

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ACETATO DE SODIO, NITRATO DE SODIO Y FOSFATO DE POTASIO EN LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO A PARTIR DE CULTIVOS MIXOTRÓFICOS DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803

**YARITZA LÓPEZ MATOS
MARLYS ELIANA VÁSQUEZ CÁCERES**

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

2014

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ACETATO DE SODIO, NITRATO DE SODIO Y FOSFATO DE POTASIO EN LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO A PARTIR DE CULTIVOS MIXOTRÓFICOS DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803

**YARITZA LÓPEZ MATOS
MARLYS ELIANA VÁSQUEZ CÁCERES**

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

**Director
CRISOSTOMO BARAJAS FERREIRA
Ingeniero Químico, M.Sc.**

**Codirector
ANA MARÍA ARDILA ALVAREZ
Ingeniero Químico**

**ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

DEDICATORIA

A Dios principalmente por ser el creador de mi vida, guía, orientador y sabiduría en mi etapa de estudiante.

A mis padres MARÍA INES CACERES HERNANDEZ Y ORLANDO VASQUEZ SERPA por todo su amor y apoyo incondicional, por impulsarme cada día a lograr mis objetivos, por ser el respaldo que siempre me brindó la fuerza necesaria para vencer cualquier dificultad. No me alcanzan las palabras para agradecerles todo su trabajo y dedicación.

A mi hermano HOLGER YESID VASQUEZ CACERES, quien fue mi fortaleza, compañía y apoyo en las luchas diarias, quien me brindó la alegría que lo caracteriza sin importar las rencillas.

A mi tía NAHIM CACERES HERNANDEZ y a mi madrina MARTHA LUCIA RANGEL CASTRO y a mi gran amigo JULIAN ESTEBAN SAJONERO ARIAS por ser mi mano derecha en las diversas dificultades de mi vida universitaria; siendo pilares e impulsándome para hoy ver con orgullo cumplida otra meta en mi vida.

A BERTHA GOMEZ, OMAR EGEA y a sus hijos, quienes me abrieron las puertas de su casa y me acogieron como una más de su familia.

A la selección de baloncesto femenino uis y a nuestro entrenador por el apoyo y dedicación.

A mis amigos, por brindarme tantas alegrías y aventuras en mi vida universitaria, y a todas aquellas personas que de alguna u otra forma aportaron un granito de arena para alcanzar esta meta.

Marlys Eliana Vásquez Cáceres

DEDICATORIA

A Dios primeramente que ha puesto pruebas en mi camino que me han hecho más fuerte pero quien no ha soltado mi mano ni un segundo. A mis angelitos de la guarda que desde el cielo mi cuidan a mi papa Milciades y a mi tía Rosa que siempre estarán en mi corazón.

A mi hijo Carlos Santiago por ser la luz de mis ojos, mi motor y el amor de mi vida, por tener paciencia, por esperarme cada semestre con sus brazos abiertos y su sincero amor, esto es por ti porque es el comienzo para brindarte un mejor futuro, te amo con todo mi ser.

A cada uno de los miembros de mi familia a mi viejita del alma Eudis Matos por cuidar de mi y de mi hijo, por tenerme paciencia en este largo proceso. A mi madre, tíos, primos por su cariño y apoyo, a mis hermosos sobrinos por llenarme de amor y ternura.

A Carlos Lozada por su apoyo y creer en mí.

A mi compañera de tesis Marfys Eliana Vásquez por su paciencia y sobre todo aguantar mi mal genio, sé que no fue fácil pero lo logramos.

A la familia Barragán Mantilla por acogerme en su hogar y tratarme como una más de sus hijas.

Aquellos amigos de la u Lizeth, Luismi, Silvia, Sergio, Joe, Ricardo, que sin pensarlo se convirtieron en mis hermanos del alma, en mis compañeros de estudio, de aventuras, gracias por su amistad incondicional.

Y a esas personas maravillosas mi prima Leida, Javi, Jose y a ti corazón que Dios puso en mi camino como ángeles del cielo, que además de su amistad me brindaron su preocupación y apoyo.

A ustedes y a cada una de las personas que de una u otra manera contribuyeron a este logro gracias por estar en los momentos hermosos pero sobre todo en los momentos difíciles.

Yaritza López Matos

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

Primero a Dios y a nuestros padres, que con sus nobles y enormes esfuerzos nos brindaron el apoyo necesario para alcanzar esta meta.

DR. SC. VIATCHESLAV KAFAROV, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación CIDES y por su respaldo como director del proyecto.

INGENIERO QUÍMICO CRISOSTOMO BARAJAS FERREIRA, por su respaldo como director del proyecto.

BIÓLOGO ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO, por su orientación y apoyo para contribuir al buen desarrollo del presente proyecto.

BIÓLOGO IVAN SEBASTIAN QUINTERO RANGEL, por su paciencia, orientación y apoyo en el desarrollo del presente proyecto.

INGENIERO ANA MARÍA ARDILA, por su paciencia, orientación y apoyo en el desarrollo del presente proyecto.

INGENIERO GUILLERMO ACERO, encargado de los laboratorios de investigación de ingeniería química, por su colaboración durante la ejecución de éste proyecto.

La Universidad Industrial de Santander, los profesores de ingeniería química que hicieron parte de nuestra formación profesional.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. METODOLOGÍA	20
1.1 MEDIO DE CULTIVO Y MICROALGA	20
1.2 FOTOBIOREACTOR	21
1.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	21
1.4 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA	22
1.5 CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS	23
1.5.1 Cuantificación de Carbohidratos Totales.	23
1.5.2 Cuantificación de Proteínas	23
1.5.3 Cuantificación de lípidos	24
1.5.4 Cuantificación de clorofilas totales	25
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS	26
2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA	28
2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS	29
2.2.1 Proteínas.....	29
2.2.2 Carbohidratos	30
2.2.3 Clorofilas.....	30
2.2.4 Lípidos	31
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
3.1 PRODUCCIÓN DE CARBOHIDRATOS	33
3.2 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS.....	35
3.3 PRODUCCIÓN DE CLOROFILAS.....	37

3.4 PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS	39
4. CONCLUSIONES	41
5. RECOMENDACIONES.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	49

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño experimental de los cultivos de <i>C. vulgaris</i>	22
Tabla 2. Mayores porcentajes de productividad de proteínas.....	30
Tabla 3. Mayores porcentajes de producción de carbohidratos.....	30
Tabla 4. Mayores porcentajes de producción de clorofilas	31
Tabla 5. Mayores porcentajes de producción de lípidos	31
Tabla 6. Resumen de las características de los mejores tratamientos para cada metabolito de interés (proteínas, clorofilas, carbohidratos y lípidos).....	32

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Metodología Experimental	20
Figura 2. Composición porcentual de metabolitos de <i>C. vulgaris</i> durante los 15 días de cultivo.	27
Figura 3. Biomasa producida [g/L] para cada uno de los tratamientos	29
Figura 4. Diagrama de Pareto para la producción de carbohidratos.....	34
Figura 5. Superficie de respuesta para la producción de carbohidratos.	35
Figura 6. Diagrama de Pareto para la producción de proteínas	36
Figura 7. Superficie de respuesta para la producción de proteínas.	37
Figura 8. Diagrama de Pareto para la producción de clorofilas	38
Figura 9. Superficie de respuesta para la producción de clorofilas.....	38
Figura 10. Diagrama de Pareto para la producción de lípidos	39
Figura 11. Superficie de respuesta para la producción de lípidos.....	40

RESUMEN

TITULO: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ACETATO DE SODIO, NITRATO DE SODIO Y FOSFATO DE POTASIO EN LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO A PARTIR DE CULTIVOS MIXOTRÓFICOS DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803^{*}.

AUTORES: YARITZA LOPEZ MATOS
MARLYS ELIANA VASQUEZ CACERES^{**}

PALABRAS CLAVES: Microalgas, proteínas, carbohidratos, lípidos, clorofilas, selectividad.

En este trabajo se analizó el efecto del nitrato, fosfato y una fuente orgánica de carbono (acetato de sodio) en la producción de metabolitos en un cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. Para ello, se realizó un diseño experimental 3³ utilizando el software STATISTICA 7.0 teniendo como variables de respuesta la producción de biomasa y metabolitos de interés durante un tiempo de 15 días.

Se obtuvo que para mejorar la producción de proteínas es el tratamiento 3 (30 mM Acetato; 2,94 mM Nitrato y 1,72 mM Fosfato) a los 5 días de cultivo, obteniendo una concentración de 0,63 g/L y 60% de la biomasa total; mientras que, para la producción de carbohidratos es el tratamiento 5 (20 mM Acetato; 1,96 mM Nitrato y 1,15 mM Fosfato) a los 15 días de cultivo, obteniendo una concentración de 1,02 g/L y 73% de la biomasa total; para lípidos, se encontró, que el tratamiento 13 (20 mM Acetato; 0,32 mM Nitrato y 1,15 mM Fosfato) a los 10 días de cultivo es el más adecuado, obteniendo una concentración de 0,008 g/L y 0,34% de la biomasa total. Finalmente, para Clorofilas se determinó, una óptima producción para el tratamiento 14 (20 mM acetato; 1,96 mM de Nitrato y 0,19 mM de Fosfato) a los 15 días de cultivo, obteniendo una concentración de 0,11 g/L y 10% de la biomasa total.

* Proyecto de grado

** Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director. M. Sc Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirectores: Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano; Ingeniero Químico. Ana María Ardila Alvarez.

