

MEJORAMIENTO DE LA TASA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* UTILIZANDO CICLOS DE LUZ ARTIFICIAL Y DIFERENTES FUENTES DE CARBONO A ESCALA DE LABORATORIO

CARLOS ALBERTO GONZALEZ CABEZA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTA DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA

2010

MEJORAMIENTO DE LA TASA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* UTILIZANDO CICLOS DE LUZ ARTIFICIAL Y DIFERENTES FUENTES DE CARBONO A ESCALA DE LABORATORIO

CARLOS ALBERTO GONZALEZ CABEZA

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

Ingeniero Químico

Director

Ph. D Viatcheslav Kafarov

Codirector

Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTA DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA

2010

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la vida y sabiduría, a mis papas que han sido un apoyo importante y un ejemplo de vida, a mi hermana que a la distancia siempre está pendiente de mi, a mi novia por su paciencia y a todas las personas que conozco que han aportado su granito de arena y me han hecho crecer como persona tanto en lo académico como en lo personal.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	13
1. MARCO TEORICO.....	14
1.1 Usos.....	14
1.2 Fuentes de Energía y de Carbono.....	14
1.3 Producción y optimización de la luz.....	16
1.4 Fotobiorreactores.....	17
1.5 Mezclaje	18
1.6 Temperatura.....	19
1.7 Heterotrofia.....	19
1.8 Mixotrófia	20
1.9 Fases de Crecimiento en un Reactor Discontinuo	21
1.10 Especie en estudio.....	22
2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	24
2.1. MATERIALES	24
2.1.1 Inóculo.....	24
2.1.2 Fotobiorreactor	24
2.1.3 CO ₂	24
2.1.4 Glucosa.....	24
2.1.5 Cultivo de Microalga	24
2.2 DETERMINACIÓN DEL TRATAMIENTO ÓPTIMO EN AUTÓTROFOS.....	25
2.3. DETERMINACIÓN DEL TRATAMIENTO ÓPTIMO EN MIXOTRÓFICO.....	25
2.4. CARACTERIZACION.....	25

2.4.1 Determinación de concentración celular por Densidad Óptica (OD):	25
2.4.2 Determinación de concentración celular por contenido de Clorofila:	26
2.4.3 Calculo de coeficiente de extinción:	26
2.4.4 Calculo de la tasa de crecimiento específico μ (dia^{-1}):	26
3. RESULTADOS Y ANALISIS	27
3.1 MIXOTROFIA	27
3.1.1 Clorofila en Mixotrófia	28
3.2 AUTOTROFIA	29
3.2.1 Tipo de ciclos luz/oscuridad	29
3.2.1.1 Ciclo de luz/oscuridad 12:12	29
3.2.1.2 Ciclo de luz/oscuridad 24:0	30
3.2.1.3 Ciclo de luz/oscuridad 18: 6	31
3.2.2 Clorofila en Autótrofos	33
4. CONCLUSIONES	36
5. RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFIA	38
ANEXOS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento microbiano	21
Figura 2. Crecimiento exponencial de <i>Chlorella vulgaris</i> medido por Densidad Óptica en medio mixotrófico con glucosa con diferentes % p/v.....	27
Figura 3. Cantidad de Clorofila a+b de <i>Chlorella vulgaris</i> en crecimiento mixotrófico con glucosa en % p/v.....	28
Figura 4. Crecimiento exponencial de <i>Chlorella vulgaris</i> medido por Densidad Óptica en el ciclo luz/oscuridad 12:12.....	29
Figura 5. Crecimiento exponencial de <i>Chlorella vulgaris</i> medido por Densidad Óptica en el ciclo luz/oscuridad 24:0.....	30
Figura 6. Crecimiento exponencial de <i>Chlorella vulgaris</i> medido por Densidad Óptica en el ciclo luz/oscuridad 18:6.....	31
Figura 7. Comparación de biomasa final en cultivo autótrofo.....	32
Figura 8. Cantidad de Clorofila a+b de <i>Chlorella vulgaris</i> en el ciclo luz/oscuridad 12:12.33	
Figura 9. Cantidad de Clorofila a+b de <i>Chlorella vulgaris</i> en el ciclo luz/oscuridad 24:0..	34
Figura 10. Cantidad de Clorofila a+b de <i>Chlorella vulgaris</i> en el ciclo luz/oscuridad 18:6.34	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Determinación del tratamiento óptimo en autótrofos en tipo de luz, tipo de ciclo luz/oscuridad y pulso de CO ₂	25
Tabla 2. Modelos de crecimiento para cultivo mixotrófico en fase exponencial	27
Tabla 3. Modelos de crecimiento para cultivo autótrofo en fase exponencial.	32

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS.....	46
ANEXO B. DATOS EXPERIMENTALES.....	51
ANEXO C. COMPOSICIÓN DEL MEDIO BOLD.....	59
ANEXO D. BALANCE DE BIOMASA EN REACTOR DISCONTINUO.....	60
ANEXO E. CALCULO DEL COEFICIENTE DE EXTINCION	61

RESUMEN

TITULO: MEJORAMIENTO DE LA TASA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* UTILIZANDO CICLOS DE LUZ ARTIFICIAL Y DIFERENTES FUENTES DE CARBONO A ESCALA DE LABORATORIO¹

AUTOR: Carlos Alberto González Cabeza²

PALABRAS CLAVES: Microalgas, Mixotrófia, Autotrófia, Dióxido de carbono, Ciclos luz/oscuridad, Luz artificial, *Chlorella vulgaris*.

Las microalgas se han venido aplicando en la industria desde mediados del siglo XX, debido a la producción de moléculas importantes difíciles de obtener por vía sintética; entre las cuales tenemos producción de farmacéuticos, aditivos para alimentos, alimentos para humanos y animales, fijación de CO₂ y cosméticos entre otros, dando sus primeros frutos en tratamiento de aguas residuales biológicamente tratadas, acondicionamiento del suelo, tratamiento del cáncer y producción de biocombustibles.

A pesar de sus grandes aplicaciones todavía las microalgas tienen muchos limitantes en su producción a gran escala, como el exceso de luz natural sobre todo al medio día, el control de la contaminación generada por otros microorganismos, la agitación uniforme, la transferencia de masa, el pH, la temperatura sobre todo en días nublados, entre otros.

Este estudio presenta la influencia de la luz, la asimilación de CO₂ y un medio mixotrófico con glucosa en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor a escala de laboratorio, analizando ciclos de luz/oscuridad y dos tipos de luz en la obtención de biomasa. La experimentación se dividió en dos partes: Un medio mixotrófico con glucosa con concentraciones de 0.5% p/v, 1% p/v, 1.5% p/v. Un medio autótrofo con dos tipos de luz (blanca y roja), tres ciclos luz/oscuridad (12:12, 18:6, 24:0) y dos regímenes de inyección de CO₂ (cada 60 minutos por 264 segundos y cada 15 minutos por 88 segundos) analizando la cinética del crecimiento y la producción de biomasa mediante la medición de Densidad Óptica (500nm) y el cálculo de concentración de clorofila a+b.

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible de la Industria y la Energía (CIDES) de la escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander.

¹ Proyecto de grado

² Facultad de Ingenierías Físico-Químicas Escuela de Ingeniería Química Director Viatcheslav Kafarov.

ABSTRACT

TITLE: IMPROVEMENT OF BIOMASS PRODUCTION RATE OF *Chlorella vulgaris* USING ARTIFICIAL LIGHT CYCLES AND DIFERENT CARBON SOURCES AT LABORATORY SCALE.³

AUTHOR: Carlos Alberto González Cabeza⁴

KEYWORDS: Microalgae, Mixotrophy, Autotrophy, Carbon Dioxide, Cycles Light/Dark, Artificial Light, *Chlorella vulgaris*.

Microalgae have been applied in industry since the middle of twentieth century due to their production of important molecules, hard to be obtained by synthetic ways; among them we have the production of pharmaceuticals, food additives, feed and food, carbon dioxide fixation, cosmetics among other applications, giving its first results, by which wastewaters can be biologically treated, pharmaceutical uses applied as skin cancer and biofuel production.

Despite of their many applications, microalgae still face up many limitations in their big scale production, as the excess of natural light mainly at noon, control of contamination generated by other microorganisms, uniform agitation, mass transfer, pH, control of temperature principally in cloudy days among other ones.

This study presents influence of light, CO₂ taking up and a glucose-added mixotrophic medium on *Chlorella vulgaris* growth in a laboratory-scale photobioreactor, analyzing light/dark cycles and two kinds of light on the yield of biomass. The setting up of the experiment was divided into two parts: a glucose-added mixotrophic medium with concentrations of 0.5%, 1.0% and 1.5% w/v.

The other was an autotrophic medium with two kinds of light (white and red), three cycles of light/dark (12:12, 18:6 and 24:0 in hours) and two regimes of CO₂ injection (every 60 minutes for 264 seconds and every 15 minutes for 88 seconds) analyzing growth kinetics and biomass production by means of Optical Density measurement at 500 nm and the calculation of chlorophylls a+b concentration.

This work was done in the Centre of Investigation for Sustainable Development of Industry and Energy (CIDES) of the school of Chemical Engineering in the Industrial University of Santander.

³ Final studies work report.

⁴ Physical-chemistry Engineering Faculty Chemical Engineering School Director Viatcheslav Kafarov

INTRODUCCION

El fomento de nuevas aplicaciones y el uso convencional de aplicaciones existentes le da una gran importancia al cultivo de microalgas (Hu et al., 1998 & Evens et al., 2000). Entre los usos convencionales encontramos aplicaciones en la industria de agricultura, acuicultura, producción de alimentos para animales y humanos, cosméticos, productos farmacéuticos, del medio ambiente (Richmond et al., 1990), y la acumulación de CO₂ en valiosa biomasa por medio de la fotosíntesis (Watanabe et al., 1995) , ayudando mitigar el efecto de invernadero ya este problema se ha venido aumentando en los últimos años debido al aumento de consumo de combustibles fósiles (Berberoglu et al., 2007).

En los cultivos de microalgas a espacio abierto poseen un problema debido a la ausencia de luz solar en los días nublados y que la luz no puede ser acumulada (Molina Grima et al., 1996), una solución a este problema es suministrar al sistema luz artificial y modificar las frecuencias de los ciclos luz/oscuridad para incrementar la productividad.

