

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/ NITRÓGENO EN LA
PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y CARBOHIDRATOS EN CULTIVOS DE
Chlorella vulgaris UTEX 1803 EN FOTOBIOREACTORES A ESCALA DE
LABORATORIO.**

LAURA VIVIANA RUEDA QUIÑONEZ

LAURA YULEXI ALFONSO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2012

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/ NITRÓGENO EN LA
PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y CARBOHIDRATOS EN CULTIVOS DE
Chlorella vulgaris UTEX 1803 EN FOTOBIOREACTORES A ESCALA DE
LABORATORIO.**

LAURA VIVIANA RUEDA QUIÑONEZ

LAURA YULEXI ALFONSO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:

Ingeniero Químico

Directores

Ph. D. Viatcheslav Kafarov

M.Sc. Crisóstomo Barajas

Codirector

Biól. Andrés Fernando Barajas Solano

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2012

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	14
OBJETIVOS	17
1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	18
1.1. CRECIMIENTO	18
1.2. APLICACIÓN.....	19
1.3. MEDICIÓN	19
1.3.1. Determinación de carbohidratos.....	19
1.3.2. Determinación de la tasa de consumo de fosfato	20
1.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
2.RESULTADOS Y ANÁLISIS	21
3.DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	28
4.CONCLUSIONES	33
RECOMENDACIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXOS.....	40

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño experimental de los cultivos de <i>C. vulgaris</i>	19
Tabla 2. Concentración total de xilosa y glucosa al tercer y quinto día de ser inoculada la cepa	27

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema de la metodología experimental	18
Figura 2. Concentración de xilosa al quinto día de inoculación de la cepa obtenida mediante los tres métodos comparativos utilizados para los nueve tratamientos	22
Figura 3. Concentración de glucosa al quinto día de inoculación de la cepa obtenida mediante los tres métodos comparativos utilizados para los nueve tratamientos	22
Figura 4. Concentración de xilosa y glucosa para el tratamiento 3 (20 mM; 0,97 mM) durante los cinco días siguientes a la inoculación de la cepa	23
Figura 5. Concentración de xilosa y glucosa para el tratamiento 6 (20 mM; 1,94 mM) durante los cinco días siguientes a la inoculación de la cepa	23
Figura 6. Concentración de xilosa y glucosa para el tratamiento 9 (20 mM; 2,78 mM) durante los cinco días siguientes a la inoculación de la cepa	24
Figura 7. Concentración de xilosa al tercer día de inoculación de la cepa obtenida mediante los tres métodos comparativos utilizados para los nueve tratamientos	25
Figura 8. Concentración de glucosa al tercer día de inoculación de la cepa obtenida mediante los tres métodos comparativos utilizados para los nueve tratamientos	25

- Figura 9.** Consumo de fosfato de *Chlorella vulgaris* en el medio de cultivo, para los todos los tratamientos. 26
- Figura 10.** Concentración de xilosa y glucosa en la biomasa y concentración de la biomasa de *Chlorella vulgaris* en el cultivo, para todos los tratamientos al tercer (a) y quinto día (b) de ser inoculada la cepa 26

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. CÁLCULO DEL COEFICIENTE MÁSIKO DE EXTINCIÓN PARA LA XILOSA	40
ANEXO B. CÁLCULO DEL COEFICIENTE MÁSIKO DE EXTINCIÓN PARA LA GLUCOSA	41

RESUMEN

TITULO: EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/ NITRÓGENO EN LA PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y CARBOHIDRATOS EN CULTIVOS DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN FOTOBIOREACTORES A ESCALA DE LABORATORIO*

AUTORES: Laura Viviana Rueda Quiñonez, Laura Yulexi Alfonso**

PALABRAS CLAVES: Microalgas, cultivo mixotrófico, *Chlorella vulgaris*, relación carbono/nitrógeno, carbohidratos.

Chlorella vulgaris es un microorganismo de importancia industrial por la producción de metabolitos de gran valor económico como pigmentos, carbohidratos y proteínas. En este trabajo se estudió el efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa y carbohidratos (glucosa y xilosa) de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, mediante la variación de las concentraciones de acetato y nitrato de sodio. Se efectuaron cultivos mixotróficos durante 5 días con diferentes concentraciones de acetato (5, 10 y 20mM), y nitrato de sodio (0,97, 1,94 y 2,94mM).

Al quinto día de cultivo T5 (10mM de acetato; 1,94mM de nitrato) alcanzó una producción de biomasa de 0,79 g/L con alta productividad de xilosa y glucosa (76,9 µg/ml y 73,7 µg/ml respectivamente). Sin embargo, al tercer día, T3 (20mM de acetato; 0,97mM de nitrato) había producido 1,04 g/L de biomasa, 78,9 µg/ml de xilosa y 77,2 µg/ml de glucosa equivalentes al 7,6 y 7,5% del total de biomasa. Aunque estos tratamientos tuvieron una producción mayor (0,55 g/L de biomasa, 40,2 µg/ml de xilosa y 31,3 µg/ml de glucosa) a un cultivo sin modificación (0mM de acetato y 2,94mM de nitrato), el T3 consumió casi 4 veces más fosfato (70%) que los cultivos T5 y sin modificación (aprox. 20%)

Gracias a la relación carbono/nitrógeno, se mejoran las productividades de biomasa (de 0,55 g/L hasta 1,04 g/L), de xilosa (de 40,2 µg/ml hasta 78,9 µg/ml) y de glucosa (de 31,3 µg/ml hasta 77,2 µg/ml), representando un mejoramiento de hasta 2 veces tanto la producción de biomasa como de carbohidratos en 3 días de cultivo.

*Proyecto de grado

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

ABSTRACT

TITLE: EFFECT OF CARBON/NITROGEN RATIO ON BIOMASS AND CARBOHYDRATES PRODUCTION OF *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 ON LABSCALE PHOTOBIOREACTORS*

AUTHORS: Laura Viviana Rueda Quiñonez, Laura Yulexi Alfonso**

KEYS WORDS: Microalgae, mixotrophic culture, *Chlorella vulgaris*, carbón/nitrogen ratio, carbohydrates.

Chlorella vulgaris is a microorganism of industrial importance because of the production of metabolites of great economic value as pigments, carbohydrates and proteins. In this paper was studied the effect of the relationship carbon/nitrogen in the productivity of biomass and carbohydrates (glucose and xylose) of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, by varying the concentrations of acetate and sodium nitrate. Mixotrophic cultures were performed for 5 days with different acetate concentration (5, 10 and 20 mM), and sodium nitrate (0,97, 1,94 and 2,94 mM).

By the fifth day the T5 (10mM of acetate; 1,94mM of nitrate) reached a biomass production of 0.79 g/L with high productivity of xylose and glucose (76,9 µg/ml y 73,7 µg/ml respectively). However, by the third day, the T3 (20mM of acetate; 0,97 mM of nitrate) presented a production of 1,04 g/L of biomass, 78,9 µg/ml of xylose and 77,2 µg/ml of glucose equivalent to the 7,5 and 7,6% of the total of the biomass. Although this treatments had a higher production (0,55 g/L of biomass, 40,2 µg/ml of xylose and 31,3 µg/ml of glucose) than a culture without modification (0mM of acetate and 2.94mM of nitrate), the T3 consumed almost 4 times more phosphate (70%) than the cultures T5 and without modification (around 20%)

Thanks to the relationship carbon/nitrogen, is possible to improve both the productivity of biomass (from 0,55 g/L to 1,04 g/L) and xylose (of 40,2 µg/ml to 78,9 µg/ml) and glucose (from 31,3 µg/ml to 77,2 µg/ml), which represents an improvement of up twice both, production of biomass as carbohydrates in only 3 days of culture.