ABSTRACT

TITLE: THE EFFECT OF CONCENTRATION OF SODIUM ACETATE, SODIUM NITRATE AND POTASSIUM PHOSPHATE TO PRODUCE METABOLITES WITH ADDED VALUE AFTER MIXOTROPHIC CULTURE OF *Chlorella vulgaris* UTEX 1803^{*}.

AUTHORS: YARITZA LOPEZ MATOS
MARLYS ELIANA VASQUEZ CACERES^{**}

KEYWORDS: Microalgae, proteins, carbohydrates, lipids, chlorophylls selectivity.

In this work the effect of nitrate, phosphate and an organic carbon source (sodium acetate) on the production of metabolites in a mixotrophic culture of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 was analyzed. To do this, an experimental design was performed using 3³ STATISTICA 7.1 software as response variables taking biomass production and metabolites of interest for a period of 15 days.

Treatment 3 was found to be the best one improving protein production (30 mM acetate; 2,94 mM nitrate and 1,72 mM phosphate) at 5 days of culture, resulting in a concentration of 0,63 g/L and 60% of the total biomass; while treatment 5 is the one for the production of carbohydrates (20 mM acetate; 1,96 mM nitrate and 1,15 mM phosphate) at 15 days of culture, obtaining a concentration of 1,02 g/L and 73% of the total biomass; For lipids, it was found that treatment 13 is the most appropriated (20 mM acetate; 0,32 mM nitrate and 1,15 mM phosphate) at 10 days in culture, obtaining a concentration of 0.008 g/L and 0.34% of the total biomass. Finally, for Chlorophylls, the optimum production was determined by using treatment 14 (20 mM acetate; 1,96 mM nitrate and 0,19 mM phosphate) at 15 days of culture, obtaining a concentration of 0,11 g/L and 10% total biomass.

^{*} Graduation project

^{**} Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering. Departament. Director: M.Sc Crisostomo Barajas Ferreira. Codirectors: Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano; Ingeniero Químico. Ana María Ardila Alvarez.

INTRODUCCIÓN

El uso de combustibles fósiles ha sido considerado como insostenible debido al agotamiento de los recursos y los problemas ambientales relacionados con el consumo de éstos [1, 2]. Recientemente, las microalgas se han convertido en una materia prima prometedora para la producción de biocombustibles, incluyendo el bioetanol, el biodiesel, gasolina verde, metanol, biohidrógeno, etc [2]; sin embargo, el desarrollo de biocombustibles a partir de microalgas se enfrenta a grandes retos, ya que el costo de producción de estas como materia prima es mucho mayor en comparación con los combustibles fósiles. Para mejorar la viabilidad económica de la producción de biocombustibles de microalgas, se han hecho muchos intentos para mejorar el rendimiento de las cepas, los sistemas de cultivo, separación y extracción [3, 4].

Las microalgas poseen la capacidad de utilizar dióxido de carbono, agua, energía lumínica y algunos nutrientes inorgánicos para sintetizar diversos metabolitos como proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos [6]. Además, son fotosintéticamente más eficiente que las plantas superiores y se puede cultivar en un medio enriquecido con sales a gran escala, por este motivo las microalgas constituyen una buena opción para la producción de metabolitos de valor agregado para sintetizar productos como biodiesel, bioetanol, biometano, biohidrógeno, fármacos, productos de cosméticos, alimento para animales y suplementos proteicos de alto nivel nutricional [7 y 8]. Por estas razones, las investigaciones se están centrando en reducir dichos costos mediante el mejoramiento del cultivo y de las técnicas de extracción para la obtención de nuevos metabolitos como son los isoprenoides, alcaloides, toxinas, polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados, enzimas, péptidos no ribosomales, carbohidratos y

proteínas, que encuentran aplicaciones en la salud, la farmacología, nutrición y biotecnología [9].

Aunque las microalgas pueden utilizar de manera eficiente la luz, el crecimiento en cultivos a gran escala es lento debido a la limitada penetración de la luz causada por el espesor de la columna de agua y la alta densidad de células [10]; en vista de estas desventajas asociadas al cultivo autótrofo una alternativa viable para algunas especies es el uso de cultivos mixotrófico, en la que el CO₂ y una fuente de carbono orgánico se asimilan de forma simultánea [11, 10]; sin embargo, aunque el cultivo es económicamente viable, se requiere una fuente de carbono de bajo costo y el conocimiento de cuáles son las concentraciones más favorables [11, 13], con ciertos cambios en los nutrientes del medio pueden aumentar las tasas de crecimiento [5 y 14] o pueden ser inhibidores y tóxicos para las algas [21, 10].

En cultivos mixotróficos *Chlorella vulgaris*, es capaz de crecer utilizando glucosa (C₆H₁₂O₆), acetato (C₂H₃O₂⁻), glicerol (C₃H₅ (OH)₃), y otras fuentes de carbono [12, 4], los beneficios se asocian con un aumento significativo en la tasa de crecimiento y la productividad debido a la alta incorporación de carbono orgánico dentro de la cepa, en particular en la formación de metabolitos tales como lípidos, polisacáridos y proteínas [10, 13]; esto es particularmente importante, ya que se han reportado aumentos de hasta cinco veces en comparación con los cultivos de microalgas autótrofos [11]. Otra ventaja de los cultivos mixotróficos es el uso de luz, que induce y regula la producción de macromoléculas de alto valor, tales como pigmentos y ácidos grasos [15], también reduce la producción de CO₂ en comparación con cultivos heterótrofos [16, 10]. Se ha demostrado que *C. vulgaris* puede oxidar y utilizar acetato como fuente de carbono y energía para el crecimiento en la oscuridad [17], que causa cambios en el ciclo del ácido tricarbóxico, debido a que la acetil - CoA no se deriva a partir de piruvato, pero forman el ion acetato.

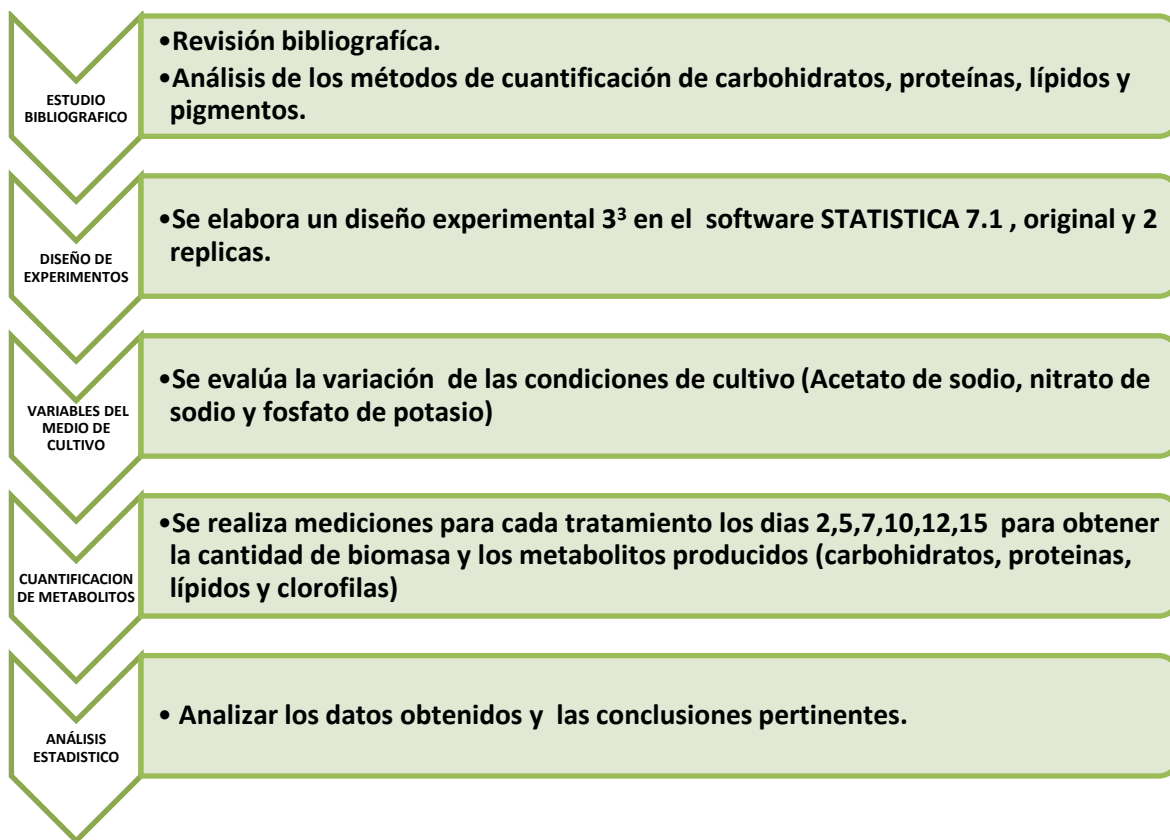
La incorporación de acetato es dependiente de un proceso tanto anabólico como catabólico del metabolismo [18]. Durante varias décadas se han llevado a cabo investigaciones sobre el crecimiento de microalgas de diferentes especies en presencia de acetato [19, 10], sin embargo su uso es problemático debido a que su efecto es dependiente de la concentración [20]. Algunos autores como Jeon *et al* [21]., y Barajas-Solano *et al* [10], encontraron que las concentraciones por encima de 1 g/L pueden causar la inhibición del crecimiento debido a la intoxicación de las algas [21, 10], mientras que las concentraciones más bajas estimulan el crecimiento y la acumulación de lípidos [22, 19]. Por otra parte, la acumulación de lípidos y el crecimiento de microalgas se ven afectados por otros factores, tales como la concentración de nutrientes, la aireación de CO₂, la temperatura, la intensidad de la luz, etc. La concentración de nitrógeno y fósforo presentes en el agua son considerados como factores fundamentales y tienen influencia directa sobre el crecimiento de microalgas y la acumulación de lípidos [23].