Los combustibles renovables son una prometedora alternativa para el reemplazo de combustibles fósiles, entre los cuales el biodiesel ha sido el más atractivo en años recientes. En la actualidad las microalgas son consideradas como materias primas para la producción de biodiesel siendo la especie estudiada *Chlorella vulgaris* una candidata a la producción de biodiesel debido a sus altos contenidos de lípidos en cultivos fotoautótrofos y heterótrofos (Miao et al., 2004).

En el presente trabajo presentamos la diferencia en productividad de biomasa durante la fase exponencial entre cultivo mixotrófico con glucosa a 0,5%, 1%, 1,5% p/v y cultivo autotrófico con luz artificial blanca y roja, inyectando CO₂ con dos pulsos (cada 60 minutos por 264 segundos y cada 15 minutos por 88 segundos) y tres ciclos de luz/oscuridad (12:12 , 24:0 , 18:6).

1. MARCO TEORICO

1.1 Usos

El uso comercial del cultivo de microalgas se ha llevado a cabo por más de 50 años, demostrando así un sin número de aplicaciones; en la industria las microalgas sirven como fuente de farmacéuticos, pigmentos (Pulz et al., 1998) al igual como suplementos alimenticios para animales y humanos (Becker, 1988), y también se han difundido al área del tratamiento de aguas residuales, la agricultura, fijación de dióxido de carbono, obtención de ácidos grasos poli-insaturados, polisacáridos, moduladores inmunes, e hidrógeno (Park et al., 2000 & Wijanarko et al., 2008).

1.2 Fuentes de Energía y de Carbono

Para su crecimiento, las microalgas necesitan dos cosas, una es la fuente de carbono (normalmente en forma de CO_2), y otra, es la fuente de energía, en este caso la luz, pero no cualquier luz, sino aquella conocida como la radiación fotosintéticamente activa (o PAR de sus siglas en ingles) (Csogör et al., 2001 & Lee, 1999). Las células almacenan la energía lumínica en los fotosistemas durante su exposición a la luz; esta energía será utilizada posteriormente en su metabolismo cuando se encuentre en la oscuridad; de modo que la productividad es mayor en ciclos rápidos de luz/oscuridad (Sastre et al., 2007). La fotosíntesis promueve el transporte de electrones, la cual está limitada por las reacciones redox de las plastiquinonas (Pulz et al., 1998); de este sistema, las estructuras antenales en las microalgas son tan eficientes en la utilización de la luz que pueden absorber todos los fotones que las golpean, aun cuando no pueden utilizarlos (Lee, 1999) y por lo tanto la tasa de crecimiento celular alcanzará sus máximos límites cuando se incrementa la energía lumínica, lo cual limitará la cantidad de energía a utilizar (Pulz et al., 1998); este fenómeno de saturación lumínica es probablemente una respuesta al mecanismo interno donde las células pueden fotosintetizar una pequeña cantidad de luz (Carlozzi et al., 2003).

En cualquier sistema biológico, en su estado estacionario, bajo condiciones estándar, tendrá un tamaño poblacional óptimo, lo cual permitirá la tasa máxima de productividad (Richmond et al., 1999); a grandes densidades celulares es de esperar que la tasa de crecimiento comience a decaer debido al aumento de la zona oscura; el aumento de la intensidad de la luz no detendrá su caída ya que a altas intensidades las células sufren daño, a esto se le conoce como fotoinhibición (Lee, 1999 & Molina Grima et al.,1996).

La luz posee dos propiedades importantes para el metabolismo y el crecimiento del alga: La calidad espectral y la intensidad (Lee 1999 & Park et al., 2000). La intensidad puede expresarse como la cantidad de energía en una superficie durante un periodo de tiempo (Gliessman, 2002); la calidad espectral se define por medio del rango de absorción de la clorofila y otros pigmentos fotosintéticos (Rabinowitch, 1961). El espectro de la luz emitida a partir de la fuente, el reparto, la distribución de la luz en el cultivo, la dispersión, reflexión, refracción, difracción y atenuación lumínica en el cultivo deben considerarse (Lee, 1999). La tasa de crecimiento de las microalgas depende de la energía de la luz absorbida por las células; a medida que el cultivo crece, el efecto pantalla también, es decir, las células que están frente a la fuente de luz no dejarán pasar los rayos lumínicos a las células que están en el interior del Fotobiorreactor, disminuyendo así la energía disponible, como resultado la eficiencia de utilización de la luz disminuye y también lo hace la tasa de crecimiento específica (Jeon et al., 2005); debido a esto, el modelo de crecimiento de microorganismos fototróficos depende de las intensidades locales de luz, las cuales pueden ser estimadas utilizando un modelo de luz atenuada integrado a un modelo de lógica difusa, la cual combina la ley de absorción de Beer-Lambert y algunas mediciones empíricas necesarias (Franco-Lara et al., 2006), además es necesario tener en cuenta que la relación entre la tasa de crecimiento y la irradiación es diferente para cada especie de Microalgas debido principalmente a presiones evolutivas (Acien Fernández et al, 1997 & Benson et al, 2007).

1.3 Producción y optimización de la luz

La utilización eficiente de la luz ha sido el reto científico y tecnológico más grande en la investigación y el desarrollo del cultivo de microorganismos fotosintéticos. Para la optimización de la productividad, la luz a intensidad de saturación debería distribuirse de manera homogénea en el fotobiorreactor, lo cual es imposible en los sistemas de cultivos prácticos, incluso mantener la intensidad de luz dentro del nivel crítico y el de saturación es posible sólo si la profundidad del cultivo es poca, la concentración celular es muy baja y la intensidad de la luz incidente está controlada (Ogbonna et al., 2000). Una solución posible al efecto pantalla y la fotoinhibición es el suministro de luz en cortos destellos, el cual consiste en el hecho de que la intermitencia evita los exceso de luz a las células, maximizando su eficiencia sobre todo en concentraciones celulares altas (20%) (Park et al., 2000). La eficiencia con la cual la luz captada por las algas se utiliza tiende a ser mayor en luz intermitente de lo que fuera en luz continua de una intensidad igual a los destellos de luz (Park et al., 2000). La existencia de un periodo más largo de oscuridad entre los destellos cortos de luz puede incrementar la eficiencia de la fotosíntesis, particularmente para luz de elevada intensidad (Kok, 1953 & Weller et al., 1941). Sin embargo, la tasa de fotosíntesis en luz intermitente nunca es mayor que la tasa en luz continua de la misma intensidad (Molina Grima, 1996).

Los ciclos de luz/oscuridad se relacionan con los tamaños de los volúmenes iluminado y oscuro del reactor, como también la duración de los ciclos promedios, y de manera más importante la frecuencia del ciclo (Hu et al., 1998a). Los ciclos día/noche y la variación diurna de la luz es un gran problema con el uso de la energía solar (Ogbonna et al., 1999), este se debe filtrar para evitar el paso de los rayos ultravioleta e infrarrojos, evitando así daños en la célula (Ogbonna et al., 1999); un exceso de luz conduciría a la pérdida de fotones, pues la célula sólo puede absorber una pequeña parte de los fotones para la fotosíntesis, es decir la productividad de la biomasa no depende sólo de la cantidad de energía radiante, sino también de la eficiencia de la célula (Ugwu et al., 2008). A menos de que el

cultivo sea ópticamente muy delgado, la luz estará disponible sólo en una zona estrecha cercana a la superficie de cultivo; por lo tanto los tanques de almacenamiento deben tener una gran área de exposición a la luz, los cuales contienen relativamente pequeñas concentraciones celulares, un modo de producción costoso y básicamente ineficiente (Richmond et al., 1999). Un factor importante además de la intensidad de la luz, es la longitud de paso de luz del fotobiorreactor; una reducción de longitud de paso afecta al sistema, mejorando la tasa de crecimiento específica que refleja una relación área volumen mejorada, que acompaña el acortamiento de la longitud de paso de luz; esto a su vez incrementa la frecuencia de las células que se mueven desde la oscuridad hasta el volumen fótico del fotobiorreactor, es decir, una frecuencia incrementada del ciclo luz/oscuridad (Richmond et al., 1999).

1.4 Fotobiorreactores

Los fotobiorreactores actuales para la producción industrial masiva se quedan cortos en facilitar el máximo potencial fotosintético (Richmond et al., 1999), pueden ser horizontales o verticales (Pirt et al., 1983 & Richmond et al., 1993), serpentines (Hoshino et al., 1991) y fotobiorreactores de paneles delgados horizontales o inclinados (Tredici et al., 1991). Los tanques de cultivo abiertos desarrollados en los 50`s todavía se utilizan para casi toda la producción de algas, porque tanto la inversión de capital como los costos de mantenimiento de operación son bajos pero son difíciles de controlar las condiciones del cultivo (Ogbonna et al., 2000). El problema de los fotobiorreactores es el diseño eficiente y económico a gran escala para reemplazar los tanques abiertos de baja productividad y el cultivo de microorganismos fotoautótrofos a la intemperie se basa conceptualmente en la utilización efectiva de la alta energía solar, que representa como regla una radiación excesiva para la maquinaria fotosintética (Richmond et al., 1999).

En los cultivos por lotes la intensidad de luz en cualquier punto dado dentro del fotobiorreactor continúa cambiando en el transcurso del cultivo, razón por la cual se requieren estimaciones exactas de las condiciones de luz dentro del fotobiorreactor, las cuales son importantes para los estudios cinéticos sobre el crecimiento de las células fotoautótrofas (Ogbonna et al., 2000); la dificultad al diseñar mecanismos de cultivos eficientes para la producción masiva de microorganismos fotoautótrofos reside en el hecho de que la luz se atenúa de manera exponencial al penetrar en el cultivo (Richmond, 1996 & Richmond et al., 1999). Dentro del fotobiorreactor existen simultáneamente la oscuridad completa, limitación de luz, la saturación de luz y las zonas de inhibición por luz (Ogbonna et al., 2000), el suministro de este tipo de energía es el factor más importante que limita el crecimiento celular debido a que el fotobiorreactor no está diseñado para almacenar la luz y esta debe ser suministrada continuamente (Park et al., 2001 & Suh et al., 2001), teniendo en cuenta que solo necesitamos entre 5%-10% de la luz solar al medio día (Richmond et al., 1997).

