantidad de lípidos extraídos de la muestra con floculante es menor, es decir, es significativa dadas las ventajas que la floculación ofrece para la recuperación de biomasa.

Figura 39. Comparación del porcentaje de extracto lipídico en biomasa floculada y biomasa centrifugada.



El método de centrifugación es eficiente para separar la microalga de su medio de cultivo, pero es más costoso que el proceso de floculación con polímero FO4990. Se concluyó que la floculación con biopolímeros para *C. vulgaris* es el más eficiente, por sus características de biopolímero no se altera la biomasa recuperada.

5.4 CONCLUSIONES

- El AlCl_3 no afecta a la producción de metil ésteres de ácidos grasos, haciendo de este método efectivo para pre-concentrar biomasa para la posterior obtención de biodiesel.
- Se demostró que ajustar el pH después de adicionar floculante es el mejor método para lograr altas eficiencias de floculación.
- Para obtener la mejor eficiencia de floculación, el proceso debe realizarse para la mayor concentración de biomasa; de esta manera se logró recuperar un 99,7% de *C. vulgaris* de los medios de cultivo, usando AlCl_3 como agente floculante.
- Se estableció que en un rango de concentración de floculante de 3,26 mg/L, agitación inicial promedio 500rpm y agitación final 200 rpm presenta una máxima recuperación de microalga (Mayor de 90%) sin importar el volumen de biomasa.
- Se logró demostrar el alto desempeño del polímero FO4990 para la floculación del alga *C. vulgaris* ya que con concentraciones bajas se logran excelentes resultados.

6. EFECTO DE LA INMOVILIZACIÓN MICROALGAL EN LA PRODUCTIVIDAD DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO (PROTEÍNAS, CARBOHIDRATOS, LÍPIDOS Y PIGMENTOS) EN POLÍMEROS ORGÁNICOS.

6.1 INTRODUCCIÓN

El uso de microalgas en la biotecnología se ha incrementado en los últimos años, debido a que contienen numerosos compuestos bioactivos que pueden aprovecharse para uso comercial. El tamaño de las microalgas (la mayoría de las especies utilizadas en la biotecnología son menores de 50 micras) implican serias dificultades a la hora de diseñar biorreactores, la pérdida de biomasa cuando se trabaja con sistemas de flujo continuo y la recolección de la biomasa celular en suspensión es un proceso costoso y a menudo ineficaz. Con el fin de resolver ambos problemas, la biotecnología ha recurrido a técnicas de inmovilización de los organismos unicelulares fotosintéticos, los cuales se utilizan hoy en día en la industria farmacéutica, la acuicultura, la alimentación, cosmética, procesos de depuración (van Haveren, *et al.*, 2008), la producción de energía, como el biodiesel o biogás (Christenson, *et al.*, 2011), así como la bioproducción de hidrógeno molecular, pruebas de toxicidad (Wang *et al.*, 2002) y en técnicas de cultivo para obtención de biomasa (Yadala, *et al.*, 2014).

Las microalgas tienen una tendencia natural de adherirse a las superficies y crecer en ellos. Esta capacidad también se ha aprovechado con el fin de preconcentrar estas sustancias y facilitar así la medición de trazas en el medio ambiente (Singh y Prasad, 2000). La selección del soporte es una de las decisiones cruciales del proceso de inmovilización (Zacheus, *et al.*, 2000). Los materiales de soporte deben cumplir con los siguientes criterios: ser insolubles, no biodegradables, no tóxicos, de bajo peso, flexibles, tener alta estabilidad mecánica, química y tener un bajo costo (Leenen, *et al.*, 1996).

Hoy en día no hay muchas investigaciones realizadas sobre inmovilización de microalgas dedicadas a la producción de biocombustibles, la mayoría de los estudios están aplicados en el tratamiento de aguas residuales. Zamalloa, *et al.*, (2013), diseñaron un reactor de placas paralelas para inmovilizar los nutrientes de las aguas residuales domésticas tratadas químicamente, donde se eliminó nitrógeno y fósforo con una eficiencia del 67% del nitrógeno total y 96% de fósforo total. En 2009, Wen, *et al.*, (2009) construyó un sistema para cultivar *Chlorella* destinada a la producción de biocombustibles con remoción de nitrógeno y fósforo simultánea, además de probar diferentes materiales como espuma de poliestireno, cartón, polietileno de fibra paisaje, esponja vegetal. Entre todos estos materiales, el mejor en términos de producción de biomasa y ácidos grasos fue de espuma de poliestireno (Patil *et al.*, 1996), además de facilitar la recuperación de la biomasa.

Según Liang *et al.*, (2009) las condiciones que promueven la alta productividad y el crecimiento rápido son la suficiencia de nutrientes y las condiciones que inducen la acumulación de lípidos es la limitación de nutrientes, es por esto que se propone un método de inmovilización de biomasa con el fin de evaluar el efecto de acumulación de biomasa y metabolitos de valor agregado.

6.2 METODOLOGÍA

6.2.1 Diseño experimental. Se siguió un diseño de experimentos factorial 3^3 de composición central tomando el cual fue desarrollado con la ayuda del software STATISTICA versión 7.1, obteniéndose un total de 17 tratamientos; todos ellos llevados a cabo por triplicado. Como variables la fuente de carbono (glicerol), de nitrógeno y fósforo (Tabla 18),

Tabla 18. Diseño de experimentos.

Tratamiento	Glicerol [% v/v]	$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ [g/L]	NaNO_3 [g/L]
1	1	0,126	0,125
2	1	0,377	0,375
3	5	0,126	0,375
4	5	0,377	0,125
5	3	0,251	0,250
6	1	0,126	0,375
7	1	0,377	0,125
8	5	0,165	0,125
9	5	0,377	0,375
10	3	0,251	0,250
11	0	0,251	0,250
12	6	0,251	0,250
13	3	0,041	0,250
14	3	0,461	0,250
15	3	0,251	0,041
16	3	0,251	0,459
17	3	0,251	0,250

6.2.2 Etapa de inoculación. Las microalgas se mantuvieron durante 16 días en biorreactores rectangulares de vidrio con medidas de 20 cm largo, 20 cm altura, 10,5 cm ancho y un volumen correspondiente a 2 L.

Sin embargo, el volumen de cultivo fue de 1,8 L; esta reducción en el volumen se debe a la inclusión del soporte polimérico donde se llevó a cabo la inmovilización. Este soporte fue cortado y armado previamente a partir de láminas de espuma de poliuretano de 1 cm de espesor.

Dicho sistema reactor-polímero tiene acoplado un difusor de hule en su parte inferior, para burbujear constantemente el aire suministrado desde un compresor; esto con el fin de garantizar la homogeneidad de todo el cultivo así como evitar la sedimentación celular.

6.2.3 Etapa experimental. Una vez terminada la etapa de inoculación, se da inicio a los tratamientos propiamente dichos por el diseño de experimentos. Para ello se utilizaron bioreactores y condiciones idénticas a las mencionadas anteriormente. La diferencia radica en que, en esta etapa, el medio de cultivo sufre las siguientes modificaciones:

1. El polímero con las células ya inmovilizadas es ahora el nuevo inóculo.
2. En el medio de cultivo cambian, según el diseño de experimentos, las concentraciones de NaNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , además de agregarse el glicerol residual como sustrato.

Esta etapa tiene una duración total de 16 días, en los que cada 4 días, se tomaron muestras para la cuantificación y seguimiento de la producción de biomasa, carbohidratos, lípidos, proteínas, consumo de glicerol, nitrógeno y fósforo.