*Research project

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

INTRODUCCIÓN

Las microalgas se consideran como uno de los grupos de organismos más versátiles en términos de su tamaño, forma y función ecológica [39], además, son capaces de convertir la energía solar en energía química mediante la fotosíntesis [21], gracias a esto han sido reconocidas como fuente de diferentes productos de gran utilidad como proteínas (con balance adecuado de aminoácidos, vitaminas y minerales), colorantes, viscosantes, medicamentos, edulcorantes, aditivos alimenticios, materia prima para la fabricación de cosméticos, fármacos [4]. y biocombustibles renovables [9] dentro de los que se incluyen el metano producido por la digestión anaeróbica de la biomasa microalgal [36]; biodiesel derivado del aceite de microalgas [5, 13, 17, 33, 35, 35]; y biohidrógeno producido fotobiológicamente [3, 15, 18, 22, 27]; sin embargo la idea de usar microalgas como fuente de combustible no es nueva [8, 30, 34], pero actualmente ha tomado mayor relevancia debido al precio del petróleo, la inestabilidad política en los países productores, los desafíos ambientales, y más significativamente la preocupación emergente por el calentamiento global, el cual está asociado con la quema de combustibles fósiles [17].

En los últimos años, la biorefinería es uno de los principales usos que se la ha venido dando a las microalgas, el cual implica la valoración y utilización de una amplia gama de tecnologías para separar la biomasa en sus componentes principales (carbohidratos, proteínas, triglicéridos, entre otros) que posteriormente pueden ser transformados en productos de alto valor agregado y biocombustibles mediante la aplicación de otros procesos. Estudios actuales demuestran que la producción de microalgas tiene un alto costo para solo la producción de biodiesel, por tanto esta es otra razón para llevar a cabo la investigación de microalgas en el campo de la biorefinería [19]. Las algas además de contener un cierto porcentaje de lípidos, también pueden ser una buena solución alternativa en otros procesos debido a que contiene compuestos de bajo peso residual, 10-20% de proteínas y 40-70% de

carbohidratos [6], los cuales pueden ser aprovechados para la obtención de bioetanol. Un aspecto importante para la utilización de microalgas en biorefinería es la generación de una alta productividad de biomasa, por tanto, con el objeto de obtener mayor cantidad de biomasa microalgal enriquecida se han venido desarrollando variaciones de las condiciones de cultivo de microalgas, en donde se evalúan el tipo y concentración de nutrientes, temperatura, intensidad luminosa, fotoperíodo, manipulación genética, etc. [14, 28, 29, 37].

En los últimos años se han venido realizando estudios en diferentes partes del mundo para aportar información relevante sobre esta especie y aprovecharla por su gran potencial. Cabe destacar que los trabajos que se han venido publicando en cuanto a la extracción de carbohidratos ha sido en macroalgas y en especial las de la familia Phaeophyta debido a que el 60% de la biomasa seca de las algas marrones está constituida por carbohidratos, un 50% de los cuales son alginatos. Sin embargo, no solo son importantes estas algas por la obtención de metabolitos, también se puede lograr una alta producción de etanol, lo que duplicaría, aproximadamente, la productividad conseguida con el maíz o sería cinco veces la de caña de azúcar. Otros estudios publicados determinan polisacáridos de diferentes especies de alga roja los cuales son heteropolímeros que están constituidos predominantemente por glucosa, xilosa y galactosa. Adicionalmente, pequeñas cantidades de ramnosa, ribosa, arabinosa y manosa se han detectado para estas algas. Otros análisis relacionados con macroalgas utilizan diferentes especies con el objetivo de caracterizar químicamente polisacáridos presentes como carragenina, alginato, fucoidano y agar-agar como por ejemplo en *Ulva* sp y *Enteromorpha* sp [23, 24, 25, 32], y en estudios recientes encuentran que en *Ulva clathrata* se obtuvieron varios de estos polisacáridos [20].

Es importante destacar que a pesar que se han realizado estudios en cuanto a la determinación de polisacáridos presentes en algas, no se han realizado estudios para determinar la concentración de carbohidratos presentes en

Chlorella vulgaris. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar la concentración de glucosa y xilosa presente en *Chlorella vulgaris* realizando diferentes modificaciones al medio de cultivo Bold Basal.

OBJETIVOS

General:

Determinar el efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de CARBOHIDRATOS presentes en *C. vulgaris* UTEX 1803

Específicos:

- Evaluar la viabilidad de la metodología de fenol-ácido sulfúrico (Dubois 1956) para la cuantificación de carbohidratos presentes en cultivos de *C. vulgaris* UTEX 1803
- Cuantificar la productividad de carbohidratos presentes en *C. vulgaris* UTEX 1803 en el medio de cultivo Bold Basal.
- Cuantificar la productividad de carbohidratos presentes en *C. vulgaris* UTEX 1803 en el medio de cultivo Bold Basal modificado bajo la metodología de relación carbono/nitrógeno (C/N).

1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

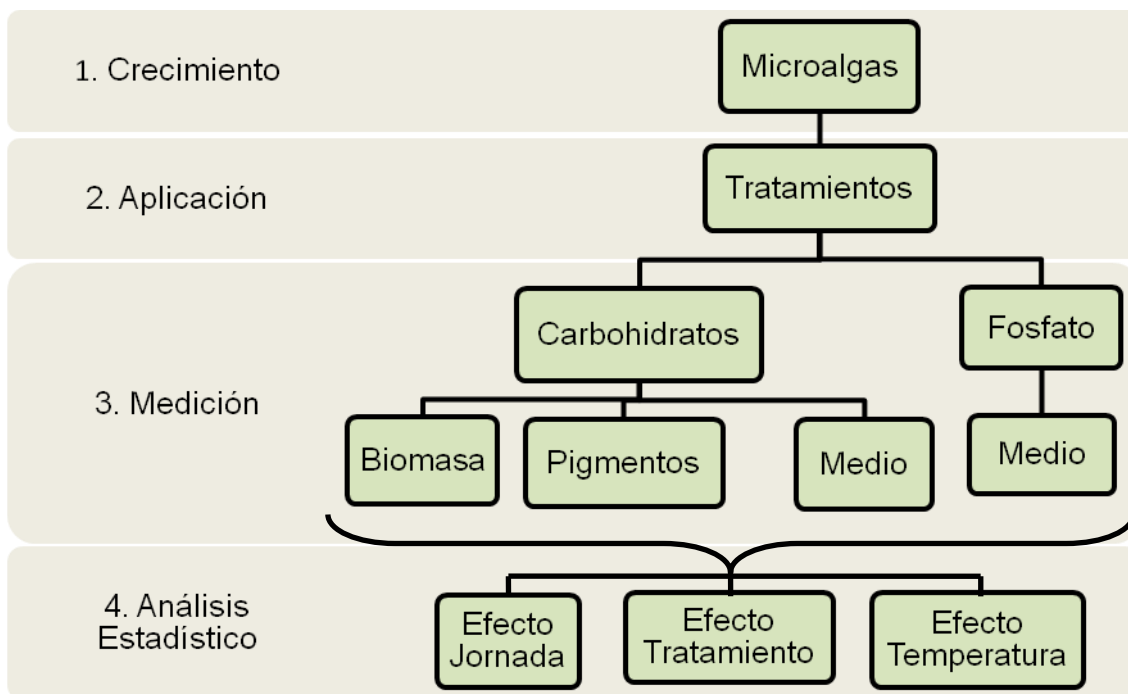


Figura 2. Esquema de la metodología experimental

1.1. CRECIMIENTO

Se utilizó una cepa silvestre de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 proveniente de la colección de cultivo de algas de la universidad de Texas (Austin, TX, USA). Inicialmente, esta cepa permaneció en crecimiento en fotobiorreactores a escala de laboratorio, en medio de cultivo *Bold basal* (MBB) siguiendo las metodologías recopiladas en el manual de *Algal Culture Techniques* (Elsevier Academic Press 2006) y condiciones de temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH entre 7 y 8, aireación permanente y ciclo luz-oscuridad 12:12h, sin ningún suministro complementario de CO_2 considerándose este cultivo como tratamiento control.