1.5 Mezclaje

Se pueden utilizar buenos sistemas de mezclaje para hacer circular las células entre las zonas (oscuridad completa, limitación de luz, la saturación de luz y las zonas de inhibición por luz) produciendo así reducción de la fotoinhibición en la superficie de iluminación, y de la pérdida de biomasa en la zona oscura. No obstante la efectividad del método está limitada a ciertas condiciones donde las proporciones relativas de fotoinhibición y de zonas oscuras son pequeñas (Ogbonna et al., 2000). Para lograr la homogenización del cultivo se puede recurrir a diversos métodos, en los cuales el medio puede ser impulsado por bombas o por columnas de burbujas (Sastre et al., 2007). La transferencia de energía mecánica hacia el fluido evita que las células se sedimenten o que se adhieran a la pared del reactor, además de estimular el intercambio de gases; así que las turbulencias locales llevan a las células de manera aleatoria a través de los elementos iluminados, cerca a la pared del reactor y hasta las zonas oscuras o

poco iluminadas de éste, de modo que cada célula individual se dispone a ciclos estadísticos luz/oscuridad (Sastre et al., 2007). No obstante, hay que tener en cuenta evitar el estrés a las algas debido a la presión (Sastre et al., 2007).

1.6 Temperatura

La temperatura ambiente es un parámetro clave, pues ella controla las tasas básicas de todas las reacciones químicas de la célula; los efectos de la temperatura sobre los cultivos celulares se relacionan tanto con la dependencia térmica de los componentes estructurales de la célula (particularmente lípidos y proteínas), como también con los coeficientes de temperatura de las velocidades de reacción (Richmond, 1986). Una consecuencia de la temperatura no óptima, son los cambios significativos en los mecanismos de regulación metabólica, la especificidad de las reacciones enzimáticas, la permeabilidad celular y la composición (Sandnes et al., 2005). Podemos regular la temperatura del cultivo a partir de la cantidad de irradiación que se le proporcione al fotobiorreactor, sin embargo algunas especies pueden cambiar sus estrategias de aclimatación en respuesta a la combinación de luz y temperatura, de una manera independiente como si ellas actuaran individualmente (Dermoun et al., 1992).

1.7 Heterotrofia

Las algas heterótrofas se consideran actualmente como una fuente potencial promisoría para la producción del biodiesel, pues los lípidos se acumulan rápidamente en sus células (Lu et al., 2009), alcanzando muy altas concentraciones celulares (Carlozzi et al., 1996) debido a que la contaminación no sería un problema, ya que las condiciones estrictamente estériles pueden mantenerse con los biorreactores convencionales (Ogbonna et al., 2000) y sus cultivos se pueden desarrollar de forma económica (Liang et al., 2009). La producción heterótrofa tiene la ventaja de no utilizar luz y por ende no se produce foto-inhibición (Myers et al., 1940). Los cultivos heterótrofos usan compuestos orgánicos como fuente de carbono, tales como azúcares y ácidos carboxílicos

(Liang et al., 2009), también se puede utilizar etanol, glicerol, y fructosa dependiendo de la especie utilizada (Yodochi et al., 1998). Sin embargo, uno de los principales obstáculos para producir biodiesel a partir de algas heterótrofas es la alta dependencia de las fuentes de carbono (Lu et al., 2009).

1.8 Mixotrófia

Un método posible de producir alta concentración de biomasa con altas concentraciones celulares de productos fotosintéticos es el uso de cultivo mixotrófico, donde tanto fuente de carbono orgánico como energía lumínica se suministran simultáneamente, con buenas condiciones de esterilidad, buen coeficiente de suministro de luz y buenas características de transferencia de masa con la óptima concentración de la fuente de carbono, pues una mayor concentración resulta inhibitoria para las células (Liang et al., 2009 & Martínez et al., 1991). En el cultivo mixotrófico la relación entre metabolismo heterótrofo y fotoautótrofo es compleja; en ciertos cultivos bajo ciertas condiciones las actividades metabólicas tanto en autótrofas como en heterótrofas podrían seguir simultáneamente y de manera independiente de modo que la tasa de crecimiento celular y por tanto la concentración final de células del cultivo es la suma de los valores obtenidos en los cultivos heterótrofo y fotoautótrofo (Liang et al., 2009 & Martínez et al., 1991). Los cultivos mixotróficos son una opción promisoriosa para la producción de muchos metabolitos pero su utilidad depende del producto; cada producto tiene un balance óptimo entre el metabolismo heterótrofo y el fotoautótrofo, sin embargo, es difícil lograrlo debido a que las condiciones óptimas para el autótrofo son diferentes para el heterótrofo (Ogbonna et al., 2000).

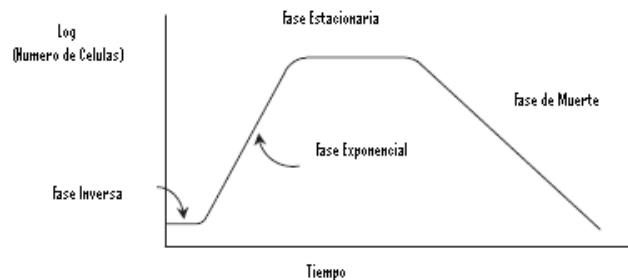
La fuente de carbono en condiciones mixotróficas puede ser almidón hidrolizado de yuca, hidrolizado de fécula de maíz, acetato, glicerol, etanol, ácidos orgánicos, azúcares, subproductos de procesos industriales como alpechín y glucosa (Sanchez et al., 2001). El costo de las fuentes de carbono orgánico (usualmente en forma de glucosa o acetato) es alto, comparado con todos los demás nutrientes

agregados (Liang et al., 2009); para superar este bache, debe hallarse un recurso barato, siendo el glicerol, derivado de los procesos de producción del biodiesel, un buen candidato para tal fin (Liang et al., 2009), en consecuencia el aumento de la oferta y la poca demanda del glicerol crudo ha presionado a los productores del biodiesel a buscar afanosamente las maneras de disponer de este subproducto , y vendrán más todavía de la industria de la producción de biodiesel en el futuro (Liang et al., 2009).

1.9 Fases de Crecimiento en un Reactor Discontinuo

En un cultivo por lotes o batch es un sistema cerrado sin ningún tipo de entrada o salida de flujos, ya que los nutrientes son preparados en un volumen fijo; Los inóculos se transfieren y los microorganismos poco a poco crecen y se reproducen hasta que los nutrientes son empobrecidos y los productos se forman (Ghasem, 2007). La curva de crecimiento se puede dividir en cuatro fases como se muestra en la figura 1.

Figura 1. Curva de crecimiento microbiano



Fuente: Biochemical Engineering and Biotechnology. Ghasem D. Najafpour. 2007.

Fase Inversa: Casi no hay crecimiento celular aparente, en este tiempo los microorganismos se adaptan al nuevo entorno, sin mucha replicación celular y sin

signos de crecimiento; el tiempo de duración de esta fase dependerá del tamaño del inóculo (Ghasem, 2007).

Fase Exponencial: Las células están creciendo muy rápidamente, aumentando de manera exponencial, el aumento lineal se muestra en el gráfico semilogarítmico con una pendiente constante de población de células, el cual se utiliza rápidamente los sustratos y se acumulan productos (Ghasem, 2007).

Fase Estacionaria: Debido a la acumulación de los productos, la densidad celular se mantiene constante (Ghasem, 2007).

Fase de Muerte: La célula empieza a morir gradualmente a medida que envejecen. Las células muertas pueden crear toxicidad, desactivando las células restantes, y si los metabólicos secundarios son tóxicos la fase de muerte muestra una disminución exponencial (Ghasem, 2007).

1.10 Especie en estudio

Chlorella sp. es actualmente el alga verde más investigada y más publicada (Wijanarko et al., 2008), de las especies más estudiadas se encuentra *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890, la cual en su metabolismo procesa el bicarbonato [HCO_3^-] producto de la reacción del dióxido de carbono con el agua; lo cual produce un cambio en el pH del cultivo y usando una aproximación de la ley de Henry y ecuación Henderson Hasselbalch's se puede calcular la concentración del bicarbonato directamente relacionado con el metabolismo del alga. La concentración de bicarbonato se puede utilizar en modelos cinéticos como Monod, Jerusalemsky y Haldane (Bailey et al., 1986 & Schugerl et al., 2000).

El espectro de absorción de *C. vulgaris* muestra dos picos alrededor del azul (430 nm) y del rojo (675 nm), los cuales son típicos de las algas verdes que contienen clorofila a como pigmento principal pero *C. vulgaris* es deficiente en pigmentos que absorban luz alrededor de luz verde (550 nm) (Yun et al., 2001).

Algunas cepas de *C. vulgaris* solo pueden crecer en la oscuridad (Haass et al., 1974), mientras otras solo pueden crecer en la luz (Karlander et al., 1966), y otras cepas pueden crecer en ambas condiciones (Estep et al., 1981).

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.1. MATERIALES

2.1.1 Inóculo

Se trabajó con *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803, perteneciente al Orden Chlorellales obtenida en la colección de cultivo de algas de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA). Las microalgas se mantuvieron en crecimiento en medio Bold Basal, en temperatura ambiente durante 5 días, un pH neutro y aeración constante de dos psi.

2.1.2 Fotobiorreactor

Se usaron botellas de plástico de 2 L $\frac{1}{2}$. Para aislar los reactores de la luz externa, se colocaron dentro de cuartos oscuros de 62*62*69 cm, con bombillos fluorescentes marca Opalux de 11 w, donde habían tres bombillos en cada cajón con cuatro botellas a una distancia de 15 cm en el cultivo autótrofo, mientras en el cultivo mixotrófico se colocaron las botellas encima del mesón, con aeración por medio de un torrente de aire comprimido de un compresor de un hp.

2.1.3 CO₂

Se utilizó una bala de CO₂ marca Praxair Oxígenos de Colombia de 20 Kg a un caudal de 10 CFH (m³/h).

2.1.4 Glucosa

Se utilizó D (+) glucosa anhidrida marca CARLO ERBA.

2.1.5 Cultivo de Microalga

Los experimentos se realizaron en reactores de 2 Litros de medio Basal, con una concentración celular inicial de 0,15 g/L en autótrofos y 0,19 g/L en mixotrófico, a temperatura ambiente, con aireación a 1,66 psi e intensidad lumínica constante de 460 Lm en cultivo autótrofo y luz natural en cultivo mixotrófico.