En estudios realizados por Zhu *et al* [4], se ha evidenciado el efecto de la privación de nutrientes individuales como nitrato, fosfato y hierro para mejorar el contenido de lípidos en las microalgas, para ello, se analizó la actividad fotosintética y la composición de la biomasa en respuesta a estos cambios [24]. Se determinó que el contenido de lípidos puede aumentar debido al estrés generado por la limitación en algunos nutrientes esenciales como el nitrógeno y fósforo [25]. El agotamiento de nitrógeno cambia el flujo de carbono celular para la síntesis de lípidos a partir de la síntesis de proteínas, puede aumentar de 20 % a 40 % en virtud de la privación de nitrógeno [26]. Sin embargo, un alto contenido de lípidos producidos bajo la limitación de nutrientes se asocia generalmente con la baja productividad de biomasa. En general, es necesaria una fuente alterna de nitrógeno para mantener una alta tasa de crecimiento de las células y el logro de alta densidad celular [26, 25].

Después de realizar una revisión bibliográfica pertinente se evidenció la necesidad de evaluar una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo simultáneamente, por este motivo el objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la concentración de acetato de sodio, nitrato de sodio y fosfato de potasio en la obtención de metabolitos de valor agregado a partir de cultivos mixotróficos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 mediante la modificación de estos nutrientes en el medio de cultivo Bold Basal.

1. METODOLOGÍA

Figura 1. Metodología Experimental



1.1 MEDIO DE CULTIVO Y MICROALGA

Chlorella vulgaris UTEX 1803 fue adquirida en la colección de cultivo de algas de la universidad de Texas (Austin, TX, USA). Inicialmente, esta cepa se mantuvo en crecimiento en fotobiorreactores a escala de laboratorio, en medio de cultivo *Bold basal* (MBB), cada litro de medio está compuesto por: (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

($1,29 \times 10^3$); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,70 \times 10^{-4}$); H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-4}$); KOH ($5,53 \times 10^{-4}$); EDTA ($1,71 \times 10^{-4}$); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-5}$) y 1 mL de solución de metales Andersen et al, [27].

El medio debe cumplir con las siguientes condiciones: temperatura ambiente (23°C), pH neutro, aireación permanente y ciclos luz-oscuridad 12/12 horas, sin ningún suministro complementario de CO_2 considerándose este cultivo como tratamiento control.

1.2 FOTOBIOREACTOR

Se usaron botellas de vidrio de 1L de capacidad. En el extremo superior de cada uno de los reactores se implementó un sistema de suministro de aire continuo por burbujeo (tubo-difusor) con el fin de proveer de aire los cultivos y garantizar que todas las células estén expuestas a la luz y los nutrientes del medio.

1.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Con la ayuda de software STATISTICA 7.1, se realizó un diseño de experimentos 3^3 . El diseño constó de 17 experimentos, cada uno con su original y dos replicas (Tabla 1). Las diferencias entre los tratamientos radicaban en las concentraciones de acetato de sodio (36,76; 30; 20; 10 y 3,27 mM), nitrato de sodio (0,32; 0,98; 1,96; 2,94 y 3,60 mM) y fosfato de potasio (0,19; 0,57; 1,15; 1,7 y 2,11 mM), manteniendo la concentración de los demás componentes del medio (macronutrientes y micronutrientes) constantes según las especificaciones del Medio Bold Basal (MBB).

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

Tratamientos	Acetato de sodio (mM)	Nitrato sodio (mM)	Fosfato potasio (mM)
1	10,00	2,940	0,574
2	10,00	0,980	1,721
3	30,00	2,940	1,721
4	30,00	0,980	0,574
5	20,00	1,960	1,147
6	10,00	2,940	1,721
7	10,00	0,980	0,574
8	30,00	2,940	0,574
9	30,00	0,980	1,721
10	3,27	1,960	1,147
11	36,73	1,960	1,147
12	20,00	3,600	1,147
13	20,00	0,320	1,147
14	20,00	1,960	0,187
15	20,00	1,960	2,107

1.4 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA

La concentración de biomasa se estimó mediante Densidad Óptica, por lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm (densidad óptica) en un espectrofotómetro SpectroquantPharo 300 (Merck). La densidad óptica (DO) fue correlacionada contra una curva estándar de calibración que correlaciona la cantidad de biomasa (g/L) y la absorbancia a 500 nm:

$$C_B(g/l) = 1,316 * (A_{500}) + 0,173 \quad (1)$$

1.5 CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS

Se realizaron mediciones para cada tratamiento, durante los días 0, 2, 5, 7, 10 y 15 de cultivo en los que se cuantificó la cantidad de biomasa y el total de cada uno de los metabolitos producidos (carbohidratos, proteínas, lípidos y clorofilas).

1.5.1 Cuantificación de Carbohidratos Totales. Se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, [28]). Se tomó 1mL de medio de cultivo, a este se le adicionan 0,5mL de fenol al 5% y 2,5mL de ácido sulfúrico al 95%, seguidamente se homogeniza.

Por último la muestra se midió en un espectrofotómetro (SpectroquantPharo 300, Merck) a longitudes de onda de 480nm, 485nm y 490nm para identificar Xilosa, Arabinosa, glucosa y Fructosa presentes en la biomasa. Se calculó el contenido de carbohidratos de las muestras en mg de carbohidrato/L.

1.5.2 Cuantificación de Proteínas La extracción de proteínas se desarrolló siguiendo el procedimiento de Rausch *et al.*, [29] empleado por Chen & Vaidyanathan [30]. En el proceso se centrifugó una alícuota (10mL) del medio de cultivo a 3400 rpm durante 20 minutos. Al pellet se le adicionó 1mL 1M de NaOH y se extrajo a 80°C por 10 minutos con agitación ocasional. Después de enfriar se centrifugó por segunda vez y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. La extracción alcalina fue repetida 3 veces. La última extracción fue calentada a 100°C por 10 minutos para extraer completamente las proteínas. Las tres extracciones fueron combinadas y mezcladas antes del análisis.

El contenido de proteínas totales en el extracto fue estimado usando el método de proteínas por reacción de folin [31], empleado por Dorey y Draves [32]. Este consistía en tomar 1mL de las muestras extraídas en un tubo de ensayo de vidrio forrado con aluminio, al cual se le agregó 1.4mL d solución Lowry (A-B-C), con un

vórtex se mezcló durante 3 min y luego se dejó incubar por 20min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adicionó 0,2mL del reactivo de folin en solución con agua, el cual se dejó reaccionar por 30 minutos con agitación ocasional.

Finalmente la concentración de proteínas en la muestra se estimó por lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro SpectroquantPharo 300 (Merck) a una longitud de onda de 750nm y a partir de la correlación contra una curva de calibración de solución de proteínas estándar (solución de albúmina de suero bovino con concentración máxima de 2g/L) se calculó el contenido de proteínas en mg de BSA / L.

1.5.3 Cuantificación de lípidos La cuantificación de lípidos se estimó siguiendo el procedimiento de Chen *et al* [33], que consiste, en realizar la lisis celular, seguida, de la saponificación de los lípidos, extracción de FA, y la formación de complejos de Cu-FA. Para cada experimento realizado, se tomó 0,05 g de biomasa de los días 5, 10 y 15 de cultivo. Esta biomasa se resuspendió en 100µl de Tris-HCl (1M, pH 8,0). Seguidamente, se añadió 2.400 µl de reactivo de saponificación (25 % de metanol en 1M NaOH) y se añadió aproximadamente 250 mg de perlas de vidrio de 0,1 mm (Sigma - Aldrich). Posteriormente, se realizó la ruptura celular mediante la agitación con vórtex vigorosa durante 3 min. Luego, se añaden otros 2.500µl de del reactivo de saponificación. Después, la mezcla se saponifica en baño maría a 90°C durante 30 min y se agitó con vórtex cada 5 min para hidrolizar los enlaces éster de los lípidos de membrana y triglicéridos [33, 34].

Después de la saponificación, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se tomaron 3.000 µl de la mezcla saponificada y se añadieron a un tubo Eppendorf (Eppendorf) que contenía 4.500 µl de una mezcla disolvente de cloroformo y metanol (2:01). Después de agitación durante 2 min, las muestras se centrifugan a 5.000 rpm durante 2 min. A continuación, se tomó un volumen de 2.500 µl de la

fase orgánica y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf que contenía reactivo de cobre (9 vol. AQ. 1 TEA M, 1 vol. Ácido acético 1M, 10 vol. 6,45 %w/v de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$). Después de este paso, 1.500 μl de la fase orgánica se transfirió cuidadosamente a una cubeta de cuarzo y se mide la absorbancia a 260nm usando un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300, Merck).

