

EFFECTO DE LA RELACION CARBONO/NITROGENO Y EL TIEMPO DE
CULTIVO EN LA DEPOSICION FINAL DE METABOLITOS EN *Chlorella vulgaris*
UTEX 1803

ANGIE TATIANA TAMARA GUEVARA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA
2012

EFFECTO DE LA RELACION CARBONO/NITROGENO Y EL TIEMPO DE
CULTIVO EN LA DEPOSICION FINAL DE METABOLITOS EN *Chlorella vulgaris*
UTEX 1803

ANGIE TATIANA TAMARA

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

DIRECTOR
PH. D VIATCHESLAV KAFAROV
TUTOR
PH. D VIATCHESLAV KAFAROV
CONSEJERO
HUMBERTO GARCIA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA
2012

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas hicieron parte de mi vida estos últimos años, gracias a todos los que llegaron a mi, los que me dieron consejos, los que me brindaron apoyo, los que me hicieron sufrir, lo que me causaron problemas, gracias a todos por llenar mi vida de enseñanzas. Necesite mucho valor para continuar, y me siento orgullosa de no haberme rendido en el camino, a pesar de los tropiezos logre comprender que la forma de enfrentar los problemas era manteniendome feliz, no hay nada que facilite la vida, como encontrarle el lado bueno a todas las situaciones.

Gracias a mi mamá y a mi hermano que me dieron la fuerza para continuar, sin ellos no habría sido posible la culminación de esta etapa de mi vida.

Gracias a mi amiga Viviana por estar siempre conmigo, gracias por entenderme, por cuidarme, por consolarme y acompañarme en todo momento; al analizar todo este tiempo me doy cuenta que en estos años no solo conseguí un título universitario, también gané una hermana.

Gracias a Claudia y a Adrian por ser parte de mi vida, ustedes se convirtieron en mi familia en Bucaramanga, y atesoraré cada momento vivido junto a ustedes.

Gracias a Ivan, por ser mi amigo y compañero, sin ti no habría sido posible este proyecto.

Gracias al CIDES y a Andres Barajas por permitirme trabajar en sus instalaciones, y ayudarme en el desarrollo de esta tesis.

Gracias a la Escuela de Biología, los profesores, técnicos y administrativos por brindarme tantas enseñanzas.

Después de graduarse la vida apenas empieza, el camino puede ser difícil pero debemos decidir con qué queremos cargar en nuestra vida y con qué no y aunque el camino parece muy largo y complicado, es cuestión de seguir sin rendirse porque al llegar al destino, nos habremos encontrado a nosotros mismos.

CONTENIDO

INTRODUCCION	13
1. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	18
1.1 Descripción del proceso metodológico	18
1.2 Microalga y Condiciones de Crecimiento	18
1.3 Cuantificación de la Biomasa algal	19
1.4 Cuantificación de Carbohidratos	20
1.5 Cuantificación de Proteínas	20
1.6 Cuantificación de Clorofila <i>a</i> y <i>b</i>	21
1.7 Cuantificación de Lípidos	21
1.8 Cuantificación del consumo de Nitrógeno.....	21
1.9 Análisis estadístico	22
2. RESULTADOS	22
2.1 Efecto de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en la productividad de la biomasa	22
2.2 Efecto de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en la productividad de Carbohidratos	23
2.3 Efecto de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en la productividad de Proteínas	24
2.4 Efecto de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en la productividad de Clorofilas.....	26
2.5 Efecto de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en la productividad de Lípidos	27
2.6 Porcentaje de Nitrógeno consumido en los cultivos.....	28
2.7 Composición porcentual de la biomasa en función del tiempo.	29
3. DISCUSION.....	31
3.1 Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la deposición de metabolitos en <i>C.</i> <i>vulgaris</i>	31

3.2 Efecto del tiempo de cultivo en la deposición final de metabolitos en <i>C. vulgaris</i>	32
3.3 Efecto del déficit de nitrógeno en la producción de metabolitos en <i>C. vulgaris</i> .	33
4. CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFIA	37
ANEXOS	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos y sus restricciones nutricionales.....	19
Tabla 2. Concentración de biomasa (g/L) en función de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803...	22
Tabla 3. Concentración de Carbohidratos (g/L) en función de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803...	23
Tabla 4. Porcentaje de carbohidratos presentes en la biomasa.	24
Tabla 5 Concentración proteínica (g/L) en función de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803...	25
Tabla 6. Porcentaje de proteínas presentes en la biomasa.	25
Tabla 7. Concentración de Clorofilas (g/L) en función a la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803...	26
Tabla 8 Porcentaje de pigmentos presentes en la biomasa.	27
Tabla 9 Concentración lipídica (g/L) en función a la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803.....	27
Tabla 10. Porcentaje de lípidos presentes en la biomasa.....	28
Tabla 11. Porcentaje de Nitrógeno consumido por <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803 los días 5, 10 y 15 de cultivo.	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Metabolismo cultivo autotrófico <i>Chlorella vulgaris</i> Fuente: Deng et al, 2011.	14
Figura 2. Metabolismo <i>Chlorella vulgaris</i> en presencia de fuente de Nitrógeno y fuente de carbono orgánico. Fuente: Deng et al, 2011.	15
Figura 3. Metabolismo <i>Chlorella vulgaris</i> . A. En presencia de fuente de Nitrógeno y fuente de carbono orgánico. B. En presencia de fuente de carbono orgánico y ausencia de fuente de nitrógeno. Fuente: Deng et al, 2011.	16
Figura 4. Descripción del proceso metodológico.	18
Figura 5. Composición porcentual de la biomasa en función del tiempo (Día 5). ..	29
Figura 6. Composición porcentual de la biomasa en función del tiempo (Día 10). ..	30
Figura 7. Composición porcentual de la biomasa en función del tiempo (Día 15). ..	30

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo Bold basal.	43
Anexo 2. Montaje de los tratamientos.	44
Anexo 3. Variación de la absorbancia con la concentración de la muestra de Xilosa.	44
Anexo 4. Variación de la absorbancia con la concentración de la muestra de glucosa.	44
Anexo 5. Curva de calibración de proteínas.	45

RESUMEN

TÍTULO: EFECTO DE LA RELACION CARBONO/NITROGENO Y EL TIEMPO DE CULTIVO EN LA DEPOSICION FINAL DE METABOLITOS EN *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803*

AUTORES:

TAMARA Guevara Angie Tatiana**

PALABRAS CLAVE: *Chlorella vulgaris*, Biomasa, cultivo mixotrofico.

En este trabajo se estudio el efecto de la relación carbono/nitrógeno y el tiempo del cultivo en la concentración de proteínas, carbohidratos, clorofilas y lípidos en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803; para lograr esto, se realizaron cultivos mixotróficos utilizando modificaciones en la concentración inicial de CH₃COONa (5, 10 y 20mM), y NaNO₃ (0.97, 1.94 y 2.94mM). Los tratamientos fueron realizados a 23±1°C, con ciclos luz-oscuridad 12h: 12h durante 5 días. Se encontró que además de la relación carbono/nitrógeno, el tiempo influye en la concentración de metabolitos; la mayor concentración de biomasa se encontró en el tratamiento T9 con una producción de 3.89 g/L a los 10 días del cultivo; en cuanto a la obtención de carbohidratos y proteínas el mejor escenario fue el cultivo control con una producción de 0.092 g/L y 0.56g/L respectivamente al quinto día de cultivo. El decimo día fue el mas productivo para lípidos y pigmentos, durante este día del tratamiento T7 se recuperaron 0.5g/L de lípidos; mientras que del tratamiento autotrófico control se obtuvo una producción de 0.734 g/L de clorofilas. Se encontró que a incrementar la relación carbono/nitrógeno, es posible mejorar las productividades de biomasa, carbohidratos y proteínas en los cultivos, sin embargo esto se ve afectado por los días de cultivo. El déficit de nitrógeno aumento la producción de lípidos en el tratamiento T7.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Ph.D. KAFAROV Viatcheslav

ABSTRACT

TITLE: EFFECT OF CARBON / NITROGEN RATIO AND CULTURE TIME IN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803'S METABOLITES DEPOSITION *

AUTHORS:

TAMARA Guevara Angie Tatiana **

KEY WORDS: *Chlorella vulgaris*, biomass, mixotrophic culture.