6.2.4 Consumo de glicerol. Para la cuantificación del consumo de glicerol, se filtraron 1,5mL de muestra de medio de cultivo, usando membranas PVDF (Difluoruro de polivinilideno) OlimPeak de 0,22 μm . La técnica empleada fue la de cromatografía líquida de alta eficacia con una columna Biorad Aminex HPX-87H acoplada a un equipo UFLC 20AD (Shimadzu), seguida de un detector de índice de refracción RID-10A. El equipo operó a una temperatura de 65 °C, con flujo de 0,6 mL/min. La fase móvil empleada fue una solución de ácido sulfúrico 5 mM. El tiempo de cada análisis fue 30 minutos, aunque el tiempo de retención del

glicerol con esta columna es de 14 minutos; sin embargo, se dejó más tiempo como factor de seguridad para no contaminar posteriores muestras.

6.2.5 Consumo de nitrógeno. El consumo de nitrógeno está representado por la cuantificación de Nitrato (NO_3) que se realizó por medio del método espectrofotométrico ultravioleta (Clesceri, Greenberg & Eaton 1999). Para ello se tomaron 50 mL de medio de cultivo, se filtró al vacío y se añadió 1 mL de solución 1 N HCl. Se dejó reaccionar durante 10 minutos y finalmente se realizó la lectura de la absorbancia a 220 y 275 nm en un espectrofotómetro (Pharo300 Merck). La corrección de los valores obtenidos debido al material orgánico presente (Clesceri, Greenberg & Eaton, 1999), fue realizada mediante la ecuación.

$$\text{Nitrogeno} = (2 \times \lambda_{275}) - \lambda_{220}$$

6.2.6 Consumo de fósforo. El consumo de fósforo está representado por la cuantificación de fosfato (PO_4), para lo cual se empleó el método colorimétrico del ácido Metavanadato Molibdato (Clesceri, Greenberg & Eaton 1999). Su aplicación se basó en tomar 3 mL de medio de cultivo en un vaso de precipitado, que posteriormente se filtró al vacío. Adicionalmente se añadió 1 mL de agua destilada y 1 mL del ácido Metavanadato Molibdato, se dejó reaccionar durante 10 minutos para finalmente realizar la lectura de la absorbancia una longitud de onda de 750 nm en espectrofotómetro.

6.2.7 Cuantificación de biomasa. La cuantificación de la biomasa fue evaluada utilizando el parámetro de peso seco, mediante toma de alícuotas de 5 mL, a partir de un raspado uniforme realizado a las caras frontal, posterior e inferior del polímero. Las muestras se filtraron al vacío (Filtros MUNKTELL 110mm) y secaron durante 24 h en el horno (WTC BINDER) a 105 °C para posteriormente

transferirlas a un desecador por 12 h. Finalmente por diferencia de peso mediante balanza analítica (Precisa Gravimetrics AG) se obtuvieron las cantidades en gramos de biomasa.

6.2.8 Cuantificación carbohidratos. Los carbohidratos fueron cuantificados siguiendo el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico propuesto por Dubois et al (1956). Descrito en el capítulo 2.

6.2.9 Cuantificación de lípidos. La extracción de lípidos fue realizada siguiendo una modificación al protocolo propuesto por Chen et al (2012). Descrito en el capítulo 2.

6.2.10 Cuantificación de proteínas. El proceso de cuantificación de proteínas inició con la extracción de las mismas por medio del método de Rausch (1981) empleado por Chen & Vaidyanathan (2013). Descrito en el capítulo 2.

6.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.3.1 Consumo de nitrógeno, fósforo y carbono. Con el fin de tener un panorama general, en las figuras (40, 41 y 42) y tabas (18, 19, 20), se muestra el comportamiento desde el primer hasta el último día de experimentación para la producción porcentual de metabolitos (carbohidratos, lípidos y proteínas) correspondiente a la biomasa obtenida para cada día de experimentación, a partir del consumo de la fuente de nitrógeno, fósforo y carbono (glicerol) en los mejores tratamientos.

Figura 40. Consumo fuente de nitrógeno, fósforo y Glicerol Vs producción carbohidratos [%], tratamiento 3.

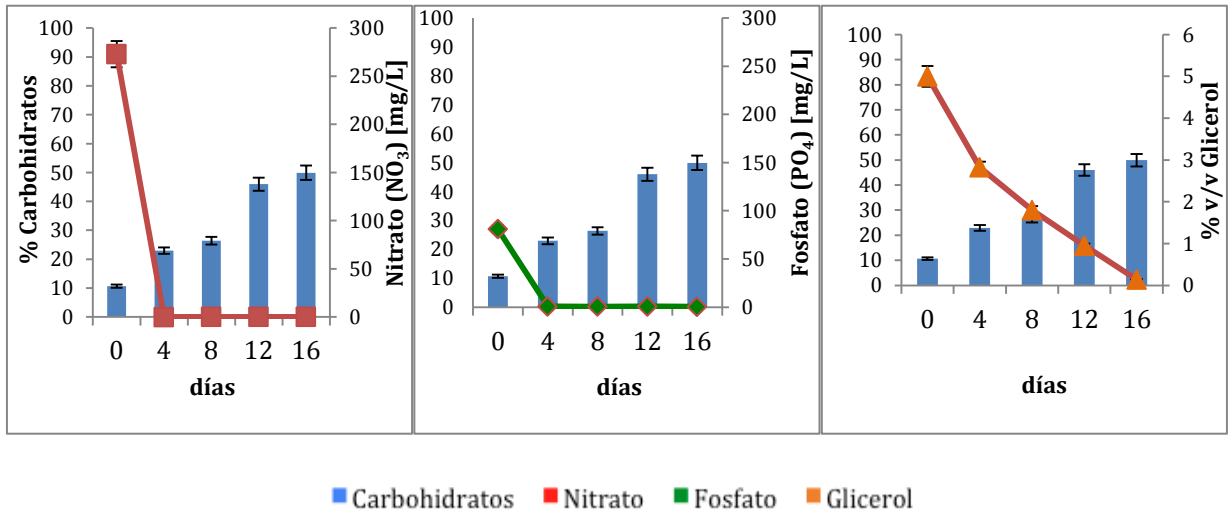


Tabla 19. Producción porcentual carbohidratos respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento.

Tiempo [día]	0	4	8	12	16
Biomasa [g/L]	16,69	12,42	11,31	11,62	11,27
Carbohidratos %	11	23	26	46	50

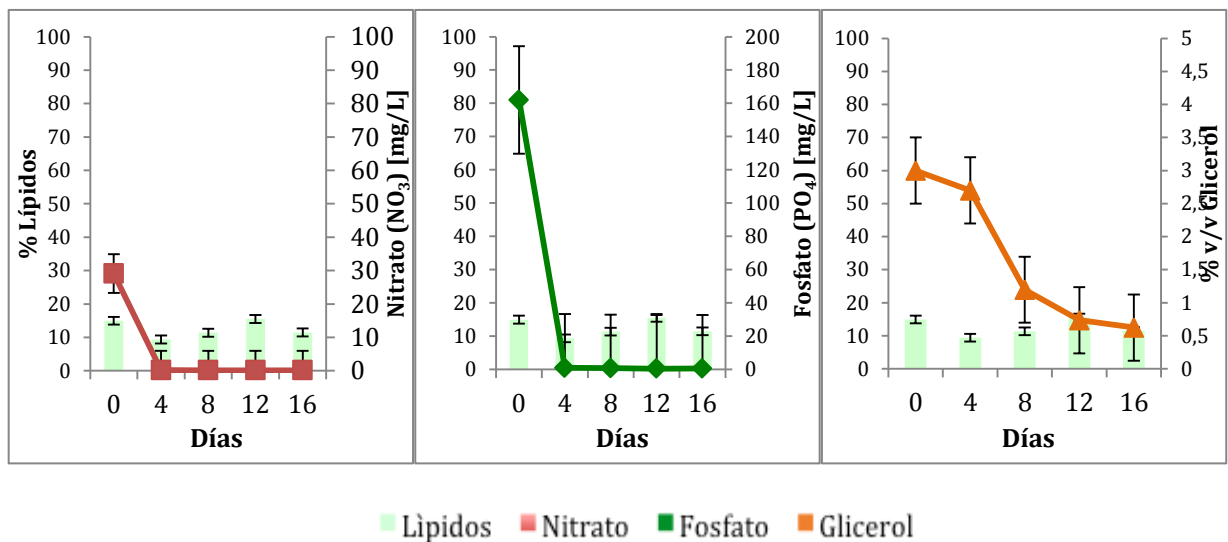
En las figuras 40 y 41 se observa que para el día 4 se ha consumido casi la totalidad de nitrato y fosfato, utilizados para el mantenimiento y producción de metabolitos, por lo que hubo una limitación de estos nutrientes hasta el final de los días experimentales. Este hecho aumentó la acumulación de lípidos

y carbohidratos; coincidiendo con lo reportado por Brányiková *et al.* (2011) y Belotti *et al.* (2013).

