

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN
LA DEPOSICIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS PRESENTES EN
CHLORELLA VULGARIS UTEX 1803 PARA LA VALORIZACIÓN DE LA
BIOMASA.**

Janet Bibiana García Martínez

Mónica Tatiana Sarmiento Muñoz

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA
2012**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN
LA DEPOSICIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS PRESENTES EN
CHLORELLA VULGARIS UTEX 1803 PARA LA VALORIZACIÓN DE LA
BIOMASA.**

Janet Bibiana García Martínez

Mónica Tatiana Sarmiento Muñoz

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Químico**

Directores

Ph. D Viatcheslav Kafarov

M.Sc. Crisóstomo Barajas

Codirector

Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano

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

2012

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser el motor de nuestras vidas, y por darnos una segunda oportunidad de cumplir nuestros sueños.

A la Universidad Industrial de Santander por habernos brindado una formación integral desde sus diferentes escenarios.

A la escuela de ingeniería química por permitirnos recibir enseñanzas de unos verdaderos maestros con una excelente calidad humana.

A nuestros compañeros de carrera por su compañía y apoyo incondicional durante el desarrollo de la misma.

Al Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES) por su colaboración para el desarrollo de este proyecto.

A todos los compañeros del grupo de investigación, a nuestro codirector Andrés Barajas, a las compañeras de Biología en especial a Linda Duran por su constante apoyo y sinceridad.

Dedicatoria

Les dedico este logro a mis padres Alberto García y Miriam Martínez por ser los artifices de este sueño que hoy se hace realidad, por ser la motivación que alguna vez perdí y el impulso para seguir adelante, por estar conmigo en el momento más duro de mi vida y no dejarme nunca desfallecer.

A mi hermana Leidy García por ser mi constante amiga y mi más grande apoyo, por acompañarme y cuidarme en todo momento, por darme el aliento que a veces sentía perdido, y por ser la mejor enfermera que nunca hubiera podido tener.

A mi hermano Edison García por su apoyo y amor, por su ternura y eterno respeto, por ser mi compañero en largas noches y darme dos razones más para seguir adelante: Jerónimo y Matías.

A Naira Dávila por ser más que una fiel amiga, por convertirse en mi hermana y estar siempre conmigo.

A todos mis amigos por su constante preocupación y apoyo, especialmente a Tatiana Sarmiento, Ronald Hurtado, Linda Duran, Alejandra Álvarez y Hugo Orozco.

Y a todos los demás que me apoyaron de una u otra manera, a todos ellos gracias.

Bibiana Gracia

Dedicatoria

A Dios, Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre María Teresa Muñoz Calderón por haberme educado y soportar mis errores. Gracias a tus consejos, por el amor que siempre me has brindado, por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad. ¡Gracias por darme la vida!

A mi Padre Marco Antonio Sarmiento a quien le debo todo en la vida, le agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me brindó para culminar mi carrera profesional.

A mis hermanos Adriana Patricia por la confianza que siempre hemos tenido, Kelly Johanna por sus consejos y Rafael Antonio por su orientación constante.

A mis amigos Bibiana, Ana Milena, Jherson, Oscar Leonardo, Adriana, Sarita y Ronald por su cariño, colaboración y compañía, ustedes que se han convertido en mi segunda familia.

A mi tío Alvaro Sarmiento por abrirme las puertas de su casa y brindarme cariño como una hija más.

Tatiana Sarmiento.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA.....	19
1.1 Biomasa	20
1.2 Sistema de cultivo	20
1.3 Concentración de biomasa microalgal.....	21
1.4 Determinación de Clorofila total.....	21
1.5 Determinación de la tasa de consumo de nitrógeno	22
1.6 Obtención de Pigmentos.....	22
1.7 Análisis estadístico.....	23
2 RESULTADOS Y ANALISIS	24
2.1 Variación de la biomasa bajo diferentes condiciones de nitrato y acetato.....	24
2.2 Producción Pigmentos vs producción biomasa.....	27
2.3 Consumo de Nitrógeno en relación a la producción de pigmentos.....	30
2.4 Extracción de pigmentos.....	31
2.4.1 Optimización y condiciones para la producción de pigmentos.	33
2.5 Biomasa seca vs biomasa húmeda.....	36
3 CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
ANEXOS.....	46

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1: Productividad de biomasa para condiciones iniciales de acetato/nitrato.	24
Figura 2: Concentración de biomasa durante los días de cultivo, para las mejores productividades obtenidas en cada nivel de nitrógeno y comparadas con el cultivo control.	25
Figura 3. Concentración de biomasa, para las mejores productividades obtenidas en cada nivel de nitrógeno y acetato de sodio comparadas con el cultivo control.	26
Figura 4. Concentración de biomasa y clorofila para cada uno de los tratamientos al quinto día de tratamiento.	27
Figura 5: Cambios en la concentración de clorofila diaria para el tratamiento R5 y su relación con el porcentaje de nitrógeno consumido.	30
Figura 6: Producción de clorofila para cada uno de los tratamientos bajo diferentes condiciones de tiempo, temperatura, solvente.	32
Figura 7: Productividad de clorofila a para condiciones de acetato/nitrato	33
Figura 8: Temperatura más óptima para la producción de clorofila a.	34
Figura 9: Cambios en el contenido de clorofila a y clorofila b bajo diferentes condiciones de tiempo, solvente, temperatura.....	35
Figura 10: Relación biomasa húmeda vs. Biomasa seca para la extracción de pigmentos.	36

LISTA DE ANEXOS

□ ANEXO A. DISEÑO EXPERIMENTAL	46
□ ANEXO B. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN	47

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN LA DEPOSICIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS PRESENTES EN *CHLORELLA VULGARIS* UTEX 1803 PARA LA VALORIZACIÓN DE LA BIOMASA.*

AUTORES: Janet Bibiana García Martínez, Mónica Tatiana Sarmiento Muñoz**

PALABRAS CLAVES: Microalga, *Chlorella Vulgaris*, Relación C/N, Pigmentos

Los pigmentos derivados de cultivos microalgales (Clorofila *a*, *b* y carotenoides) han adquirido gran importancia a nivel de la industria alimentaria, tratamientos farmacéuticos y cosmética, sin embargo pocos estudios se enfocan en la maximización de la productividad de estos. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la relación carbono/nitrógeno en la deposición de pigmentos fotosintéticos presentes en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 como método para la valorización de la biomasa. En la primera etapa se realizaron cultivos mixotróficos con diferentes concentraciones de acetato (5, 10 y 20mM), y nitrato de sodio (0,97, 1,94 y 2,94mM) durante 5 días. Por último, se modificó la extracción de pigmentos mediante la variación de temperatura, solvente y tiempo. Los resultados obtenidos muestran que la mayor producción de biomasa (0,838 g/L) se dio en el tratamiento R3 y la mayor producción de pigmentos se dio en R5 (0,417 g/L); sin embargo, el más productivo fue R7, donde se obtuvo 0,079 g de clorofila / g de biomasa. Por otro lado, para la extracción de pigmentos, las mejores condiciones fueron Temperatura entre 55°C y 61.73°C, Solvente: 60 mL de etanol y Tiempo: 4 h. Sin embargo, tanto el tiempo como la cantidad de solvente no tienen un efecto significativo, siendo solo significativa la temperatura; por otro lado, la extracción es más eficiente si la biomasa se encuentra en base húmeda.

* Trabajo de grado

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

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE EFFECT OF THE RELATIONSHIP CARBON/NITROGEN DEPOSITION OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS PRESENT IN *CHLORELLA VULGARIS* UTEX 1803 FOR THE VALORIZATION OF BIOMASS.*

AUTHORS: Janet Bibiana García Martínez, Mónica Tatiana Sarmiento Muñoz**

KEYWORDS: Microalgae, *Chlorella vulgaris*, relationship C/N, pigments,

Pigments derived from microalgal crops (chlorophyll *a*, *b* and carotenoids) have acquired mayor importance at the food and pharmaceutical industry, specially on treatments and cosmetics; however, few studies focuses on maximization of pigments production. In this study we assessed the carbon/nitrogen ratio at the deposition of photosynthetic pigments present in *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 as a method for the valorization of biomass. In the first stage, *C. vulgaris* was cultured mixotrophically using a variation on carbon source (sodium acetate: 5, 10 and 20 mM), and nitrogen source (sodium nitrate: 0,97; 1,94 and 2,94 mM) within 5 days. At the second stage, pigment extraction was modified through the variation of temperature, solvent and time. Results shows that the highest biomass production (0,838 g/L) was at the R3 treatment, but the highest pigment production occurred in R5 (0,417 g/L); However, the most productive was R7, earning 0,079 g chlorophyll/g of biomass. On the other hand, the best conditions for pigments extraction, were temperature between 55 ° C and 61,73 ° C, 60 mL of ethanol and 4 h; however, time and solvent does not have a significant effect, being the temperature the only significant variable; but, the extraction is more efficient if the biomass is on wet base

* Research project

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

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos unicelulares que utilizan la luz y dióxido de carbono como energía, con una producción de biomasa fotosintéticamente más eficiente que las plantas [25,46]. Uno de sus principales usos es la producción de alimentos y farmacéutica, además poseen gran potencial para la producción de biocombustibles renovables como biodiesel, biohidrógeno y biogás, ya que algunos de estos microorganismos pueden acumular 70% o más de su biomasa seca como hidrocarburos [10].