1.5.4 Cuantificación de clorofilas totales Se tomó 10mL de muestra, se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos (Centrifuga PowerSpin™ MX). Luego se extrajo el sobrenadante con el fin de eliminar el medio presente, se adicionó 3 ml de etanol al 95% al sedimento. La mezcla se calentó al baño maría durante 10 minutos a 80°C. Después de enfriar se aforó hasta 5 mL con etanol al 95% y se centrifugó nuevamente a 3400 rpm durante 15 minutos para eliminar la biomasa libre de pigmento. La concentración de la clorofila a (C_a) y clorofila b (C_b) en el sobrenadante se cuantificó al usar el método espectrofotométrico propuesto por Jeffrey y Humphrey [35], por lectura de la absorbancia a longitudes de onda de 645 nm y 663 nm en un espectrofotómetro SpectroquantPharo 300 (Merck). La relación de la cantidad de clorofila (a), (b) y (a+b) en el sobrenadante C_a (mg/L), C_b (mg/L) y C_{a+b} (mg/L) con el valor de la absorbancia fue correlacionado de acuerdo a las ecuaciones:

$$C_a(\text{mg/L}) = 12.7 * (A_{663}) - 2.49 * (A_{645}) \quad (2)$$

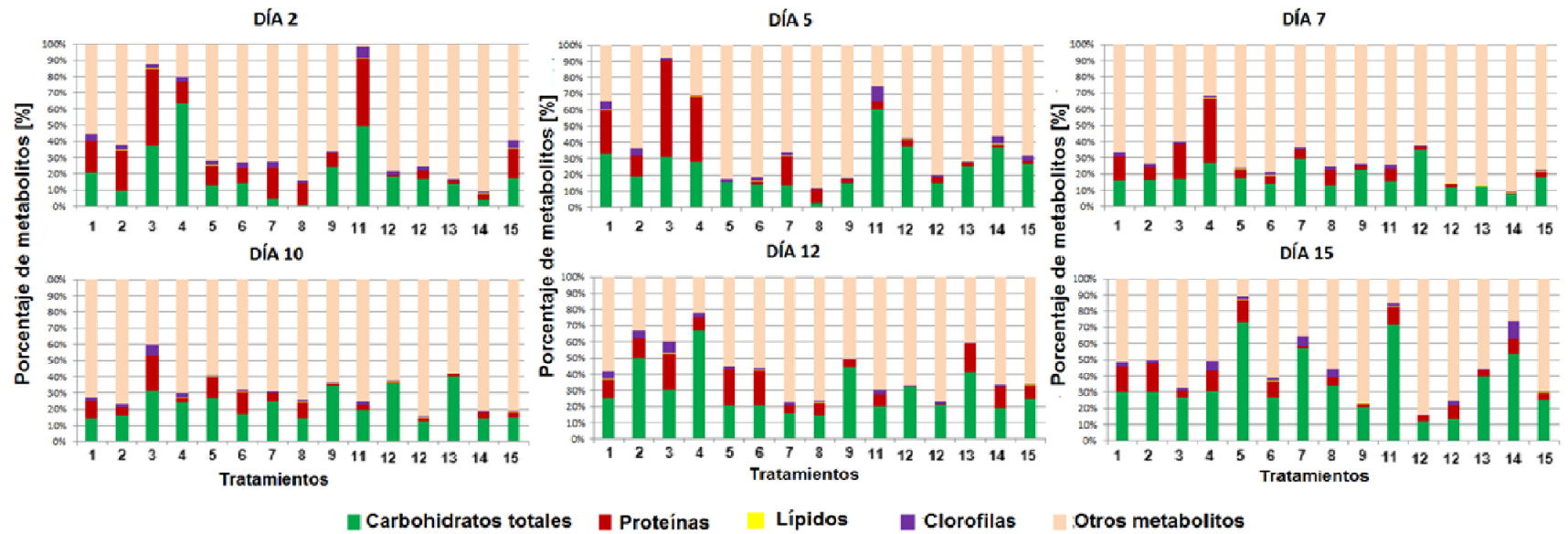
$$C_b(\text{mg/L}) = 22.9 * (A_{645}) - 4.68 * (A_{663}) \quad (3)$$

$$C_{a+b}(\text{mg/L}) = 20.2 * (A_{645}) + 8.02 * (A_{663}) \quad (4)$$

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

La Figura 2, muestra los datos en gramos por gramo de biomasa de proteínas, carbohidratos, clorofilas y lípidos para cada una de las pruebas del diseño experimental. Se observa que los mayores porcentajes de producción de proteínas se obtuvieron alrededor del día 2 del cultivo; sin embargo, el porcentaje más alto de biomasa total fue del 60% en el día 5; para carbohidratos en cambio, los mayores porcentajes de producción se encuentran alrededor del día 15 de cultivo y con un 73% del total de la biomasa. Vale la pena resaltar que de los metabolitos estudiados, los mayores porcentajes fueron de carbohidratos. También se evidencia una disminución general en la producción de las clorofilas, observándose que la producción más alta de este metabolito fue del 10% de la biomasa total en el día 15. Finalmente, se puede apreciar que la mayor producción de lípidos se obtuvo en los días 5, 10 y 15, alcanzando producciones hasta del 0,33% de la biomasa total al décimo día, no obstante, los porcentajes de lípidos fueron significativamente bajos con relación a los otros metabolitos estudiados.

Figura 2. Composición porcentual de metabolitos de *C. vulgaris* durante los 15 días de cultivo.



2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

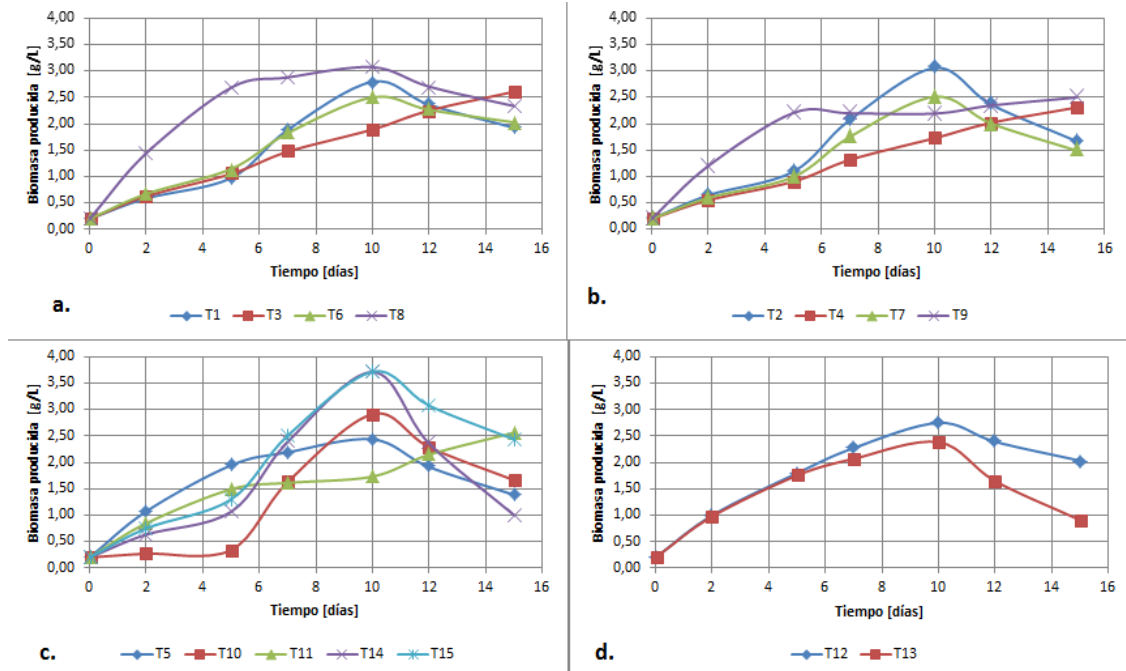
En la figura 3 se observa una variación significativa en la concentración de nitrógeno en el medio, lo que conlleva a la disminución en la producción de biomasa; comprobando los estudios realizados por Illman *et al* [26]; en donde la tasa de crecimiento de *C. vulgaris* es menor en un medio con limitación de nitrógeno.

La mayor producción de biomasa fue de 3,55 g/L en el tratamiento 15 (20 mM de acetato, 1,96 mM de nitrato y 2,11 mM de fosfato), este aumento de biomasa se podría explicar por la acumulación de compuestos de almacenamiento tales como triacilglicerol (TAG) [41].

Por otra parte, a diferencia de la asimilación de nitrógeno, la absorción de fósforo bajo diferentes modos de cultivo mostró una tendencia representativa. Altas concentraciones de fosfato (2,11 mM) producen mayor cantidad de biomasa. Después del día 10 de cultivo la producción empezó a decaer excepto, para los tratamientos 3 y 4 en los que la biomasa continuó creciendo.

Puesto que, minimizar el consumo de fósforo durante la producción de biomasa a través de un modo de cultivo adecuado, es la clave para producir más biomasa con menos fósforo, resulta importante controlar el cambio en la composición química de las células de microalgas durante el crecimiento. Este hecho ha sido estudiado por muchos investigadores como por ejemplo, Powell *et al.*, [42], quien informó que el contenido celular de fósforo en las microalgas es del 0,41% al 3,16% en diferentes condiciones de cultivo.

Figura 3. Biomasa producida [g/L] para cada uno de los tratamientos



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

2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS

2.2.1 Proteínas En la tabla 2, se observa que el mejor porcentaje para proteínas es del 60% de la biomasa total y corresponde a 0,63g/L para el tratamiento 3 (30 mM Acetato, 2,94 mM Nitrato y 1,72 mM Fosfato). En sus estudios Porras & Prada [36], ha evidenciado la presencia del 54% (p/p) de las proteínas en la biomasa cultivada en medio Bol Basal al 5^o día, comparando este porcentaje con el obtenido en esta investigación se presentó un aumento en promedio del 6% [36], trabajando con cultivos mixotróficos; Este aumento puede reflejar la tasa de actividad metabólica en las células que crecen activamente [30].