2.2 DETERMINACIÓN DEL TRATAMIENTO ÓPTIMO EN AUTÓTROFOS

Tabla 1. Determinación del tratamiento óptimo en autótrofos en tipo de luz, tipo de ciclo luz/oscuridad y pulso de CO₂

		TIPO DE CICLO		
TIPO DE LUZ		12:12	18:6	24:0
Blanca		15 min durante 88 s	15 min durante 88 s	15 min durante 88 s
		60 min durante 264 s	60 min durante 264 s	60 min durante 264 s
Roja		15 min durante 88 s	15 min durante 88 s	15 min durante 88 s
		60 min durante 264 s	60 min durante 264 s	60 min durante 264 s

El diseño experimental corresponde a un trifactorial con tres factores de dos niveles cada uno 2*2*2

2 Tipos de luz (Blanca y Roja), 2 Regímenes de CO₂ (cada 15 minutos por 88 segundos y cada 60 minutos por 264 segundos) y 2 Ciclos de luz/oscuridad (24:0, 18:6).

2.3. DETERMINACIÓN DEL TRATAMIENTO ÓPTIMO EN MIXOTRÓFICO

Se montaron tres reactores con glucosa a las concentraciones de 0.5% p/v, 1% p/v, 1.5% p/v

2.4. CARACTERIZACION

2.4.1 Determinación de concentración celular por Densidad Óptica (OD):

Para cada una de las diferentes concentraciones se tomaron 6 mL de cultivo (original y réplica) dos veces por día en mixotrófico y una vez al día en autótrofo, se diluyeron tres veces con 3 mL de agua destilada y luego se midió su absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro (Spectroquant 300 Merck).

La concentración celular se determinó de acuerdo a la Ley de Beer Lambert:

$$\text{Abs} = KXL$$

Donde:

Abs: Absorbancia, K: Coeficiente de extinción molar, X: Concentración

L: Distancia que viaja la luz a través de la muestra.

2.4.2 Determinación de concentración celular por contenido de Clorofila:

Para preparar el extracto de clorofila se tomaron 10 mL de cultivo (original y réplica) y se centrifugaron a 3400 rpm xg durante 6 minutos. El pellet se resuspendió en 3 mL de etanol y se calentó durante 5 minutos en baño maría. Después del baño se llevó el volumen hasta 5 mL, para asegurar concentraciones óptimas, se diluyó las muestras hasta 5 veces, luego se midió su absorbancia a 650nm y a 665 nm en un espectrofotómetro (Spectroquant 300 Merck) (Modificado de Becker, 1994).

$$\text{Clorofila a + b} = (4.0 * A_{665}) + (25.5 * A_{650})$$

2.4.3 Calculo de coeficiente de extinción:

Se tomó 1 mL de una de las botellas, se colocó en un tubo de ensayo previamente pesado, se llevó al horno y se calculó la biomasa presente y se diluyó cuatro veces, también se midió la absorbancia con tres diluciones y se graficó absorbancia vs peso seco donde el coeficiente de extinción es la pendiente de la grafica la cual dio $\text{Abs} = 1,408 X + 0,015$ (Anexo E).

2.4.4 Calculo de la tasa de crecimiento específico μ (dia^{-1}):

Se tomó el modelo de crecimiento del reactor discontinuo $\text{LN } X = \text{LN } X_0 + \mu t$ (Anexo D), se graficó para cada experimento $\text{Ln } X$ vs t y la pendiente de la línea es la tasa de crecimiento específica μ (d^{-1}).

3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1 MIXOTROFIA

Figura 2. Crecimiento exponencial de *Chlorella vulgaris* medido por Densidad Óptica en medio mixotrófico con glucosa con diferentes % p/v.

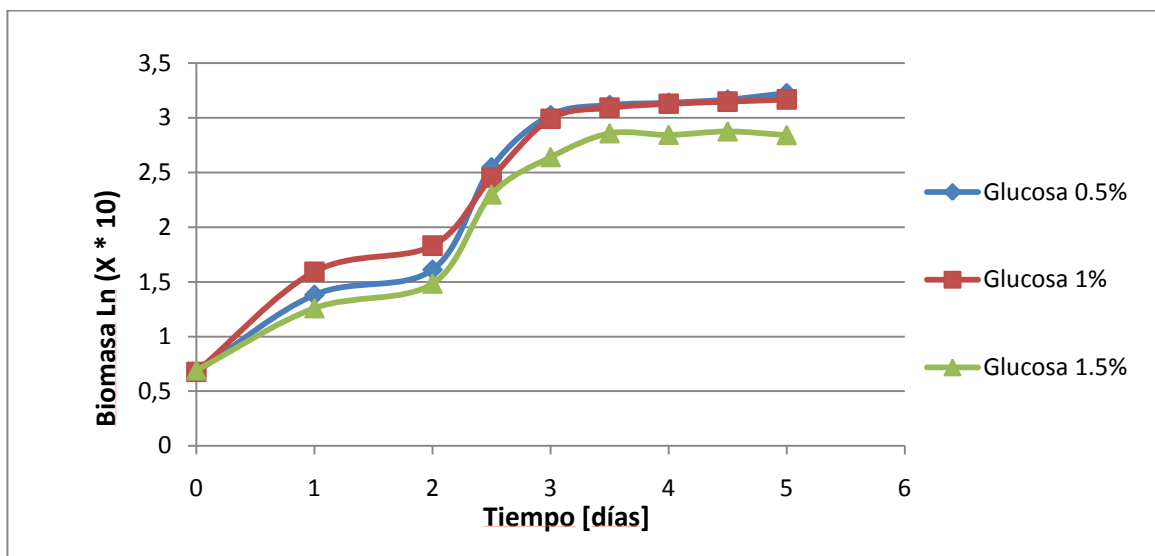


Tabla 2. Modelos de crecimiento para cultivo mixotrófico en fase exponencial

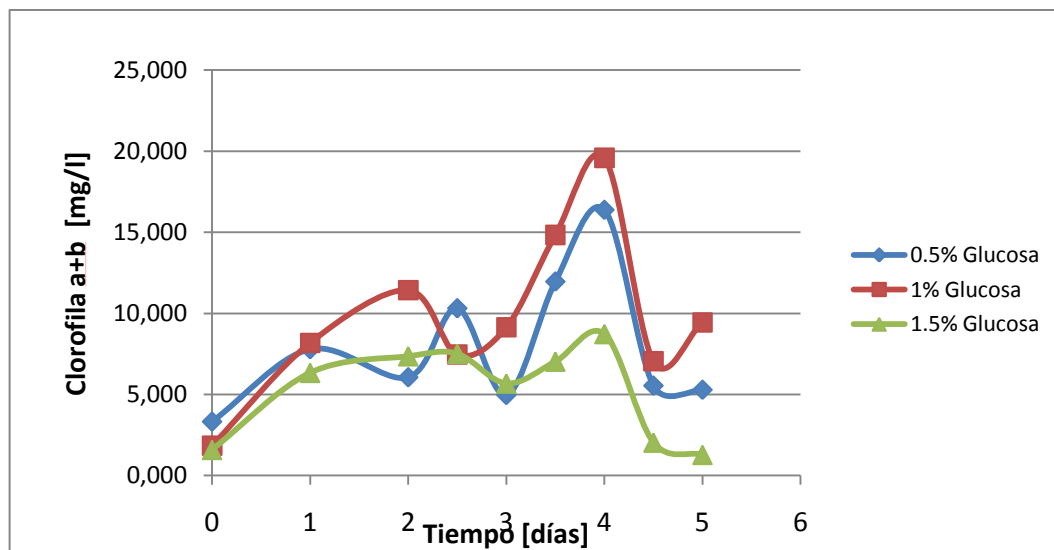
% p/v Glucosa	MODELO LN $X = LN X_0 + \mu t$	μ (d^{-1})	R^2	X_0 (g/L)	X_F (g/L)
0,5	$Ln x = 0,552 t + 0,867$	0,552	0.89	0,19	2,51
1	$Ln x = 0,518 t + 0,985$	0,518	0.90	0,19	2,37
1,5	$Ln x = 0,481 t + 0,836$	0,481	0.89	0,19	1,71

Se observó en la figura 2 que en el cultivo mixotrófico tuvieron una fase de adaptación al metabolismo mixotrófico durante 2 días, al cuarto día se mantuvo casi constante el crecimiento celular, el coeficiente de crecimiento fue mayor para las concentraciones más bajas representadas por el 0.5% y 1% p/v en la gráfica 2, siendo el mejor al quinto día el 0.5% p/v, con una tasa de crecimiento específico

$\mu=0,552 \text{ (d}^{-1}\text{)}$ y una concentración final de biomasa $X_F = 2,51 \text{ (g/L)}$ como podemos mirar en la tabla 2. Podemos observar que el crecimiento mixotrófico con glucosa fue bueno, pero los costos de la glucosa son elevados y es sensible a contaminación por microorganismos externos.

3.1.1 Clorofila en Mixotrófia

Figura 3. Cantidad de Clorofila a+b de *Chlorella vulgaris* en crecimiento mixotrófico con glucosa en % p/v.



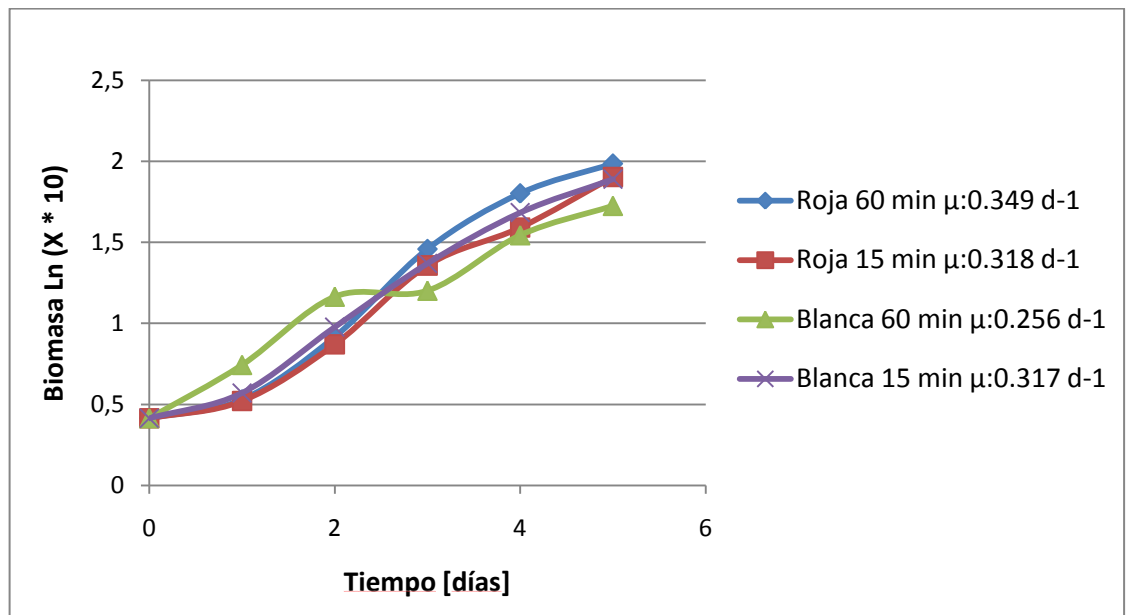
De acuerdo a la cantidad de clorofila observada en la gráfica 3, se nota un descenso en la concentración de la clorofila para la concentración de glucosa 1,5% p/v, esto se debe al cambio metabólico de un sistema autotrófico al heterotrófico, debido al uso de carbono orgánico; mientras que las de menor concentración tuvieron un comportamiento normal.