Trabajos como el de González *et al* (2011) [18], basado en el desarrollo de Biorefinerías teniendo como materia prima la biomasa de microalgas, señalan que la producción de esta es poco rentable para la obtención de biodiesel por sí solo, por lo cual se hace necesario valorizar integralmente la totalidad de la biomasa generada, mediante el aprovechamiento de los diferentes subproductos obtenidos; dentro de estos se incluyen tanto carbohidratos, proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y pigmentos [15].

La clorofila es un compuesto químico de interés comercial que puede extraerse de la biomasa microalgal, puede ser utilizada como un agente colorante para alimentos, además posee propiedades antioxidantes y antimutagénicas [17]. Este producto es extraído desde la biomasa a partir de solventes orgánicos que penetran a través de la membrana celular disolviendo los lípidos, así como las lipoproteínas de las membranas del cloroplasto [23]. Si se asume que las microalgas son fábricas productoras de pigmentos, se debe entonces considerar la célula como una planta de producción y los plástidos (que es donde están contenidos los pigmentos) como los reactores principales del proceso.

Las especies del género *Chlorella* son de gran interés en la investigación debido a que sus tasas de crecimiento son relativamente rápidas y por poseer un alto contenido lipídico [35]. La microalga *Chlorella* posee un alto contenido de clorofilas, proteínas, vitaminas y muchos carotenoides, tales como luteína, β -carotenoides y astaxantina [9].

Se ha determinado que el contenido de pigmentos fotosintéticos está influenciado por la limitación de factores como la falta de nitrógeno, escases de nutrientes y la no uniformidad en la incidencia lumínica, limitando así la fijación de dióxido de carbono y por consiguiente la velocidad de crecimiento de las microalgas [19,44]; por esto, se ha implementado el uso de cultivos mixotróficos de microalgas que además de la fotosíntesis pueden crecer mediante el uso de sustratos orgánicos como fuente de energía y carbono para el crecimiento celular [28]. La mixotrofia fue introducida para reducir los costos de producción, y facilitar el suministro de una fuente de proteína barata para alimentos en áreas de deficiencia de proteína en el mundo [34].

Según Bhola *et al* (2011) [3], sugieren que la cantidad y calidad de biomasa algal y lípidos pueden optimizarse variando los nutrientes del medio; que incluyen la concentración de CO₂, nitrógeno y fosfatos. Entre los diferentes nutrientes necesarios para el crecimiento microalgal, tanto el nitrato como el fosfato tienen un papel central en la fisiología del crecimiento celular. Se ha reportado que las fuentes de nitrógeno son un factor de estrés para el crecimiento de algas donde el suministro limitado podría cambiar significativamente la composición del organismo [5], incluyendo una disminución en la clorofila y proteínas, afectando la capacidad fotosintética celular y la tasa de decrecimiento celular [33].

Se han realizado esfuerzos para reducir los costos de producción de pigmentos de fermentación en comparación con los costos de pigmentos sintéticos y pigmentos extraídos de fuentes naturales. Los desarrollos tecnológicos mejoraran la economía de la producción de pigmentos, aislando nuevos o creando mejores microorganismos mediante la mejora de los procesos [5]. Comercialmente se puede encontrar clorofila líquida usada como suplemento vitamínico con un valor de unos 30 dólares por litro aproximadamente [30]. La astaxantina (carotenoide) ha sido producida principalmente por el método químico sintético a una escala industrial, teniendo un valor comercial de 2500 a 3500 dólares americanos por kilogramo. En el mercado, el carotenoide microalgal está en competencia con los pigmentos sintéticos. Aunque las formas sintéticas son mucho menos costosas

que los naturales, el carotenoide microalgal tienen la ventaja de suministrar isómeros naturales en su relación natural [32].

Las técnicas de extracción de pigmentos tradicional tienen desventajas, tales como el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos tóxicos, tiempos de extracción prolongados, exposición de los extractos al calor excesivo, luz y oxígeno. En la literatura se encuentra una gran variedad de recomendaciones, algunas de ellas contradictorias para la extracción de los pigmentos fotosintéticos, se requieren diferentes metodologías, cada una de las cuales puede ser fuente de inexactitud y error. Dere *et al* (1998) [14] al realizar un determinación espectrofotométrica de clorofila y carotenoides utilizando diferentes solventes y microalgas sugieren, que la selección de método y el solvente va de acuerdo al tipo de pigmento y la especie utilizada, además menciona la importancia del rompimiento de las paredes celulares de la microalga para un mejoramiento en la extracción.

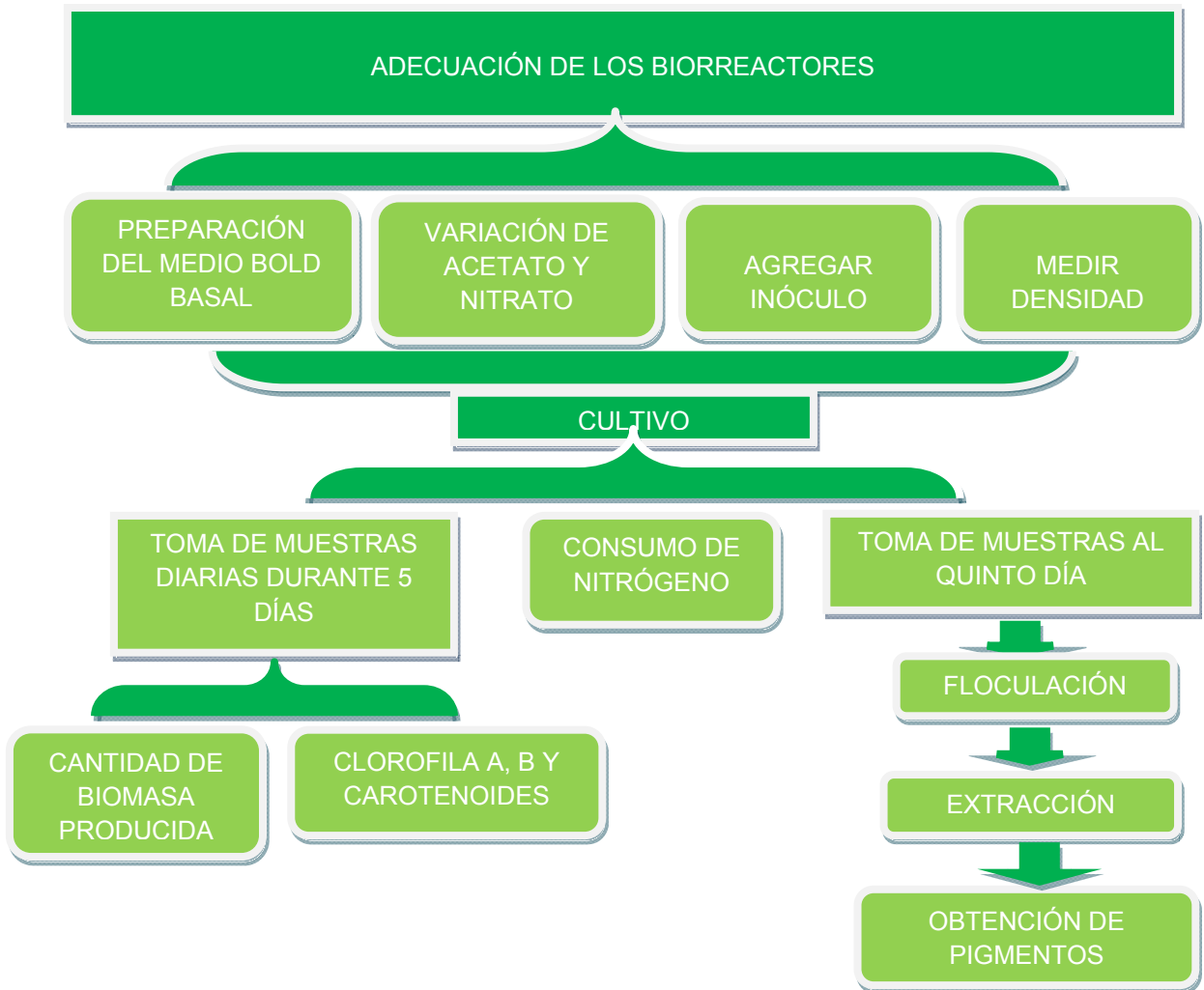
Según Dos Santos *et al.* (2003) [36], el término clorofila *a* debe abandonarse cuando la determinación de pigmentos no se realiza a través de métodos cromatográficos. Por lo tanto, recomiendan usar sólo clorofila o pigmentos totales, incluso si se utilizan ecuación tricromáticas; Wasmund *et al.* (2006) [45], en su trabajo titulado optimización y extracción de muestras de clorofila, recomiendan utilizar etanol en lugar de acetona como disolvente, Hosikian *et al.* (2010) [24] realizaron una revisión sobre los aspectos de ingeniería de procesos de la extracción de clorofila *a* partir de microalgas, en donde recomienda utilizar Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) debido a su precisión para fraccionar y cuantificar clorofila junto con sus derivados, Simon & Helliwell (1998) reportan que hay parámetros que afectan la eficiencia de la extracción con disolventes orgánicos, que incluyen las condiciones de cultivo de las microalgas, el contenido de disolventes orgánicos utilizados, la duración de la extracción [37]. Cabe destacar que la selección del disolvente para la extracción es una cuestión muy importante ya que determina el grado de afinidad con la composición química

de las sustancias que se extraen, además el disolvente también desempeña un papel importante en la lisis celular [24].