In this research, was study the effect of carbon/nitrogen ratio and cultivation time in proteins, carbohydrate, chlorophyll and lipids concentration in *Chlorella vulgaris* UTEX 1803; for do that, we realized mixotrophic cultures using modifications in the initial concentrations of CH₃COONa (5, 10 y 20mM), and NaNO₃ (0.97, 1.94 y 2.94mM).. The treatments' was realized at 23±1°C, with light-dark cycles 12h: 12h during 5 days. Was found that not only the carbon/nitrogen ratio have influence in the metabolites concentration, the time also is a important factor; the highest biomass concentration was found in the treatment 9 with value of production of 3.89 g/L at 10 days of cultivation. In relation with the obtaining of carbohydrate and proteins, the best scenery was the control culture with a production of 0.092 g/L and 0.56 g/L respectively at day number 5 of cultivation. The tenth day was the most productive day for lipids and pigments, during this day of treatment T7 was recovered 0.5 g/L of lipids; while in the control treatment autotrophic was obtained a production of 0.734 g/L of chlorophylls. Was found at increase the carbon/nitrogen relation, is possible improve the biomass production (carbohydrates, and proteins) in the cultures; however that is affected for the number of days of cultivation. Nitrogen deficiency increase lipid production in the treatment T7.

*Thesis

**Faculty of Sciences. Biolgy Department. Director: Ph.D. KAFAROV Viatcheslav

INTRODUCCION

En los últimos años, los combustibles alternativos han adquirido gran importancia debido al rápido agotamiento de las reservas de petróleo y al deterioro de los ecosistemas (Chisti, 2007; Song et al, 2008; Meng et al., 2008). La tendencia mundial es reducir al máximo el uso de combustibles fósiles y reemplazarlos con biocombustibles que sean renovables, amigables con el ambiente y que además posibiliten la captura de CO₂; una alternativa energética que ha resultado muy atractiva en años recientes es el biodiesel (Donohue & Cogdell, 2006).

Dentro de los organismos propuestos para la producción de biodiesel, las microalgas se perfilan como una alternativa viable, ya que algunas especies poseen altos contenidos de lípidos transesterificables, no compiten con la producción de alimentos ya que no requiere de grandes extensiones de tierra y puede utilizar tierras no cultivables (Chisti, 2007; Williams, 2007; Song *et al.*, 2008). El biodiesel obtenido a partir de estos microorganismos es biodegradable, renovable, no contribuye a la liberación de sulfuro a la atmósfera y genera menos contaminantes gaseosos que los combustibles fósiles convencionales (Vicente *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005); además, la quema de éstos últimos está asociada al calentamiento global (Gavrilescu & Chisti, 2005).

Las microalgas constituyen un amplio y diverso grupo de microorganismos fotosintéticos capaces de crecer en diversos hábitats, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (Chisti, 2007); las microalgas oleaginosas contribuyen de manera importante a la fijación de CO₂ y pueden ser utilizadas para producir una amplia gama de biocombustibles como el biodiesel, bioetanol y biometanol (Schenk et al., 2008), además de que producen metabolitos secundarios con aplicación en la industria farmacéutica, para complementos nutricionales, acuicultura y cosmetología (Spolaore *et al.*, 2006).

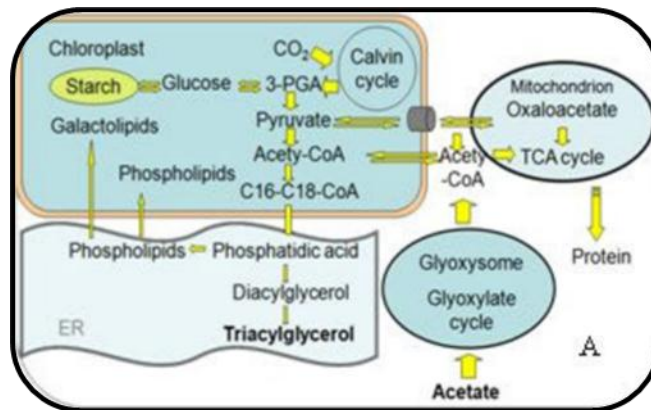


Figura 2. Metabolismo *Chlorella vulgaris* en presencia de fuente de Nitrógeno y fuente de carbono orgánico. Fuente: Deng et al, 2011.

Los cultivos deben ser económicamente viables, para esto se requiere de una fuente de carbono de bajo costo y el conocimiento de cuales concentraciones son las más favorables (Jeon *et al.*, 2006), ya que ciertas concentraciones pueden incrementar las tasas de crecimiento y obtención de biocompuestos (Martínez & Orus, 1991; Chisti, 2007; Chisti, 2008; Liang *et al.*, 2009) mientras que otras resultan inhibitorias y tóxicas para las microalgas (Orosa *et al.*, 2001; Jeon *et al.*, 2006).

Entre los principales géneros de interés comercial se encuentra *Chlorella*, la cual posee una de las tasas de crecimiento más rápida (Converti et al, 2009) y constituye una fuente importante de biomasa para la producción de biodiesel de tercera generación y productos derivados de la extracción de carbohidratos y pigmentos (Becker, 2004); sin embargo, el proceso de obtención del mismo es poco rentable (Jeon *et al.*, 2006).

Mediante el cultivo mixotrófico de *C. vulgaris* se integran algunas ventajas de las configuraciones autotróficas y heterotróficas al tiempo que se superan las dificultades asociadas a estas dos formas de cultivo (Yuan-Kun *et al.*, 1996); las ventajas están relacionadas con un incremento significativo en la tasa crecimiento y productividad debido a una alta incorporación de carbono orgánico dentro de la célula, en particular en la formación de metabolitos como: lípidos, polisacáridos y

proteínas (Harris & James, 1969; Martínez *et al.*, 1997); esto es especialmente importante, pues se han reportado aumentos de hasta cinco veces en comparación con microalgas cultivadas autotróficamente (Syrett *et al.*, 1963).

Sumado a esto, cuando las microalgas son sometidas a condiciones de estrés impuestas por estímulos ambientales, físicos (temperatura e intensidad luminosa) y químicos (deficiencia de nitrógeno, fósforo, azufre y silicio, salinidad y pH del medio de cultivo), solos o en combinación, puede ocurrir síntesis y acumulación de triglicéridos (Rodolfi *et al.*, 2009), acompañada de alteraciones en la composición de lípidos y ácidos grasos. La carencia de nitrógeno, es respecto a los nutrientes el factor que más afecta la producción de lípidos (Fig. 3) (Li *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2008; Gouveia & Oliveira, 2009).

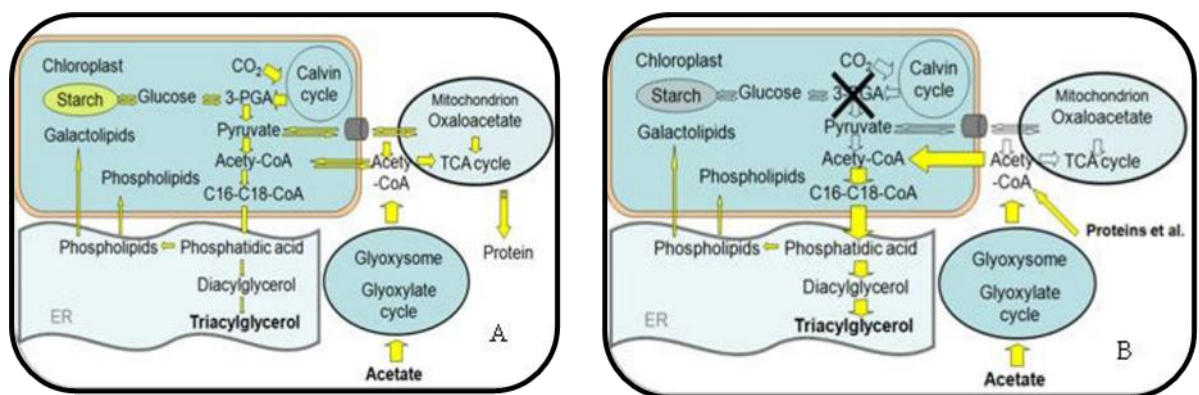


Figura 3. Metabolismo *Chlorella vulgaris*. A. En presencia de fuente de Nitrógeno y fuente de carbono orgánico. B. En presencia de fuente de carbono orgánico y ausencia de fuente de nitrógeno. Fuente: Deng et al, 2011.