Tabla 20. Producción porcentual lípidos respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento

Tiempo [día]	0	4	8	12	16
Biomasa [g/L]	14,13	30,03	22,73	24,07	20,23
Lípidos [%]	15	9	11	15	11

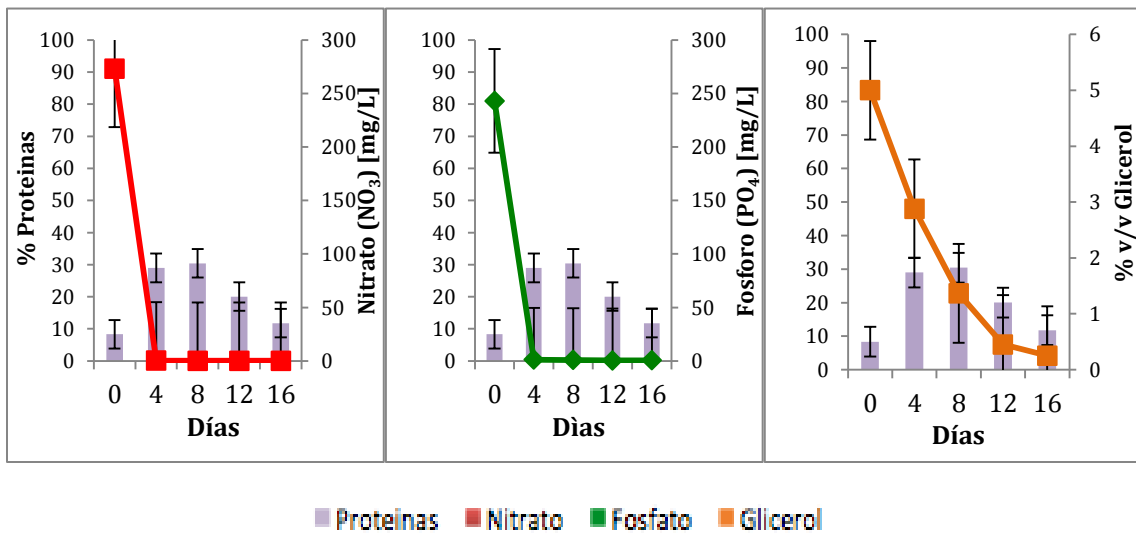
Figura 41. Consumo fuente de nitrógeno, fósforo y Glicerol Vs producción lípidos [%], tratamiento 15.



Sin embargo, analizando la interacción de dicha limitación de nutrientes en la producción de proteínas cabe destacar que hasta el día 4 existe un aumento de proteínas acompañado posteriormente por un descenso de las

mismas al existir la limitación de nutrientes, Figura 42, confirmado lo reportado en la literatura con respecto al descenso en la concentración de nitrógeno, pues según Shifrin *et al.* (1981): “mientras el contenido de nitrógeno es deficiente, en general, la concentración de proteínas disminuye a su vez”.

Figura 42. Consumo fuente de nitrógeno, fósforo y Glicerol Vs producción proteínas [%], tratamiento 9.



Respecto al glicerol crudo cabe resaltar que fue consumido totalmente por la microalga *C. vulgaris* en todos los tratamientos, lo que demuestra su viabilidad como fuente de carbono. De la misma manera, se prueba que la inmovilización constituye una parte fundamental en la adaptación de la microalga a este sustrato, además de impedir posibles procesos de inhibición (Silveira *et al.* 2013).

Tabla 21. Producción porcentual proteínas respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento

Tiempo [día]	0	4	8	12	16
Biomasa [g/L]	3,53	4,49	6,03	21,53	17,36
Proteínas [%]	8	29	30	20	12

El alto contenido de lípidos hace atractiva a las microalgas para la producción de biocombustibles, según Hu *et al.* (2008). Sin embargo, es posible aprovechar los demás metabolitos presentes en la biomasa, tal es el caso del uso de éstas como fuente de proteínas, para la producción de alimentos altamente nutricionales (Becker *et al.*, 2007).

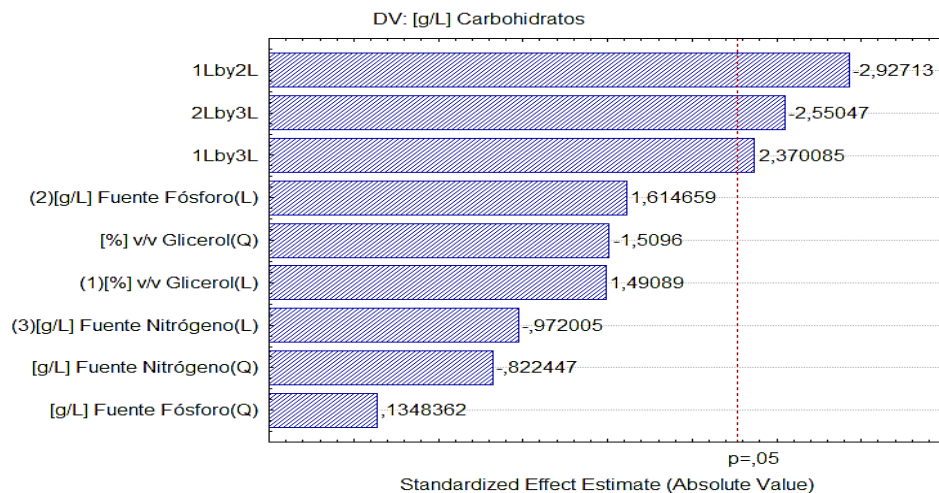
Tabla 22. Resumen mejores tratamientos y control, producción carbohidratos, proteínas y lípidos, para el mejor día de experimentación (día 12)

Tratamiento		Biomasa [g/L]	Proteínas [%]	Carbohidratos [%]	Lípidos [%]
T9	5% G 0,37[g/L] P 0,37[g/L] N	21	20	14	0.015
T15	3% G 0,25[g/L] P 0,04[g/L] N	14	15	29	15.5
T3	5% G 0,12[g/L] P 0,37[g/L] N	12	22	46	0.025

6.3.2 Concentración de carbohidratos. En el diagrama de Pareto se observa (Figura 43), que la interacción entre la fuente de glicerol/nitrógeno es la más significativa para obtener altas concentraciones de carbohidratos.