Es por ello que en este trabajo de investigación se evaluará el efecto de la relación carbono/nitrógeno en la deposición de pigmentos fotosintéticos presentes en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 para la valorización de la biomasa, mediante el uso de etanol como disolvente de extracción, además de la relación de las variables temperatura, cantidad de solvente y tiempo en el proceso de extracción.

1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA.

Inicialmente se realizó el estudio de métodos existentes e investigaciones realizadas en el campo de cultivo algal y la extracción de sus pigmentos fotosintéticos. Se seleccionó el alcance, los métodos y procedimientos a aplicar; seguidamente se aplicó la metodología a una serie de cultivos de prueba, permitiendo ajustar las variables como: 1. Biomasa 2. Concentración de Acetato de sodio /Nitrato. 3. Temperatura. 4. Tiempo. 5. Cantidad de solvente.



Fuente: Los autores

1.1 Biomasa

El microorganismo utilizado fue *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, obtenida de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, Tex, USA).

1.2 Sistema de cultivo

Inicialmente, esta cepa permaneció en crecimiento en fotobiorreactores plásticos de 2 Litros de capacidad, a escala de laboratorio, en medio de cultivo *Bold basal* (MBB), Cada litro de medio de cultivo está compuesto por: macronutrientes (Moles) NaNO_3 ($2,94 \times 10^{-3}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,04 \times 10^{-4}$) NaCl ($4,28 \times 10^{-4}$), K_2HPO_4 ($4,31 \times 10^{-4}$), KH_2PO_4 ($1,29 \times 10^{-3}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,70 \times 10^{-4}$) y micronutrientes (g/L) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,07 \times 10^{-5}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($7,28 \times 10^{-6}$), MoO_3 ($4,93 \times 10^{-6}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,29 \times 10^{-6}$), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,68 \times 10^{-6}$), H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-4}$), EDTA ($1,71 \times 10^{-4}$), KOH ($5,53 \times 10^{-4}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-5}$) y condiciones de temperatura de $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, pH neutro, aireación permanente y ciclo luz-oscuridad 12:12h, sin ningún suministro complementario de CO_2 considerándose este cultivo como tratamiento control.

Posteriormente se implemento un diseño experimental (Tabla 1) donde se varió tanto 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), cada uno con su original y dos replicas; además se realizó un cultivo control (0mM acetato de sodio, 2,94mM de nitrato). Finalmente se realizaron mediciones en la jornada de la mañana y la tarde durante cinco días consecutivos.

Tabla A1. Diseño experimental de los cultivos de *C. vulgaris*

ACETATO DE SODIO				
		5 mM	10 mM	20 mM
NITRATO DE SODIO	0,97 mM	R1	R2	R3
	1,94 mM	R4	R5	R6
	2,94mM	R7	R8	R9

Fuente: Los autores

1.3 Concentración de biomasa microalgal.

Para las mediciones de concentración de biomasa se realizó durante los cinco primeros días, se tomó una muestra de 5 ml de cada cultivo a las 9 am (Fase oscuridad), y 4 pm (Fase día). Posteriormente, se midió la densidad óptica de cada muestra a una longitud de onda de 500nm. La densidad óptica (D.O) fue correlacionada con la cantidad de biomasa (g L^{-1}) de acuerdo a (Anexo 3):

$$C_B (\text{g/L}) = 0,759 \cdot \text{DO}_{500} - 0,131$$

1.4 Determinación de Clorofila total

Se tomó 10 ml de muestra de cada fotobioreactor, se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos (Centrifuga PowerSpin™ MX). Luego se extrajo el sobrenadante con el fin de eliminar el medio presente. El pellet (biomasa resultante) fue suspendido en 3 ml de etanol al 99%. La mezcla se llevó a calentamiento en baño maría a una temperatura de 80°C durante 5 minutos. Luego de un posterior enfriamiento hasta alcanzar temperatura ambiente se agregó 2 ml adicionales de etanol. La concentración de clorofila en el sobrenadante se calculó leyendo la absorbancia (A) del pigmento en el espectrofotómetro (Spectroquart Pharo 300 Merck) a una longitud de onda de 645 y 663 nm. La relación de la cantidad de clorofila (a+b) en el sobrenadante C_{a+b}

(mg/L) con la densidad óptica fue correlacionada de acuerdo a la ecuación de Becker (1994) [2]

$$\text{Clorofila } (a + b) = (4 * A_{663}) + (25,5 * A_{645})$$

1.5 Determinación de la tasa de consumo de nitrógeno

Para la cuantificación de Nitrógeno (NO₃-N) se recurrió al libro métodos estándar para la determinación de aguas residuales [13]. Siguiendo este procedimiento se tomaron 50 ml de medio de cultivo libre de células y se agregó 1 ml de solución de HCL 1 N y se agitó vigorosamente, después de 10 minutos, finalmente la muestra se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 220 nm.

1.6 Obtención de Pigmentos

Después de cinco días de crecimiento del cultivo se pasaron al horno (Marca WTC binder, 115 V 60 Hz, 1,20 kW) a 80°C, durante 12 h lo que favorece la floculación de la biomasa y permite obtener biomasa en estado húmedo. Posteriormente, se aisló la biomasa húmeda y se guardó en un refrigerador. Se elaboró un diseño experimental central compuesto DCC, en el programa STATISTICA 7, teniendo en cuenta que es necesario el análisis de tres factores relevantes en el proceso: temperatura, tiempo y cantidad de solvente; además este tipo de diseño permite analizar puntos axiales y centrales (máximos, mínimos); esto represento un diseño de 17 experimentos, los cuales fueron aplicados a los 9 diferentes cultivos e incluso al tratamiento control, dando como resultado 170 corridas experimentales.

Posteriormente, se pesó 1 gramo de la biomasa en base húmeda para cada tratamiento en una balanza analítica Serie 320XB, marca Precisa Gravimetrics, para llevar a cabo el diseño experimental según ANEXO 1.

Para determinar la concentración de clorofilas, se aplicó un método espectrofotométrico, midiendo absorbancia aplicando las ecuaciones 1, 2 y 3 [27] teniendo en cuenta el solvente etanol utilizado para la extracción. Donde, C_a es la concentración de clorofila a en la muestra, C_b , la concentración de clorofila b, y $C_{(x+c)}$, concentración de carotenoides totales. Y están dadas en $\mu\text{g/ml}$ de extracto:

$$c_a (\mu\text{g/ml}) = 13,36A_{664,1} - 5,19A_{648,6} \quad (1)$$

$$c_b (\mu\text{g/ml}) = 27,43A_{648,6} - 8,12A_{664,1} \quad (2)$$

$$c_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 2,13c_a - 97,64c_b)/209 \quad (3)$$

1.7 Análisis estadístico

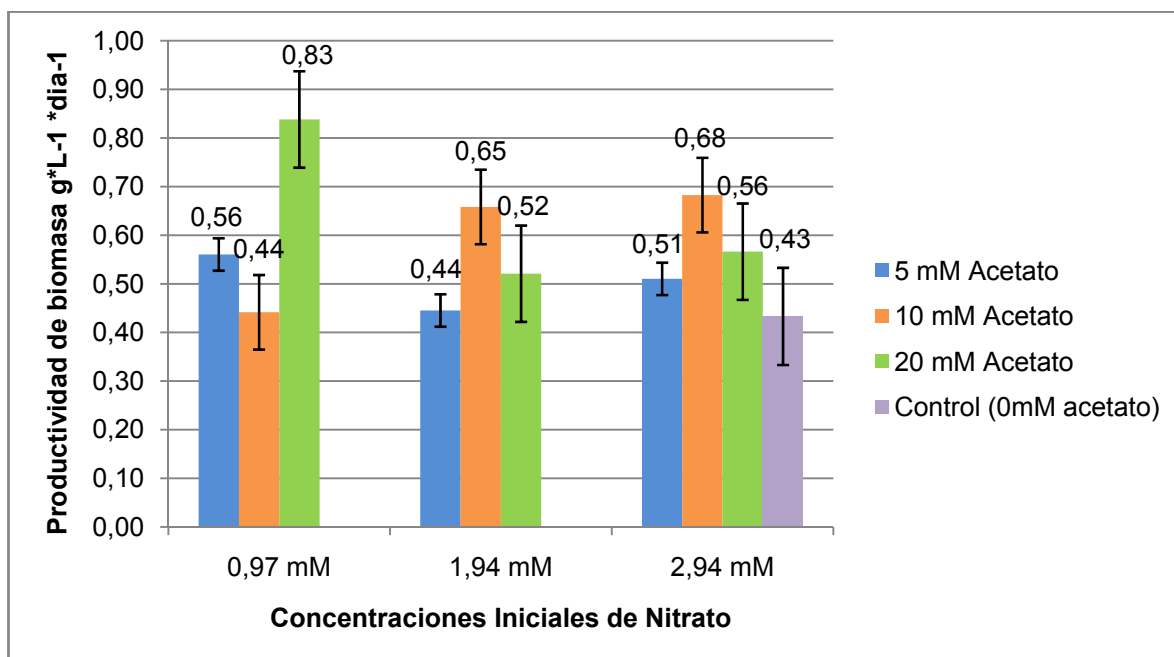
Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante los paquetes estadísticos STATISTICA 7.0 y STATGRAPHICS centurión XVI.I. Se realizaron Test de normalidad (Shapiro Wilk) y Análisis de varianzas (ANOVA) con el fin de establecer diferencias y similitudes entre las diferentes variables analizadas. Para determinar diferencias significativas en los resultados ($p \leq 0,05$). Cuando se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba Scheffé ($\alpha = 0,05$) de comparaciones múltiples entre medias [38].