Tabla 2. Mayores porcentajes de productividad de proteínas

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

2.2.2 Carbohidratos En la tabla 3, se aprecia que el mayor porcentaje de producción de carbohidratos se encuentra en el día 15 de cultivo con un 73% de la biomasa total, este porcentaje corresponde a 1,02g/L para el tratamiento 5 (20 mM Acetato, 1,96 mM Nitrato y 1,15 mM Fosfato), comparado con algunas cepas de *C. vulgaris* que han logrado concentraciones del 55% [37 y 26] y 41% [3] en la biomasa, se obtiene un aumento del 18%. Este aumento o acumulación de carbohidratos puede ser causado por la formación de productos de almacenamiento fotosintéticos [25].

Tabla 3. Mayores porcentajes de producción de carbohidratos

Tratamiento		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Carbohi- dratos	%	33	50	37	67	73	27	57	34	44	72	38	21	41	53	27
	g/L	0,31	1,18	0,23	1,35	1,01	0,54	0,84	0,79	1,03	1,19	0,56	0,50	0,67	0,53	0,34
	día	5	12	2	12	15	15	15	15	12	15	5	12	12	15	5

2.2.3 Clorofilas En la tabla 4, se puede evidenciar una disminución general en la producción de las clorofilas, observándose que la producción más alta de este metabolito fue del 10% de la biomasa total. La concentración de este metabolito es 0,105g/L para el tratamiento 15 (20 mM acetato, 1,96 mM de Nitrato y 0,18 mM de Fosfato); la disminución en la producción se debe a que las células no solo obtuvieron energía y carbono del CO₂ presente en el aire, sino de la fosforilación oxidativa del acetato [38]; lo que provoca una inhibición de la fotosíntesis. Vale la pena resaltar el hecho de que una fuente de carbono diferente a CO₂ puede causar una disminución en la tasa fotosintética de la célula afectando así la producción de pigmentos [39], los cambios en los niveles de pigmento pueden indicar cómo el organismo adopta una nueva estrategia para captar la energía luminosa y convertirla en energía bioquímica [30].

Tabla 4. Mayores porcentajes de producción de clorofilas

Tratamiento		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
clorofilas	%	6	5	7	6	2	3	6	5	1	9	2	3	1	10	5
	g/L	0,054	0,051	0,166	0,134	0,026	0,022	0,091	0,124	0,013	0,031	0,017	0,065	0,010	0,105	0,038
	día	5	5	12	15	2	2	15	15	2	5	2	15	2	15	2

2.2.4 Lípidos En la tabla 5 se observa que la concentración de lípidos correspondiente al 0,34% es 0,0081g/L para el tratamiento 13 (20 mM Acetato, 0,32 mM Nitrato y 1,15 mM Fosfato). Los carbohidratos y los lípidos suelen ser las principales reservas de energía, los cambios en éstos pueden ser un indicativo de la forma en que el organismo percibe su entorno y la forma en que se adapta a él [30]. El porcentaje de lípidos obtenido es bajo comparado con estudios realizados por Porras & Prada [36], en los cuales se alcanzan presencias de éste metabolito del 21% con un medio de cultivo Bol Basal modificado con nitrato de sodio y acetato de sodio [36].

Tabla 5. Mayores porcentajes de producción de lípidos

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

La determinación del contenido oleaginoso de las microalgas resulta complicada a causa de las diversas condiciones de cultivo; generalmente constituyen del 20 al 50% del peso seco en las microalgas. Estos porcentajes pueden variar si se presentan condiciones como: el crecimiento en ambientes adversos o bajo situaciones de estrés, éstos provocan el incremento de la fracción lipídica, aunque en detrimento de la productividad lipídica del cultivo [40].

Las respectivas modificaciones de nitrato, fosfato y acetato en el medio de cultivo permite variar considerablemente la proporción en los metabolitos celulares de interés (carbohidratos, proteínas, clorofilas y lípidos), esto nos permite separar y seleccionar los tratamientos que cumplan con mejorar la producción de los

metabolitos deseados (Tabla 6) y de esta manera cumplir el objetivo establecido para este proyecto.

Tabla 6. Resumen de las características de los mejores tratamientos para cada metabolito de interés (proteínas, clorofilas, carbohidratos y lípidos).

TRATAMIENTO	DÍA	METABOLITO	CONCENTRACIÓN [g/L]	PORCENTAJE [g/g]	NUTRIENTES DEL MEDIO		
					Acetato [mM]	Nitrato [mM]	Fosfato [mM]
3	5	PROTEÍNAS	0,63	60%	30	2,94	1,72
14	15	CLOROFÍLAS	0,11	10%	20	1,96	0,19
5	15	CARBOHIDRATOS	1,02	73%	20	1,96	1,15
13	10	LÍPIDOS	0,01	0,34%	20	0,32	1,15

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

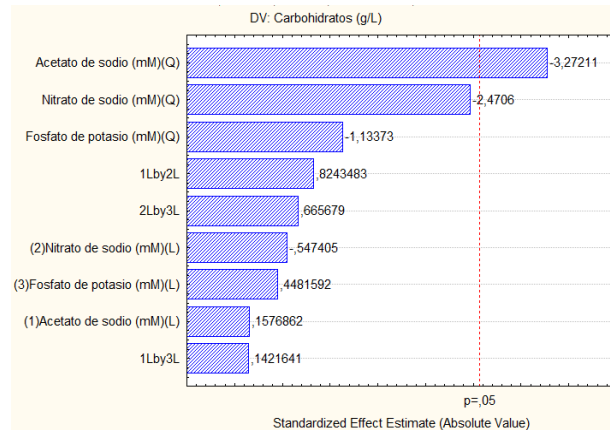
Para determinar la influencia de las variables acetato de sodio, nitrato de sodio (Nitrógeno) y fosfato de potasio (fósforo), sobre los datos obtenidos en el diseño de experimentos, se realizaron los diagramas de Pareto determinando la influencia significativa positiva o negativamente de estas variables en la producción de metabolitos (Figuras 4, 6, 8 y 10), es decir, algunas de las variables mencionadas anteriormente tienen mayor incidencia sobre las otras de acuerdo al metabolito que se esté analizando; esta significancia se aprecia cuando las variables cruzan el umbral (línea punteada de color rojo) con un valor $p < 0,05$.

Los diagramas de superficie de respuesta (figuras 5, 7, 9 y 11) se realizaron de acuerdo a los datos arrojados por los diagramas de Pareto manteniendo constante en cada uno, las mejores condiciones acetato de sodio, nitrato de sodio y fosfato de potasio, para observar el efecto que tienen las interacciones entre las variables significativas con respecto a cada uno de los metabolitos evaluados. En el diagrama se diferencian dos zonas que representan la mayor (Gama de rojos) o menor (Gama de verdes) producciones cuantificadas.

3.1 PRODUCCIÓN DE CARBOHIDRATOS

En la figura 4, se observa que la variable acetato de sodio, es significativa para la producción de carbohidratos, mientras que las demás variables no representan variaciones importantes para este metabolito. De manera que, a menor concentración de acetato de sodio, la producción de carbohidratos se hace mayor (figura 5); obteniendo concentraciones de hasta 1 g/L.

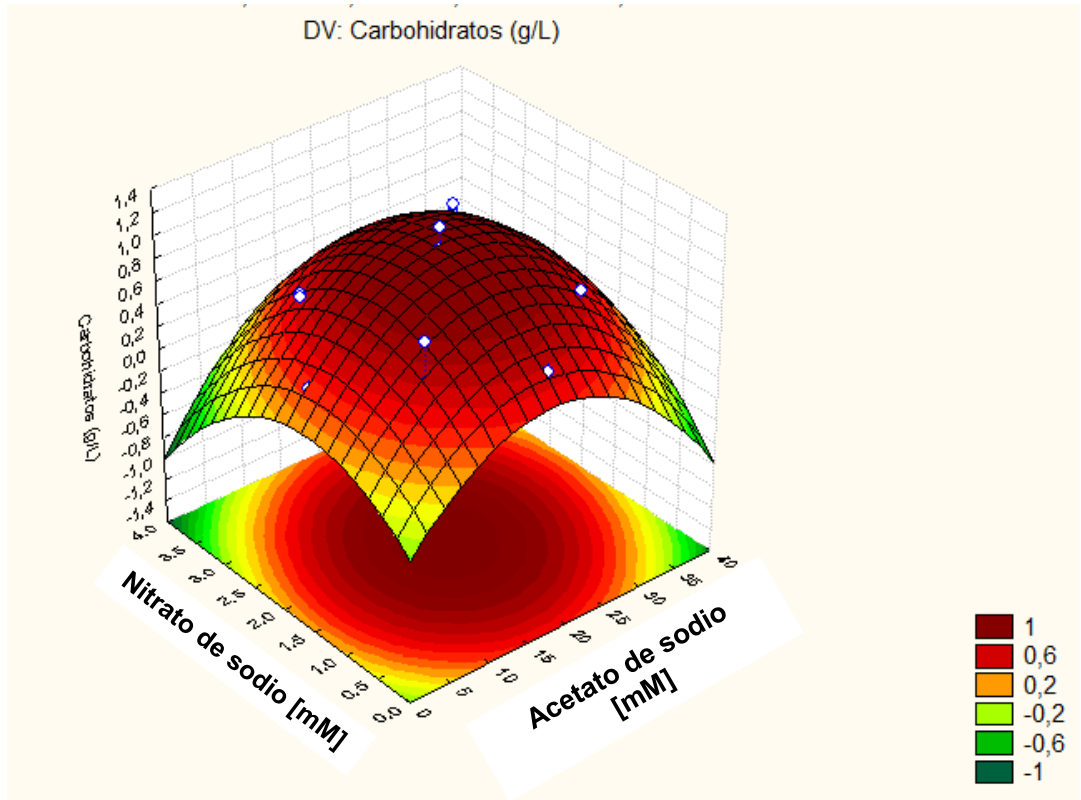
Figura 4. Diagrama de Pareto para la producción de carbohidratos



La figura 5, muestra que el modelo propuesto es selectivo para la producción de carbohidratos. Sin embargo, es necesario suministrar concentraciones promedio de acetato (20 mM), nitrato (1,96 mM) y fosfato (1,08 mM) para obtener altas concentraciones de este metabolito. Según Barajas-Solano *et al.* [10] el uso de acetato de sodio es problemático debido a que su efecto es dependiente de la concentración. Algunos autores como Quiao y Wang, [19]; Jeon *et al.*, [21] y Degrenne *et al* [22] encontraron que las concentraciones por encima de 1g/L pueden causar la inhibición del crecimiento debido a intoxicación [10].