1.2. APLICACIÓN

Se utilizaron botellas de plástico con capacidad de 2,5L en las que se implementaron nueve cultivos, cada uno con su original y dos replicas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en trabajos anteriores del grupo de investigación, a cada cultivo se agregó un tratamiento diferente, estos tratamientos diferían uno del otro por las concentraciones de acetato de sodio (5 mM, 10 mM y 20 mM) y nitrato de sodio (0,97mM, 1,94 mM y 2,94 mM). Se manejó un volumen de trabajo equivalente a 2L.

Tabla 1. Diseño experimental de los cultivos de *C. vulgaris*

ACETATO DE SODIO NITRATO DE SODIO	5 mM	10 mM	20 mM
0,97 mM	T1	T2	T3
1,94 mM	T4	T5	T6
2,94 mM	T7	T8	T9

1.3. MEDICIÓN

Se realizaron mediciones en la jornada de la mañana y la tarde durante cinco días consecutivos, en las que se cuantificaron las cantidades tanto de fosfato consumido como de xilosa y glucosa producidas.

1.3.1. Determinación de carbohidratos

Se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico [12], el cual nos permite diferenciar diferentes tipos de monosacáridos presentes en la muestra, además de ser más sensible que métodos como el de DNS. Por tanto, se tomó una muestra de 1ml de cada cultivo y se centrifugó por 20 min a 3400 rpm, separando la biomasa de la fase líquida. Para evitar el posible ruido generado por la clorofila presente, se extrajo este pigmento mediante la adición de 10 ml

de etanol, posteriormente se calentó durante 10 minutos a baño maría a 80° C y se centrifugó nuevamente por 20 min a 3400 rpm. Luego de centrifugar se obtienen dos fases, la fase líquida correspondiente al extracto con pigmentos y el precipitado correspondiente a la biomasa libre de pigmentos. Para evitar que el color de los pigmentos altere la medición, se le adicionó 0,3 g de carbón activado a la fase líquida, seguidamente se agitó por unos segundos y luego se filtro. Posteriormente, a cada fase se les adicionó 1 mL de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico al 95,5%. Finalmente, cada una de estas muestras fue transferida a las celdas colorimétricas y se midió la absorbancia a 480nm para la identificación de pentosas y 490nm para hexosas, en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

1.3.2. Determinación de la tasa de consumo de fosfato

Para realizar esta medición se recurrió al libro métodos estándar para la determinación de aguas residuales [10]. Siguiendo este procedimiento, se tomó 30 ml de muestra de cada tratamiento, se centrifugó por 20 min a 3400 rpm, luego se filtró al vacío cada muestra y se adicionó 1 ml de solución de Metavalanato-Molibdato y se aforó con agua destilada hasta un volumen de 50 ml. Finalmente la muestra se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 470 nm.

1.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos fueron analizados mediante los paquetes estadísticos SPSS 15.0, STATISTICA 7.0 y STATGRAPHICS centurión XVI.I. Se realizaron Test de normalidad (Shapiro Wilk) y Análisis de varianzas (ANOVA) con el fin de establecer diferencias y similitudes entre las diferentes variables analizadas. Para las decisiones, se utilizó un nivel de significancia del 95%.

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En los nueve tratamientos realizados, al quinto día de cultivo se encuentran diferencias significativas (F: 3,03 p: 0,0004) entre cada uno de los tratamientos, sin embargo en la producción de monosacáridos (xilosa y glucosa) entre la mañana y de la tarde no se encontraron diferencias significativas (F: 0,264; p: 0,8510).

De entre los diferentes experimentos, el tratamiento 5 (10 mM de acetato; 1,94 mM de nitrato) alcanzó la mayor producción de azúcares, obteniendo una concentración total de 76,9 $\mu\text{g/ml}$ y 73,7 $\mu\text{g/ml}$ de xilosa y glucosa respectivamente; la xilosa total producida se distribuyó de la siguiente forma: 48,9 $\mu\text{g/ml}$ en la biomasa (63,6%), 11,21 $\mu\text{g/ml}$ en el extracto de pigmentos (14,6%) y 16,8 $\mu\text{g/ml}$ en el medio de cultivo (21,8%); de manera similar, la glucosa total producida, se dividió así: 47,7 $\mu\text{g/ml}$ en la biomasa (64,7%), 8,04 $\mu\text{g/ml}$ en el extracto de pigmentos (10,9%) y 17,9 $\mu\text{g/ml}$ en el medio (24,4%) (Fig. 1 y Fig. 2).

Por otro lado, en la Fig. 2 y 3 se observa que en el tratamiento control (T0: 0mM de acetato de sodio; 20mM de nitrato de sodio) la mayor cantidad de xilosa y glucosa se encuentra en el medio extracelular, esto demuestra que las modificaciones realizadas al cultivo permiten que los azúcares no salgan al medio y por tanto, permanezcan y produzcan una mayor concentración de estos en la biomasa.

Adicionalmente, con el fin de observar si ocurría un aumento en la concentración de azúcares en el medio de cultivo, llevo una muestra de cada uno de los tratamientos al horno a 90°C durante 1h; sin embargo, este procedimiento demostró mediante análisis estadísticos que no habían diferencias significativas al ser calentada la muestra (F: 0,99; p: 0,4167).

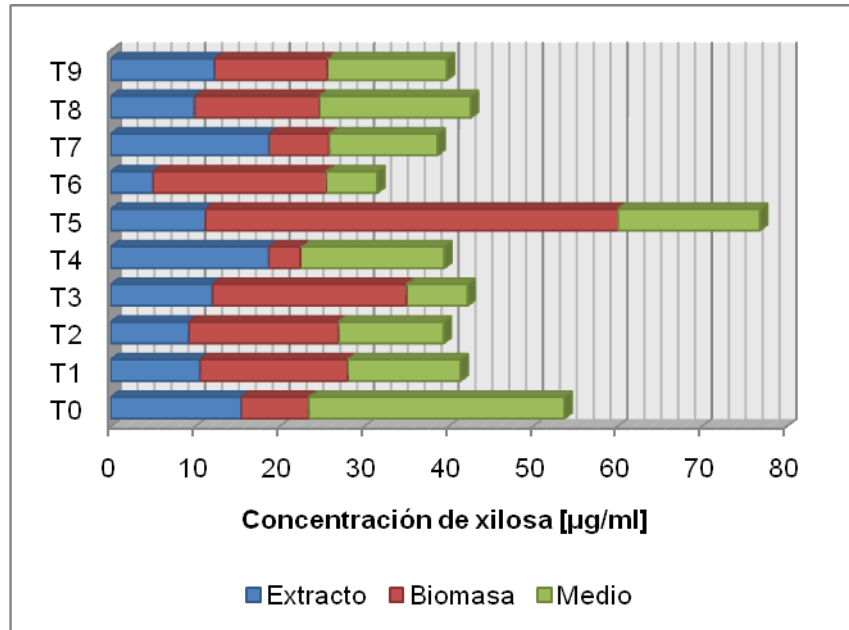


Figura 2. Concentración de xilosa al quinto día de inoculación de la cepa obtenida mediante los tres métodos comparativos utilizados para los nueve tratamientos.