2 RESULTADOS Y ANALISIS

2.1 Variación de la biomasa bajo diferentes condiciones de nitrato y acetato

En la figura 1 se comparan las productividades de biomasa después de cinco días de cultivo, a partir de las concentraciones iniciales de acetato/nitrato. Se encontró que una concentración de nitrato (0,97mM) y alta de acetato (20mM) (R3) favoreció la productividad de biomasa comparada con el tratamiento que contenía las concentraciones más altas de acetato de sodio (20mM) y nitrato (2,94mM) (R9).

Figura 1: Productividad de biomasa para condiciones iniciales de acetato/nitrato.

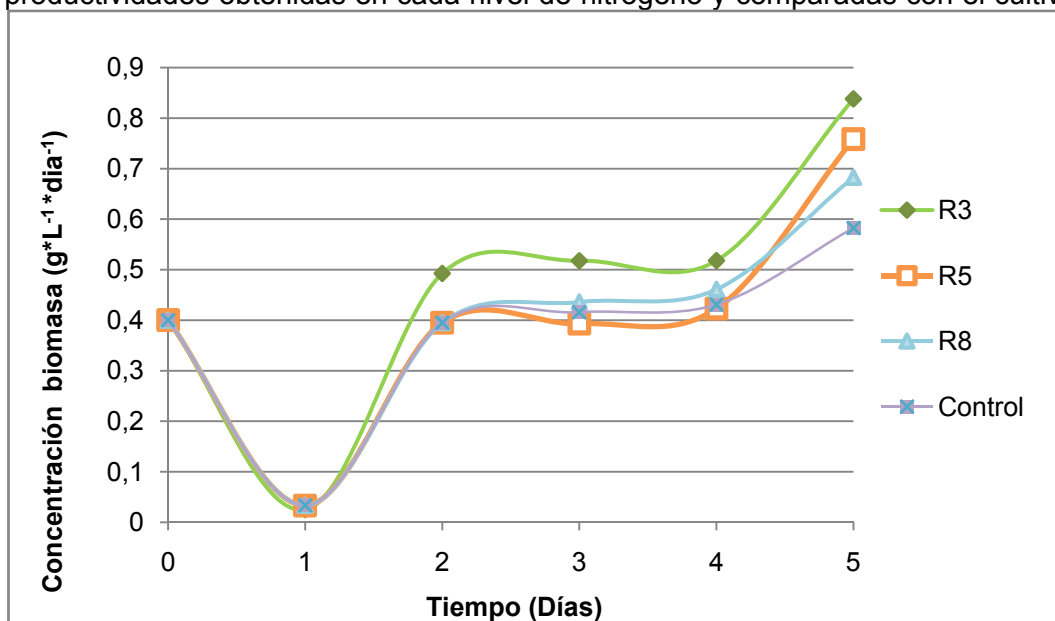


Fuente: Los autores.

El tratamiento R3, obtuvo la mayor producción de biomasa con respecto a los tratamientos R1, R2, que contenían la misma concentración de nitrógeno (0,97mM), esta baja producción de biomasa está relacionada con la deficiencia de nitrógeno el cual afecta considerablemente el crecimiento ya que limita la

formación de aminoácidos que son los bloques constructores de las proteínas, las cuales a su vez están involucradas en muchos de los aspectos del crecimiento[29]; sin embargo para este estudio en el caso de R3, este tratamiento se ve influenciado además por una concentración alta de acetato (20mM) lo que genera una relación Carbono/ Nitrógeno optima para una alta producción de biomasa, en comparación con cultivos autotróficos, los cuales logran $1,5 \text{ gL}^{-1}$ después de 15 días de cultivo. En nuestro estudio se muestra que el tratamiento R2 obtuvo la menor productividad de biomasa, este presentaba la menor concentración de nitrato, su óptimo crecimiento puede verse afectado también por factores como la luz, el pH y la temperatura [39].

Figura 2: Concentración de biomasa durante los días de cultivo, para las mejores productividades obtenidas en cada nivel de nitrógeno y comparadas con el cultivo control.

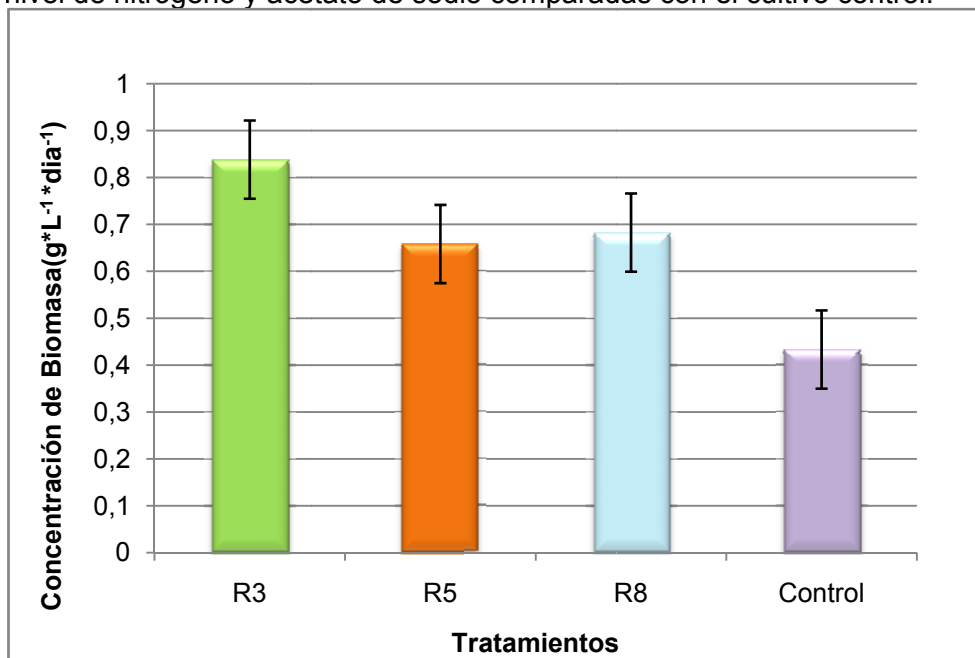


Fuente: Los autores.

Inicialmente, en todos los tratamientos se observa una disminución marcada en la concentración de biomasa, se debe en principal medida a la cantidad de acetato utilizado en los diferentes tratamientos, el cual generó un cambio brusco en el pH del medio (datos no mostrados), desencadenando una inhibición de algún proceso fisiológico [42]. Además se observa un aumento de biomasa con el transcurrir de

los días, por lo cual se hace evidente que la relación 0,97mM de nitrato y 20 mM de acetato (R3) fue superior en producción de biomasa durante el experimento (Figura 3). Los demás tratamientos mostraron un comportamiento similar al cultivo control. Sin embargo en todos los tratamientos se nota un incremento en la concentración de biomasa en el segundo día y son superiores al control al concluir el periodo de experimentación R5 (0,65 g/L), R8 (0,68 g/L), Control (0,43 g/L).

Figura 3. Concentración de biomasa, para las mejores productividades obtenidas en cada nivel de nitrógeno y acetato de sodio comparadas con el cultivo control.

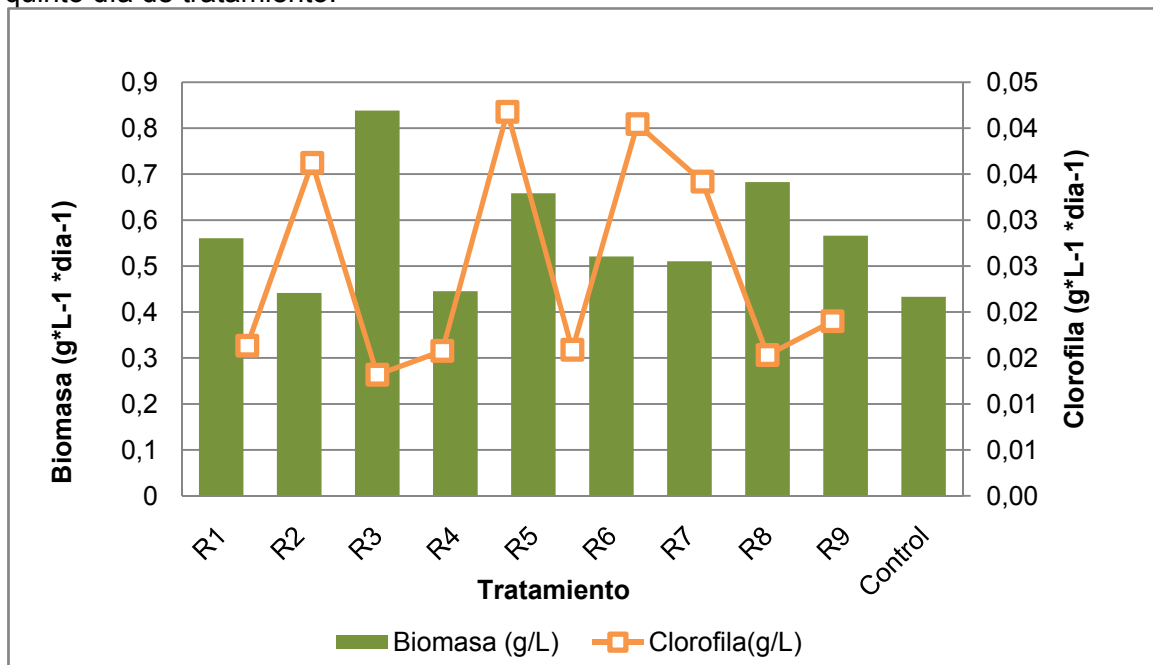


Fuente: Los autores.