Con respecto a la producción de carbohidratos, son pocos los estudios con respecto al entendimiento de sus propiedades y los procesos asociados a la utilización de estos en productos consumibles; algunos de estos estudios evalúan el efecto de diferentes niveles de CO₂ en las concentraciones de carbohidratos y la composición de la pared celular, lo cual puede variar con respecto a la cepa utilizada (Izumo, et al., 2007). En otros estudios *Chlorella* ha sido investigada

como un nuevo recurso alimenticio (ya que una célula de *Chlorella* contiene cerca de 50% de proteínas, 5% de clorofila y un gran número de vitaminas y carotenos) para utilizarse en las poblaciones humanas pobres de todo el mundo y para proveer comida y oxígeno en viajes al espacio y en submarinos (Lee, 1995). Según se ha documentado, posee beneficios terapéuticos, como la capacidad de desintoxicar al organismo de metales pesados como el Hg, el Cd y el Pb entre otros químicos, que son contaminantes agregados a insecticidas o plásticos. Además se piensa que posee la capacidad de prevenir el cáncer (Konishi et al., 1996). En cuanto a la producción de pigmentos, comparada con otras microalgas, *Chlorella* tiene una alta concentración de clorofila, así que su capacidad de fotosíntesis es muchas veces mayor, estas características la convierten en una fuente de ideal de este metabolito, el cual puede ser aprovechado con fines cosméticos y farmacéuticos (Kanno & Kazie, 2005).

En estudios anteriores se ha evaluado el efecto del estrés generado a partir del hambreamiento del carbono y nitrógeno en las microalgas (Deng *et al.*, 2011), sin embargo el comportamiento de estas ante la restricción de nutrientes es considerablemente variante y por tanto, no ha sido posible establecer una tendencia generalizada entre las especies estudiadas (Gouveia & Oliveira, 2009); Aunque los cambios físico-químicos inciden considerablemente en la producción de metabolitos, no se ha determinado el grado de la influencia de parámetros como el tiempo sobre la misma. Por esto, este trabajo se enfoca en evaluar las condiciones óptimas para el cultivo y la incidencia del tiempo en la productividad de proteínas, lípidos, pigmentos y carbohidratos en la microalga *C. vulgaris* UTEX 1803.

1. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1.1 Descripción del proceso metodológico

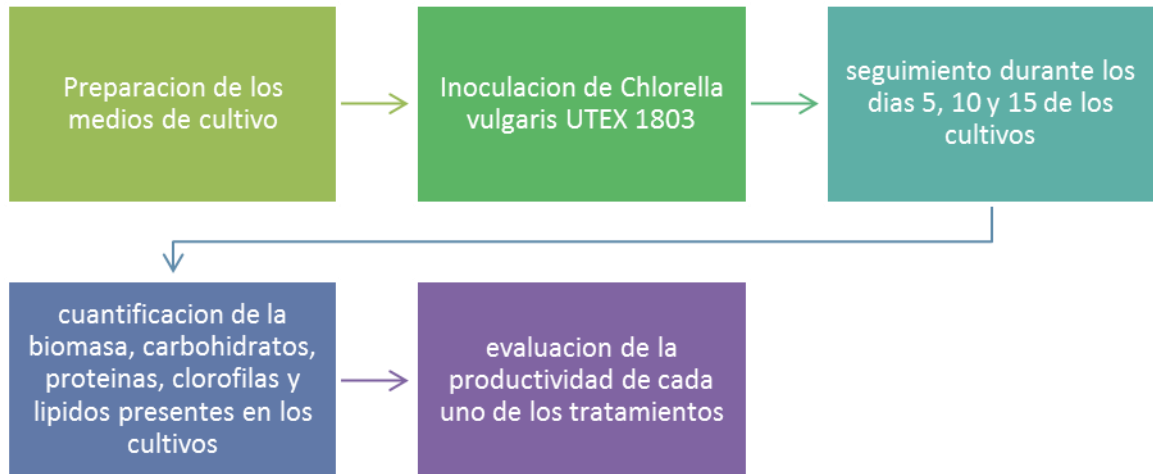


Figura 4. Descripción del proceso metodológico.

1.2 Microalga y Condiciones de Crecimiento

La microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, fue adquirida de la colección de cepas proveniente de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA); se cultivó en medio Bold Basal, cuya composición en g/l es: 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 ($5,53 \times 10^{-4}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-5}$).

Se utilizaron reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14cm y 35cm altura con un volumen del cultivo de 2 L. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 2 L/min.

Con el fin de maximizar la productividad de los diferentes metabolitos en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, se probaron diferentes relaciones carbono/nitrógeno en condiciones mixotróficas. Se utilizó acetato de sodio grado industrial obtenido en laboratorios León (Bucaramanga); Se realizó un diseño de experimentos en el cual se variaron las concentraciones tanto de nitrato de sodio como de la fuente de carbono (Tabla 1). Cada uno de los experimentos (incluyendo el control) se realizaron por triplicado durante quince días, en ciclos de luz: oscuridad de 12:12 y un flujo de aire de 2 L/min filtrado utilizando filtro de membrana de 0,2 µm; el pH inicial, temperatura e intensidad lumínica fueron $6,5 \pm 1$, $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y $480 \pm 1 \mu\text{mol fotonos/m}^2/\text{s}$. Se agregó un volumen de inóculo suficiente para lograr una concentración celular inicial de aproximadamente 0,4 g/l (peso seco), esto se logró controlando la densidad óptica inicial (aproximadamente 0,8 de absorbancia a 500 nm) utilizando un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300 Merck).

Tabla 1. Tratamientos y sus restricciones nutricionales.

		Acetato de Sodio		
		5 mM	10 mM	20 mM
Nitrato	1,03 mM	T1	T2	T3
de Sodio	1,47 mM	T4	T5	T6
	2,94mM	T7	T8	T9

1.3 Cuantificación de la Biomasa algal

Se tomo una muestra de 5 mL de cada uno de los tratamientos durante los días 0, 5, 10 y 15 del cultivo, posteriormente se midió la densidad óptica de cada muestra a una longitud de onda de 500nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck). La densidad óptica fue correlacionada con la cantidad de biomasa (g/L^{-1}) utilizando la ecuación 1:

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

1.4 Cuantificación de Carbohidratos

La cuantificación de carbohidratos se realizó utilizando el método colorimétrico fenol-acido sulfúrico (Dubois *et al*, 1956). Para esto se tomó una muestra de 1 mL de cada cultivo y se centrifugó (Centrifuga DYNAC) por 20 min a 3400 rpm, separándose la biomasa de la fase líquida. Se extrajo la clorofila presente en la muestra mediante la adición de 10 mL de Etanol, se calentó durante 10 minutos a baño maría (80°C) y se centrifugó nuevamente por 20 min a 3400 rpm. Luego se obtienen dos fases, la fase líquida corresponde al extracto con pigmentos y el precipitado a la biomasa libre de pigmentos. Con el fin de evitar que el color de los pigmentos altere la medición, se le adicionó 0,3 gr de Carbón activado a la fase líquida, se agitó por unos segundos y luego se filtró. A cada fase se le adicionó 1 mL de fenol al 5% y 5 mL de Acido sulfúrico al 95.5%. Finalmente cada una de las muestras fue transferida a celdas colorimétricas y se midió la absorbancia a 480 nm para la identificación de pentosas y 490 nm para hexosas, en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

1.5 Cuantificación de Proteínas

La extracción de las proteínas en los cultivos se realizó siguiendo el procedimiento de Illman, *et al* (2000) y el contenido de proteínas totales fue determinado espectrofotométricamente utilizando el método de Biuret, para esto se tomó una muestra de 10 mL de cultivo la cual se centrifugó (Centrifuga DYNAC) durante 15 minutos a 3400 rpm. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el precipitado se re-suspendió en 1 mL de NaOH 1M, esta mezcla fue centrifugada a 3400 rpm durante 15 minutos, este procedimiento fue realizado dos veces. Finalmente, para determinar el contenido de proteínas totales (Dorey y Draves, 1998) se tomó el sobrenadante y se le agregó 5 mL de Biuret, dejando reaccionar la mezcla durante 20 minutos, seguidamente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merk). La curva de calibración fue preparada usando ovoalbúmina con una concentración máxima de 2 g/L.