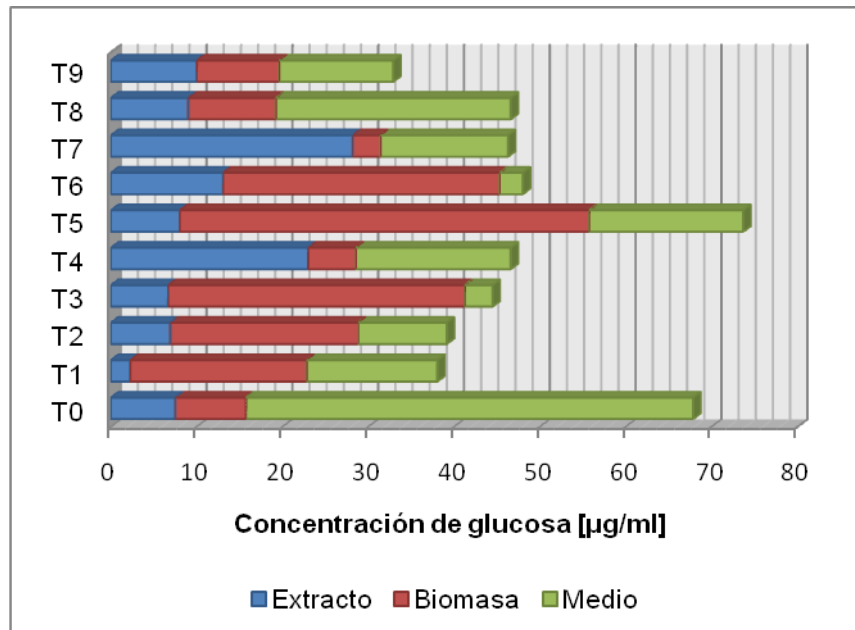


Figura 3. Concentración de glucosa al quinto día de inoculación de la cepa obtenida mediante los tres métodos comparativos utilizados para los nueve tratamientos.

De los azúcares producidos directamente en la biomasa (sin tener en cuenta la cantidad presente en el medio de cultivo y la que se pierden durante la extracción de pigmentos), se observó que en los tratamientos (T3, T6, T9) donde se utilizó la mayor concentración de acetato (20 mM) se obtuvo las mayores concentraciones de glucosa y xilosa en solo tres días de cultivo de la cepa (Fig. 4, Fig. 5 y Fig. 6).

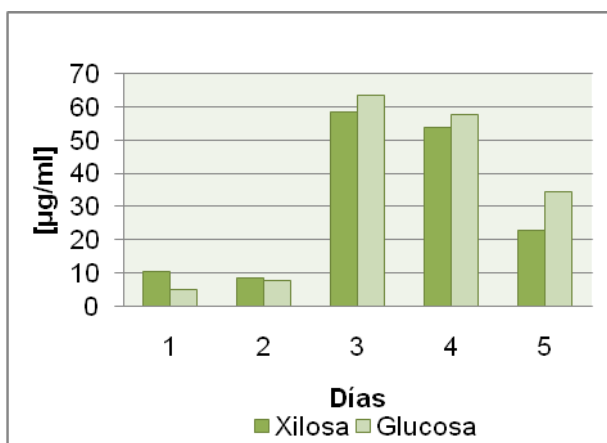


Figura 4. Concentración de xilosa y glucosa para el tratamiento 3 (20 mM; 0,97 mM) durante los cinco días siguientes a la inoculación de la cepa.

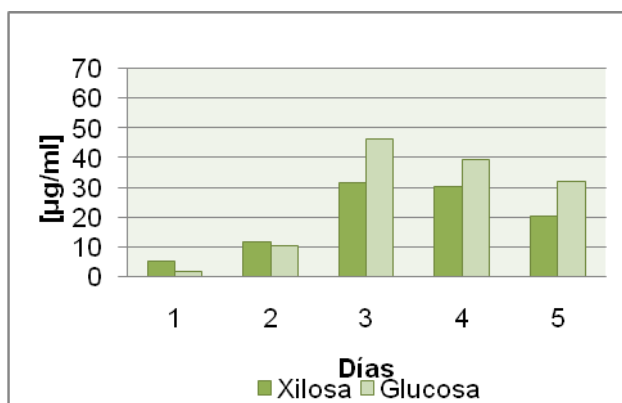


Figura 5. Concentración de xilosa y glucosa para el tratamiento 6 (20 mM; 1,94 mM) durante los cinco días siguientes a la inoculación de la cepa.

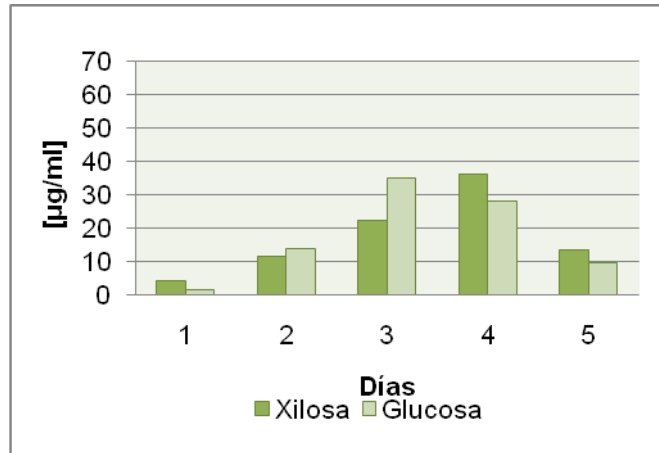


Figura 6. Concentración de xilosa y glucosa para el tratamiento 9 (20 mM; 2,94 mM) durante los cinco días siguientes a la inoculación de la cepa.

Como es posible obtener en 3 días una cantidad similar tanto de xilosa como de glucosa a las obtenidas después de 5 días de cultivo, se cuantificó la cantidad de estos azúcares para los tratamientos anteriormente mencionados. Dentro de estos, el tratamiento con mayor concentración de azúcares fue el T3, con concentraciones de xilosa de 58,3 µg/ml, 6,49 µg/ml y 14,1 µg/ml, además de 63,32 µg/ml, 6,75 µg/ml y 7,13 µg/ml de glucosa mediante la extracción en la biomasa directa, extracción de pigmentos y en el medio respectivamente, para un total de 78,95 µg/ml de xilosa y 77,21 µg/ml de glucosa (Fig. 7 y 8)

Igualmente, se observó que tanto el consumo de fosfato como la producción de biomasa y azúcares, son directamente proporcionales a la cantidad de acetato añadido a cada uno de los tratamientos (Fig. 9, Fig. 10a y Fig. 10b). Adicionalmente, el análisis estadístico muestra diferencias significativas en cuanto al consumo de fosfato y entre los diferentes tratamientos (F: 213,6; p: 0,00).