También, vale la pena resaltar que cuando el nitrógeno se agota del medio de cultivo, la célula utiliza el nitrógeno restante en enzimas y estructuras celulares esenciales y una parte del contenido de dióxido de carbono se convierte en lípidos y carbohidratos [43].

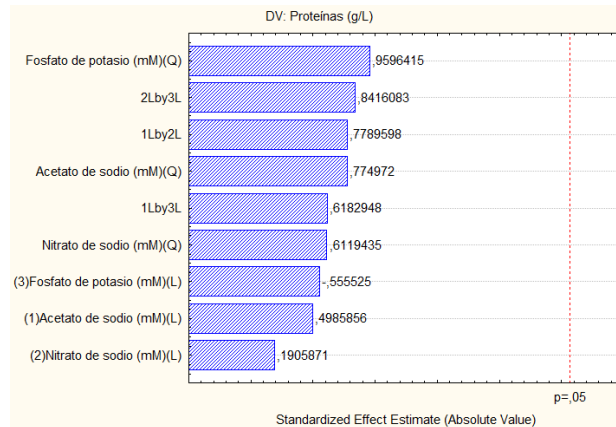
Figura 5. Superficie de respuesta para la producción de carbohidratos.



3.2 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS

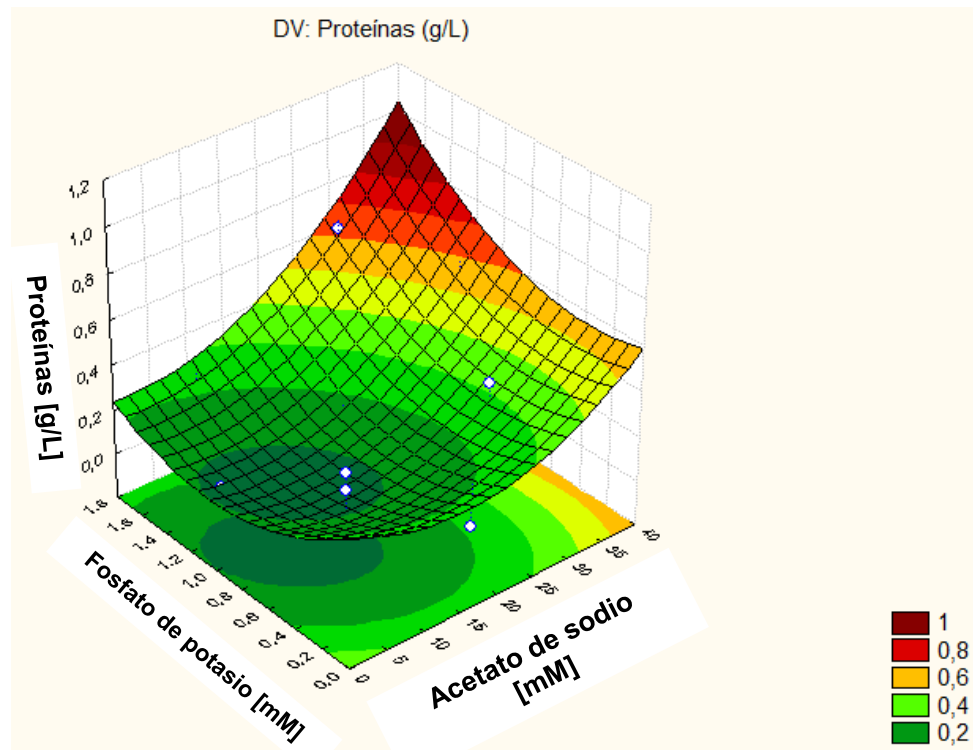
En el diagrama de Pareto para la producción de proteínas (Figura 6), se observa que en los experimentos cultivados no hay variables significativas para la producción de este metabolito. Esto se debe a que el modelo propuesto no es selectivo para la producción de proteínas ya que, las concentraciones de nutrientes proporcionadas al cultivo no son apropiadas.

Figura 6. Diagrama de Pareto para la producción de proteínas



La superficie de respuesta para la producción de proteínas (Figura 7) muestra, que la mayor producción (1g/L), se obtiene con 36,73 mM de acetato; 3,6 mM de nitrato y 2,11 mM de fosfato. Sin embargo, pueden obtenerse concentraciones superiores de proteínas usando concentraciones más altas de acetato, nitrato y fosfato. Fábregas *et al* [44] realizó estudios en los que se evidenció una variación en la concentración de nitrato de sodio influye en la producción de proteínas, de manera que la producción de este metabolito siempre es alta usando nitrato como fuente de nitrógeno pero es proporcional a la concentración que se utilice de este nutriente [44].

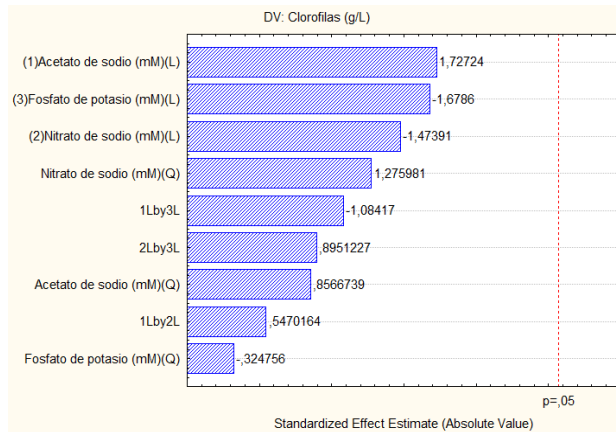
Figura 7. Superficie de respuesta para la producción de proteínas.



3.3 PRODUCCIÓN DE CLOROFILAS

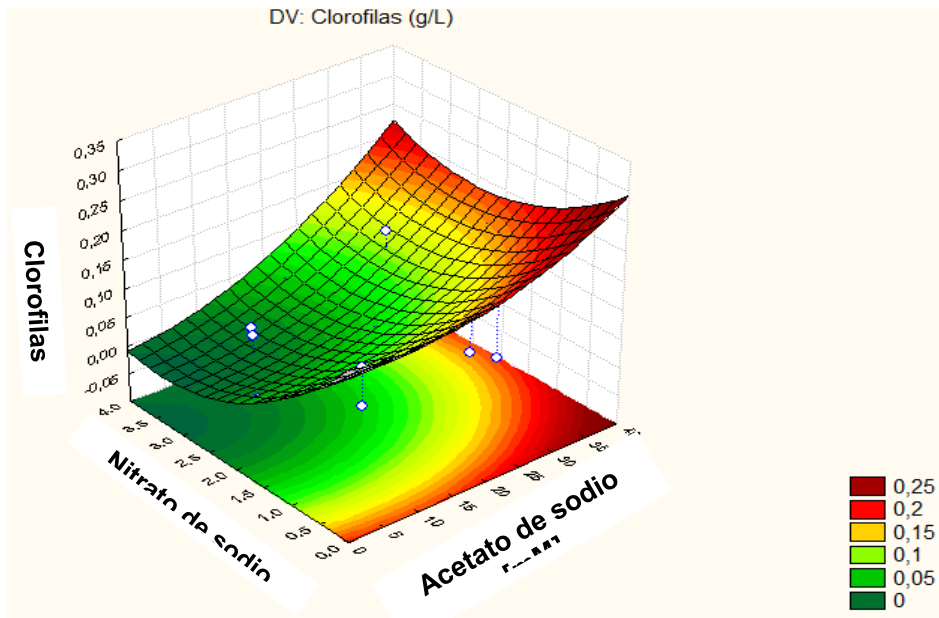
En el diagrama de Pareto para la producción de clorofilas (Figura 8), se observa que en los experimentos realizados no hay variables influyentes para la producción de clorofilas ya que, no se usaron las proporciones adecuadas de nutrientes. No obstante, la producción de clorofilas puede mejorarse empleando concentraciones de acetato superiores a 36,73mM y concentraciones tanto de fosfato como de nitrato inferiores a 0,19mM y 0,32mM respectivamente (figura 9).

Figura 8. Diagrama de Pareto para la producción de clorofilas



La superficie de respuesta para la producción de clorofilas de los cultivos (Figura 9) muestra, que la mayor producción (0,25g/L), se obtiene a altas concentraciones de acetato y bajas concentraciones de fosfato y nitrato. Bajo ciertas condiciones, las microalgas pueden acumular elevadas concentraciones de pigmentos, sin embargo, la producción de clorofilas se ve afectada con cualquier variación en los nutrientes [44].

Figura 9. Superficie de respuesta para la producción de clorofilas.