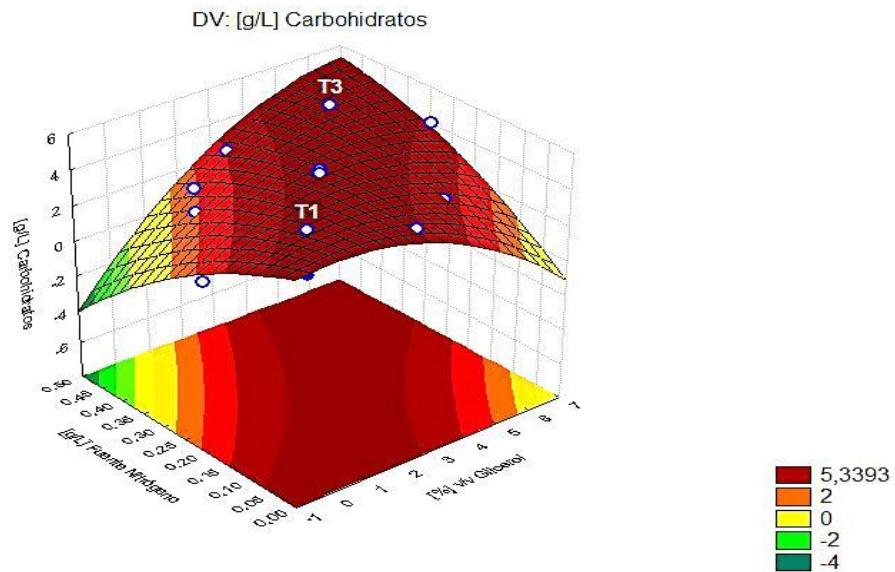
Como constituye un valor positivo, dicha interacción tiene una relación directamente proporcional entre sí para aumentar la concentración del metabolito; es decir que, a mayor concentración inicial en la fuente de glicerol y mayor concentración inicial en la fuente de nitrógeno, o viceversa, se obtendrán las cantidades más altas de carbohidratos.

Figura 43. Diagrama de Pareto para carbohidratos en el día 12.



Analizando el diagrama de superficie de respuesta, Figura 44, se concluye que los mejores tratamientos han sido el número 1 y el número 3, lo que comprueba lo anteriormente mencionado para la influencia de la interacción glicerol/nitrógeno.

Figura 44. Superficie de respuesta para la concentración de carbohidratos [g/L], glicerol [% v/v] vs fuente de nitrógeno [g/L] para el día 12.



Sin embargo, la mayor concentración de carbohidratos fue obtenida en el tratamiento número 3 (Tabla 22). Este alcanza 5,34 [g/L] de carbohidratos (correspondiente a 46% de la biomasa), con una concentración inicial alta de glicerol del 5% [v/v] y una concentración inicial alta de nitrógeno 0,37 [g/L].

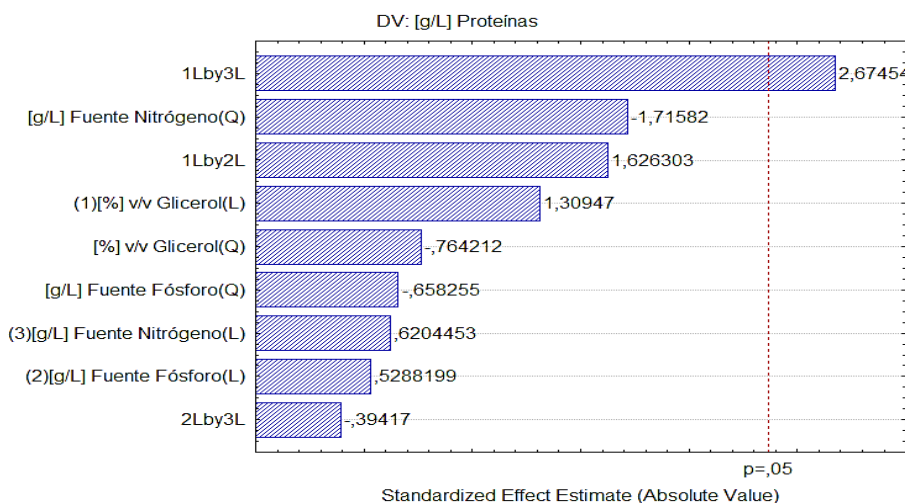
Tabla 23. Comparación mejores tratamientos día 12 para carbohidratos.

Tratamientos	Glicerol [%v/v]	Fuente de Nitrógeno[g/L]	Carbohidratos [g/L]	Biomasa [g/L]
1	1	0,12	1,78	9,81
3	5	0,37	5,34	11,62

Esto concuerda con lo reportado por Abreu *et al.* (2012) y por Kong *et al.* (2013), en cuyos estudios se encontró que, bajo condiciones de crecimiento mixotrófico (utilización de glicerol en altas cantidades), *C vulgaris* aumenta la acumulación de carbohidratos.

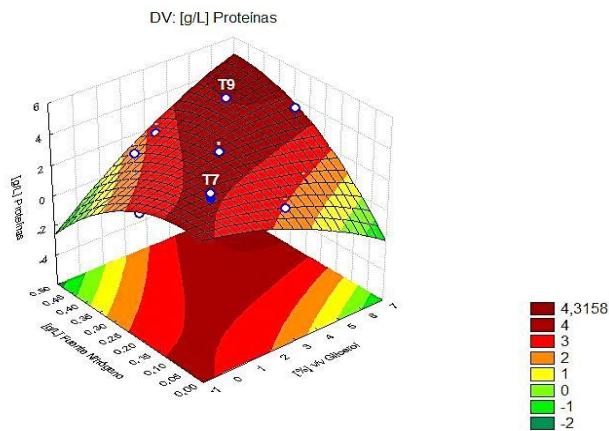
6.3.3 Concentración de proteínas. Teniendo en cuenta el diagrama de Pareto (Figura 45), la interacción entre la fuente de glicerol/nitrógeno fue la única estadísticamente significativa para aumentar la concentración de proteínas. Ésta presenta una relación directa de proporcionalidad, es decir que, para aumentar la concentración de proteínas es necesario que la concentración inicial de la fuente de carbono y nitrógeno sea alta o baja.

Figura 45. Diagrama de Pareto para proteínas en el día 12.



Mediante el diagrama de superficie para proteínas (Figura 46) es posible determinar que la producción de proteínas aumentó a mayores concentraciones de glicerol y nitrógeno; lo que permite comprobar la proporcionalidad directa entre las mismas, evidenciada anteriormente en el diagrama de Pareto.

Figura 46. Superficie de respuesta para la obtención de proteínas, fuente de nitrógeno [g/L] vs glicerol [%v/v] para el día 12.



La mejor concentración de proteínas se logró en el tratamiento 9, trabajando bajo una concentración inicial de glicerol 5% [v/v], junto con una concentración inicial alta de nitrógeno 0,37 [g/L]; logrando así una concentración de proteínas de 4,32 [g/L] correspondiente al 20% de la biomasa (Tabla 23).

Tabla 24. Comparación mejores tratamientos día 12 para proteínas

Tratamientos	Glicerol [%v/v]	Nitrógeno [g/L]	Proteínas [g/L]	Biomasa [g/L]
7	1	0,12	3,34	19,31
9	5	0,37	4,32	21,53

6.4 CONCLUSIONES

- Los resultados de este trabajo mostraron que el uso del glicerol crudo como fuente de carbono aumenta la producción de metabolitos cuando esta consume

mayores cantidades del mismo (entre 3 y 5% v/v), en comparación con tratamientos a bajas concentraciones de glicerol y en ausencia del mismo.

- También se encontró que para estimular la acumulación de lípidos y carbohidratos, debe existir una limitación en las fuentes de nitrógeno y fósforo. Sin embargo, para favorecer la acumulación de proteínas se debe aplicar totalmente lo opuesto.
- El uso de la inmovilización pasiva favoreció la adaptabilidad de la microalga al sustrato y aumentó significativamente la concentración de biomasa, logrando superar la cantidad de la misma en comparación con estudios anteriores.
- Todo lo anterior ayuda a constituir una manera viable para reducir el costo en la producción de biocombustibles a partir de microalgas; esto por la utilización de un sustrato de bajo costo como el glicerol así como la reducción de costos en el uso de nutrientes en el medio de cultivo.