El tratamiento con mayor consumo de fosfato en el medio de cultivo (76%) y mayor producción tanto de biomasa (1,04 g/L) como de azúcares en la biomasa (0,06g/L de xilosa y 0,06g/L de glucosa) fue el tratamiento 3, seguido por el tratamiento 6, en el cual el consumo de fosfato fue de 67%, la producción de biomasa, xilosa y glucosa fue de 0,86g/L, 0,03g/L y 0,05g/L respectivamente, y

por último el tratamiento 9 que consumió el 66% de fosfato y produjo 1g/L de biomasa, 0,02g/L de xilosa y 0,04g/L de glucosa.

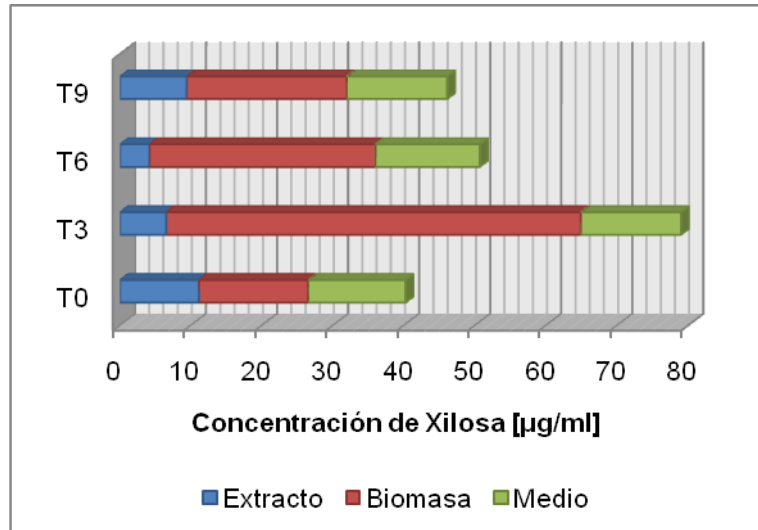


Figura 7. Concentración de xilosa al tercer día de inoculación de la cepa obtenida mediante los tres métodos comparativos utilizados para los nueve tratamientos.

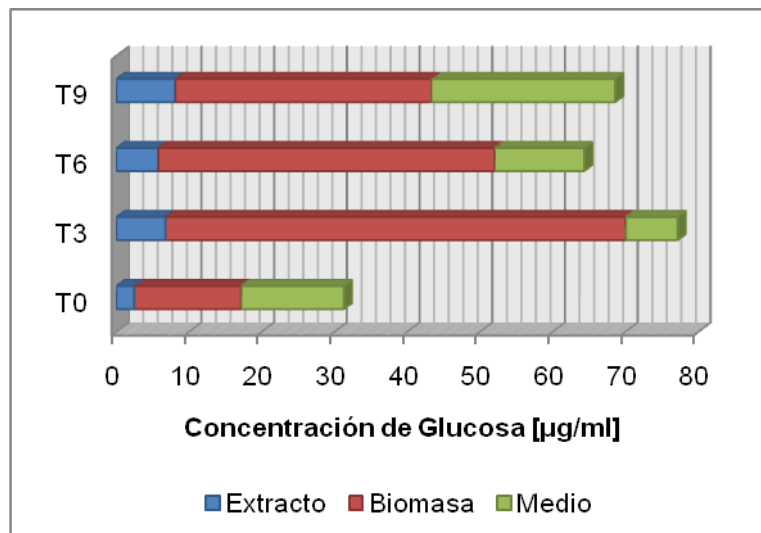


Figura 8. Concentración de glucosa al tercer día de inoculación de la cepa obtenida mediante los tres métodos comparativos utilizados para los nueve tratamientos.

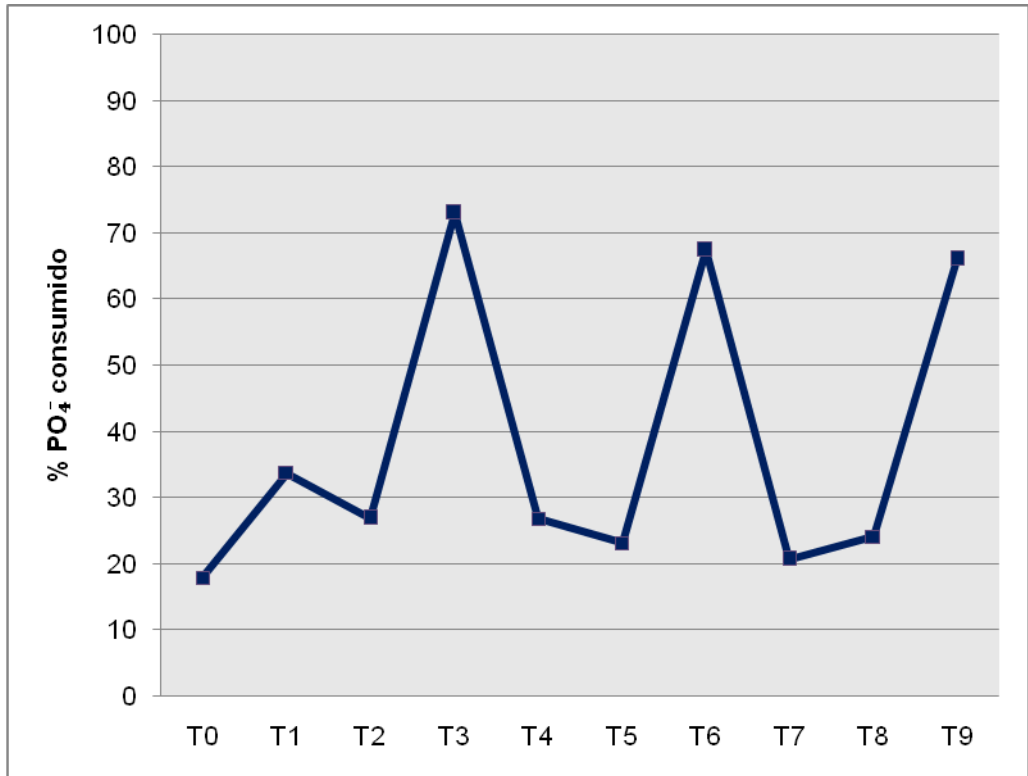


Figura 9. Consumo de fosfato de *Chlorella vulgaris* en el medio de cultivo, para los todos los tratamientos.