En la figura 3, se muestran los tratamientos con mayor productividad de biomasa y se comparó con la productividad alcanzada mediante el cultivo autotrófico o control. Este último contenía 2,94mM de nitrógeno (nitrato) como se indica en el medio *Bold Basal* y 0 mM de carbono orgánico (acetato) en este se obtuvo la menor productividad de biomasa, tal como se encontró en el trabajo de Ogbonna *et al.* (2001), donde la tasa de crecimiento celular fue menor en los cultivos autotróficos en comparación con los cultivos heterotróficos y mixotróficos en *Euglena gracilis* [31].

2.2 Producción Pigmentos vs producción biomasa.

Figura 4. Concentración de biomasa y clorofila para cada uno de los tratamientos al quinto día de tratamiento.



Fuente: Los autores.

En la figura 4 se observa la producción de biomasa y concentración promedio de clorofila total ($a+b$) en $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ en los cinco días de cultivo, para las condiciones iniciales de acetato/nitrato. Los mayores valores de producción de biomasa (0,83 y 0,56 g/L, comparado con el control: 0,43g/L), se obtuvieron en R3 y R8 respectivamente, además estos tratamiento presentan la mayor concentración de acetato (20 mM) por lo cual la concentración del acetato no presenta un efecto negativo; sin embargo, el uso de una fuente de carbono distinta al CO_2 puede disminuir la tasa fotosintética, lo cual se traduce en la disminución de pigmentos [47]. Esto se puede comprobar con los resultados obtenidos en este estudio, ya que la cantidad de biomasa producida con estos tratamientos no es dependiente de la cantidad de clorofila obtenida. En la Figura 4 se evidencia lo descrito anteriormente, ya que el tratamiento R3 posee una producción de 0,015 g de clorofila/g de biomasa; comparado con el tratamiento R7, el cual, con una

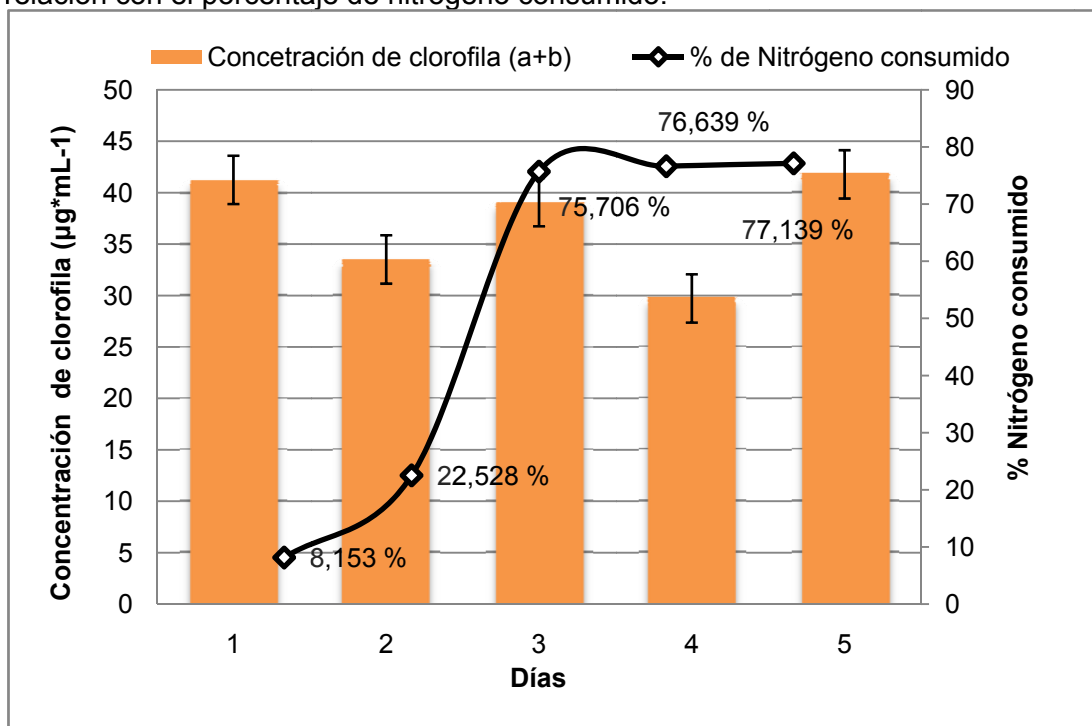
producción de biomasa de 0,51 g/L, obtiene una productividad de 0,079 g de clorofila/g de biomasa, la cual corresponde a la mayor productividad encontrada en este estudio. De igual forma, estos resultados son acordes a los obtenidos por Yang *et al.* (2000) en el cual plantean que los cultivos mixotróficos alcanzan mayores productividades celulares que los cultivos autotróficos; sin embargo, se produce una menor cantidad de pigmentos liposolubles, además, se espera que su concentración decaiga con el tiempo [47] debido a la rápida incorporación de carbono orgánico [8,16]; este fenómeno se debe principalmente a la fosforilación oxidativa del acetato incorporado mediante el ciclo de glioxilato, el cual produce CO₂ disponible para su uso en la fotosíntesis [12,41]. De igual forma, la productividad de biomasa fue mayor en los cultivos mixotróficos comparado con el cultivo autotrófico (Control), lo que ratifica que las células obtuvieron sus recursos de energía y carbono no solo por fotosíntesis del CO₂ presente en el aire, sino también de los aportados por la fosforilación oxidativa del acetato tal como se indica en la literatura [9], demostrando que las dos rutas metabólicas están activas. Estos resultados coinciden con los publicados por Syrett *et al.* (1963)[40] cuyos experimentos emplearon aire libre de CO₂ para los cultivos mixotróficos. lo cual regula la síntesis celular de clorofila para ahorrar energía; lo anterior se observa en el presente estudio (Figura anterior), donde la concentración de clorofila fue inferior en los cultivos con mayor concentración de acetato es el caso de R3,R6,R9, además en todos los tratamientos la concentración de clorofila fue cercana o mayor a la producida en el control, los resultados de este experimento mostraron una actividad fotosintética más alta de 0,04 g/l de clorofila, en 1,94 mM de Nitrato y 10 mM de acetato (R5).

La deficiencia de nitrógeno afecta aspectos de la fisiología de la célula tales como la formación de aminoácidos, lo cual a su vez limita la traslación del mRNA y por lo tanto se reduce la síntesis de proteínas. Por otra parte, la eficiencia del fotosistema II (PSII) disminuye inicialmente como una consecuencia de la disipación térmica de la energía de excitación absorbida en el lecho pigmentario,

derivando en una reducción de la tasa de fotosíntesis, lo cual a su vez lleva a una reducción en la tasa de respiración [1], esto afecta la capacidad fotosintética celular además de una reducción notable en la tasa de crecimiento [43]. En el presente estudio este comportamiento se observa en los tratamientos R2 para el cual se obtiene 0,441 g/L de biomasa con una producción un 8,20% de clorofilas y un consumo del 55,69% de nitrógeno, en contraste con el tratamiento R4 en donde se produjo 0,445 g/L de biomasa, 3,54 % de clorofila y 72,57% de consumo de nitrógeno. Tanto la clorofila *a* y *b* son pigmentos fotosintéticos celulares, los cuales a mayor concentración existirá una mayor fotosíntesis; sin embargo, esto no significa que la cantidad de clorofila por célula sea constante, pues en lo observado en R3, la biomasa aumentaba aún cuando la concentración de clorofila disminuía. Comparando la concentración de clorofila entre el cultivo control y R5, se observó que en el cultivo autotrófico (control) se obtuvieron concentraciones de clorofila $a + b = 0,019$ g/L comparado con el R5 (mixotrófico) clorofila $a + b = 0,041$ g/L, con una mejor producción de biomasa debido a la fuente de carbono orgánico; además, bajo condiciones óptimas de crecimiento los pigmentos antena absorben la luz y la convierten a energía química formando ATP y NADPH a través de la cadena de transporte fotosintético de electrones, esta energía es finalmente almacenada como almidón mediante la fijación del CO₂ a través del ciclo de Calvin [21].

2.3 Consumo de Nitrógeno en relación a la producción de pigmentos

Figura 5: Cambios en la concentración de clorofila diaria para el tratamiento R5 y su relación con el porcentaje de nitrógeno consumido.



Fuente: Los autores.

En la figura 5 se muestra la producción de clorofila total y el porcentaje de nitrógeno consumido en el tratamiento con mayor producción de clorofila obtenida durante los cinco días. El cultivo con mayor producción de clorofila (41,78 µg/ml) fue aquel con una relación de 10 mM Acetato de sodio: 1,94 mM Nitrato, y un consumo de nitrógeno del 77% al quinto día. Cuando *C. vulgaris*, empieza a consumir nitrógeno las concentraciones de clorofila y biomasa (Figura 5) también aumentan, pero, se observa una excepción en el segundo día donde hay una menor producción de biomasa y clorofila pese al consumo de nitrógeno 22,5% esto se debe en principal medida a la cantidad de acetato utilizado en los diferentes tratamientos, el cual generó un cambio brusco en el pH del medio

(datos no mostrados), y que bajo condiciones de estrés las células bajan su nivel normal de división celular pero, siguen su proceso de fotosíntesis [11]. La cantidad de clorofila en una célula puede cambiar debido a las condiciones climáticas variables y a los eventos de estrés. La composición de los pigmentos y la actividad fotosintética de las algas cambian continuamente durante el periodo de crecimiento y se adaptan a condiciones externas [26].