3.2 AUTOTROFIA

3.2.1 Tipo de ciclos luz/oscuridad

3.2.1.1 Ciclo de luz/oscuridad 12:12

Figura 4. Crecimiento exponencial de *Chlorella vulgaris* medido por Densidad Óptica en el ciclo luz/oscuridad 12:12.

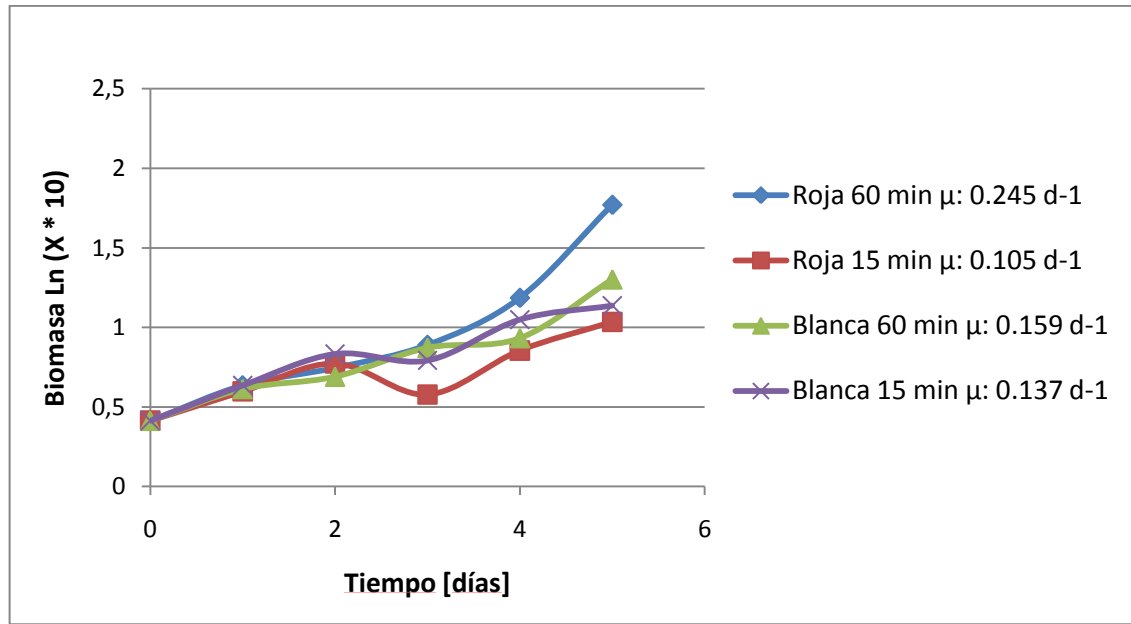


En el cultivo autótrofo se observó que no tienen fase de adaptación pues la concentración inicial (0,15 g/L) de células era suficientemente alta y el comportamiento de crecimiento microbiano fue típico.

Los reactores bajo luz roja obtuvieron mayores tasas de crecimiento específico μ (d^{-1}); siendo la mejor el tratamiento con luz roja, con pulsos de CO_2 cada 60 minutos con una tasa de crecimiento específica $\mu: 0,349$ (d^{-1}); los demás tratamientos tuvieron un comportamiento similar.

3.2.1.2 Ciclo de luz/oscuridad 24:0

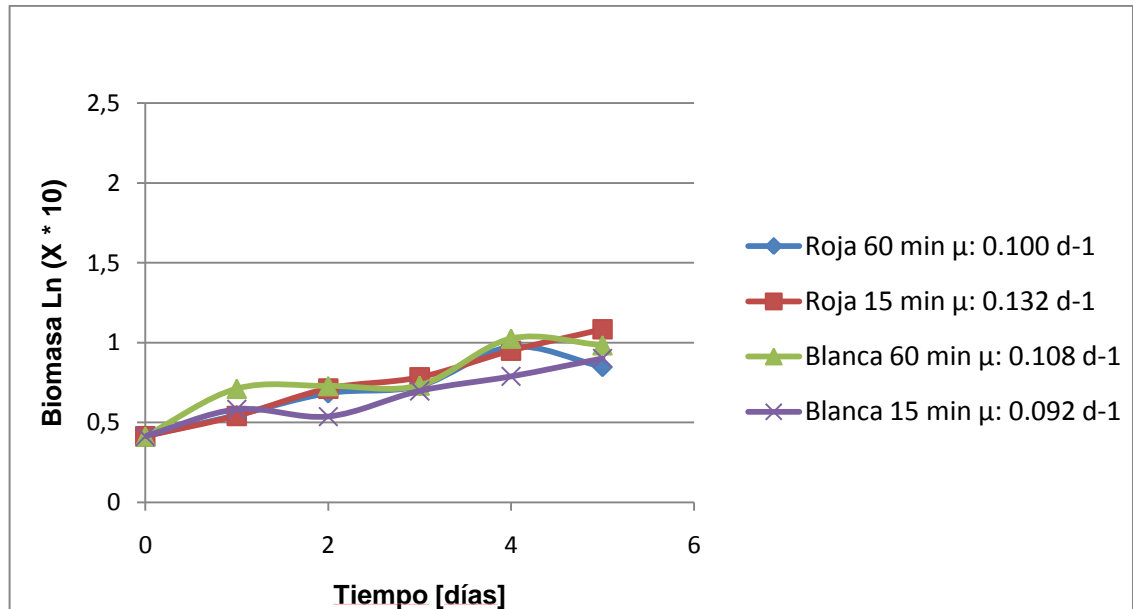
Figura 5. Crecimiento exponencial de *Chlorella vulgaris* medido por Densidad Óptica en el ciclo luz/oscuridad 24:0.



La mayor tasa de crecimiento específica μ (d^{-1}) en el ciclo luz/oscuridad 24:0 corresponde al tratamiento luz roja con pulsos de CO_2 cada 60 minutos con μ : 0,245 (d^{-1}), con un incremento de biomasa a partir del día 3 debido a fotoinhibición temprana en los días previos, inhabilitando el crecimiento por exceso de fotones presentes y menor cantidad de células, además de una mayor cantidad de CO_2 presente en el medio.

3.2.1.3 Ciclo de luz/oscuridad 18: 6

Figura 6. Crecimiento exponencial de *Chlorella vulgaris* medido por Densidad Óptica en el ciclo luz/oscuridad 18:6.

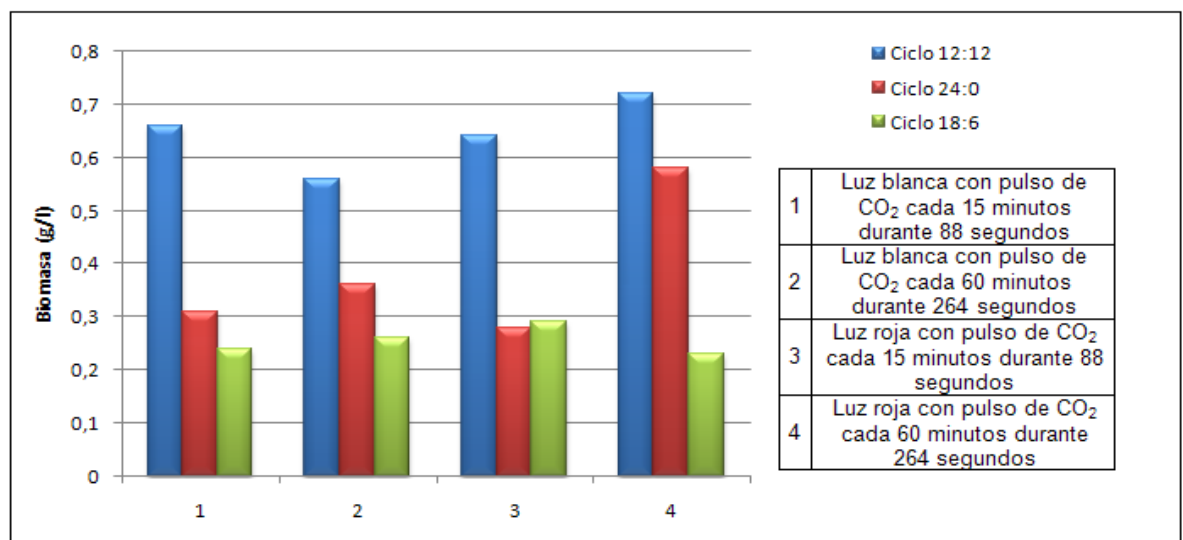


La mayor tasa de crecimiento específica μ (d^{-1}) en el ciclo luz/oscuridad 18:6 se presentó en el tratamiento de luz roja con pulsos de CO_2 cada 15 minutos, con μ : 0,132 (d^{-1}); los demás tratamientos tuvieron un comportamiento similar.

Tabla 3. Modelos de crecimiento para cultivo autótrofo en fase exponencial.