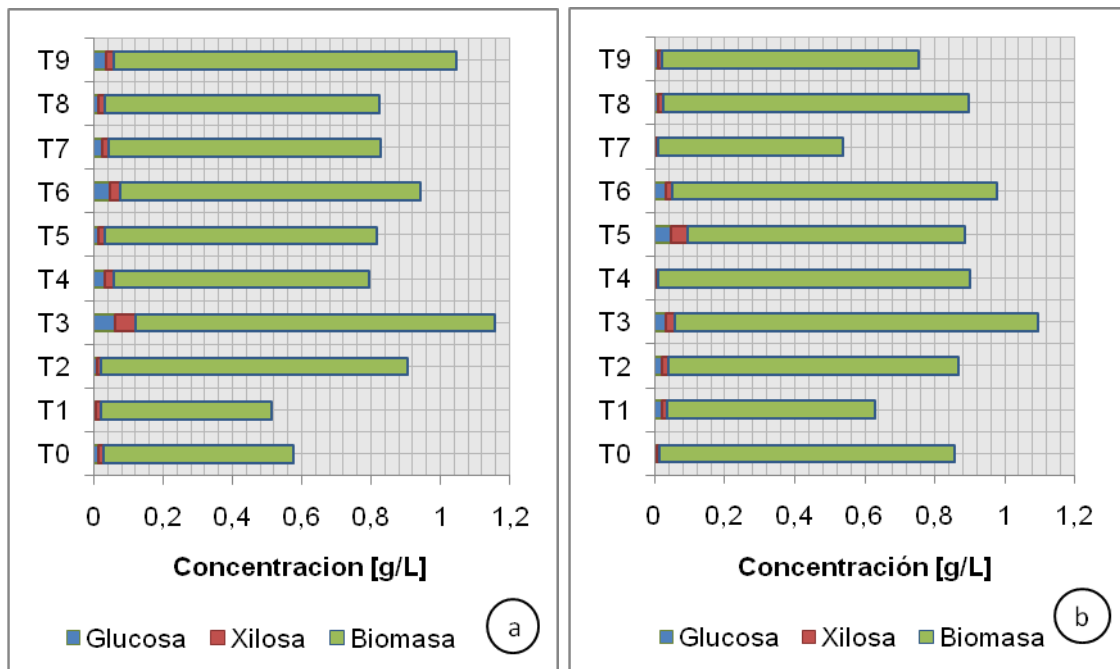


Figura 10. Concentración de xilosa y glucosa en la biomasa y concentración de la biomasa de *Chlorella vulgaris* en el cultivo, para todos los tratamientos al tercer (a) y quinto día (b) de ser inoculada la cepa.

Por último, se realizó una comparación de cada uno de los tratamientos que presentaron mayor productividad de azúcares (T3, T5, T6 y T9) con respecto al tratamiento control (T0, 0mM de acetato y 2,94mM de nitrato), obteniendo como resultado que al tercer día de inoculación, la producción que se había generado por estos tratamientos fue de 46 – 78,9 µg/ml de xilosa y 62,2 – 77,2 µg/ml de glucosa, superando la productividad del tratamiento control (40,2 µg/ml de xilosa y 31,3 µg/ml de glucosa); de igual manera, se cuantificaron los porcentajes de xilosa y glucosa totales producidas con respecto a las cantidades de biomasa generada, donde se encontró que para el tercer día, los porcentajes en el tratamiento control oscilaron entre 4,3 y 5,6% y para el quinto día estaban entre 6,4 y 8,1% mientras que para los tratamientos evaluados estuvieron entre 4,7 y 7,9% al tercer día y 3,4 y 9,7% al quinto día (Tabla 2)

Tabla 2. Concentración total de xilosa y glucosa al tercer y quinto día de ser inoculada la cepa

	Xilosa				Glucosa			
	Día 3		Día 5		Día 3		Día 5	
	Conc. total [µg/ml]	%p/p en la biomasa	Conc. total [µg/ml]	%p/p en la biomasa	Conc. total [µg/ml]	%p/p en la biomasa	Conc. total [µg/ml]	%p/p en la biomasa
T0	40,2	5,6%	53,7	6,4%	31,3	4,3%	67,9	8,1%
T3	78,9	7,6%	42,3	4,1%	77,2	7,5%	44,5	4,3%
T5	52,1	6,6%	76,9	9,7%	62,2	7,9%	73,7	9,3%
T6	50,6	5,9%	31,6	3,4%	64,3	7,4%	48	5,2%
T9	46,0	4,7%	39,8	5,4%	68,6	6,9%	32,9	4,5%

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las algas desempeñan un papel vital en el ciclo biogeoquímico del carbono. Aunque muchas son capaces de utilizar diferentes fuentes de carbono orgánico, el CO₂ es la principal fuente de carbono en las microalgas. Según los resultados observados en las Fig. 7 y 8, las altas concentraciones de acetato conllevaron a la obtención de altos valores en la producción de carbohidratos, debido a que en el metabolismo del acetato, este es metabolizado a acetil CoA, luego convertido en succinato y posteriormente es utilizado como precursor para la síntesis de carbohidratos [26], de igual manera, esta actividad metabólica aumenta cuando lo hace la concentración de acetato [11].

Los resultados encontrados en este estudio concuerdan con estudios realizados por Chinnasamy *et al.* (2009), hallando que *Chlorella vulgaris* obtenía un mayor crecimiento celular con un valor elevado en la fuente de carbono. Así mismo, se ha encontrado que el acetato además de estimular el crecimiento celular y la producción de carbohidratos en *C. vulgaris*, promueve la síntesis de clorofila y la producción de lípidos [26].

Al analizar la Fig. 10 es posible notar que la producción de biomasa no sigue una misma tendencia para todos los tratamientos en relación con la producción de carbohidratos, lo cual puede ser explicado por los resultados obtenidos por Ortega *et al.* 2004 donde concluyen que la utilización de fuentes alternativas de carbono, puede acelerar el crecimiento de la flora microbiana, asociada a un detrimento en la microalga, estableciendo una competencia interespecífica entre ambos microorganismos; por otro lado Xiong *et al.* (2008) afirman que el factor determinante para la obtención de biomasa es la fuente de nitrógeno, sin embargo, en este estudio no es posible determinar alguna tendencia de la producción de biomasa con respecto a las cantidades de nitrato de sodio suministradas inicialmente a cada cultivo, debido a que los tratamientos 7, 8 y 9 no mostraron una mayor productividad de biomasa y de azúcares. En este estudio la mayor productividad de biomasa y de azúcares se obtuvo en el

tratamiento 3 (20mM acetato de sodio; 0,97mM de nitrato de sodio) consiguiendo un valor de 78,95 µg/ml de xilosa y 77,21 µg/ml de glucosa. Xiong et al (2008) no modificaron la concentración inicial de la fuente carbono, por lo cual es posible concluir que no solo la concentración inicial de nitrógeno juega un papel importante en la producción de biomasa, sino una relación adecuada entre la fuente de carbono y nitrógeno.

La mayor productividad de carbohidratos se observó en los cultivos con la concentración inicial de acetato de sodio más alta (20 mM), asimismo se observó en la Fig. 9 que el consumo de fosfato es proporcional a la producción de biomasa resultado similar encontrado en las investigaciones realizadas por Vera *et al.* 2002, debido a que este nutriente es indispensable en el crecimiento y el metabolismo de las microalgas, además es uno de los elementos esenciales que comprenden el ADN, ARN, ATP y algunos materiales de la membrana celular etc, además es de particular relevancia, que la fotosíntesis requiere grandes cantidades de proteínas (principalmente Rubisco), las cuales son sintetizadas por ribosomas ricos en fosforo [2]. Cabe resaltar que aunque T3 produce 15% de la biomasa total en azúcares, es necesario recordar que el gasto de fosfato fue de aproximadamente el 70% del total presente en el medio de cultivo, sin embargo, el T5 el cual obtuvo un 19% de la biomasa total en carbohidratos consumió solo el 20% del total del fosfato presente, indicando que el consumo de fosfato no presenta una relación directamente proporcional en cuanto a la cantidad de carbohidratos presentes pero si influencia en la producción de la biomasa total de cada tratamiento.

Las sustancias poliméricas extracelulares están constituidas por biopolímeros hidratados (incluyen polisacáridos, proteínas, ácidos nucleídos y lípidos) que son secretadas por las células del biofilm para revestir e inmovilizar los agregados microbianos [16]. Por tanto, es importante destacar que los azúcares encontrados en el medio de cultivo se deben a que las células de microalgas pueden formar colonias irregulares manteniéndose unidas por mucílago, el cual constantemente es secretado por las células, formando una

cápsula alrededor de ellas. El grosor de la cápsula de polisacárido varía en función de la fase de crecimiento y las condiciones de cultivo. Durante el crecimiento celular en cultivos discontinuos del material de polisacárido tanto las cápsulas como los lodos pueden ser liberados al medio circundante, causando un aumento progresivo de su viscosidad [31].