1.6 Cuantificación de Clorofila a y b

Para determinar la cantidad de clorofila total se tomaron 10 mL de la muestra, se centrifugo a 3400 rpm durante 15 min (Centrifuga DYNAC) para posterior extracción del sobrenadante. La biomasa resultante fue suspendida en 3 mL de etanol al 95%, esta mezcla se llevo a calentamiento en baño de maría durante 10 min a 100°C. Al enfriarse se le agregaron 2mL adicionales de etanol y se centrifugo bajo las condiciones anteriormente mencionadas con el fin de eliminar la biomasa libre de pigmentos. Finalmente, se cuantifico clorofila a (C_a) y clorofila b (C_b) midiendo la absorbancia a longitudes de onda de 664 y 649 nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck) y se aplicaron las ecuaciones 2 y 3, propuestas por Wrolstad et al, (2005):

$$c_a (\mu g/ml) = 13,36A_{664,1} - 5,19A_{648,6} \quad (2)$$

$$c_b (\mu g/ml) = 27,43A_{648,6} - 8,12A_{664,1} \quad (3)$$

1.7 Cuantificación de Lípidos

La cuantificación de los lípidos en los cultivos fue realizada siguiendo el protocolo Soxhlet con hexano, modificado por el centro de investigación CIDES, Para llevar a cabo este procedimiento, se secaron 10g de biomasa, durante un periodo de 12h a 200°C, después se homogenizó la biomasa usando un mortero y se llevó al horno durante 3h a una temperatura de 125°C. Finalmente, se pesaron 5g de dicha biomasa y se envolvieron en papel de filtro (tamaño de poro de 90mm), este montaje ingresó al soxhlet y permaneció allí durante 16h.

1.8 Cuantificación del consumo de Nitrógeno

Para la cuantificación de Nitrógeno (NO_3-N) se utilizó el método de muestreo por espectrofotómetro ultravioleta el cual se encuentra consignado en el Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20th edition (Clesceri *et al*, 1999). Para esto se tomaron 50 ml de medio de cultivo libre de células y se agregó 1 ml de solución de HCl 1 N y se agita vigorosamente, después de 10 minutos, la

muestra se leyó a 220 y 275 nm. Los valores fueron reemplazados en la ecuación 4:

$$\text{valor corregido} = (2 \times \lambda_{275}) - \lambda_{220} \quad (4)$$

1.9 Análisis estadístico

La toma de datos se realizó por triplicado durante la mañana y la tarde de los días 0, 5, 10 y 15 del cultivo; Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el software R versión 2.14.1, evaluándose la normalidad de los datos usando el Test Shapiro Wilks. Posteriormente se evaluó la relación entre las variables usando ANOVAS de dos vías con un límite de confianza del 95% (Parker, 1980).

2. RESULTADOS

2.1 Efecto de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en la productividad de la biomasa

En la tabla 2 se observan las concentraciones de biomasa encontradas en cada uno de los tratamientos en los días 0, 5, 10 y 15 de cultivo. La concentración de biomasa en los tratamientos T3 (3.57 g/L), T6 (3.55 g/L) y T9 (3.24 g/L) durante el quinto día de cultivo fue mayor con respecto a los otros tratamientos durante ese mismo día. La concentración más alta de biomasa se encontró el décimo día del tratamiento T9 (3.83 g/L).

Tabla 2. Concentración de biomasa (g/L) en función de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

Tratamiento	Tiempo de cultivo (Días)			
	0	5	10	15
T1	1.35	1.62	1,94	2.49
T2	1.35	2.29	2.65	2.61

T3	1.35	3.57	3.15	2.56
T4	1.35	0.93	1.85	2.69
T5	1.35	1.28	2.03	2.90
T6	1.35	3.55	2.69	2.87
T7	1.35	1.89	2.36	2.54
T8	1.35	2.16	3.01	2.19
T9	1.35	3.24	3.83	2.77
Control	1.35	1.12	1.84	2.43
Valor estadístico (p)	-	0.043	0.928	0.0798

Con base en el análisis estadístico se infiere que la concentración de biomasa mostro mayores diferencias entre tratamientos el quinto día de cultivo ($p= 0.043$).

2.2 Efecto de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en la productividad de Carbohidratos

La mayor concentración de carbohidratos se encontró en el cultivo control (0.217 g/L). Con respecto a los tratamientos, el T3 (0.0939 g/L) y T5 (0.0928 g/L) permitieron recuperar la mayor cantidad de este metabolito (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de Carbohidratos (g/L) en función de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

Tratamientos	Tiempo de cultivo (Días)			
	0	5	10	15
T1	0.0303	0.0249	0.0679	0.0276
T2	0.0303	0.0113	0.0208	0.045
T3	0.0303	0.0313	0.0544	0.0939
T4	0.0303	0.0617	0.0359	0.0426
T5	0.0303	0.0928	0.0359	0.0426
T6	0.0303	0.0585	0.0716	0.0412
T7	0.0303	0.0319	0.073	0.0305
T8	0.0303	0.0479	0.0515	0.0471

T9	0.0303	0.0571	0.0553	0.0449
Control	0.0303	0.1607	0.0452	0.0536
Valor Estadístico (p)	-	0.0014	0.217	0.0067

En los días 5 ($p=0,0014$) y 15 ($p=0,0067$) del cultivo se encontraron diferencias en cuanto a la deposición de carbohidratos.

Al evaluar la composición de la biomasa se encontró que el tratamiento control estaba compuesto en un 14% por carbohidratos. La biomasa proveniente de los tratamientos mixotrofos tuvo una reducción de mínimo el 50 % con respecto al control (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de carbohidratos presentes en la biomasa.

TRATAMIENTO	DÍA	BIOMASA g/l	CARBOHIDRATOS g/l	CARBOHIDRATOS %
T3	15	2.5600	0.0939	4
T5	5	1.2813	0.0928	7
T2	15	2.6059	0.0450	2
T8	10	3.0115	0.0515	2
CONTROL	5	1.1173	0.1607	14

2.3 Efecto de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en la productividad de Proteínas

La mayor concentración de proteínas se recupero en el cultivo control (0.5886 g/L). Entre los tratamientos se destacaron T8 (0.5644 g/L), T1 (0.4646 g/L) y T2 (0.5153 g/L) por sus altas concentraciones de proteínas (Tabla 5).

Tabla 5 Concentración proteínica (g/L) en función de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

TRATAMIENTO	TIEMPO (días)			
	0	5	10	15
T1	0.1356	0.4646	0.1115	0.2712
T2	0.1356	0.5153	0.1957	0.3567
T3	0.1356	0.3337	0.1484	0.1308
T4	0.1356	0.1650	0.2791	0.2831
T5	0.1356	0.1115	0.2975	0.1504
T6	0.1356	0.3970	0.3143	0.1863
T7	0.1356	0.1926	0.0604	0.3197
T8	0.1356	0.1877	0.1145	0.5644
T9	0.1356	0.4142	0.0131	0.0793
CONTROL	0.1356	0.5886	0.2375	0.3353
VALOR ESTADÍSTICO (p)	-	0.0001	0.7402	0.0689

Solo el día 5 muestra diferencias en cuanto a la deposición de proteínas en los tratamientos (p= 0.0001).

Con respecto a la productividad de la biomasa se encontró que el cultivo control estaba compuesto en un 53% por proteínas, mientras que la biomasa recuperada de los tratamientos solo estaba constituida entre un 23 -26 % por este metabolito, encontrándose una reducción de mas del 50% (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de proteínas presentes en la biomasa.

TRATAMIENTO	DÍA	BIOMASA g/l	PROTEÍNAS g/l	% PROTEÍNAS
T1	5	1.62	0.4646	28
T2	5	2.2900	0.5153	23

T8	15	2.1899	0.5644	26
CONTROL	5	1.1173	0.5886	53

2.4 Efecto de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en la productividad de Clorofilas

Se obtuvo la concentración mas alta de clorofilas en el tratamiento control (0.1215 g/L), con respecto a los tratamientos se encontró que T1 (0.0762 g/L) y T5 (0.0907 g/L) permitían recuperar la mayor concentración de este metabolito (Tabla7).