CONCLUSIONES GENERALES

En búsqueda de la construcción de una biorrefinería a partir de biomasa de microalgas para la producción de biocombustibles y productos de alto valor agregado, se propuso este trabajo en el cual se muestra un conjunto de contribuciones en el cultivo y cosecha de la biomasa, con la cual se pudo demostrar una sostenibilidad en la producción de biomasa, costos de producción, impactos ambientales y eficiencia del proceso.

En el cultivo el aumento del 73% en la producción de biomasa total permite obtener microalgas más robusta, aumentando la productividad de ácidos grasos, proteínas y carbohidratos. Además se emplean sustancias que son consideradas residuos de otros procesos industriales como es el glicerol, que es reutilizado y presenta un impacto positivo en la producción de biomasa. El uso del glicerol crudo como fuente de carbono aumenta la producción de metabolitos cuando esta consume mayores cantidades del mismo (entre 3 y 5% v/v), en comparación con tratamientos a bajas concentraciones de glicerol y en ausencia del mismo. Con estos resultados obtenidos a nivel experimental del crecimiento de biomasa microalga resulta ser prometedor su cultivo e implementación en una biorrefinería a partir de microalgas.

La cosecha de microalgas es sin duda un cuello de botella, ya que con este proceso se aumenta casi un 40% el costo total de producción, con el trabajo realizado se evaluaron diferentes procesos de cosecha con el fin de aumentar la recuperación de biomasa, sin afectar las características de la biomasa, reduciendo el tiempo y costos en la recolección de la biomasa. Es por esto que la floculación con el biopolímero FO49990 es el mejor método ya que la recuperación es superior al 90% sin importar el volumen de biomasa con el que se trabaje y la biomasa no se ve afectada con su adición.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABREU, A.; FERNANDES, B.; Vicente, A.; Teixeira, J. & Dragone, G. (2012). Mixotrophic Cultivation Of *Chlorella Vulgaris* Using Industrial Dairy Waste As Organic Carbón Source. En: *Bioresource Technology*, Vol. 118. p. 61–66.
2. ANDERSEN, RA., 2005. Algal culturing techniques. London: *Elsevier Academic Press*.
3. ARREDONDO, B.O., VÁZQUEZ-Duhalt, R., 1991. “Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas”. *Ciencia y Desarrollo*. 17: 99-111.
4. CLESCERI, L.S., GREENBERG, AE & Eaton, AD. Standard methods for examination of water and wastewater. En: American Public Health Association. 1999. 20th ed. Washington, DC.
5. CONVERTI, A.; ORTIZ, P. & PEREGO, M. (2009). Effect of Temperature And Nitrogen Concentration on The Growth and Lipid Content of *Nannochloropsis Oculata* and *Chlorella Vulgaris* for Biodiesel Production. En: *Chemical Engineering and Processing*, vol. 48. p. 1146–1151.
6. BARSANTI, L. & GUALTIERI, P. (2006). *Algae Anatomy Biochemistry and Biotechnology*. New York: Taylor & Francis Group.
7. BELOTTI, G.; BRAVI, M.; De CAPRARIIS, B.; De FILIPPIS, P. & SCARSELLA, M. (2013). Effect Of Nitrogen And Phosphorus Starvations On *Chlorella Vulgaris* Lipids Productivity And Quality Under Different Trophic Regimens For Biodiesel Production. En: *American Journal Of Plant Sciences*, Vol. 4. p. 44-51.

8. BHOLA, V.; DESIKAN, R.; SANTOSH, S.; SUBBURAMU, K.; SANNIYASI, E. & BUX, F. (2011). Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. En: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 111, No. 3. p. 377–382.
9. BORGES, L., MORÓN-VILLARREYES, J. A., D'Oca, M. G. M., & ABREU, P. C. (2011). Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *biomass and bioenergy*, 35(10), 4449-4454.
10. BOROWITZKA M. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. En: *Journal of Biotechnology*, vol. 70. p. 313-321.
11. BOROWITZKA, M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 393-401.
12. BOUARAB, L.; DAUTAB, A. & LOUDIKI, M. (2004). Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum fresenius* in the presence of acetate and glucose: Effect of light and acetate gradient concentration. En: *Water Res.*, vol. 38, No. 11. p. 2706-2712.
13. BRÁNYIKOVÁ, I.; MARŠÁLKOVÁ, B.; DOUCHA, J.; BRÁNYIK, T.; BIŠOVÁ, K.; ZACHLEDER, V. & VÍTOVÁ M. (2011). Microalgae Novel Highly Efficient Starch Producers. En: *Biotechnology Bioengineering*, Vol. 108(4). p. 766–776.
14. BRENNAN, L., & OWENDE , P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, No. 14. p. 558-573.

15. BULUT, Y. (2009). *The investigations on the possibility of increase lipid content of Chlorella (Master Thesis)*. Cukurova Univ., Institute of science and technology, Biotechnology Department, 62 p. Turkey.
16. CHEN, Y., & VAIDYANATHAN, S. (2013). Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. *Analytica chimica acta*, 776, 31-40.
17. CHEN Y. & VAIDYANATHAN, S. (2012). A Simple, Reproducible and Sensitive Spectrophotometric Method to Estimate Microalgal Lipids. En: *Analytica Chimica Acta*, Vol. 724. p. 67-72.
18. CHEN, C.; YEH, K.; AISYAH, R.; Lee, D. & Chang, J. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A Critical review. En: *Bioresource Technology*, vol. 102, No. 1. p. 71-81.
19. CHEN, Y. & VAIDYANATHAN S. (2012). *A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids*. *Anal. Chim. Acta*. 724. p. 67–72
20. CHISTI, Y. (2008). Response to REIJNDERS: Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants? En: *Biotechnology Advances* 26. p. 351-352.
21. CHRISTENSON, L. & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. En: *Biotechnology Advances*, vol. 29, No. 6. p. 686-702.
22. CHUN, W.; FENG-WU, B. & XIN-QING, Z. (2013). Effects of nitrogen concentration and media replacement on cell growth and lipid production of

- oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* DUT01". En: *Biochemical Engineering Journal* 78. p. 32– 38.
23. CONVERTI, A.; CASAZZA, A.; Ortiz, E. Y., PEREGO, P. & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. En: *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), p. 1146-1151.
24. DEVI, M. P., SUBHASH, G. V., & MOHAN, S. V. (2012). Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*, 43, 276-283.
25. DEGRENNE, B., PRUVOST, J., CHRISTOPHE, G., CORNET, J. F., COGNE, G., & LEGRAND, J. (2010). Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *International journal of hydrogen energy*, 35(19), 10741-10749.
26. DOREY, C. R., & DRAVES, J. A. (1998). Quantitative analysis laboratory: a new approach. *Laboratory manual. Department of Chemistry, University of Central Arkansas, Conway, AR.*
27. DRAGONE, G.; FERNANDES, B.; ABREU, A.; Vicente, A. & Texeira, J. (2011). *Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae.* *Applied Energy*. p. 3331–3335.
28. DUAN, J., & Gregory, J. (2003). Coagulation by hydrolysing metal salts. *Advances in colloid and interface science*, 100, 475-502.

29. DUBOIS, M.; Gilles, K.; REBERS, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric Method For Determination Of Sugars And Related Substances. En: *Analytical Chemistry*, Vol. 3, No. 28. p. 350-356.
30. DUTTA, D., De, D., Chaudhuri, S., & BHATTACHARYA, S. K. (2005). Hydrogen production by Cyanobacteria. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 36.
31. D'SOUZA, F. M., & Kelly, G. J. (2000). Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. *Aquaculture*, 181(3), 311-329.
32. ESTÉVEZ, L.; BARAJAS, A.; BARAJAS, C. & KAFAROV, V. (2013). Improvement Of Lipid Productivity On *Chlorella Vulgaris* Using Waste Glycerol And Sodium Acetate. En: *Ciencia, Tecnología y Futuro*, Vol. 5, No. 2. p. 113-126.
33. FÁBREGAS, J.; ABALDE, J. & HERRERO, C. (1989). Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. En: *Aquaculture*, vol. 83. p. 289-304.
34. FENG, P.; DENG, Z.; FAN, L. & HU, Z. (2012). Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. En: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 114, No. 4., p. 405-410.
35. FERNÁNDEZ, F. A., HALL, D. O., GUERRERO, E. C., Rao, K. K., & Grima, E. M. (2003). Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. *Journal of Biotechnology*, 103(2), 137-152.