CICLO LUZ	TIPO LUZ	TIEMPO PULSO	MODELO LN X= μ t + LN X0	μ (d ⁻¹)	R ²	X ₀ (g/L)	X _F (g/L)
12:12	Blanca	15 minutos	Ln x = 0,317 t + 0,356	0,317	0,99	0,15	0,66
		60 minutos	Ln x = 0,256 t + 0,489	0,256	0,97	0,15	0,56
	Roja	15 minutos	Ln x = 0,318 t + 0,313	0,318	0,98	0,15	0,64
		60 minutos	Ln x = 0,349 t + 0,311	0,349	0,97	0,15	0,72
24:0	Blanca	15 minutos	Ln x = 0,137 t + 0,466	0,137	0,94	0,15	0,31
		60 minutos	Ln x = 0,159 t + 0,405	0,159	0,95	0,15	0,36
	Roja	15 minutos	Ln x = 0,105 t + 0,446	0,105	0,78	0,15	0,28
		60 minutos	Ln x = 0,245 t + 0,328	0,245	0,91	0,15	0,58
18:6	Blanca	15 minutos	Ln x = 0,092 t + 0,423	0,092	0,94	0,15	0,24
		60 minutos	Ln x = 0,108 t + 0,495	0,108	0,84	0,15	0,26
	Roja	15 minutos	Ln x = 0,132 t + 0,415	0,132	0,99	0,15	0,29
		60 minutos	Ln x = 0,100 t + 0,449	0,100	0,86	0,15	0,23

Figura 7. Comparación de biomasa final en cultivo autótrofo.



Observando los diferentes resultados reportados en la figura 7 y la tabla 3, la mayor tasa de crecimiento μ (d⁻¹) y biomasa final en cada ciclo de luz/oscuridad

siempre corresponde al tratamiento con luz roja, donde en los ciclos luz/oscuridad 12:12 y 24:0 fue la luz roja la mejor, con un pulso de CO₂ cada 60 minutos por 264 segundos. Sin embargo en el ciclo luz/oscuridad 18:6 se obtiene esto mismo con luz roja con pulso de CO₂ cada 15 minutos durante 88 segundos. Concluyendo que el mejor tratamiento fue el ciclo luz/oscuridad 12:12, con luz roja y pulso de CO₂ de 60 minutos durante 264 segundos, obteniéndose concentraciones de biomasa final $X_F = 0,72$ g/L.

El mejor ciclo luz/oscuridad fue 12:12, ya que los ciclos 24:0 y 18:6 al tener CO₂ disponible la gran parte del día generó una sobreproducción de O₂ durante el metabolismo, el cual al disolverse en el sistema puede no liberarse rápidamente inhibiendo la cadena de electrones que actúan en el proceso fotosintético e impidiendo que los cloroplastos se fotoadaptan a las largas exposiciones de fotones (Lopes et al., 2008 & Ogbonna et al., 1996).

3.2.2 Clorofila en Autótrofos

Figura 8. Cantidad de Clorofila a+b de *Chlorella vulgaris* en el ciclo luz/oscuridad 12:12.

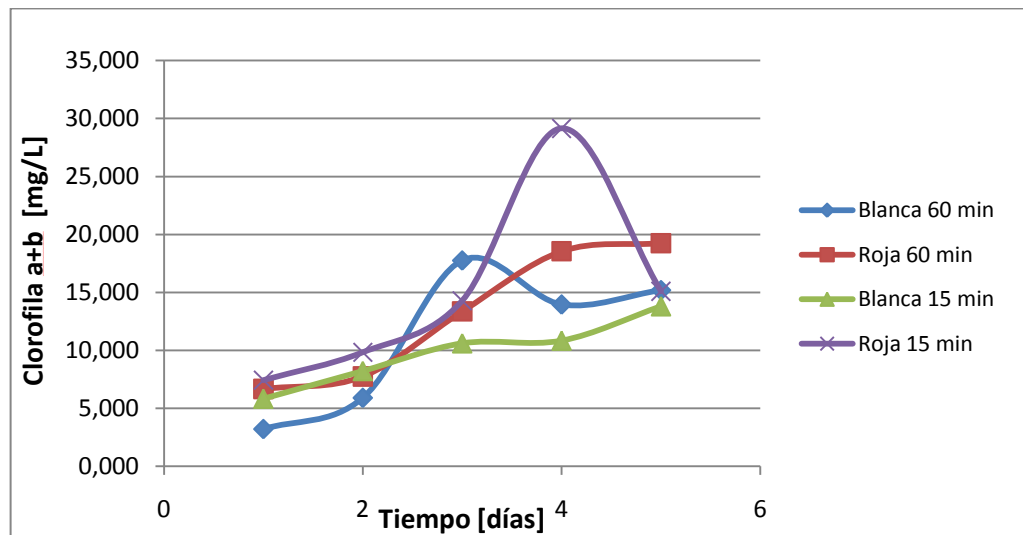


Figura 9. Cantidad de Clorofila a+b de *Chlorella vulgaris* en el ciclo luz/oscuridad 24:0.

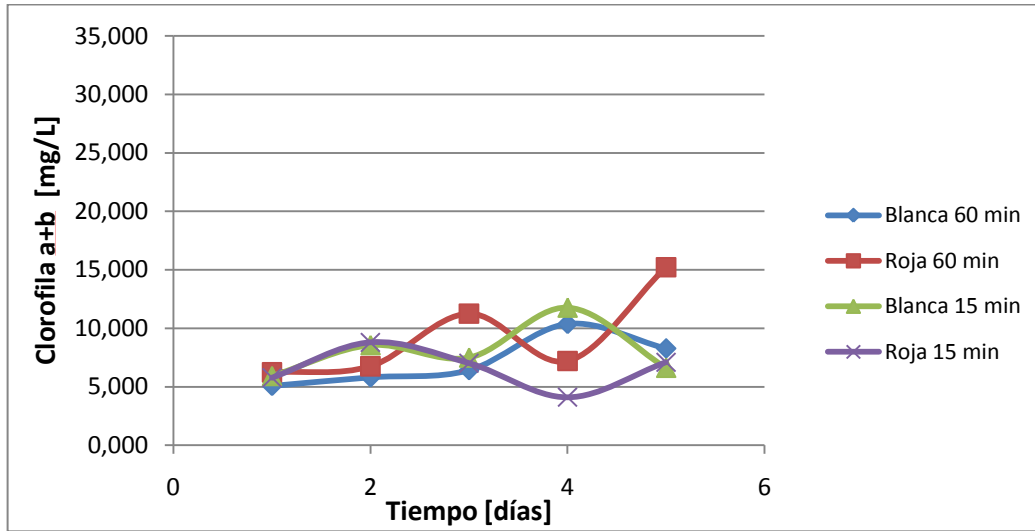
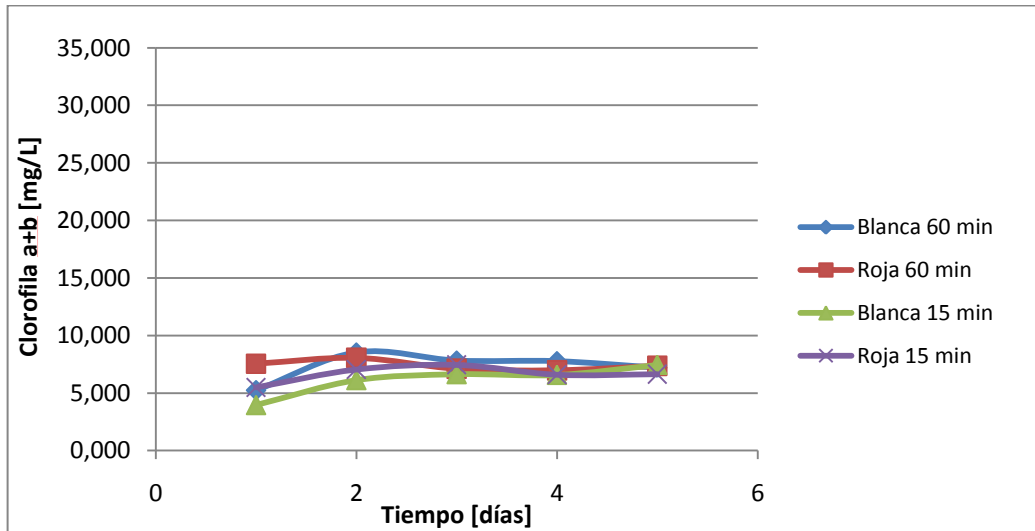


Figura 10. Cantidad de Clorofila a+b de *Chlorella vulgaris* en el ciclo luz/oscuridad 18:6.



Las figuras 8, 9 y 10 nos representan la cantidad de clorofila a + b presente en *Chlorella vulgaris* durante el crecimiento dependiendo del tipo de luz, ciclo y pulso de CO₂, donde se evidencia aumento en la cantidad de clorofila presente, corroborándose el comportamiento observado por medio de Densidad Óptica; sin

embargo no todos los tratamientos presentaron un aumento constante. También se observó que el ciclo luz/oscuridad 12:12 produjo los rangos de clorofila más altos, en concordancia con lo observado por densidad óptica, seguido de los ciclos luz/oscuridad 24:0 y 18:6 en su orden.

La clorofila a + b son pigmentos fotosintéticos de la célula; a mayor concentración existirá una mayor fotosíntesis; esto a su vez no significa que la cantidad de clorofila por célula sea constante, pues en lo observado se vio que la biomasa aumentaba aun cuando la concentración de clorofila disminuía. Comparando concentración de clorofila a+b en cultivo autótrofo y mixótrofo, se observó que en el cultivo autótrofo se obtuvieron concentraciones de clorofila a+b hasta 29,1 mg/L comparado con el cultivo mixotrófico con concentraciones de clorofila a+b hasta 19,1 mg/L, con una mejor producción de biomasa debido a la fuente de carbono orgánico.

La cantidad de clorofila en una célula puede cambiar debido a las condiciones climáticas variables y a los eventos de estrés (Hartmurt et al., 2004). La composición de los pigmentos y la actividad fotosintética de las algas cambian continuamente durante el periodo de crecimiento y se adaptan a las condiciones externas (Hartmurt et al., 2004).

4. CONCLUSIONES

El crecimiento de *Chlorella vulgaris* observado en cultivo mixotrófico con glucosa fue mejor que el cultivo autótrofo con pulsos de CO₂ debido que presenta una combinación de crecimiento heterótrofo y autótrofo, pero el costo de la glucosa es alto y el medio de cultivo es propenso a la contaminación de microorganismos externos y debe estar esterilizado.

En los cultivo bajo crecimiento mixotrófico, se observó una mayor tasa de crecimiento específica y una mayor concentración final de biomasa en el tratamiento con menor concentración de glucosa (0.5 % p/v).

El mejor ciclo de luz/oscuridad a partir de las tasas de crecimiento específica y concentración final de biomasa fue el ciclo luz/oscuridad 12:12, debido a que no se produce un exceso de O₂ en el sistema, evitando así inhibiciones oxidativas en los sistemas fotosintéticos de las algas.