Tabla 7. Concentración de Clorofilas (g/L) en función a la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

TRATAMIENTO	TIEMPO (días)			
	0	5	10	15
T1	0.0016	0.0290	0.0500	0.0762
T2	0.0016	0.0277	0.0398	0.0473
T3	0.0016	0.0236	0.0416	0.0454
T4	0.0016	0.0413	0.0497	0.0725
T5	0.0016	0.0392	0.0462	0.0907
T6	0.0016	0.0268	0.0400	0.0364
T7	0.0016	0.0411	0.0407	0.0639
T8	0.0016	0.0328	0.0464	0.0463
T9	0.0016	0.0232	0.0353	0.0691
CONTROL	0.0016	0.0328	0.0598	0.1215
VALOR ESTADÍSTICO (p)	-	0.4489	0.7348	0.0308

Se encontró que la relación Carbono/Nitrógeno afecta la concentración de clorofilas solo durante el día 15 de los cultivos ($p=0.0308$).

Al evaluar la cantidad porcentual de los pigmentos en la biomasa se encontró que el cultivo control se componía en un 5% por clorofilas, mientras que la biomasa recuperada de los tratamientos solo estaba compuesta entre el 1 y 3% por este metabolito (Tabla 8).

Tabla 8 Porcentaje de pigmentos presentes en la biomasa.

TRATAMIENTO	DÍA	BIOMASA g/l	PIGMENTOS g/l	% PIGMENTOS
T1	15	2.4860	0.0762	3
T5	15	2.8952	0.0907	3
T6	15	2.8700	0.0364	1
T8	15	2.1899	0.0463	2
CONTROL	15	2.4310	0.1215	5

2.5 Efecto de la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en la productividad de Lípidos

La mayor concentración de lípidos se encontró en los tratamientos T7 (0.5003 g/L) y T8 (0.3018 g/L). Con base en el análisis estadístico se estableció que la relación carbono/nitrógeno afecta significativamente la concentración de lípidos durante todos los días del cultivo (Tabla 9).

Tabla 9 Concentración lipídica (g/L) en función a la relación Carbono/Nitrógeno y el tiempo de cultivo en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

TRATAMIENTO	TIEMPO (días)			
	0	5	10	15
T1	0.0140	0.0599	0.0049	0.0225
T2	0.0140	0.0035	0.0085	0.2034
T3	0.0140	0.0318	0.2403	0.0143
T4	0.0140	0.0018	0.0169	0.0183
T5	0.0140	0.1685	0.0016	0.0041
T6	0.0140	0.0332	0.0113	0.0088
T7	0.0140	0.0059	0.5003	0.0010

T8	0.0140	0.3018	0.0148	0.0053
T9	0.0140	0.0204	0.0237	0.0169
CONTROL	0.0140	0.0270	0.0111	0.0497
VALOR ESTADÍSTICO (p)	-	0.0000	0.0001	0.0014

En este caso se encontró que la proporción de lípidos con respecto a la biomasa fue mayor para el tratamiento T7 (21%), los otros cultivos solo se veían representados entre 1 - 14% por lípidos (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de lípidos presentes en la biomasa.

TRATAMIENTO	DÍA	BIOMASA g/l	LÍPIDOS g/l	% LÍPIDOS
T7	10	2.3634	0.5003	21
T8	5	2.1613	0.3018	14
T5	5	1.2813	0.1685	13
T6	5	3.5460	0.0332	1
CONTROL	15	2.4310	0.0497	2

2.6 Porcentaje de Nitrógeno consumido en los cultivos

La disponibilidad de nitrógeno en los cultivos es un factor decisivo en la deposición de metabolitos por *Chlorella vulgaris*, la tabla 11 expone el porcentaje de consumo de nitrógeno y la concentración de lípidos para los tratamientos T7, T8 y el cultivo control.

Tabla 11. Porcentaje de Nitrógeno consumido por *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 los días 5, 10 y 15 de cultivo.

TRATAMIENTO	PRODUCTIVIDAD LÍPIDOS g/l					
	DÍA 5	[NO ₃ -N]	DÍA 10	[NO ₃ -N]	DÍA 15	[NO ₃ -N]
T7	0.0059	93%	0.5003	94%	0.0010	99%

T8	0.3018	83%	0.0148	90%	0.0053	91%
CONTROL	0.0270	79%	0.0111	79%	0.0497	79%

Se encontró que después de quinto día de cultivo el alga ha consumido la mayor parte del nitrógeno presente en el medio, este déficit nutricional aumenta la productividad de lípidos al llegar el día 10.

2.7 Composición porcentual de la biomasa en función del tiempo.

Se estimó la composición de la biomasa en los diferentes tratamientos para los días 5, 10 y 15 de los cultivos. Las mayores concentraciones de carbohidratos y proteínas fueron encontradas durante el día 5 de los tratamientos, siendo este día el más productivo con respecto a estos metabolitos. El cultivo control se vio representado en un 53% por proteínas y en un 14% por carbohidratos (Fig. 5), lo que lo convirtió en el mejor escenario para la extracción de estos metabolitos.

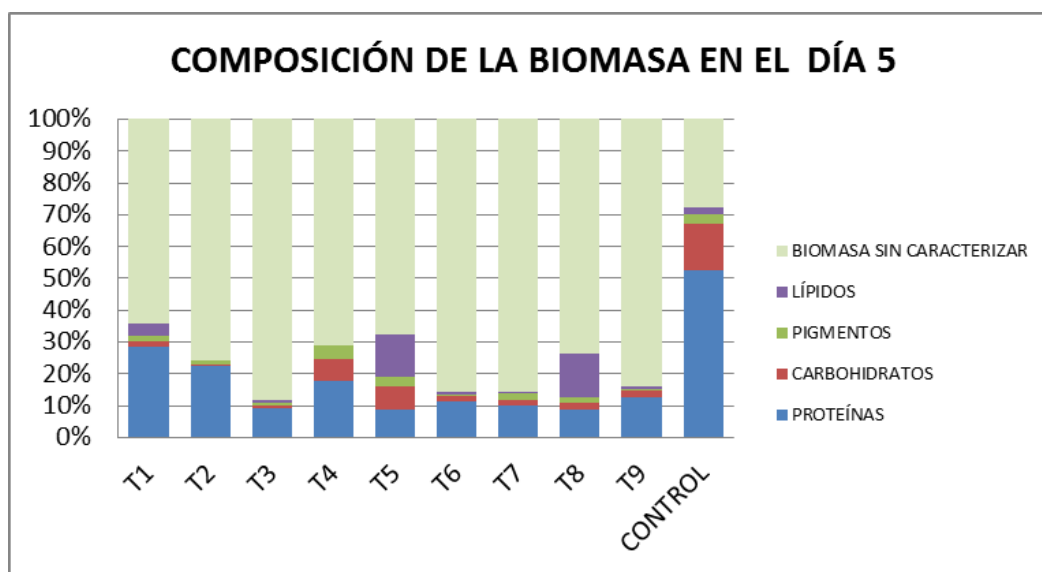


Figura 5. Composición porcentual de la biomasa en función del tiempo (Día 5).

El porcentaje lipídico alcanzó su mayor valor durante el décimo día (Fig. 6) del tratamiento T7 (21%). El día 15 hubo una drástica disminución en la concentración de lípidos, encontrándose porcentajes de composición menores al 5% (Fig. 7).