La clorofila es rica en nitrógeno, cada molécula contiene cuatro átomos de nitrógeno, se presumen que, cuando se agota el nitrógeno en el medio, la célula comienza a utilizar nitrógeno del pool intracelular para soportar la síntesis de material celular para mayor división celular. Al parecer la clorofila fue uno de los pools de nitrógeno intracelular más fácilmente accesibles y las células comenzaron a utilizarlas cuando se agotó el pool exterior de nitrógeno. Vale la pena notar que, la clorofila es el componente esencial del mecanismo fotosintético de algas verdes, que es responsable de capturar la energía solar y el CO₂ para generar el flujo metabólico para el crecimiento celular y acumulación de lípidos [16]. Las células acumulan grandes cantidades de moléculas de clorofila cuando la fuente de nitrógeno estuvo altamente disponible. Entonces, cuando se agotan las fuentes externas de nitrógeno, las células comenzaron a utilizar clorofilas como una fuente de nitrógeno intracelular [4].

2.4 Extracción de pigmentos.

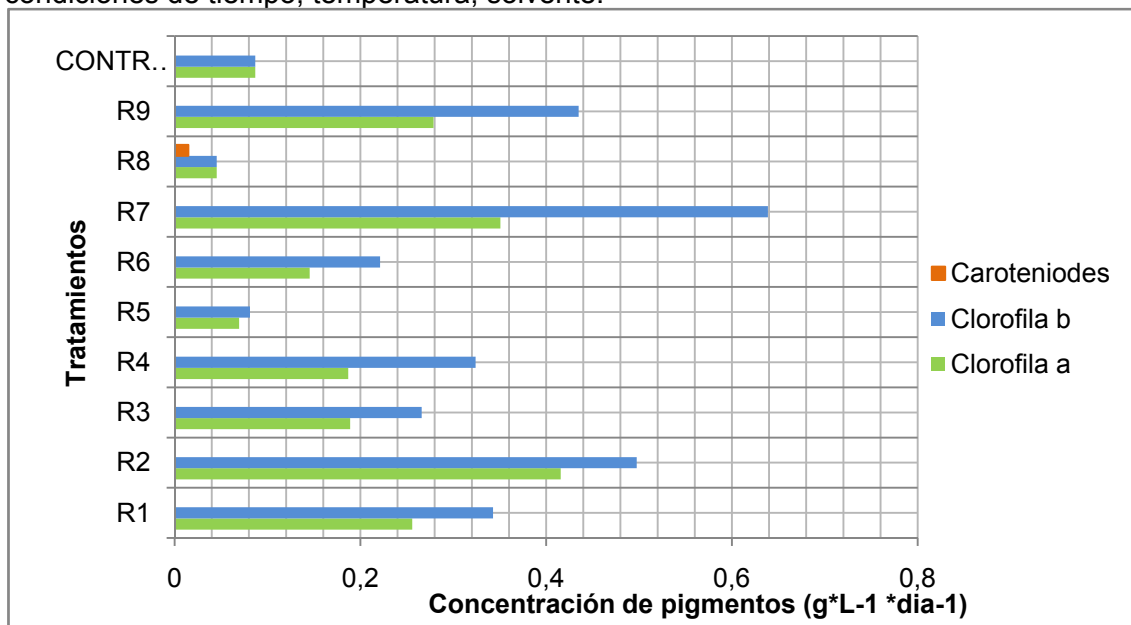
En la figura 6 se muestra los resultados de las extracciones propuestas para pigmentos donde se hace una variación en los parámetros de temperatura, tiempo y cantidad de solvente usados en la extracción, a demás se puede determinar cuáles tratamientos producen más pigmentos y que convenciones de variables son las más productivas en cuanto a cantidad de clorofila total.

La figura representa las diez diferentes variaciones de cultivos y su mayor productividad de pigmentos con una combinación específica de temperatura

tiempo y cantidad de solvente. Se determinó que de los tratamientos R2 y R7 se puede extraer una mayor cantidad de pigmentos con respecto al control.

De igual forma se destaca la producción de carotenoides únicamente en el tratamiento R8 (0,014%) a partir de 45°C, 4 h y 9,8 ml de etanol, además, la concentración de clorofila *a* y *b* en este tratamiento presentan bajos valores (Clorofila *a* = 0,04 g/L, Clorofila *b* = 0,045 g/L), con respecto al control.

Figura 6: Producción de clorofila para cada uno de los tratamientos bajo diferentes condiciones de tiempo, temperatura, solvente.



R1: T=45°C, S=60 ml, t=7,35 h **R2:**T=45°C,S=60ml,t=4 h. **R3:**T=61,73°C,S=60ml, t=4h.
R4: T=35°C, S=90 ml, t=4 h. **R5:** T=45°C, S=60 ml, t=4 h. **R6:** T=45°C, S=60 ml, t=4 h.
R7: T=45°C, S=60 ml, t=4 h. **R8:** T=45°C, S=9,8 ml, t=4 h. **R9:** =45°C, S=9,8 ml. t=4 h.
CONTROL: T=45°C, S=9,8 ml, t=4 h.

Fuente: Los autores.

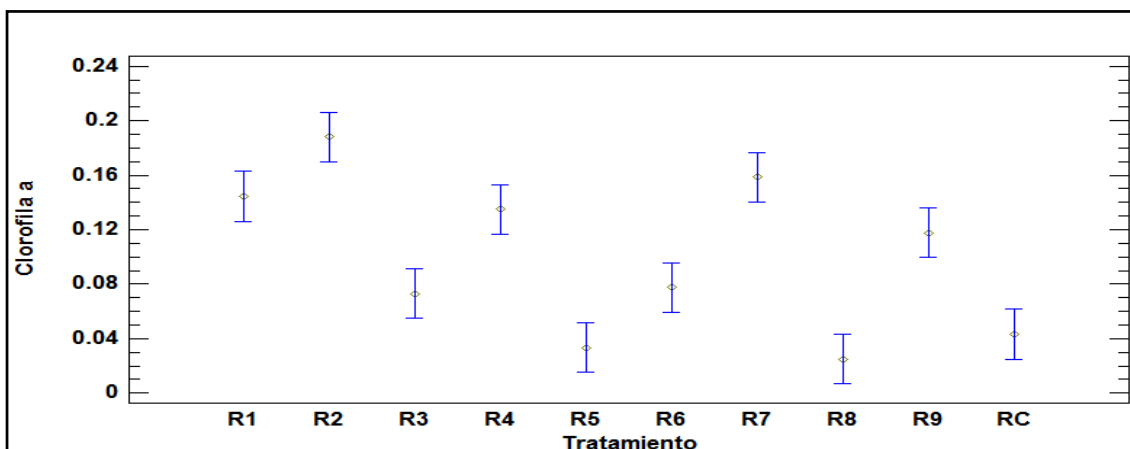
Según Dere *et al.* (1998) [14], el nivel de este pigmento podría ser diferente incluso en la misma especie y depende de diversas condiciones ambientales, ejemplos de esto se encuentran en especies como *Chlamydomonas nivalis* la cual sintetiza grandes cantidades de carotenoides bajo condiciones de estrés como limitación de nitrógeno y posiblemente irradiación solar elevada [6].

Haciendo una comparación entre ambos métodos empleados para la extracción de pigmentos, se encontró que con el método para la determinación de clorofila total el cual consiste en mediciones diarias, se obtuvo una concentración 0,041g/L de clorofila total, mientras que para el segundo método el cual se fundamenta en una variación de los parámetros, se encontró una concentración mayor de clorofila con un valor de 0,15 g/L, lo que implica una mejora de casi 4 veces en el proceso.

2.4.1 Optimización y condiciones para la producción de pigmentos.

Se realizó un análisis de varianza para determinar la importancia de las variables implicadas dentro del proceso de extracción de pigmentos fotosintéticos. Para este análisis estadístico se realizó una categorización de las variables, en donde: **1=** Valores mínimos, **2=** Valor medio, **3=** Valor máximo. Se encontraron diferencias significativas entre los valores de clorofila *a* obtenidos con los factores tratamiento ($p=0,0001$), temperatura ($p=0,0157$) la cual influyen positivamente en el sistema de extracción. No hubo diferencias significativas para volumen del solvente ($p=0,053$), tiempo ($p=0,087$). En todos los casos donde la prueba F resultó significativa, se empleó la prueba de rangos múltiples de Scheffé a nivel de significancia del 95%. Donde los tratamientos R2 y R7 presentaron la mayor producción de clorofila *a*. (Figura 7).