Se observó que la luz roja fue la mejor en los tres ciclos de luz/oscuridad como lo dice la literatura, independientemente de la duración y frecuencia de los pulsos de CO₂.

El crecimiento autótrofo mostró que el mejor tratamiento fue ciclo luz/oscuridad 12:12, luz roja y pulso de CO₂ cada 60 minutos durante 264 segundos.

5. RECOMENDACIONES

Se aconseja utilizar en cultivos mixotróficos fuentes orgánicas de carbono diferentes a la glucosa, para evitar la contaminación de microorganismos externos y elevados costos de la misma.

En los cultivos autótrofos se recomienda un flujo menor de CO₂ o un pulso con menor frecuencia para evitar la producción excesiva de O₂, durante los ciclos de mayor exposición a la luz.

BIBLIOGRAFIA

Acién Fernández, F. García Camacho, F. Sánchez Pérez, J. Fernández Sevilla, J. Molina Grima E. (1997). A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnol Bioeng* 55(5):701–714.

Bailey, J. E. and D. F. Ollis (1986) *Biochemical Engineering Fundamentals*. pp. 382-392. Mc Graw Hill Book Co., New York, NY, USA.

Becker EW (1988) Microalgae for human and animal consumption. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds) *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 222–256.

Becker EW. *Microalgae, Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, New York. (1994). Pág. 58-59.

Benson, B. C. Gutierrez W, M. T. Rusch K. A. (2007). The development of a mechanistic model to investigate the impacts of the light dynamics on algal productivity in a Hydraulically Integrated Serial Turbidostat Algal Reactor (HISTAR). *Aquacult Eng* 36: 198–211.

Berberoglu H, Yin J, Pilon L. (2007). Light transfer in bubble sparged photobioreactors for H₂ production and CO₂ mitigation. *International Journal of Hydrogen Energy* 32: 2273 – 2285.

Carlozzi, P. (2003). Dilution of Solar Radiation Through “Culture” Lamination in Photobioreactor Rows Facing South–North: A Way to Improve the Efficiency of

Light Utilization by Cyanobacteria (*Arthrospira platensis*). *Biotechnol Bioeng* 81(3):305-315.

Csogör, Z. Herrenbauer, M. Schmidt, K. Posten, C. (2001). Light distribution in a novel photobioreactor – modelling for optimization. *Journ Appl Phycol* 13: 325–333.

Dermoun D, Chaumont D, Thebault J, Dauta A (1992). Modelling of growth of *Porphyridium cruentum* in connection with two interdependent factors: Light and temperature. *Bioresource Technol.* 42: 113–117.

Estep MF, Hoering TC (1981) Stable hydrogen isotope fractionations during autotrophic and mixotrophic growth of Microalgae. *Plant Physiol* 67:474-477.

Evens, T.J., Chapman, D.J., Robbins, R.A., D'Asaro, E.A., (2000). An analytical flat-plate photobioreactor with a spectrally attenuated light source for the incubation of phytoplankton under dynamic light regimes. *Hydrobiologia* 434, 55–62.

Franco-Lara, E. Havel, J. Peterat, F. Weuster-Botz D. (2006). Model-Supported Optimization of Phototrophic Growth in a Stirred-Tank Photobioreactor. *Biotechn Bioeng.* Vol. 95, No. 6, 1177-1187.

Ghasem D. Najafpour. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. First edition, 2007. p 98-99.

Gliessman S. *Agroecología: Procesos ecológicos en agricultura sostenible*. Turrialba. C.R. :CATIE, 2002. Pag. 47. 359 p

Haass D, Tanner W (1974) Regulation of hexosa transport in *Chlorella vulgaris*. Plant Physiol 53:14-20.

Hartmurt K, Lichtenthaler L. Adaption and senescence of the photosynthetic Apparatus Changes in Pigment Composition, Chlorophyll fluorescence Parameters and photosynthetic activity. In Papageorgiou G, Govindjee(eds.) Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Springer, 2004, Chapter 28, p 713-736.

Hoshino K, Hamochi M, Mitsuhashi S, Tanishita K (1991) Measurements of oxygen production rate in flowing *Spirulina* suspension. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 89–93.

Hu Q, Zarmi Y, Richmond A (1998a) Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (cyanobacteria). Eur. J. Phycol. 33: 165–171.

Hu, Q., Faiman, D., Richmond, A., (1998). Optimal tilt angles of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors. J. Ferment. Bioeng. 85 (2), 230–236.

Jeon Y-C, Cho C-W, Yun Y-S. (2005). Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. Biochem Eng J ;27:127–31.

Karlander EP, Krauss RW (1966) Responses of heterotrophic cultures of *Chlorella vulgaris* beyerinck to darkness and light I. Pigment and pH changes. Plant Physiol 41:1-6.

Kok, B. (1953) Experiments on photosynthesis by *Chlorella* in flashing light, pp. 63-75. In: Burlew, J. S. (ed). *Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant*. Carnegie Institution of Washington Publication, Washington, DC, USA.

Lee C. (1999). Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 4, 78-81.

Liang Y. Sarkany N. Cui Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett.* 31:1043–1049.

Lopes J, Gimenes SC, Ferreira LL, Franco T (2008) Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors *Elsevier*.

Lu Y, Zhai Y, Liu M, Qingyu Wu Q. (2009) Biodiesel production from algal oil using cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as feedstock. *J Appl Phycol* DOI 10.1007/s10811-009-9496-8.

Martinez F, Orus MI (1991) Interaction between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 101. *Plant Physiol.* 95: 1150–1155.

Miao, X., Wu, Q., 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J. Biotechnol.* 110, 85–93.

Molina Grima, E., Fernández Sevilla, J.M., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., (1996). A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense

microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *J. Biotechnol.* 45, 59–69.

Myers J. Burr GO. (1940) Studies on photosynthesis, some effects of light of high intensity on *Chlorella*. *J Gen Physiol*; 24:45-67.

Ogbonna J.C. and Tanaka, H. (1996) Night Biomass Loss and Changes in Biochemical Composition of Cells during Light/Dark Cyclic Culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Ferment. Bioeng.* 6: 558-564.

Ogbonna J. Soejima T. Tanaka H. (1999). An integrated solar and artificial light system for internal illumination of photobioreactors. *Journal of Biotechnology* 70: 289–297.

Ogbonna J y Tanaka H, (2000) Light requirement and photosynthetic cell cultivation – Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology.* 12: 207–218.

Park K. y Lee C. (2000). Optimization of Algal Photobioreactors Using Flashing Lights. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5: 186-190.

Park K-H, Lee C-G. (2001). Effectiveness of flashing light for increasing photosynthetic efficiency of micro-algal cultures over a critical cell density. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 6:189–93.

Pirt JS, Lee YK, Walach MR, Pirt MW, Balyuzi HHM, Bazin MJ (1983) A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 33B: 35–58.

Pulz, O. & Scheibenbogen, K. (1998). Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 59, 123–152.

Rabinowitch E. (1961) Spectral efficiency of photosynthesis, p. 274-298. In: Campbell, P. A. (ed.). *Medical and Biological Aspects of the Energies of Space*. Columbia University Press. New York, NY.

Richmond A. (1986) Cell response to environmental factors. In: Richmond A (ed), *Handbook of Microalgal Mass Culture*, CRC Press Boca Raton, FL. pp. 69–99.

Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A., Kopel, R., (1990). A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *J. Appl. Phycol.* 5, 327–332.

Richmond A, Boussiba S, Vonshak A, Kopel R (1993) A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *J. appl. Phycol.* 5: 327–332.

Richmond A (1996) Efficient utilization of high irradiance for production of photoautotrophic cell mass: A survey. *J. appl. Phycol.* 8: 381–387.

Richmond A. y Qiang H. (1997). Principles for Efficient Utilization of Light for Mass Production of Photoautotrophic Microorganisms *Applied Biochemistry and Biotechnolog.* Vol. 63-65.649-659.

Richmond A. y Zou N. (1999). Efficient utilisation of high photon irradiance for mass production of photoautotrophic micro-organisms. *Journal of Applied Phycology* 11: 123–127.

S.Sanchez, M.E.Martinez, M.T. Espejo, R. Pacheco, F. Espinola y G. Hodaifa. (2001). Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium. *Journal of Applied Phycology* 13: 443–449.

Sandnes J. Källqvist T. Wenner D. y Gislerød H. (2005). Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *Journal of Applied Phycology* 17: 515–525.

Sastre R. Csogor Z, Perner-Nochta I, Fleck-Schneider P, Posten C. (2007). Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors—A conceptual approach. *Journal of Biotechnology*. 132 : 127–133.

Schugerl, K. and K. H. Bellgardt (2000) *Bioreaction Engineering Modeling and Control*. Springer, Berlin, Germany.

Suh I-S, Lee S-B. (2001) Cultivation of a cyanobacterium in an internally radiating air-lift photobioreactor. *J Appl Phycol* 13:381–8.

Tredici MR, Carlozzi P, Zittelli GC, Materassi R (1991) A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Biores. Technol.* 38: 153–159.

Ugwu C y Aoyagi H. (2008). Influence of shading inclined tubular photobioreactor surfaces on biomass productivity of *C. sorokiniana*. *PHOTOSYNTHETICA* 46 : 283-285.

Watanabe, Y., de la Noue, J., Hall, D.O., 1995. Photosynthetic performance of a helical tubular photobioreactor incorporating the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 261–269

Weller, S. and J. Franck (1941) Photosynthesis in flashing light. J. Phys. Chem. 45: 1359-1373.

Wijanarko A. Dianursanti. Sendjaya A. y col. (2008). Enhanced *Chlorella vulgaris* Buitenzorg Growth by Photon Flux Density Alteration in Serial Photobioreactors. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 13: 476-482.

Yodochi T, Honda D, Higashihara T, Nakahara T. (1998) Optimisation of decosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacimum* SR21. Appl Microbiol Biotechnol; 49:72-76.

Yun Y. Park J. (2001). Attenuation of monochromatic and polychromatic lights in *Chlorella vulgaris* suspensions. Appl Microbiol Biotechnol 55:765–770.

ANEXOS

ANEXO A. MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS

Figura A.1 Inóculo de *Chlorella vulgaris*.



Para inocular la cepa UTEX 1803 utilizamos un fotobioreactor de 10 L cada columna de capacidad, con luz blanca y aireación constante.