36. FERNÁNDEZ, C. (2000). *Algas de Galicia*. Centro de Espectrometría Atómica UCM.: Universidad de Madrid.
37. GAO, Y.; YANG, M. & WANG, C. (2013). Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. En: *Bioresource Technology*, vol. 147. p. 484-491.
38. GARZÓN-SANABRIA, A.; DAVIS, R. & NIKOLOV, Z. (2012). Harvesting *Nannochloris oculata* by inorganic electrolyte flocculation: Effect of initial cell density, ionic strength, coagulant dosage, and media pH. En: *Bioresource Technology*, Vol. 118. p. 418–424.
39. GARZÓN-SANABRIA, A.; RAMÍREZ-CABALLERO, S.; MOSS, F. & NIKOLOV, Z. (2013). Effect of algogenic organic matter (AOM) and sodium chloride on *Nannochloropsis salina* flocculation efficiency. En: *Bioresource technology* vol. 143. p. 231- 237.
40. GONZÁLEZ-DELGADO, A. D, & KAFAROV, V. (2011). Microalgae based biorefinery: Issues to consider. *CTyF - Ciencia, Tecnología y Futuro*, 4(4), 5-22.
41. GOULDING K. & MERRETT M. (1966). The photometabolism of acetate by *Chlorella pyrenoidosa*. En: *Journal of Experimental Botany*, vol. 17, No. 4. p. 678-689.
42. GRANADOS, M. R., ACIÉN, F. G., GÓMEZ, C., FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M., & Grima, E. M. (2012). Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. *Bioresource technology*, 118, 102-110.

43. GREENWELL, H.; LAURENS, L.; SHIELDS, R.; LOVITT, R. & FLYNN, K. (2010). *Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges.*, vol. 7, No. 703–726.
44. GREGORY, J. & Duan, J. (2001). *Hydrolyzing metal salts as coagulants. Pure and Applied Chemistry.*, 73. 2017–2026.
45. GRIFITHS, M.; GARCIN, C., VAN HILLE, R. & HARRISON S. (2011). *Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density.* Journal of Microbiological Methods, 85, 119–123.
46. GRIMA, E. M., BELARBI, E. H., FERNÁNDEZ, F. A., MEDINA, A. R., & CHISTI, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology advances*, 20(7), 491-515.
47. HAGE, C.; GRÜNEWALD, K.; XYLÄNDER, M. & ROTHE, E. (2001). Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology*, 13(1), 79-87.
48. HALIM, R.; GLADMAN, B.; SANQUAH, M. & WEBLEY. P. (2011). Oil Extraction from Microalgae for Biodiesel Production. En: *Bioresource Technology*, vol. 102, No. 1. p. 178-185.
49. HAMMOUDA, O., GABER, A., & ABDELRAOUF, N. (1995). Microalgae and wastewater treatment. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 31(3), 205-210.
50. HENDERSON, R.; PARSONS, S. & JEFFERSON, B. (2008). Successful removal of algae through the control of zeta potential. *Separation Science and Technology*, 43(7), 1653-1666.

51. HUANG, G., CHEN, F., WEI, D., ZHANG X & CHEN G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied energy*, 87(1), 38-46.
52. ILLMAN, A. M., SCRAGG, A. H., & SHALES, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and microbial technology*, 27(8), 631-635.
53. JEON, Y.; CHO, C. & YUN, Y. (2006). Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. En: *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 490-495.
54. KIM, D. G., La, H. J., Ahn, C. Y., PARK, Y. H., & Oh, H. M. (2011). Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. *Bioresource technology*, 102(3), 3163-3168.
55. KIM, S. G., CHOI, A., AHN, C. Y., PARK, C. S., PARK, Y. H., & Oh, H. M. (2005). Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination. *Letters in applied microbiology*, 40(3), 190-194.
56. KONG, W.; YANG, H.; CAO, Y.; SONG, H.; Hua, S. & Xia, C. (2013). Effect of Glycerol and Glucose on The Enhancement of Biomass, Lipid and Soluble Carbohydrate Production By *Chlorella Vulgaris* In Mixotrophic Culture. En: *Biotechnology*, Vol. 51(1). p. 62–69.
57. KULCZYCKI, G.; VIRNSTEIN, R. & NELSON, W. (1981). *The Relationship Between Fish Abundance and Algal Biomass in a Seagrass-Drift Algae Community*. *Estuarine, Coastal And Shelf Science*, 12(3). p. 341-347.
58. LARKUM, A. W., ROSS, I. L., KRUSE, O., & HANKAMER, B. (2012). Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production.

Trends in biotechnology, 30(4), 198-205.

59. LEE, J. Y., YOO, C., JUN, S. Y., AHN, C. Y., & Oh, H. M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource technology*, 101(1), S75-S77.
60. LEE, Y. (2004). *Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycology.* Oxford: Blackwell Publishing. 116-124.
61. LEE, Y. (2001). *Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential.* *Journal of Applied Phycology*, 13(4). p. 307-315.
62. LEE, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y., & Oh, H. M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource technology*, 101(1), S75-S77.
63. LEENEN, E.; DOSSANTOS, V.; GROLLE, K.; TRAMPER, J. & WIJFFELS, R. (1996). Characteristics of And Selection Criteria For Support Materials For Cell Immobilization In Wastewater Treatment. En: *Water Research*, 30(12), 2985-2996.
64. Li, X., Xu, H., & Wu, Q. (2007). Large- scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 98(4), 764-771.
65. LIANG, Y.; SARKANY, N. & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology letters*, 31(7), 1043-1049.

66. LINDGREN, J., OHMAN, L. O., GUNNARS, S., & WÅGBERG, L. (2002). Charge determinations of cellulose fibres of different origin-Comparison between different methods. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 17(1), 89-96.
67. LILING, J.; SHENGJUN, L.; XIAOLEI, F.; ZHIMAN, Y. & RONGBO, G. (2011). *Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂*. *Applied Energy*, 88, p. 3336–3341.
68. LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N.; FARR, A. & RANDALL, R. (1951). Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. En: *J Biol Chem*, vol. 193. p. 265-275.
69. LU, C.; CUNWEN, W.; WEIGUO, W.; JIANG, W. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus sp.* cultivated in an open-pond system. *Bioresource Technology*, vol. 133, pp. 9-15, 2013.
70. MATA, T.; MARTINS, A. & CAETANO, N. S. (2010). *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232.
71. MORWEISER, M., KRUSE, O., HANKAMER, B., & POSTEN, C. (2010). Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(4), 1291-1301.
72. ÖRDÖG, V., W.A. STIRK, P. BALINT, J. van STADEN & C. LOVASZ. (2012). Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of applied phycology*, 24(4), 907-914.