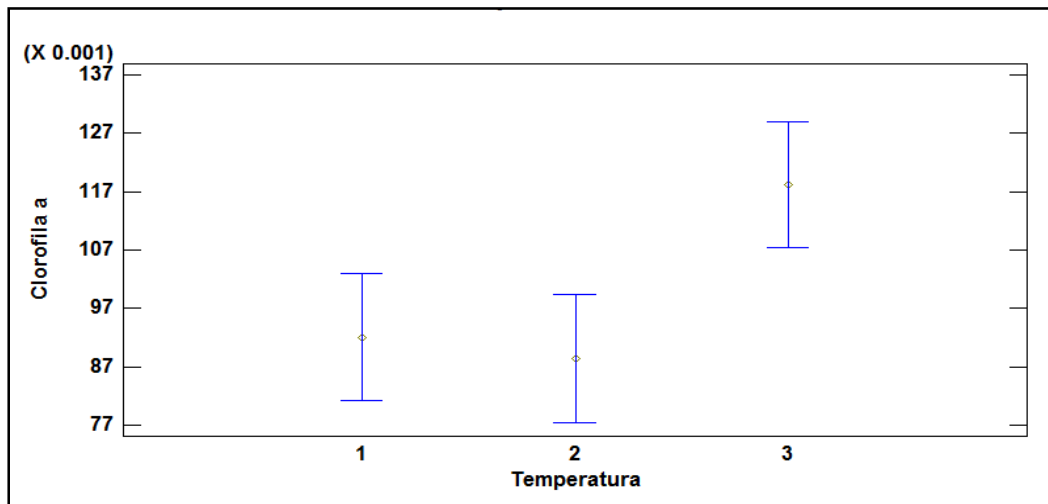
Figura 7: Productividad de clorofila *a* para condiciones de acetato/nitrato



Fuente: Los autores.

Posteriormente, con la prueba de múltiples rangos se determinó cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Los pares indica para 1–3 ($p=0,026$), 2-3 ($p=0,029$) muestran diferencias estadísticamente significativas, señala que las temperaturas máximas que oscilan en 55°C y $61,73^{\circ}\text{C}$ son las más favorables para la extracción de clorofila *a*.

Figura 8: Temperatura más óptima para la producción de clorofila *a*.



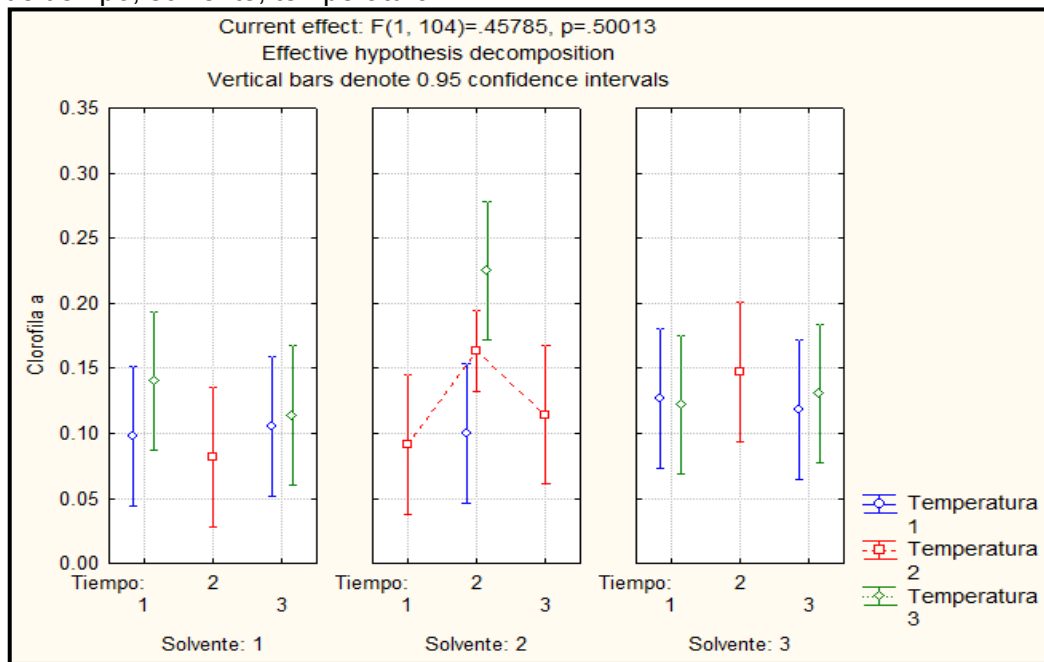
Fuente: Los autores.

Resultado similar arrojó el análisis de varianza para la extracción de clorofila *b*, donde los factores temperatura ($p\leq 0,05$), tratamiento ($p\leq 0,05$) muestran valores-P menores que 0,05. Igualmente para el análisis de múltiples rangos señala que las temperaturas máximas que oscilan en 55°C y $61,73^{\circ}\text{C}$ son las más favorables para la extracción de clorofila *b*.

Los resultados mostraron que las variables tiempo y la cantidad de solvente no tenía un efecto significativo, lo que significa que la variable que representa los cambios en el contenido de pigmentos es la temperatura, este resultado concuerda con el trabajo de *Cha KH et al. (2010) [7]* donde plantean que la eficiencia de extracción de clorofilas *a* y *b* mejoraba a altas temperaturas. *Chlorella* sp. acumula grandes cantidades de clorofilas sólo en un cloroplasto encerrado por

una gruesa pared celular, que pueden entorpecer la extracción de carotenoides y clorofila. Las altas temperaturas degradan la barrera protectora de *Chlorella* sp. durante la extracción de clorofila. Aunque el variable tiempo no presentó diferencias significativas en la extracción de clorofila, el tiempo de contacto entre los compuestos celulares que se extraen y el disolvente puede ser determinante para la cantidad de productos extraídos. Cuando el poder de lisis celular del disolvente no es demasiado elevado, esto puede ser intencional para evitar el daño de los compuestos que se extraen; un período más largo de extracción puede aumentar el rendimiento de este proceso [22]. Largos períodos de extracción puede aumentar los productos de degradación. El período necesario para la extracción de clorofila *a* depende también de la composición de las especies, como se indica por Hagerthey *et al.* (2006) [20]. Igualmente, para la optimización del método se realizó un diagrama de efectos principales para observar el nivel óptimo de las variables: Tiempo, temperatura, volumen del solvente, para obtener la mayor producción de clorofila (Figura 9).

Figura 9: Cambios en el contenido de clorofila *a* y clorofila *b* bajo diferentes condiciones de tiempo, solvente, temperatura.

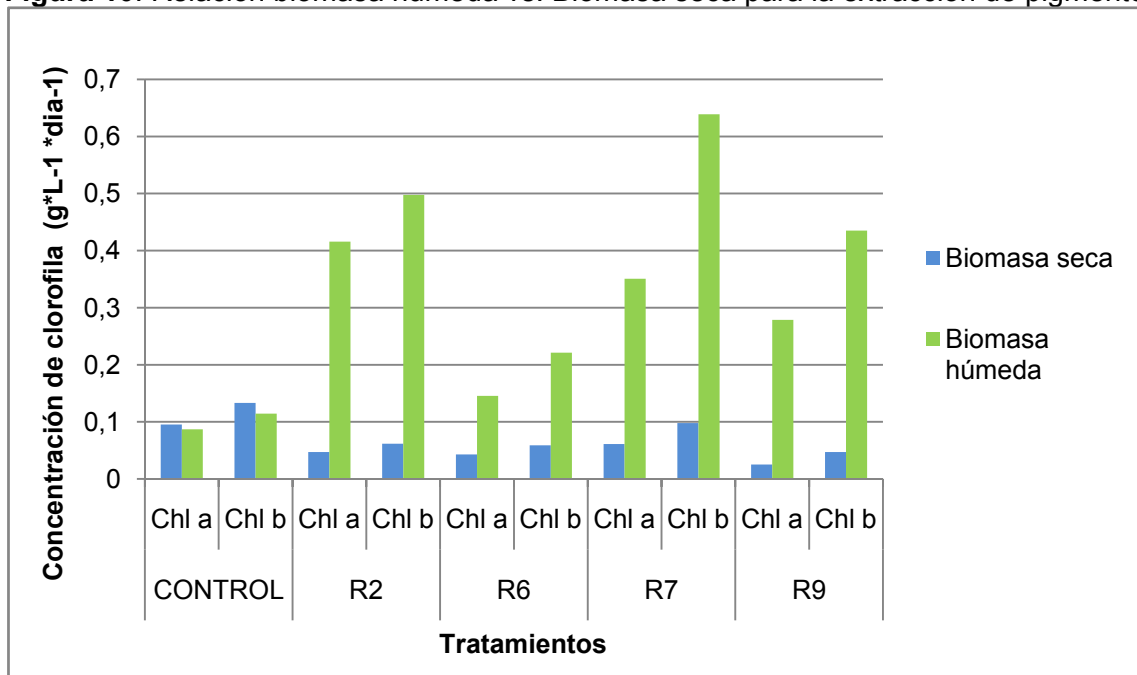


Fuente: Los autores.

Variando las condiciones de temperatura, tiempo y solvente; se encontró que las mejores condiciones de operación son: **Temperatura:** Máxima que oscilan en 55°C y 61,73°C, **Solvente:** 60 ml de etanol, **Tiempo:** 4 h, obteniendo así un porcentaje de clorofila *a* y *b*, mayor que con otras combinaciones de condiciones

2.5 Biomasa seca vs biomasa húmeda.

Figura 10: Relación biomasa húmeda vs. Biomasa seca para la extracción de pigmentos.



Fuente: Los autores.