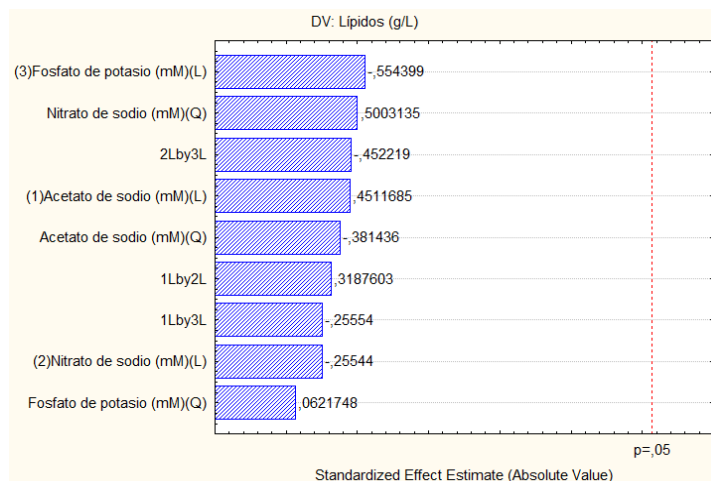


3.4 PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS

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

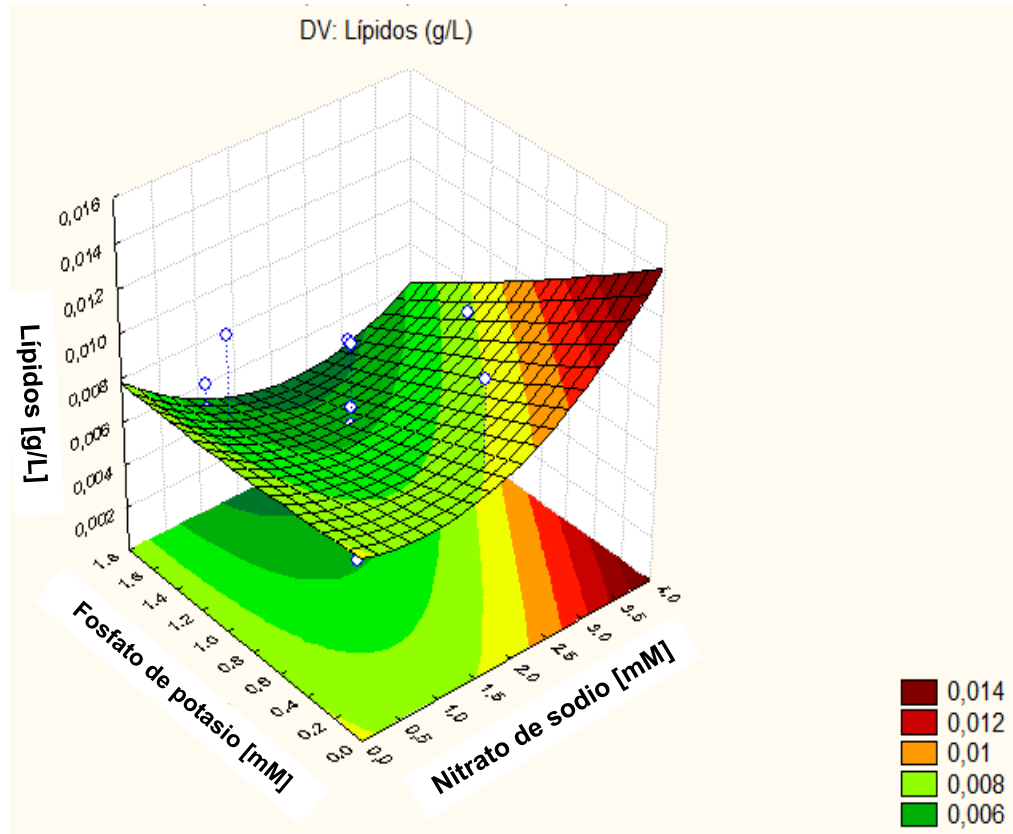
En estudios realizados por Barajas-Solano *et al.*, [10], se demostró que la regulación apropiada de la cantidad de carbono (en este caso acetato de sodio) y nitrógeno no sólo puede aumentar la producción de biomasa, sino también promover la deposición de ciertos metabolitos tales como lípidos [10]. Los resultados obtenidos en esta investigación respaldan esta afirmación de manera que, para este estudio altas concentraciones tanto de acetato como de nitrato favorecen la formación de lípidos; sin embargo, la variación simultanea de acetato, nitrato y fósforo provocaron una disminución general de este metabolito comparada con otros estudios realizados por Porras & Prada [36].

Figura 10. Diagrama de Pareto para la producción de lípidos



La limitación de fosfato provoca acumulación de altas cantidades de lípidos; sin embargo, el crecimiento celular deficiente conduce a una baja producción de este metabolito. Por lo tanto, es importante establecer medio y condiciones de cultivo apropiadas de cultivo para obtener una producción óptima de lípidos [45].

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



4. CONCLUSIONES

- Es necesario suministrar concentraciones promedio de acetato, nitrato y fosfato para obtener altas concentraciones de carbohidratos; el mayor porcentaje de producción de este metabolito se encuentra en el día 15 de cultivo con un 73% de la biomasa total, este porcentaje corresponde a 1,02g/L para el tratamiento 5 (20 mM Acetato, 1,96 mM Nitrato y 1,15 mM Fosfato).
- Agregando 36,73 mM de acetato; 3,6 mM de nitrato y 2,11 mM de fosfato se logra obtener hasta 1 g/L de proteínas. Sin embargo, el mejor porcentaje de proteínas obtenido en esta investigación fue del 60% y corresponde a 0,63g/L para el tratamiento 3 (30 mM Acetato, 2,94 mM Nitrato y 1,72 mM Fosfato).
- Con altas concentraciones de acetato y bajas concentraciones de fosfato y nitrato se consigue una producción de clorofilas de 0,25 g/L. Se logró un 10% de este metabolito correspondiente a una concentración de 0,105 g/L para el tratamiento 15 (20 mM acetato, 1,96 mM de Nitrato y 0,18 mM de Fosfato)
- La mayor producción de lípidos posible (0,014g/L), se obtiene a con altas concentraciones tanto de acetato (36,73mM) como de nitrato (3,6mM) y bajas concentraciones de Fosfato (0,19mM). Se alcanzó una concentración de lípidos del 0,34% correspondiente a 0,0081g/L para el tratamiento 13 (20 mM Acetato, 0,32 mM Nitrato y 1,15 mM Fosfato).
- A pesar que el diseño no es selectivo para proteínas, lípidos y clorofilas, se pueden realizar modificaciones en la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, con fin de obtener mayor producción de alguno de estos metabolitos.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda usar otras concentraciones de acetato de sodio, nitrato de sodio y fosfato de potasio para la producción de clorofilas y lípidos ya que, las empleadas en este estudio no son apropiadas para la producción de estos metabolitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Xiaoling, M., Qingyu ,W., 2006. "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil". *A review. Bioresour.* 97, 841–846.
- [2] Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2010. "An outlook on microalgal biofuels". *Science* 329, 796–799.
- [3] Dragone, G., Fernandes ,BD., Abreu, AP., Vicente, AA., Teixeira, JA., 2011a. "Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae". *Appl. Energy* 88 (10), 3331–3335.
- [4] Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Jingliang, X., Yuan ,Z., 2014. "Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*". *Bioresource Technology* 152, 292–298
- [5] Chisti, Y., 2008. Response to reijnders: Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants?. *Biotechnology Advances* 26, 351-352.
- [6] Chisti ,Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances.* 25, 294–306.
- [7] Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx ,U., Mussgnug ,J., Posten, C., et al. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res* 1, 20–43.
- [8] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert ,A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101, 87 – 96.

- [9] Serive, B., Kaas, R., Berard, JB., Pasquet, V., Picot, L., Cadoret, JP., 2012. "Selection and optimization of a method for efficient metabolites extraction from microalgae". *Bioresour. Technol.* 124: 311–320.
- [10] Laura, E., Barajas, A., Barajas, C., Kafarov, V., 2013. "Improvement of lipid productivity on chlorella vulgaris using waste glycerol and sodium acetate". *CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro*. Vol 5, Num 2. 113-126.
- [11] Lee, Y., 2004. Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Publishing. 116-124.
- [12] Syrett, PJ., Bocks, SM., Merrett, MJ., 1964. The Assimilation of Acetate by *Chlorella Vulgaris*. *J. Exp. Bot.* 15 (1): 35-47.
- [13] Richmond, A., 1986. Microalgae of economic potential. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of microalgal mass culture*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. 199-243.
- [14] Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., 2009. "Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions". *Biotechnol. Lett.* 31(7): 1043-1049.
- [15] Li, X., Xu H & Wu Q., 2007. "Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors". *Biotechnol. Bioeng.*, 98(4), 764-771.
- [16] Goulding K., Merrett M., 1966. "The photometabolism of acetate by *Chlorella pyrenoidosa*". *J. Experiment. Bot.*, 17(4), 678-689.

- [17] Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang X & Chen G., 2010. Biodiesel production by microalgal. *Biotechnol. Appl. Energy*, 87(1), 38-46.
- [18] Bouarab, L., Dautab, A., Loudiki, M., 2004. "Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum fresenius* in the presence of acetate and glucose: Effect of light and acetate gradient concentration". *Water Res.*, 38(11), 2706-2712.
- [19] Quiao, H., Wang, G., 2009. "Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01". *Chinese J. Oceanol. Limnol.*, 27(4), 762-768.
- [20] Hage, C., Grünewald, K., Xyländer, M. & Rothe, E., 2001. "Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*". *J. Appl. Phycol.* 13(1), 79-87.
- [21] Jeon, Y., Cho, C., Yun ,Y., 2006. "Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*". *Enz. Microb. Technol.*, 39: 490-495.
- [22] Degrenne, B., Pruvost, J., Christophe, G., Cornet, J., Cogne, G. & Legrand ,J., 2010. Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Hydr. Energ.*, 35(19), 10741-10749.
- [23] Feng, P., Deng, Z., Fan, L., Hu, Z., 2012. "Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 114 No. 4, 405-410.