Figura A.2 Montaje del cultivo autótrofo



Se utilizó la disposición mostrada en la foto para llevar a cabo el experimento con luces roja o blanca en los ciclos antedichos. Lo presentado aquí corresponde a un solo ciclo luz /oscuridad de los tres abarcados en el presente estudio.

Figura A.3 Montaje del cultivo mixotrófico.



En la foto se aprecia el montaje de los cultivos mixotróficos con glucosa (tres botellas en primer plano) junto con cultivos adicionales para producción de biomasa para futuros experimentos.

Figura A. 4 Glucosa utilizada



Se utilizó D (+) Glucosa anhidrida marca CARLO ERBA

Figura A. 5 Bala de CO₂



Se utilizó una bala de CO₂ de 20 Kg a caudal de 10 CFH, suministrada por PRAXAIR Oxigenos de Colombia.

Figura A. 6 Espectrofotometro



Se utilizó un espectrofotometro Spectroquant Pharo 300 de Merck para medir las absorbancias de las muestras en densidad óptica y clorofila.

Figura A.7 DeseCADor



Se utilizó un desecador de plástico con silica en su interior para absorber la humedad de los tubos de ensayo provenientes del horno.

Figura A.8 Balanza analítica



Se utilizó una balanza analítica de cuatro cifras decimales en gramos, con el fin de pesar el tubo con la muestra que sirvió de base para el cálculo del coeficiente de extinción molar.

Figura A.9 Centrifuga



Se utilizó una centrifuga PowerSpin™ MX con rotor de 24 tubos de 2 a 10 mL, para centrifugar las muestras de clorofila con el fin de romper las paredes celulares a 3.400 RPM durante 6 minutos.

Figura A.10 Horno



Se utilizó un horno Binder 500 a 104° Centígrados, para secar la muestra de 1 mL que se utilizo en el cálculo de coeficiente de extinción molar.

ANEXO B. DATOS EXPERIMENTALES

Tabla B.1 Cultivo mixotróficos con glucosa al 0.5% p/v

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,292	0,196	-1,625
1	0,575	0,397	-0,921
2	0,720	0,500	-0,691
2,5	1,814	1,277	0,245
3	2,911	2,056	0,721
3,5	3,193	2,257	0,814
4	3,260	2,304	0,834
4,5	3,357	2,373	0,864
5	3,558	2,516	0,922

Tabla B.2 Cultivo mixotrófico con glucosa al 1% p/v

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,292	0,196	-1,625
1	0,708	0,492	-0,708
2	0,894	0,624	-0,471
2,5	1,651	1,161	0,150
3	2,823	1,994	0,690
3,5	3,119	2,204	0,790
4	3,234	2,286	0,826
4,5	3,298	2,331	0,846
5	3,363	2,377	0,866

Tabla B.3 Cultivo mixotrófico con glucosa al 1.5% p/v

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,296	0,199	-1,611
1	0,511	0,352	-1,043
2	0,636	0,441	-0,818
2,5	1,419	0,997	-0,002
3	1,991	1,403	0,338
3,5	2,472	1,745	0,556
4	2,437	1,720	0,542
4,5	2,515	1,775	0,574
5	2,432	1,716	0,540

Tabla B.4 Cultivo autótrofo Luz Roja, Ciclo 12:12, pulso de 60 minutos por 264 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,151	-1,888
1	0,254	0,169	-1,773
2	0,367	0,25	-1,386
3	0,620	0,429	-0,844
4	0,868	0,605	-0,501
5	1,040	0,727	-0,317

Tabla B.5 Cultivo autótrofo Luz Roja, Ciclo 12:12, pulso de 15 minutos por 88 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,129	-2,040
1	0,252	0,147	-1,917
2	0,351	0,217	-1,526
3	0,562	0,367	-1,001
4	0,706	0,469	-0,756
5	0,959	0,649	-0,432

Tabla B.6 Cultivo autótrofo Luz Blanca, Ciclo 12:12, pulso de 60 minutos por 264 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,151	-1,888
1	0,311	0,210	-1,559
2	0,466	0,320	-1,138
3	0,483	0,332	-1,101
4	0,674	0,468	-0,759
5	0,805	0,561	-0,577

Tabla B.7 Cultivo autótrofo Luz Blanca, Ciclo 12:12, pulso de 15 minutos por 88 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,151	-1,888
1	0,264	0,176	-1,732
2	0,389	0,265	-1,325
3	0,569	0,393	-0,932
4	0,773	0,538	-0,619
5	0,947	0,661	-0,412

Tabla B.8 Cultivo autótrofo Luz Roja, Ciclo 24:0, pulso de 60 minutos por 264 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,151	-1,888
1	0,281	0,188	-1,666
2	0,312	0,210	-1,556
3	0,358	0,243	-1,412
4	0,476	0,327	-1,116
5	0,842	0,587	-0,532

Tabla B.9 Cultivo autótrofo Luz Roja, Ciclo 24:0, pulso de 15 minutos por 88 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,151	-1,888
1	0,271	0,181	-1,704
2	0,320	0,216	-1,529
3	0,266	0,178	-1,724
4	0,346	0,235	-1,447
5	0,411	0,281	-1,268

Tabla B.10 Cultivo autótrofo Luz Blanca, Ciclo 24:0, pulso de 60 minutos por 264 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,151	-1,888
1	0,275	0,184	-1,689
2	0,296	0,199	-1,611
3	0,352	0,239	-1,429
4	0,373	0,254	-1,369
5	0,533	0,367	-0,999

Tabla B.11 Cultivo autótrofo Luz Blanca, Ciclo 24:0, pulso de 15 minutos por 88 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,151	-1,888
1	0,281	0,188	-1,666
2	0,339	0,230	-1,469
3	0,326	0,220	-1,510
4	0,417	0,285	-1,253
5	0,454	0,311	-1,165

Tabla B.12 Cultivo autótrofo Luz Roja, Ciclo 18:6, pulso de 60 minutos por 264 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,151	-1,888
1	0,258	0,172	-1,756
2	0,294	0,198	-1,618
3	0,307	0,207	-1,573
4	0,388	0,264	-1,328
5	0,344	0,233	-1,453

Tabla B.13 Cultivo autótrofo Luz Roja, Ciclo 18:6, pulso de 15 minutos por 88 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,151	-1,888
1	0,257	0,171	-1,760
2	0,302	0,203	-1,590
3	0,323	0,218	-1,519
4	0,379	0,258	-1,352
5	0,431	0,295	-1,219

Tabla B.14 Cultivo autótrofo Luz Blanca, Ciclo 18:6, pulso de 60 minutos por 264 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,151	-1,888
1	0,302	0,203	-1,590
2	0,307	0,207	-1,573
3	0,308	0,208	-1,569
4	0,408	0,279	-1,276
5	0,392	0,267	-1,317

Tabla B.15 Cultivo autótrofo Luz Blanca, Ciclo 18:6, pulso de 15 minutos por 88 segundos.

Día	Absorbancia	x (g/L)	ln x
0	0,228	0,151	-1,888
1	0,267	0,178	-1,720
2	0,256	0,171	-1,765
3	0,298	0,200	-1,604
4	0,325	0,220	-1,513
5	0,362	0,246	-1,400

ANEXO C. COMPOSICIÓN DEL MEDIO BOLD

Soluciones Stock	Para 400 ml
(1). NaNO ₃	10.0 g
(2). MgSO ₄ .7H ₂ O	3.0 g
(3). NaCl	1.0 g
(4). K ₂ HPO ₄	3.0 g
(5). KH ₂ PO ₄	7.0 g
(6). CaCl ₂ .2H ₂ O	1.0 g

Soluciones Stock	Para un Litro
(7). Solución de elementos de traza (autoclave para disolverse): ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.82 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.44 g
MoO ₃	0.71 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.57 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.49 g
(8). H ₃ BO ₃	11.42 g
(9). EDTA	50.0 g
KOH	31.0 g
(10). FeSO ₄ .7H ₂ O	4.98 g
H ₂ SO ₄ (concentrado)	1.0 ml

Medio	Para un Litro
Soluciones Stock 1 - 6	10 ml cada una
Soluciones Stock 7 - 10	1 ml cada una

ANEXO D. BALANCE DE BIOMASA EN REACTOR DISCONTINUO

En la fase exponencial de crecimiento representa la tasa de crecimiento máxima, si X representa la concentración de biomasa en un reactor discontinuo, la acumulación de bioamasa con el tiempo (dx/dt) viene dado por la tasa de crecimiento (r_x) menos la tasa de muerte (r_d), como veremos a continuación :

$$r_x - r_d = dx/dt$$

Podemos reemplazar

$$r_x = \mu x \text{ y } r_d = \beta x$$

Como sabemos en la fase de crecimiento exponencial, la tasa de crecimiento de biomasa es mucho mayor comparada con la tasa de muerte es decir $\mu x > > > \beta x$

Obtenemos

$$\mu x = dx/dt$$

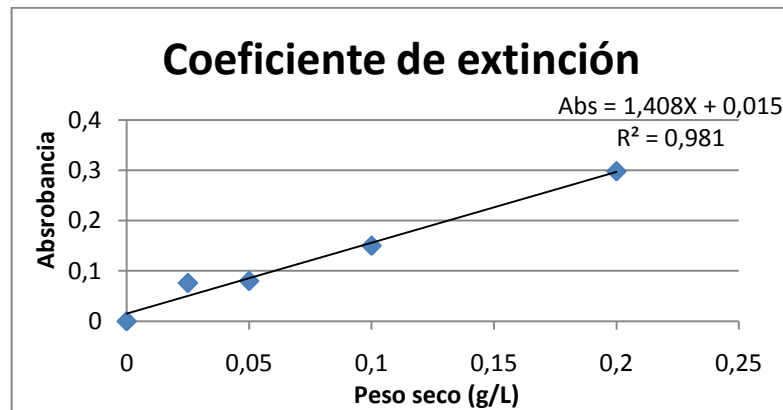
Al resolver esta ecuación diferencial obtenemos

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t$$

Ecuación que se utilizo para halla la tasa de crecimiento μ (d^{-1})

ANEXO E. CALCULO DEL COEFICIENTE DE EXTINCION

Peso (g)	Absorbancia
0	0
0,200	0,298
0,100	0,150
0,050	0,080
0,025	0,076



Método por el cual se obtuvo la ecuación $Abs = 1.408 X + 0.015$ que se utilizó para hallar las concentraciones (g/L) por Densidad Óptica.