En la figura 10 se muestra la comparación entre biomasa húmeda y biomasa seca como materia prima para la extracción de pigmentos, se replicaron los mejores tratamientos y las mejores condiciones de extracción usados en el proceso anterior con biomasa húmeda. Los resultados obtenidos en tratamientos R2, R7, R9 muestran una marcada diferencia en la cantidad de pigmentos extraídos en base húmeda con respecto a base seca, en donde se evidencia que en base húmeda se puede obtener una mejora del proceso casi cuatro veces con respecto base seca; esto no es debido a cambios en la concentración de clorofila, sino al

cambio en el sistema de referencia. Por ejemplo, podría verse un aumento en Chl en base húmeda exclusivamente debido a que hay una disminución de peso fresco causada por la pérdida de agua en base seca [27]. Bajo el concepto de Biorefinería expuesto por Gonzales *et al.* (2011) [18], en el caso específico de la extracción de lípidos, el cual ha adquirido fuerza durante los últimos años, requiere de ciertas condiciones, como que la biomasa se encuentre en base seca. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, para poder aprovechar los pigmentos, es necesario utilizar la biomasa en base húmeda. Aunque en principio esto represente un gasto extra para el proceso, el retirar los pigmentos antes de la extracción de los lípidos disminuye la posibilidad de obtener un extracto lipídico con impurezas, las cuales pueden aumentar significativamente el valor agregado del extracto.

3 CONCLUSIONES

- Mediante el uso de la relación carbono/nitrógeno es posible aumentar la deposición de clorofilas. Se encontró que el cultivo R7 (relación carbono/nitrógeno: 5mM acetato/2,94mM de nitrato) representa las condiciones con una mayor productividad para el método de extracción tradicional: de 0,07 g de clorofila/g de biomasa, en comparación con un cultivo autotrófico 0,04 g de clorofila/g de biomasa, un aumento de casi doble de productividad de pigmento.
- La aplicación el método de extracción mejorado se refleja un aumento en la productividad (0,15 g/L) de casi cuatro veces comparado con el método tradicional de medición diaria de clorofila total (0,041g/L); lo que permitió establecer los rangos óptimos de las variables estudiadas para el proceso (Temperatura: Máxima que oscilan en 55°C y 61,73°C, Solvente: 60 ml de etanol, Tiempo: 4 h).
- Se determino que es necesario utilizar la biomasa en base húmeda, ya que garantiza un aumento de la extracción de pigmentos de 4 veces y disminución de la posibilidad de obtener un extracto lipídico con impurezas.

RECOMENDACIONES.

La producción y extracción de pigmentos aumentó significativamente con el método aplicado en este trabajo, se recomienda que seguido de la extracción de pigmentos se realice una posterior extracción de lípidos con el fin de corroborar la mejora que ocasiona este proceso en el producto obtenido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barsanti & Gualtieri. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry, And Biotechnology*. Taylor & Francis.
2. Becker E. W. 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge Press University.
3. Bholá, V., Desikan, R., Kumari, S., Santosh., Subburamu, K., Sanniyasi, E., Bux, F. 2011. Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 111:3:377-382.
4. Bidigare, RR., Ondrusek, M., Kennicutt, I., Harvey H., Hoham, R., Macko, S. 1993. Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *J Phycol*. 29:4:427-434.
5. Borowitzka, M. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*. 70:313-321.
6. Buffan-Dubau, E., Carman, K. 2000. Extraction of benthic microalgal pigments for HPLC analyses. *Marine Ecology Progress Series*. 204:293-297.
7. Cha, KH., Lee, HJ., Koo, SY., Song, DG., Lee, DU., Pan, CH. 2010. Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *J Agric Food Chem*. 58:2:793-7.
8. Chen, F., Johns, MR. 1991. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *Applied Phicology*. 203-209.
9. Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T., Simon, K., Salley, S. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*. 102:1649-1655.

10. Chisti, Y. 2006. Microalgae as sustainable cell factories. *Environmental Engineering and Management Journal*. 5:3:261-274.
11. Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25:294-306.
12. Chojnacka, K., Marquez, F. 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*. 3:21-34.
13. Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. 1999. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. *American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF)*. 2:1325 p.
14. Dere. S., Günes. T., Sivaci, R. 1998. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll – A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *Tr. J. of Botany*. 22:13-17.
15. Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S., Blanc, P., Chidambara, K., Ravishankar, G. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in Food Science & Technology*. 16: 389-406.
16. Engel, N., Jenny, T., Mooser, V., Gossauer, A. 1991. Chlorophyll Catabolism in Chlorella. *Febs Letters*. 131-133.
17. Ferruzzi, M.G., Böhm, V. P.D., Courtney, S.J. Schwartz. 2006. Antioxidant and Antimutagenic Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined by Radical Scavenging and Bacterial Reverse Mutagenesis Assays. *Journal of Food Science*. 7:2589–2595.
18. González, A., Kafarov, V. 2011. Microalgae based biorefinery: Issues to consider. *Ciencia, Tecnología y Futuro*. 4:4:5-22.

19. Greene, R., Geider, R., Falkowski, P. 1991. Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom. *American Society of Limnology and Oceanography, Inc.* 36:8: 1772-1782.
20. Hagerthey, S., Louda, G., Mongkronsri, P. 2006. Evaluation of Pigments extraction methods and a recommended protocol for periphyton chlorophyll a determination and chemotaxonomic assessment. *J. Phyco.* 42:1125-1136.
21. Hartmurt, K., Lichtenthaler, L. 2004. Adaptation and senescence of photosynthetic apparatus changes in pigment composition, Chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity.
22. Henriques, M., Silva, A., Rocha, J. 2007. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.* 586-593.
23. Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., Danquah, M. 2010. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering.* 11.
24. Hosikian, A., Lim, Su., Halim, R., Danquah, K. 2010. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering.* 1-11.
25. J.R. Benemann., 1997. CO₂ mitigation with microalgae systems. *Energy Conv. Manag.* 38: 475-9.
26. Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1-8.
27. Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.*

28. Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cai, Z., Hu, Z. 2009. Effects of organic carbón sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *J Appl Phycol.* 21:239-246.
29. Meng, C., Haiying, T., Hongzhi, M., Holland, T., Simon, N., Salley, S. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *BioresourceTechnology.* 102:2:1649–1655.
30. Nature's Sunshine Colombia. Productos. Liquid Chlorophyll. <<http://www.nspcol.com/Products/ProductList.aspx>>[citado en 26 de marzo 2012]
31. Ogonna, J., Ichige, E., Tanaka, H. 2002. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Applied microbiology and biotechnology.* 58:4:532-538
32. Olaizola, M. 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000 liter outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 12:499-506.
33. Ördög, V., Stirk, W., Bálint, P., Staden, J., Lovász, C. 2011. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J Appl Phycol.* 1-8.
34. Richmond. 2004. Major Industrial Species *Chlorella*. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Industrial Production of Microalgal Cell/mass and Secondary Products. 255-263.
35. Sansawa, H., Endo, H. 2004. Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 98:437–444.
36. Santos, D., Calijuri, A., Moraes, M., Adorno, E., Falco, M., Carvalho, Deberdt, D., Benassi, S. 2003. Comparison of three methods for Chlorophyll determination: Spectrophotometry and Fluorimetry in samples containing pigment mixtures and spectrophotometry in samples with separate pigments

- through High Performance Liquid Chromatography. *Acta Limnol. Bras.* 15:3:7- 18.
37. Simon, D., Helliwell, S. 1998. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. *Wat. Res.* 32:7:2220-2223.
38. Sokal, R., Rohlf, F. 1995. The principles and practice of statistics in biological research. *W. H. freeman.*
39. Stein, J. 1975. Culture methods and growth measurements. *Cambridge University.* 365.
40. Syrett, P. J. 1963. El efecto del cianuro en la respiración y la asimilación a la oxidación de la glucosa por la *Chlorella vulgaris*. *Annals of Botany.* 15:4:473-492.
41. Syrett, P., Bocks, S., Merrett, M. 1963. The Assimilation of Acetate by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Experimental Botany.* 36-47.
42. Tandeau De Marsac, N., Houmard, J. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 104:119-190.
43. Tilman, D. 1982. Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. *Ann Rev. Ecol. Syst.* 13:349-72.
44. Ugwu, C., Aoyagi, H. 2008. Influence of shading inclined tubular photobioreactor surfaces on biomass productivity of *C. sorokiniana*. *Photosynthetica.* 46:2: 283-285.
45. Wasmund, N., Topp, I., Schories, D. 2006. Optimising the storage and extraction of chlorophyll samples. *Oceanologia.* 48:1:125–144.
46. X. Miao., Q. W. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil, Bioresour. *Technol.* 97: 84-16.
47. Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and

cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 102-106.

ANEXOS

- ANEXO A. DISEÑO EXPERIMENTAL

TABLA A2 Los nueve tratamientos fueron sometidos al siguiente diseño experimental.

Temperatura[°C]	Tiempo [h]	Solvente [mL]
35	6	90
55	6	30
55	2	90
45	4	60
35	2	30
45	4	60
35	2	90
55	6	90
35	6	30
55	2	30
45	4	110,200
45	4	60
45	4	9,800
45	7,346	60
28,267	4	60
45	0.653	60
61,733	4	60

- ANEXO B. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN

Peso seco/vol. de muestra Concentración (g/L)	Absorbancia
0,09	0,32
0,1178	0,37
0,25	0,498
0,42	0,699
0,45	0,723
0,57	0,892
0,6	0,95
0,64	0,997
0,67	1,021
0,75	1,178
0,79	1,25
0,9	1,405