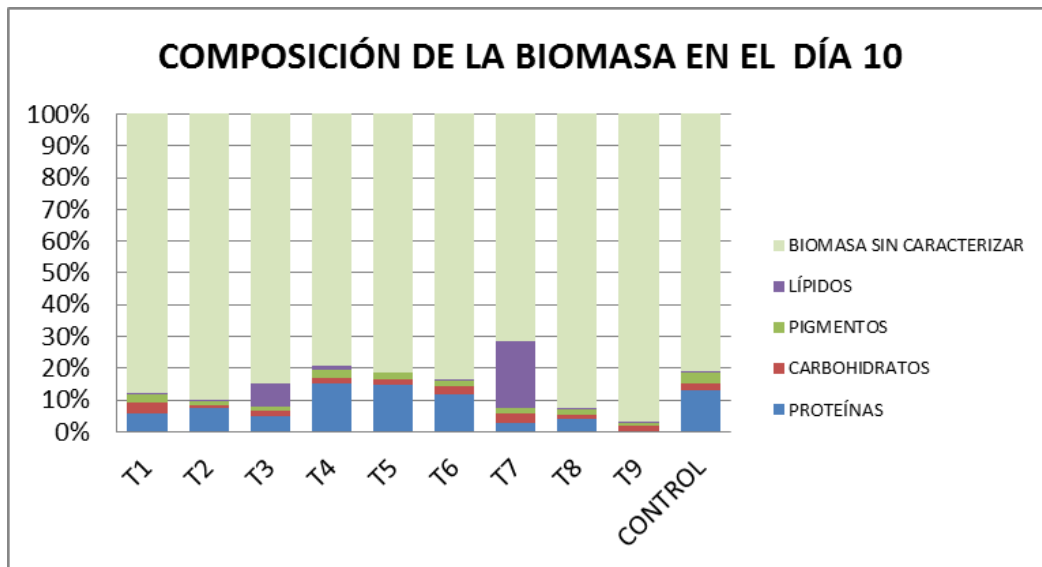


Figura 6. Composición porcentual de la biomasa en función del tiempo (Día 10).

El día 15 de los cultivos fue el menos productivo en cuanto a concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos, sin embargo la concentración de clorofilas fue mayor en estos días (5%), con respecto a los días 5 y 10 (Figura 7).

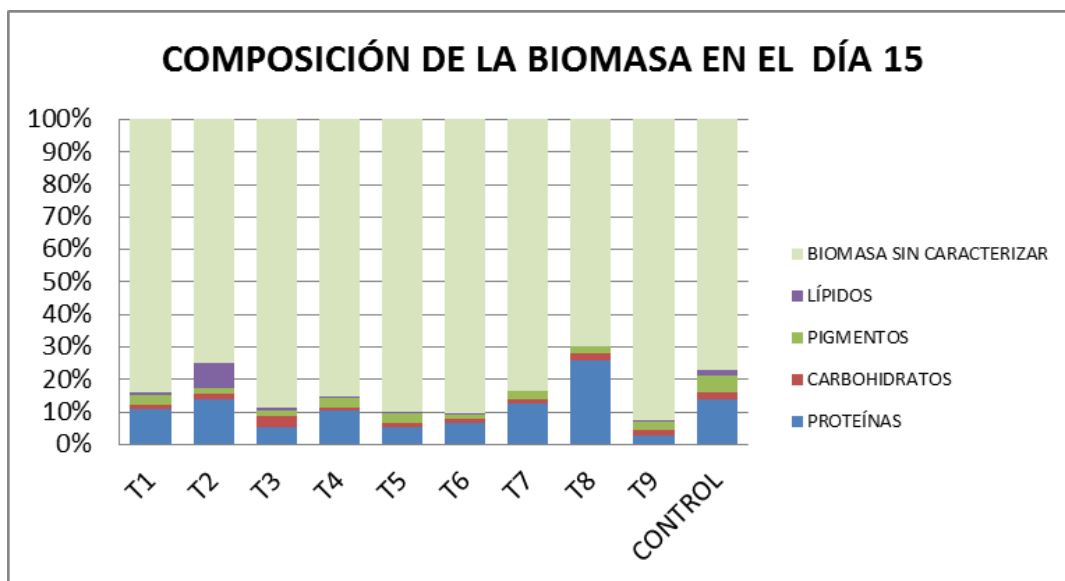


Figura 7. Composición porcentual de la biomasa en función del tiempo (Día 15).

3. DISCUSION

3.1 Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la deposición de metabolitos en *C. vulgaris*

Según Huang *et al*, (2010) las condiciones de cultivo en las microalgas influyen en la composición química final y la tendencia a acumular diversos metabolitos; *C. vulgaris* es un organismo mixotrófico el cual tiene la capacidad de oxidar y utilizar el acetato como fuente de carbono para su crecimiento en la oscuridad (Chojnacka & Rocha, 2004); en estudios anteriores se ha demostrado que su metabolismo incrementa debido a la incorporación de carbono orgánico a partir del acetato, aumentando también la síntesis de carbohidratos y proteínas (Deng *et al*, 2011); Al evaluar el efecto de la relación carbono/nitrógeno en *C. vulgaris* UTEX 1803 se encontró que los tratamientos con las mayores concentraciones iniciales de Acetato de sodio (T3, T6 y T9) tuvieron un mayor crecimiento celular, así como una mayor concentración final de biomasa. Durante el quinto día se observaron las mayores diferencias entre las concentraciones de biomasa en los tratamientos, los cultivos con menores concentraciones de acetato tuvieron un crecimiento lento, debido a las limitaciones en la fuente de carbono, ya que al utilizar sustratos orgánicos adicionales en el medio se puede aumentar la producción de la biomasa y de metabolitos específicos (Hupe & Turpin, 1994). Al incrementar la relación Carbono/Nitrógeno se observa en el alga un aumento de la biomasa producida, por medio del cultivo control se logra obtener en 10 días 1,84 g/L de biomasa, mientras que en los tratamientos mixotróficos es posible duplicar la cantidad de biomasa, alcanzando valores de 3,89 g/L.

El cultivo utilizado como control no tuvo una fuente adicional de carbono, por lo cual constituía un cultivo autótrofo, en este caso las microalgas utilizan la luz como único recurso energético, el cual es convertido en energía química a través de la fotosíntesis (Beale & Appleman, 1971). La concentración de carbohidratos, proteínas y clorofilas fue mayor en este tipo de cultivo; con esto se observa el efecto de la relación Carbono/Nitrógeno sobre *C. vulgaris*, debido a que las altas

concentraciones de acetato de sodio en el medio disminuyen la tasa fotosintética en las células, lo que trae consigo la disminución en la síntesis de carbohidratos y pigmentos (Deng et al, 2011). Por otro lado, el cultivo control tenía la mayor disponibilidad de Nitrato de sodio (2,94mM), esto permitía que las células sintetizaran grandes cantidades de proteínas ya que el Nitrógeno no era un factor limitante y podía ser usado tanto para los procesos fisiológicos, como para el crecimiento y mantenimiento de las estructuras celulares (Illman et al, 2000).

Por ultimo se obtuvo que la deposición de lípidos se vio fuertemente influenciada por las concentraciones de acetato y nitrato inicial, en el tratamiento T7 se recupero la mayor concentración de lípidos, esto esta asociado a que después del 5 día de cultivo las células han consumido el 93% del nitrato presente en el medio (Tabla 10), la baja disponibilidad de Nitrógeno los días restantes aumenta la producción de lípidos en cultivos con altas concentraciones de carbono orgánico inicial (Deng et al 2011), concluyéndose que la limitación de nitrógeno es una presión ambiental eficiente para incrementar la acumulación de lípidos (Goldberg & Cohen, 2006; Rodolfi *et al.*, 2009).

3.2 Efecto del tiempo de cultivo en la deposición final de metabolitos en *C. vulgaris*

Las condiciones de estrés en cuanto a la concentración de nutrientes (en este caso el nitrógeno) y el tiempo de cultivo en *C. vulgaris* generaron ciertas diferencias en cuanto a la deposición final de metabolitos. Durante el quinto día de cultivo se alcanzaron las mayores productividades de carbohidratos y proteínas, esto debido a que estos metabolitos están directamente relacionados con la concentración de nitrato en el medio, el cual durante los primeros días es consumido en mas de un 90%, por esto la síntesis de proteínas posterior a este pico de consumo disminuye debido a las limitaciones que implica para el metabolismo del alga no tener una fuente de nitrógeno constante; así mismo, el déficit de nitrógeno en *C. vulgaris* implica la disminución en la tasa fotosintética, lo que impide la síntesis de carbohidratos en el alga. En consecuencia, al llegar el

decimo día del cultivo el déficit de nitrógeno aumenta la síntesis de lípidos en los tratamientos con mayores concentraciones de acetato (Deng et al, 2011).