Es de importancia resaltar que la relación carbono/nitrógeno, y en especial la fuente de carbono en este caso el acetato de sodio es indispensable para el crecimiento celular y la producción de xilosa y glucosa en *Chlorella vulgaris*. El suministro de una fuente adicional de carbono y nitrógeno, en la relación adecuada (20 mM de acetato/ 0,97mM de nitrato, T3) hace que la productividad tanto de biomasa como de xilosa y glucosa aumenten considerablemente en tan solo tres días de cultivo, como se muestra en las figuras 10a y 10b, lo cual resulta beneficioso, ya que como se mencionó inicialmente la biomasa de *Chlorella vulgaris* es ampliamente utilizada en el campo de la biorefinería, en el que sus principales componentes son separados para la posterior generación de productos como biodiesel y bioetanol, es decir que si se tienen las condiciones adecuadas para que al cultivar este tipo de microalgas se genere mayor contenido de carbohidratos dentro las mismas, se lograría generar biomasa con mayor valor agregado, estos resultados demuestran que para esta microalga al utilizar como fuente de carbono el acetato de sodio, si es posible aumentar la concentración de carbohidratos en comparación con el blanco (T0), pero no es posible obtener más de 78,9 µg/ml de xilosa y 77,2 µg/ml de glucosa, lo cual corresponde a un 7,6% y 7,5% respectivamente.

Por otro lado, teniendo en cuenta la figura 10a y b, las modificaciones empleadas no solo alteran la concentración de metabolitos específicos, sino aumentan significativamente la productividad total de biomasa, por lo cual, con una de las modificaciones desarrolladas, es posible obtener cada 3 días 1,04 g/L de biomasa (T3) con las concentraciones de xilosa y glucosa mencionadas anteriormente ó cada 5 días obtener 0,79 g/L de biomasa con una

concentración de 76,9 µg/ml de xilosa y 73,7 µg/ml de glucosa equivalente al 9,7 y 9,3% de la biomasa producida.

En los últimos años se han venido utilizando los pigmentos de *Chlorella vulgaris* a nivel industrial, debido a que estos compuestos químicos son de interés comercial y son utilizados como agentes colorantes para alimentos, además de poseer propiedades antioxidantes y antimutagénicas. Al hacer la extracción de estos pigmentos (independientemente del tipo de tratamiento que se utilice) siempre arrastran consigo del 2,3 al 35,1% de xilosa y del 2,9 al 47,5% de glucosa producida, lo que podría generar mayor valor agregado a los pigmentos.

Durante el desarrollo de esta investigación se demostró que los azúcares que genera este tipo de microalgas y específicamente xilosa y glucosa, se dividen en tres partes, la primera es la biomasa, la segunda el extracto de los pigmentos y la tercera el medio de cultivo, analizando los porcentajes de azúcares presentes en este último, que llegan a ser incluso hasta del 51,3% para la xilosa y 55,7% para la glucosa, podría evaluarse la posibilidad de extraerlos directamente del medio (por cristalización) y no de la biomasa, lo cual hace más económico el proceso, no solo por el tipo de extracción a utilizar, sino porque los tratamientos para los que se observó que la mayor cantidad de xilosa y glucosa estaban presentes en el medio, presentaron bajo consumo de fosfato.

Finalmente, la intersección de todos estos resultados hallados es lo que permite viabilizar la producción de biomasa de microalgas con miras a la obtención de biocombustibles, ya que el concepto de biorefinería debe extenderse más allá del solo hecho de la obtención de una mayor cantidad de metabolitos y empezar abarcar el cultivo específico que tenga en cuenta la minimización en cuanto al tiempo empleado y el consumo de nutrientes. Sin embargo, para los resultados obtenidos en este estudio, la elección del método de cultivo que permita el máximo aprovechamiento debe estar ligado

fuertemente tanto a la productividad de los diferentes metabolitos de valor agregado (proteínas, pigmentos, lípidos, etc) como al consumo de nutrientes. En este caso, aunque se produce una cantidad considerable de biomasa y carbohidratos en tan solo tres días con el T3 (15% de la biomasa), es necesario recordar el gasto de fosfato, el cual estuvo cerca al 70% del total presente en el medio de cultivo, por otro lado, con el T5 se obtuvo 19% de la biomasa total en carbohidratos en cinco días con un gasto de solo 20% del total del fosfato presente.

4. CONCLUSIONES

- Con el tratamiento 3 (20mM de acetato: 0,97mM de nitrato) se logra mejorar hasta dos veces tanto la producción de biomasa (de 0,55g/L hasta 1,04g/L), como la de xilosa (de 40,1 $\mu\text{g/ml}$ hasta 78,9 $\mu\text{g/ml}$) y la de glucosa (de 31,2 $\mu\text{g/ml}$ hasta 77,2 $\mu\text{g/ml}$) en tres días de cultivo.
- La relación C/N de 10mM de acetato de sodio: 1,94mM de nitrato de sodio al quinto día de cultivo genera un aumento en la productividad de azúcares, pasando de 6,4% a 9,7% (76,9 $\mu\text{g/ml}$) de xilosa y de 8,1% a 9,3% (73,7 $\mu\text{g/ml}$) de glucosa, manteniendo la producción de biomasa aproximadamente igual (0,8g/L).
- El método colorimétrico fenol-acido sulfúrico es adecuado para la cuantificación de carbohidratos, ya que permite trabajar con muestras muy pequeñas de biomasa (1ml), sin que esta requiera de un tratamiento previo.

RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta que para todos los tratamientos evaluados, una parte de los carbohidratos producidos permanece en el medio de cultivo se podría verificar la viabilidad del cultivo de *Chlorella vulgaris* en procesos semicontinuos, en los que el medio de cultivo rico en carbohidratos (xilosa y glucosa) se recircule y sirva de inóculo para otros cultivos.

Con el fin de optimizar el cultivo de *Chlorella vulgaris* para la obtención de biocombustibles, se recomienda cuantificar la producción de otros metabolitos como proteínas pigmentos y lípidos, para los tratamientos que presentaron altas productividades de biomasa y carbohidratos (T3 y T5) a los tres y cinco días de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Abalde, J., Cid, J., Fidalgo, P., Torres, E & Herrero, C. (1995) *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. Universidad Da Coruña, 210 pp
- [2] Agren, G. (2004) The C:N:P stoichiometry of autotrophs—theory and observations. *Ecol Lett* 7:185-191.
- [3] Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J., Wijffels, R. (2002) Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *Int J Hydrogen Energy*;27:1195–208
- [4] Andrade, J., Perez, A., Sebastian, P., Eapen, D. (2011) A review of biodiesel production processes. *Biomass Bioenergy.*, 35: 1008-1020.
- [5] Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. (2002) *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit RevBiotechnol* 2002;22:245–79
- [6] Brennan, L., OWENDE, P. (2010) Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew and Sust Energy Rev*;14(2):557-577.
- [7] Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., Keshav C. (2009) Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 518-532.
- [8] Chisti, Y. (1981) An unusual hydrocarbon. *J Ramsay Soc*; 27-28: 24-6.
- [9] Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae *Biotechnology Advances* 25: 294–30