73. PORRAS, T. & PRADA, C. (2012). *Efecto del tiempo de cultivo en la productividad de metabolitos de valor agregado en Chlorella vulgaris UTEX 1803*. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander-Libro de tesis.
74. PRUVOST, J., VAN VOOREN, G., LE GOUIC, B., COUZINET-MOSSION, A., & Legrand, J. (2011). Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresource technology*, 102(1), 150-158.
75. PULZ, O. (2001). PHOTOBIOREACTORS: production systems for phototrophic microorganisms. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57, p. 287 - 293.
76. QUIAO, H. & WANG, G. (2009). Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27, 762-768.
77. RICHMOND, A. (1986). *Microalgae of economic potential*. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of microalgal mass culture. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. 199-243.
78. RICHMOND, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. En: *Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges Developments in Hydrobiology Volume 173*, p. 33-37.
79. RWEHUMBIZA, M.; HARRISON, R. & THOMSEN, L. (2012). Alum-induced flocculation of preconcentrated *Nannochloropsis salina*: Residual aluminium in the biomass, FAMES and its effects on microalgae growth upon media recycling. *Chemical Engineering Journal*, p.168–175.

80. SHIFRIN, N. & CHISHOLM, S. (1981). Phytoplankton Lipids: Interspecific Differences and Effects of Nitrate, Silicate And Lightdark Cycles. En: *Journal of phycology*, Vol 17. p. 372-384.
81. SILVEIRA, S.; MARTINS, C.; CIDRAO, L. & SANTAELLA, S. (2013). Immobilization Of Microbialcells: A Promising Tool For Treatment Of Toxic Pollutants In Industrial Wastewater. En: *African Journal Of Biotechnology*, Vol. 12 (28). p. 4412-4418.
82. SOXHLET, F. V. (1879). Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. *Polytechnisches Journal*, 232(5), 461-465.
83. SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., & ISAMBERT, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
84. SUH, I. S., & LEE, C. G. (2003). Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(6), 313-321.
85. SYRETT, P.; BOCKS, S. & MERRETT, M. (1964). *The Assimilation of Acetate by Chlorella Vulgaris*. *Journal of Experimental Botany*, 15(1), 35-47.
86. RAUSCH, T. (1981). *The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein*. *Hydrobiologia*, 78. p. 237-251.
87. TANG, Y., MA, X. & LAI, Z. (2011). *Thermogravimetric Analysis of The Combustion of Microalgae and Microalgae Blended With Waste in N2/O2 and*

- CO₂/O₂ Atmospheres. *Bioresource Technology*. 102(2). p. 1879-1885.
88. UDUMAN, N.; Qi, Y.; DANQUAH, M.; FORDE, G. & HOADLEY, A. (2010). *Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels*. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2(1).
89. UGWU, C.; AOYAGI, H. & UCHIYAMA, H. (2008). *Photobioreactors for mass cultivation of algae*. *Bioresource Technology*, 99(10). p. 4021-4028.
90. USLU, L.; ISIK, O.; KOÇ, K., & GÖKSAN, T. (2011). *The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of Spirulina platensis*. *African Journal of Biotechnology*, 10, p. 386-389.
91. VAN HAVEREN, J., SCOTT, E. L., & SANDERS, J. (2008). Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(1), 41-57.
92. WANG JL, QUAN X, HAN L, QUIAN Y, WERNER H (2002). Microbial degradation of quinoline by immobilized cells of Burkholderia pickettii. *Water Res.* 36:2288-2296.
93. WATANABE, M. (2005). *Chapter 2: Freshwater Culture Media A. In R. Andersen*.
94. WAWRIK, B.; HARRIMAN, B. & Rapid (2010). Colorimetric Quantification of Lipid from Algal Cultures". *The Journal of Microbiological Methods*. 80, p. 262-266.
95. WIDJAJA, A., CHIEN, C. & Ju, Y. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40, 13-20.

96. WU, N.; LAN, C.Q.; WANG, B.; Li, Y, (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 79, p. 707–718.
97. WU, Z., ZHU, Y., HUANG, W., ZHANG, C., Li, T., ZHANG, Y. & LI, A. (2012). Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource technology*, 110, 496-502.
98. XIN, L.; HONG-YING, H. & YU-PING, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. En: *Bioresource Technology*, 102(3), p. 3098-3102.
99. XIN, L.; HONG-YING, H.; Ke, G. & YING-XUE, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101 (14), 5494-5500
100. YADALA, S., & CREMASCHI, S. (2014). Design and optimization of artificial cultivation units for algae production. *Energy*, 78, 23-39.
101. YANNA, L.; Nicolas, S. & YI, C. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology letters*, 31(7), 1043-1049.
102. ZACHEUS, O.; IIVANAINEN, E.; NISSINEN, T.; LEHTOLA, M. & MARTIKAINEN, P. (2000). Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. *Water Research*, 34(1), 63-70.

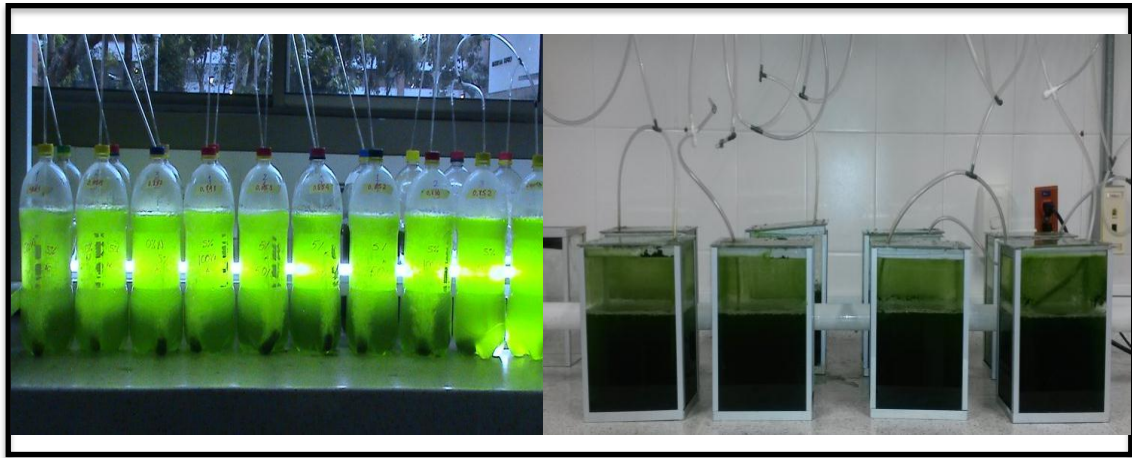
103. ZHU, S.; HUANG, W.; Xu, J.; WANG, Z.; JINGLIANG, X. & Yuan, Z. (2014). Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. En: *Bioresource Technology*, 152. p. 292–298.

ANEXOS

Anexo A. OTROS RESULTADOS DEL TRABAJO.

Como resultados adicionales se adecuo el laboratorio con reactores planos con una capacidad de 2, 20 y 40 litros con un nuevo sistema de iluminación y burbujeo para las microalgas, como se puede observar en las siguientes imágenes.