Las fuentes de carbono diferente a CO₂ puede causar una disminución en la tasa fotosintética de la célula afectando así la productividad de pigmentos (Yang *et al.*, 2000; Jeon *et al.*, 2006); sin embargo, el ultimo día del cultivo (día 15) la concentración de acetato en el medio disminuye considerablemente, por esto los cultivos aumentan la síntesis de clorofilas con el fin de convertir la energía lumínica en energía química, sin embargo la deficiencia de nitrógeno en el medio no permite que la concentración de clorofilas aumente hasta el punto de igualar al cultivo control. Esta deficiencia en la productividad de clorofilas disminuye el valor de los cultivos debido al gran interés comercial que generan estos pigmentos no solo por su capacidad como agentes colorantes para alimentos, sino por sus propiedades antioxidantes y antimutagenicas (Yang *et al.*, 2000).

3.3 Efecto del déficit de nitrógeno en la producción de metabolitos en *C. vulgaris*.

Los tratamientos con las mayores productividades fueron evaluados con respecto al porcentaje de nitrógeno consumido; el cultivo autotrófico utilizado como control tuvo el consumo mas bajo de nitrato, esto debido a que la presencia de acetato aumenta el consumo de nitrógeno en los tratamientos; Los cultivos sin fuentes de carbono orgánico (Fig 1), utilizan la energía lumínica para convertir las moléculas inorgánicas del CO₂ en moléculas orgánicas sencillas a partir de las cuales se formaran los compuestos bioquímicos constituyentes de las microalgas (Deng *et al.*, 2011); este proceso supone el uso del nitrógeno en la síntesis de enzimas, proteínas y clorofila con el fin de mantener la continuidad de los procesos, lo que genera una gran productividad de estos metabolitos en los cultivos autótrofos. Cuando se agotan las fuentes externas de nitrógeno, las células utilizan la clorofila como una fuente de nitrógeno intracelular (Bidigare, 1993), lo que disminuye a su vez la síntesis de proteínas en las algas.

El metabolismo de las algas en el tratamiento T8 se vio influenciada por la fuente de carbono suministrada inicialmente, de esta manera *C. vulgaris* podía asimilar CO₂ y acetato de sodio simultáneamente (Fig. 2). La concentración de carbohidratos y proteínas entre los días 5 y 10 del cultivo se mantuvo constante, con este resultado inferimos que a pesar de que en los primeros 5 días se consumió el 83% del nitrógeno, la cantidad presente en el medio no constituyó una limitante para el proceso fotosintético. En consecuencia, el tratamiento no estuvo bajo condiciones de déficit de nitrógeno, lo que resulta en la baja productividad de lípidos en el cultivo.

Microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica y la robustez del microorganismo, son relevantes para su selección (Chisti, 2007; Rosenberg et al., 2008); La mayor productividad de lípidos se observó en el tratamiento T7, este cultivo presentaba la mayor concentración inicial de nitrógeno, durante los primeros cinco días de cultivo el alga hace uso del nitrógeno presente en el medio para sintetizar enzimas y proteínas necesarias para el funcionamiento de la fotosíntesis (Fig. 3 A); sin embargo al analizar el porcentaje de consumo de nitrógeno se obtuvo que al quinto día de cultivo *C. vulgaris* había consumido el 93% del nitrato presente en el medio (Tabla 10), esto produjo un déficit nutricional durante los días siguientes, lo que influyó en la disminución de la concentración de proteínas en el alga (Fig. 3 B), ya que se reduce la tasa fotosintética debido a la poca asimilación del nitrógeno.

Se observó que la concentración de lípidos aumentó un 90% entre los días cinco y diez del tratamiento T7, lo cual evidencia el efecto positivo del déficit de nitrógeno en la productividad de lípidos. Los resultados son concordantes con experimentos anteriormente realizados en mixotrofia en *C. vulgaris*, en los cuales se obtuvieron concentraciones de lípidos más altas en condiciones mixotróficas que en condiciones autotróficas (Liang et al., 2009; Heredia-Arroyo et al, 2011).

4. CONCLUSIONES

Las condiciones de estrés nutricional afectan en diferentes formas la deposición de metabolitos en *C. vulgaris*; La relación carbono/nitrógeno causó efectos tanto en la productividad de biomasa como la productividad de metabolitos.

Las modificaciones en el medio además del tiempo de cultivo, permiten incrementar la productividad de biomasa; para el caso de estudio, el tratamiento T9 produjo la mayor cantidad de biomasa reportada (3,8300g/l en 10 días), duplicando la producción de biomasa respecto al control (1,8400g/l).

Con respecto a la productividad de proteínas, carbohidratos y pigmentos el cultivo control fue el mas productivo debido a su carácter autotrófico, sin embargo la producción de lípidos fue menor lo cual disminuye el valor de la biomasa encontrada en este.

En los cultivos mixotrofos, la adición de una fuente de carbono disminuye la asimilación de carbono vía fotosíntesis y el ciclo del ácido cítrico; la mayor parte del carbono intercelular es proveniente de la asimilación de acetato vía ciclo glioxilato, el cual es utilizado posteriormente para la síntesis de lípidos. El tratamiento T7 presentó la mayor productividad de lípidos (0.5003 g/L) (correspondiente al 21% de la biomasa total, el cual representa un aumento de hasta 10 veces respecto al tratamiento control) al décimo día de cultivo, lo cual aumenta el valor comercial de la biomasa proveniente del tratamiento, sin embargo es necesario realizar ensayos con el objetivo de aumentar la producción de carbohidratos, proteínas y pigmentos por este.

Con respecto a los días de cultivo, en tratamientos autotróficos son necesarios 5 días de cultivos para obtener una buena cantidad de proteínas carbohidratos y pigmentos, sin embargo la producción de lípidos bajo este tipo de cultivo es muy pequeña lo que lo convierte en una solución poco rentable ante los

biocombustibles de primera generación, sin embargo estos metabolitos de valor agregado pueden ser utilizados para diferentes destinos como la cosmética o los suplementos alimenticios.

Son necesarios 10 días de cultivo para obtener la mayor producción de lípidos bajo los tratamientos testeados; el contenido de lípidos en los cultivos aumenta el valor comercial de lo mismos, ya que a pesar del valor agregado que representan los pigmentos, y las proteínas la transesterificación del aceite de microalgas a biodiesel capta la mayor atención.

El quinceavo día de cultivo muestra las menores concentraciones de metabolitos, lo que indica que la cosecha de la biomasa debe realizarse antes de este día con el fin de tener una mayor productividad.

A pesar de las ventajas que representan los cultivos autotróficos estos no son viables debido a que la producción de biomasa es menor en comparación con cultivos mixotróficos, lo que nos lleva a concluir que el mejor escenario de cultivo debe integrar los bajos costos y la maximización de la biomasa producida.

Se observó que parte de la biomasa no fue caracterizada, por esta razón se hacen necesario realizar otras pruebas que disminuyan el sesgo en la cuantificación de los metabolitos; además de xilosa y glucosa, es recomendable cuantificar otros carbohidratos como manosa, también es posible determinar el porcentaje de ceniza y carotenoides, entre otros compuestos, que pueden estar presentes en la biomasa sin caracterizar, con el fin de diseñar sistemas integrales para el aprovechamiento y valorización de biomasa a partir de microalgas.

BIBLIOGRAFIA

Beale, S. & Appleman, D. (1971). Chlorophyll Synthesis in *Chlorella*: Regulation by degree of light limitation of growth. *Plant Physiology*, 47: 230-235.

Becker, W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. *Handbook of microalgal culture*. In Richmond, A. (ed.). Blackwell: p. 312-351.

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.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*, 25: 294–306.

Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*, 26:126–131.

Chojnacka, K. & Marquez-Rocha, F. (2004). Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. 3 (1), 21-34

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.

Converti, A., Casazza, A., Ortiz, E., Perego, P. and Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48 (6), 1146-1151.

Deng, X., Fei, X., & Li, Y (2011). The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *African Journal of Microbiology Research*. 5 (3): 260 – 270.

Donohue, T. & Cogdell, R. (2006) Microorganisms and clean energy. *Nature Reviews Microbiology*. 4: 800.