- [10] Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E.; Eaton, A.D. (1999) Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20th Edition. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF). Washington, US. 1325 p.
- [11] Combres, C., Laliberté G., Reysacj., J. (1994) *Physiol PI* 91: 729-734.
- [12] DuBois, D., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.*, 1956, 28 (3), pp 350–356
- [13] Dunahay, T., Jarvis, E., Dais, S., Roessler, P. (1996) Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *ApplBI ochem Biotechnol*;57-58:223-31
- [14] Fabregas, J., Patiño, M., Morales, E., Cordero, B., Otero, A.(1996) *Applied Environ Microbiol* 62: 266-268.
- [15] Fedorov, A., Kosourov, S., Ghirardi, M., Seibert, M. (2005) Continuous H₂ photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel two-stage, sulfate limited chemostat system. *Appl Biochem Biotechnol*;121124:403 –12.
- [16] Flemming, H., Wingender, J. (2011) The biofilm matrix. *Nature reviewa, microbiology*. 8:623
- [17] Gavrilesco, M., Chisti, Y. (2005) Biotechnology- a sustainable alternative for chemical industry, *Biotechnology Advances*, 23, 471-499
- [18] Ghirardi, M., Zhang, J., Lee, J., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E. (2000). Microalgae: a green source of renewable H₂. *TrendsBiotechnol*;18:506 –11.

- [19] Gonzales, A., Kafarov, V. (2011) Microalgae based biorefinery: issues to consider. A review. CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro, 4 (4), 5 – 22
- [20] Hernández, E., Zertuche, J., Pacheco I. (2011) Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides from the green seaweed *Ulva clathrata*. J Appl Phycol (2011) 23:537–542.
- [21] Hosikian, A., Lim, S., Halim, R & Danquah, M. (2010) Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Chemical Engineering
- [22] Kapdan IK, Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. Enzyme Microb Technol 2006;38:569–82
- [23] Lahaye, M. (1991) Marine algae as sources of fibers: Determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some 'sea vegetables'. Journal of the Science of Food and Agriculture, 54, 587–594.
- [24] Lahaye, M., Gómez, J., Jimenez, M., Garcia, G. (1995) Natural decoloration, composition and increase in dietary fibre content of an edible marine algae, *Ulva rigida* (Chlorophyta), grown under different nitrogen conditions. Journal of the Science of Food and Agriculture, 68, 99–104.
- [25] Lahaye, M., Robic, A. (2007) Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. Biomacromolecules, 8(6), 1765–1774.
- [26] Laliberté, G., De la noue, J. (1993) J Phycol 29: 612-620, 1993
- [27] Melis, A. (2002) Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. Int J Hydrogen Energy; 27:1217–28.
- [28] Molina, E., Sánchez, J., Garcia, F., Fernández, J., Acién, F., Urda, J. (1995) Applied Microbiol Biotechnology 42: 658-663.

- [29] Morales, E. (1996) Productos agrícolas para el cultivo de microalgas marinas (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, España, pp. 149.
- [30] Nagle, N., Lemke, P. (1990) Production of methyl-ester fuel from microalgae. *Appl Biochem Biotechnol*;24–5:355–61
- [31] Philippis., R, Vincenzini. (1998) M Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol Rev*; 22:151–75.
- [32] Ray, B. (2006). Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: isolation, purification and structural features. *Carbohydrate Polymers*, 66(3), 408–416
- [33] Roessler, P., Brown, L., Dunahay, T., Heacox, D., Jarvis, E, Schneider, J. (1994) Genetic-engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel form microalgae. *ACS Symp Ser*; 566:255-70.
- [34] Sawayama, S., Inoue, S., Dote, Y., Yokoyama, S. (1995) CO₂ fixation and oil production through microalga. *Energy Convers Manag*;36:729–31
- [35] Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. (1998) A look back at the U.S.Department of Energy's Aquatic Species Program biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO; Report NREL/TP-580–24190.
- [36] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E & Isambert, A. (2006) Commercial Applications of Microalgae. Review. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 101, No. 2, 87–96.
- [37] Thompson, P., Guo, M., Harrison, P. (1993) *J Phycol* 28: 481.

[38] Vera, D., Pérez., Valencia, H. (2002) Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera del arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). Acta Biol. Colomb. 7, 33-40

[39] Vonshak, A. (1990) Recent advances in microalgal biotechnology. Biotech. Adv. 8: 709 - 722.

[40] Xiong, W., Li, X. F., Xiang, J. Y., & Wu, Q. Y. (2008) High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. Applied Microbiology and Biotechnology 78: 29–36

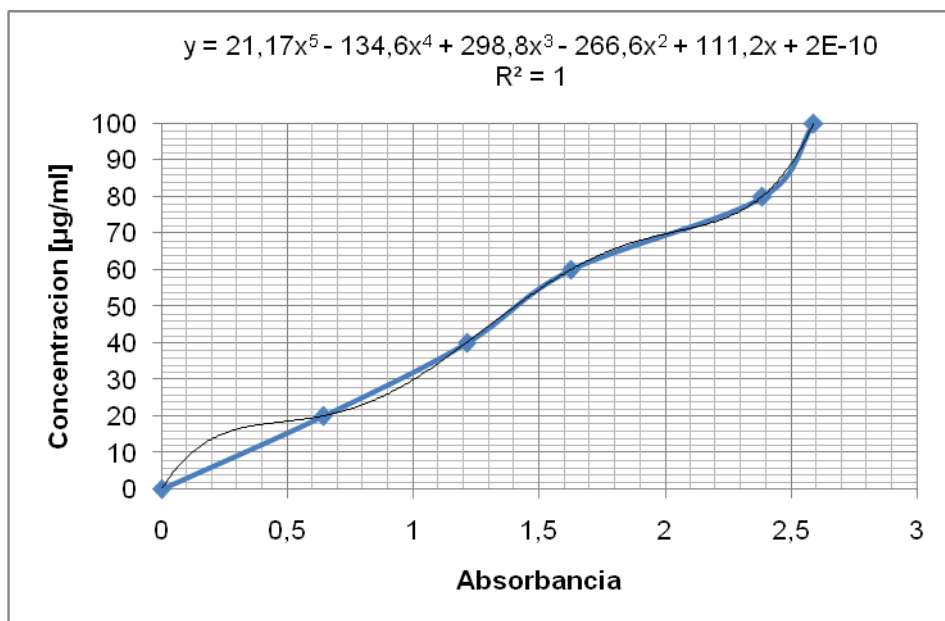
ANEXOS

ANEXO A. CÁLCULO DEL COEFICIENTE MÁSIICO DE EXTINCIÓN PARA LA XILOSA

Tabla A1. Variación de la absorbancia con la concentración de la muestra de xilosa.

Coeficiente de extinción másico (Xilosa)	
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia (480nm)
100	2.589
80	2.385
60	1.625
40	1.212
20	0.641
0	0

Figura A1. Grafica de los datos de absorbancia en función de la concentración, para el cálculo del coeficiente másico de extinción de la xilosa.



ANEXO B. CÁLCULO DEL COEFICIENTE MÁSIICO DE EXTINCIÓN PARA LA GLUCOSA

Tabla B2. Variación de la absorbancia con la concentración de la muestra de glucosa.

Coeficiente de extinción másico (Glucosa)	
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia (490nm)
100	2.569
80	1.866
60	1.469
40	0.960
20	0.346
0	0

Figura A2. Grafica de los datos de absorbancia en función de la concentración, para el cálculo del coeficiente másico de extinción de la glucosa.