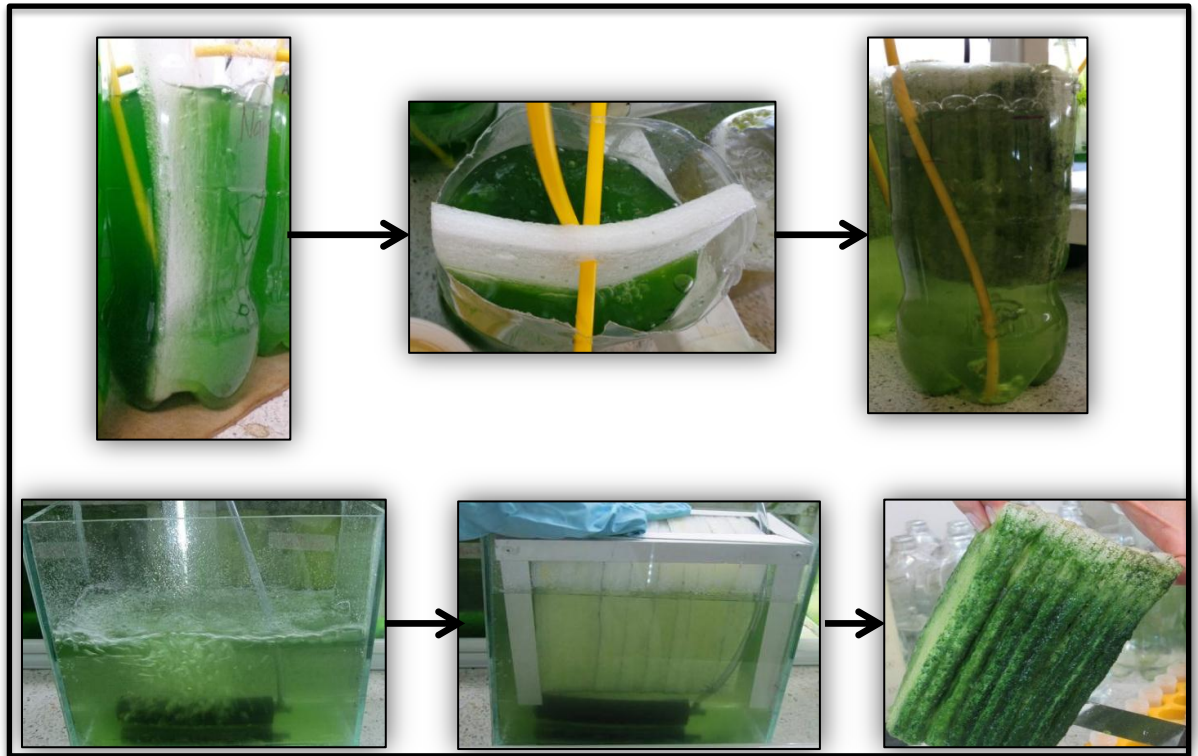
Reactores cilíndricos 2L inicialmente en el laboratorio y Reactores planos 2L, empleados en la experimentación.



Reactores planos 20L y 40L adquiridos para la experimentación



Reactores inicialmente propuestos para la inmovilización. Reactores planos utilizados en la inmovilización.



Co-Dirección de trabajos de grado.

Se codirigieron 5 trabajos de grado como requisito para optar el título de Ingeniero Químico para los estudiantes de pregrado.

1. Bravo, F. A., Barajas, A. F., **Ardila, A. M.**, Barajas, C., 2014. Efecto de la concentración de carbono, nitrógeno y fósforo en la obtención de carbohidratos, proteínas, clorofilas y lípidos a partir de cultivos autotróficos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

2. López, Y., Vásquez, M. E., **Ardila, A. M.**, Barajas, A. F., Barajas, C., 2014. Efecto de la concentración de acetato de sodio, nitrato de sodio y fosfato de

potasio en la obtención de metabolitos de valor agregado a partir de cultivos mixotróficos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

3. Mena, N. O., Ortegón, M. A., **Ardila, A. M.**, Barajas, A. F., Barajas, C., 2014. Efecto de la floculación en la extracción de lípidos en biomasa de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp.*

4. Pérez, H. A., Rodríguez, L. G., **Ardila, A. M.**, Barajas, A. F., Barajas, C., 2014. Evaluación del biopolímero FO4990 en la floculación de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803

5. Blanco, V., Villamizar, S., **Ardila, A. M.**, Barajas, A. F., Barajas, C., 2014. Efecto del glicerol residual en la deposición de lípidos y carbohidratos en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 como materia prima para la producción de biocombustibles de tercera generación.

Participación en eventos científicos nacionales e internacionales con libro de resúmenes

1. **Ardila, A. M.**, Blanco, V., Villamizar, S., Barajas, A. F., Barajas, C., Kafarov, V., 2014. Efecto del glicerol residual en la deposición de lípidos y carbohidratos en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 como materia prima para la producción de biocombustibles de tercera generación. Libro de resúmenes. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Biocombustibles CIBSCOL 2014 ISBN: 978-958-8819-16-7.

2. **Ardila, A. M.**, Mena, N. O., Ortegón, M. A., Barajas, A. F., Barajas, C., Kafarov, V., 2014. Efecto de la floculación en la cosecha de biomasa de *Chlorella vulgaris* y

Nannochloropsis sp. Libro de resúmenes. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Biocombustibles CIBSCOL 2014 ISBN: 978-958-8819-16-7.

3. **Ardila, A. M.**, Mena, N. O., Ortegón, M. A., Barajas. A. F., Sanguino, P., Kafarov, V. 2014. Evaluación de una metodología de cosecha de microalgas para la obtención de metabolitos con potencial de valor Libro de resúmenes 2° Congreso Internacional de Energía Sostenible ISBN VERSIÓN DIGITAL 978-958-57711-1-6

Eventos 2016

1. **Ardila A.M.**, Mena-Lopez N., Ortegon-Diaz M., Zuorro A., Barajas-Solano A., Barajas-Ferreira C. Effect of flocculation over lipid extraction efficiency on *chlorella vulgaris* 1803 and *nannochloropsis* sp. IBIC2016 5th International Conference on Industrial Biotechnology. April 10-13 2016, Bologna, Italy.

2. Blanco Suarez V.E., Villamizar Sanchez S.S., Peralta- Ruiz Y.Y., Gonzalez-Delgado A.D., Barajas-Solano A.F., **Ardila A.M.** Passive microalgae immobilization for wastewater treatment: study of residual glycerol consumption. International Conference of Nanotechnology based innovative Applications for the Environment. 20-23 Marzo 2016, Roma, Italia.

Artículos

1. **Ardila, A.M.**, Quintero, V., Blanco Suarez V.E., Villamizar Sanchez S.S., Barajas-Solano A.F., Kafarov, V. Efecto del glicerol residual en la deposición de metabolitos para la *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, mediante tecnicas de inmovilizacion. (Revisión)

2. **Ardila A.M.**, Mena-Lopez N., Ortegon-Diaz M., Zuorro A., Barajas-Solano A.,

Barajas-Ferreira C. Effect of flocculation over lipid extraction efficiency on *Chlorella vulgaris* 1803. (En revisión)

3. Blanco Suarez V.E., Villamizar Sanchez S.S., Peralta- Ruiz Y.Y., Gonzalez-Delgado A.D., Barajas-Solano A.F., **Ardila A.M.** Passive microalgae immobilization for wastewater treatment: study of residual glycerol consumption. (Aprobado).

Anexo B. ESTADÍSTICA.

Manual de interpretación del diagrama de Pareto el software Statistic 7.0

El software STATISTICA ® es un programa integrado para la gestión de análisis estadístico y bases de datos, que ofrecen una amplia selección de proceso analítico, desde básico a avanzado.

El sistema incluye no sólo los procedimientos estadísticos y gráficos generales, pero también módulos especializados (análisis de regresión, supervivencia, time series, análisis factorial, análisis discriminante y varios otros módulos).

Para el caso del presente estudio se hizo uso del diagrama de Pareto de efectos, para determinar la magnitud y la importancia de un efecto. El diagrama muestra el valor absoluto de los efectos y traza una línea de referencia en la gráfica. Cualquier efecto que se extienda más allá de esta línea de referencia es potencialmente importante. Par el caso se especifica un nivel de significancia del 5 % ($P = 0,05$).

Los efectos que sobrepasan la línea de significancia representan un mayor efecto acumulativo en el sistema dado. El software presenta la relación lineal (L) y cuadrática (Q) de los efectos que se generan a partir de las variables de estudio, cabe también resaltar que el programa incluye una función para la evaluación de la interacción de las variables, esto quiere decir, que el software emplea una ecuación lineal donde interseca los diferentes factores (en números) para determinar si la interacción entre 2 factores posee un factor significativo en la respuesta.

En el caso específico demostrado en la siguiente gráfica, el factor que más influye es la temperatura (factor N^o3), sin embargo su intersección con los otros factores como son Molaridad (1) y Solvente/Biomasa (N) no son significativos