Dorey, F., Draves, G. (1998). *Quantitative Analysis Laboratory: A New Approach* Funded by the National Science Foundation. University of Central Arkansas. 1-3.

Dubois, D., Gilles, K., Hamilton, J., Revers, P., Smith, F (1956). Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28 (3): 350-356.

Gavrilescu, M. & Chisti, Y. (2005). Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv*, 23:471–99.

Goldberg, I.K. & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochem*, 67: 696–701.

Gouveia, L., Oliveira, A.C. (2009). Microalgae as a raw material for biodiesel production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*36: 269-274.

Harris, P. & James, A. (1969). The effect of low temperatures on fatty acid biosynthesis in plants. *J Biochem*, 112:325–330.

Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Ruan, R. & Hu, B. (2011). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass Bioen*, 35: 2245-2253.

Hu, H. & Gao, K. (2003). Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnol Letters*, 25: 421–425.

Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. & Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl En*, 87:38–46.

Huppe, H. C., Turpin, D. H. (1994). Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 45: 577- 607.

Illman, A. M., Scragg, A. H., Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 631–635

Izumo, A., Fujiwara, S., Oyama, Y., Fujita, N., Nakamura, Y. & Tsusuki, M. (2007). Physicochemical properties of starch in *Chlorella* change depending on the CO₂ concentration during growth: Comparison of structure and properties of pyrenoid and stroma starch. *172 (6): 1138-1147*

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.

Kanno, T. & Uyama, K. (2005). *Chlorella vulgaris*: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. Publicado por Woodland Publishing.

Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. & Aaronson, S. (1986). Algal nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook for Microalgal Mass Culture*. Boca Raton, USA: CRC Press.

Konishi, F. et al., (1996). Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* sp against myelo-suppression by 5-fluorouracil cancer immunol immunolother, 46:268-274.

Lee R. E. (1995). Phycology. Cambridge, University Press, USA.

Lee, Y. (2004). Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Oxford, UK: Blackwell Publishing.

Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.O. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green algae *Neochloris oleabundans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81: 629-636.

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

Martínez, F., & Orus, M. (1991). Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM101. Plant Physiol, 95:1150–1155.

Martínez, M.E., Jiménez, J.M., & Farida, E.Y. (1997). Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. Process Biochem, 32 (8), 657-664.

Mendoza, H., Molina Cedres, C., De la Jara, A., Nordström, L., Freijanes, K., Carmona, L. (2008). Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Cryptocodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno. Grasas Aceites, 59: 27-32.

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2008). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew En*, 34:1-5.

Orosa, M., Valero, J., Herrero, C., & Abalde, J. (2001). Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnol Letters*, 23: 1079–1085.

Parker, R. E. 1980. *Introductory Statistics for Biology*. Cambridge University Press, Cambridge. 2. 60-73

Perez-Garcia, O., Escalante, FM., de-Bashan, LE. & Bashan Y (2010). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*. 45 (1): 11-36.

Pinto, A., Guarieiro, L., Rezende, M., Ribeiro, N., Torres, E., Lopes, W., Pereira, P., & De Andrade, J. (2005). Biodiesel: An Overview. *J Brazilian Chem Soc*, 16 (1), 313-1 330.

Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M.R., (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 102 (1), 100–112.

Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., & Betenbaugh, M.J. (2008) A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol*. 19: 430-436

Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J., Posten, C., Kruse, O. & Hankamer, B. (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*. 1, 20-43.

Song, D., Fu, J., & Shi, D. (2008). Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chinese J Biotechnol*, 24: 341–348.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. Review. *J. Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96

Suh, I.S., & Lee, C. (2003). Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnol Biopro Eng*, 8: 313-321.

Syrett, P., Bocks, S. & Merrett, M. (1963). The Assimilation of Acetate by *Chlorella vulgaris*. *J Experiment Bot*, 14: 249-264.

Vicente, G., Martínez, M., & Aracil, J. (2004). Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresour Technol*, 92: 297-305.

Wen, Z., Jiang, Y., & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnol Adv*, 21: 273–94.

Williams, P. B. (2007). Biofuel: microalgae cut the social and ecological costs. *Nature*, 450: 478.

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. *Biochem Eng J*, 102-106.

Yuan-Kun, L., Sun-Yeun, D., Chye-Hock, H., & Chin-Seng, L. (1996). Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. *J Appl Phycol*, 8:163-169.

Wrolstad, R., Decker, E., Schwartz, S. & Sporns, P. (2005) *Inc. Handbook of Food Analytical Chemistry*. John Wiley & sons: p.171

ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo Bold basal.

Macronutrientes		
Soluciones Stock		Para 400 mL
(1) NaNO ₃		10,0 g
(2) MgSO ₄ ·7H ₂ O		3,0 g
(3) NaCl		1,0 g
(4) K ₂ HPO ₄		3,0 g
(5) KH ₂ PO ₄		7,0 g
(6) CaCl ₂ ·2H ₂ O		1,0 g
Micronutrientes		
Soluciones Stock		Para 1 L
Soluciones de elementos de traza (autoclave para disolverse)	(7) ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82 g
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,44 g
	MoO ₃	0,71 g
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57 g
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,49 g
	(8) H ₃ BO ₃	11,42 g
	(9) EDTA	50,0 g
	KOH	31,0 g
	(10) FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,98 g
	H ₂ SO ₄ (concentrado)	1,0 mL
Medio Bold Basal		
Soluciones Stock		Para 1 L
Macronutrientes		10,0 mL de cada uno
Micronutrientes		1,0 mL de cada uno

Se realizaron variaciones en la concentración de Nitrato de sodio con el fin de evaluar el efecto de este en la deposición final de metabolitos en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

Anexo 2. Montaje de los tratamientos.

Cantidades de acetato de sodio para dos litros de cultivo.

Concentración	Cantidad en milimolar	Cantidad en gramos
100%	20 mM	5,4432 gr
50%	10 mM	2,7216 gr
25%	5 mM	1,036 gr

Cantidades de nitrato de sodio para dos litros de cultivo.

Concentración	Cantidad en milimolar	Cantidad en gramos
100%	2,94 mM	20 mL
50%	1,47 mM	10 mL
35%	1,029 mM	7 mL

Anexo 3. Variación de la absorbancia con la concentración de la muestra de Xilosa.

Coefficiente de extinción másico (Xilosa)

Concentración (µg/mL)	Absorbancia (480nm)
100	2,589
80	2,385
60	1,625
40	1,212
20	0,641
0	0

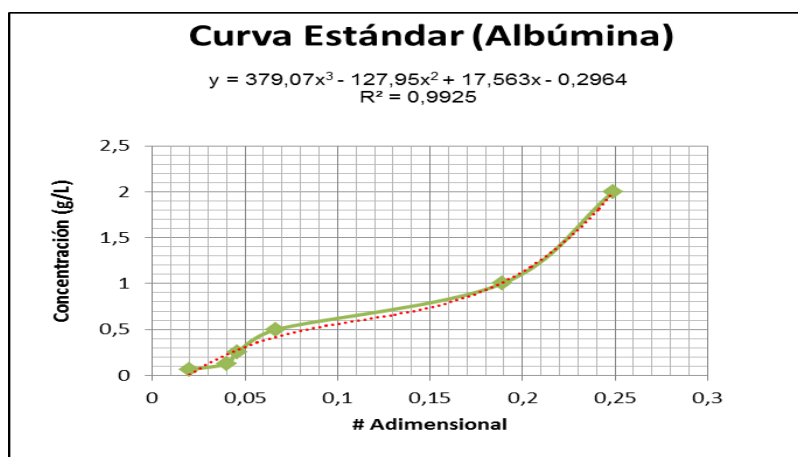
Anexo 4. Variación de la absorbancia con la concentración de la muestra de glucosa.

Coefficiente de extinción másico (Glucosa)

Concentración (µg/ml)	Absorbancia (490nm)
------------------------------	----------------------------

100	2,569
80	1,866
60	1,469
40	0,960
20	0,346
0	0

Anexo 5. Curva de calibración de proteínas.



Curva de Calibración

Concentración (mg/ml)	Proteína 540nm	Linealización
2	0,249	1,99593610
1	0,189	1,01170859
0,5	0,067	0,41996368
0,25	0,046	0,27765296
0,125	0,040	0,22566048
0,0625	0,020	0,00671256