- [24] Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., Yuan, Z., 2014. “ Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*”. *Bioresource Technology* 152, 292-298.
- [25] Gao, Y., Yang, M., Wang, C., 2013. “Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae”. *Bioresource technology* 147, 484-491.
- [26] Illiman, AM., Scragg, AH., Shales, SW., 2000. “Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium”. *Enz Microb Technol.* 27: 631–635.
- [27] Andersen, RA., 2005. Algal culturing techniques. London: *Elsevier Academic Press*.
- [28] Dubois, M., Gilles, KA., Hamilton, JK., Rebers, PA., Smith, F., 1956. “Colorimetric method for determination of sugars and related substances”. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- [29] T. Rausch., 1981. “The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein”. *Hydrobiologia.* 78: 237-251.
- [30] Chen, Y., Vaidyanathan, S., 2013. “Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae”. *Analytica Chimica Acta.* 776: 31–40.
- [31] Lowry, OH., Rosenbrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* . 193: 265-275.

[32] Dorey, F., Draves, G., Quantitative Analysis Laboratory: A New Approach Funded By the National Science Foundation, *University of Central Arkansas*, n° 1-3.

[33] Chen, Y., Vaidyanathan, S., 2012. "A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids". *Anal. Chim. Acta.* 724: 67–72

[34] Wawrik, B., Harriman, B., Rapid., 2010. "Colorimetric Quantification of Lipid from Algal Cultures". *The Journal of Microbiological Methods.* 80: 262-266.

[35] Jeffrey, SW., Humphrey, GF., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural populations. *Biochem Physiol Pflanz* 167:191–194.

[36] Porras, LT., Prada, CE., 2012. "Efecto del tiempo de cultivo en la productividad de metabolitos de valor agregado en *Chlorella vulgaris* utex 1803" (tesis pregrado) Bucaramanga, Colombia: *Universidad Industrial de Santander*.

[37] Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energy Rev.*14: 557–577.

[38] Sansawa, H., Endo, H.,2004. "Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions". *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 98: 437–444.

[39] 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*. 6(2): 87-102.

[40] Arredondo, BO., Vázquez-Duhalt, R., 1991. “Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas”. *Ciencia y Desarrollo*. 17: 99-111.

[41] Breuer, G., Lamers, P., Martens, D., Draaisma, R., ReWijffels, R., 2013. “Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*”. *Bioresource Technology* 143:1–9.

[42] Hu, W., Yin, Y., Xin, L., Ying, H., Feng, S., 2012. “Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition”. *Bioresource Technology* 112: 193–198.

[43] Elvira, N., Ruíz, A., Canedo, Y., 2013. “Effect of Nitrogen Content and CO₂ Consumption Rate by Adding Sodium Carbonate in the Lipid Content of *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans*”. *Rev International Journal of Environmental Protection*. Vol 3. 13-19.

[44] Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., 1989. “Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate”. *Aquaculture*. 83: 289-304.

[45] Chun, W., Feng-Wu, B., Xin-Qing, Z., 2013. “Effects of nitrogen concentration and media replacement on cell growth and lipid production of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* DUT01”. *Biochemical Engineering Journal* 78. 32– 38.

BIBLIOGRAFIA

Andersen, RA., 2005. Algal culturing techniques. London: *Elsevier Academic Press*.

Arredondo, BO., Vázquez-Duhalt, R., 1991. “Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas”. *Ciencia y Desarrollo*. 17: 99-111.

Bouarab, L., Dautab, A., Loudiki, M., 2004. “Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum fresenius* in the presence of acetate and glucose: Effect of light and acetate gradient concentration”. *Water Res.*, 38(11), 2706-2712.

Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energy Rev.*14: 557–577.

Breuer, G., Lamers, P., Martens, D., Draaisma, R., ReWijffels, R., 2013. “Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*”. *Bioresource Technology* 143:1–9.

Chen, Y., Vaidyanathan, S., 2012. “A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids”. *Anal. Chim. Acta*. 724: 67–72

Chen, Y., Vaidyanathan, S., 2013. “Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae”. *Analytica Chimica Acta*. 776: 31–40.

Chisti ,Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25, 294–306.

Chisti, Y., 2008. Response to reijnders: Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants?. *Biotechnology Advances* 26, 351-352.

Chun, W., Feng-Wu, B., Xin-Qing, Z., 2013. “Effects of nitrogen concentration and media replacement on cell growth and lipid production of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* DUT01”. *Biochemical Engineering Journal* 78. 32– 38.

Degrenne, B., Pruvost, J., Christophe, G., Cornet, J., Cogne, G. & Legrand ,J., 2010. Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Hydr. Energ.*, 35(19), 10741-10749.

Dorey, F., Draves, G., Quantitative Analysis Laboratory: A New Approach Funded By the National Science Foundation, *University of Central Arkansas*, n° 1-3.

Dragone, G., Fernandes ,BD., Abreu, AP., Vicente, AA., Teixeira, JA., 2011a. “Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae”. *Appl. Energy* 88 (10), 3331–3335.

Dubois, M., Gilles, KA., Hamilton, JK., Rebers, PA., Smith, F., 1956. “Colorimetric method for determination of sugars and related substances”. *Anal. Chem.* 28: 350-356.

Elvira, N., Ruíz, A., Canedo, Y., 2013. “Effect of Nitrogen Content and CO₂ Consumption Rate by Adding Sodium Carbonate in the Lipid Content of *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans*”. *Rev International Journal of Environmental Protection*. Vol 3. 13-19.

Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., 1989. "Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate". *Aquaculture*. 83: 289-304.

Feng, P., Deng, Z., Fan, L., Hu, Z., 2012. "Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 114 No. 4, 405-410.

Gao, Y., Yang, M., Wang, C., 2013. "Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae". *Bioresource technology* 147, 484-491.

Goulding K., Merrett M., 1966. "The photometabolism of acetate by *Chlorella pyrenoidosa*". *J. Exptl. Bot.*, 17(4), 678-689.

Hage, C., Grünewald, K., Xyländer, M. & Rothe, E., 2001. "Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*". *J. Appl. Phycol.* 13(1), 79-87.

Hu, W., Yin, Y., Xin, L., Ying, H., Feng, S., 2012. "Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition". *Bioresource Technology* 112: 193–198.

Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang X & Chen G., 2010. Biodiesel production by microalgal. *Biotechnol. Appl. Energy*, 87(1), 38-46.

Illiman, AM., Scragg, AH., Shales, SW., 2000. "Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium". *Enz Microb Technol.* 27: 631–635.

Jeffrey, SW., Humphrey, GF., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural populations. *Biochem Physiol Pflanz* 167:191–194.

Jeon, Y., Cho, C., Yun, Y., 2006. “Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*”. *Enz. Microb. Technol.*, 39: 490-495.

Laura, E., Barajas, A., Barajas, C., Kafarov, V., 2013. “Improvement of lipid productivity on *Chlorella vulgaris* using waste glycerol and sodium acetate”. *CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro*. Vol 5, Num 2. 113-126.

Lee, Y., 2004. Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Publishing. 116-124.

Li, X., Xu H & Wu Q., 2007. “Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors”. *Biotechnol. Bioeng.*, 98(4), 764-771.

Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., 2009. “Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions”. *Biotechnol. Lett.* 31(7): 1043-1049.

Lowry, OH., Rosenbrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* . 193: 265-275.

Porras, LT., Prada, CE., 2012. “Efecto del tiempo de cultivo en la productividad de metabolitos de valor agregado en *Chlorella vulgaris* utex 1803” (tesis pregrado) Bucaramanga, Colombia: *Universidad Industrial de Santander*.

Quiao, H., Wang, G., 2009. "Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01". *Chinese J. Oceanol. Limnol.*, 27(4), 762-768.

Richmond, A., 1986. Microalgae of economic potential. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of microalgal mass culture. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. 199-243.

Sansawa, H., Endo, H., 2004. "Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98: 437–444.

Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J., Posten, C., et al. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res* 1, 20–43.

Serive, B., Kaas, R., Berard, JB., Pasquet, V., Picot, L., Cadoret, JP., 2012. "Selection and optimization of a method for efficient metabolites extraction from microalgae". *Bioresour. Technol.* 124: 311–320.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101, 87 – 96.

Syrett, PJ., Bocks, SM., Merrett, MJ., 1964. The Assimilation of Acetate by *Chlorella Vulgaris*. *J. Exp. Bot.* 15 (1): 35-47.

T. Rausch., 1981. "The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein". *Hydrobiologia*. 78: 237-251.

Wawrik, B., Harriman, B., Rapid., 2010. "Colorimetric Quantification of Lipid from Algal Cultures". *The Journal of Microbiological Methods*. 80: 262-266.

Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2010. "An outlook on microalgal biofuels". *Science* 329, 796–799.

Xiaoling, M., Qingyu ,W., 2006. "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil". *A review. Bioresour.* 97, 841–846.

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*. 6(2): 87-102.

Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Jingliang, X., Yuan ,Z., 2014. "Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*". *Bioresource Technology* 152, 292–298

Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., Yuan, Z., 2014. " Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*". *Bioresource Technology* 152, 292-298.