

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN LA GENERACIÓN DE
PROTEÍNAS TOTALES PRESENTES EN *Chlorella vulgaris* PARA LA
VALORIZACIÓN DE LA BIOMASA.**

CESAR MAURICIO PARDO CORZO

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

2012

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN LA GENERACIÓN DE
PROTEÍNAS TOTALES PRESENTES EN *Chlorella vulgaris* PARA LA
VALORIZACIÓN DE LA BIOMASA.**

CESAR MAURICIO PARDO CORZO

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
INGENIERO QUÍMICO**

Directores

PH. D VIATCHESLAV KAFAROV

M. SC. CRISOSTOMO BARAJAS

Codirector

Biólogo ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO

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

2012

*Dedicado a Dios Todo Poderoso por ser mi compañero y
apoyo incondicional.*

*A mi madre Blanca Nieves Corzo Ibáñez, que desde el cielo
me ha dado la fuerza y guiado en este gran paso para ser
profesional.*

*A mi padre Diógenes por confiar siempre en mí, siempre
esperar lo mejor, son la inspiración para mi vida y me dan
fuerza para seguir.*

*A mis hermanos Diana Marcela y David Julián por
aguantar mis caprichos y ser buenos amigos.*

CESAR MAURICIO PARDO CORZO

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 MICROALGA Y CULTIVOS	18
2.2 BIORREACTORES	19
2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	19
2.3.1 Determinación de Biomasa.	19
2.3.2 Determinación de Proteínas Totales	20
2.3.3 Determinación del Consumo De Nitrato (No ₃ -N)	20
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1 EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO.	22
3.1.1 Efecto de la Relación Carbono/Nitrógeno en la Producción de Biomasa en <i>C. vulgaris</i> .	22
3.1.2 Efecto de la Relación Carbono/Nitrógeno en la Producción de Proteínas Totales en <i>C. vulgaris</i> .	24
3.2 EFECTO DEL TIEMPO CON RESPECTO AL PORCERCENTAJE DE PROTEÍNAS Y LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN <i>C. vulgaris</i> .	27
3.3 RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS Y EL CONSUMO DE NITRATO (NO ₃ -N) EN MEDIOS MIXOTROFICOS DE <i>C. vulgaris</i> .	30
4. CONCLUSIONES	35
5. RECOMENDACIONES	36

BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXOS	41

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diseño experimental para medir la cantidad de biomasa, proteínas y consumo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$).	17
Figura 2. Fotografía del fotobiorreactor utilizado en el estudio.	19
Figura 3. Relación carbono/nitrógeno en la producción de biomasa.	24
Figura 4. Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la producción de proteínas.	26
Figura 5. Porcentaje de proteínas totales durante el día 5 del cultivo.	27
Figura 6. Porcentaje de proteínas totales durante el día 10 del cultivo.	28
Figura 7. Porcentaje de proteínas totales durante el día 15 del cultivo.	28
Figura 8. Productividad de proteínas en el tiempo.	29
Figura 9. Producción de proteínas totales y consumo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) del día 5.	30
Figura 10. Producción de proteínas totales y consumo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) del día 10.	31
Figura 11. Producción de proteínas totales y consumo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) del día 15.	31

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño experimental de los cultivos mixotróficos para <i>C vulgaris</i> .	18
Tabla 2. Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa en <i>C. vulgaris</i> .	22
Tabla 3. Efecto de la Relación Carbono/Nitrógeno en la Productividad de Proteínas Totales en <i>C. vulgaris</i> .	25
Tabla 4. Consumo de nitrato (NO ₃ -N) por parte de <i>C. vulgaris</i> en el medio de cultivo Bold Basal modificado bajo la relación carbono/nitrógeno.	32
Tabla 5. Cultivos más eficientes en producción de proteínas totales en <i>C. vulgaris</i> en el tiempo de cultivo.	33

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Curva de calibración de proteínas.	41
Anexo B. Curva de calibración de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$).	42

RESUMEN

TITULO: EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN LA GENERACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES PRESENTES EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 PARA LA VALORIZACIÓN DE LA BIOMASA.*

AUTOR: Cesar Mauricio Pardo Corzo**

PALABRAS CLAVES: Relación C/N, *Chlorella vulgaris*, medio de cultivo, extracción proteínas, Proteína microalgal.

DESCRIPCIÓN:

A nivel mundial la producción de microalgas y la obtención de sus derivados han sido uno de los campos más estudiados en los últimos tiempos. Sin embargo, la baja productividad de los cultivos ha impedido implementar una producción a gran escala. En el caso de *Chlorella vulgaris*, ha sido capaz de crecer en condiciones autotróficas y mixotróficas, mostrando mayor crecimiento en cultivos mixotróficos. Con base en esta teoría, en este trabajo, se optimizará el tiempo de cultivo y evaluará el efecto de la relación carbono / nitrógeno, en la producción de proteínas totales presentes en la microalga *C. vulgaris* UTEX 1803 para la valorización de la biomasa.

Para ello, se efectuaron cultivos mixotróficos durante 15 días a diferentes concentraciones de acetato (0, 5, 10 y 20 mM), y nitrato de sodio (1,029; 1,47 y 2,94 mM). El valor más alto en cuanto a concentración de proteínas, se obtuvo en el medio de cultivo control al quinto día, con una productividad de 0,527 g de proteína / g de biomasa, con un consumo de nitrato (NO₃-N) del (79%). Con base en los datos obtenidos y el análisis de los mismos, se comprobó experimental y estadísticamente que el contenido de proteínas dependen de la relación carbono / nitrógeno presentes en el medio y del tiempo de cultivo, siendo más productivo llevar el cultivo de *C. vulgaris* hasta el día quinto para poder obtener la mayor cantidad de proteínas.

* Proyecto de grado

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

ABSTRACT

TITLE: EFFECT OF CARBON / NITROGEN RATIO IN PROTEIN DEPOSITION TOTAL PRESENT FOR *Chlorella vulgaris* BIOMASSVALUING.*

AUTHOR: Cesar Mauricio Pardo Corzo**

KEYWORDS: C / N ratio, *Chlorella vulgaris*, culture medium, protein extraction, microalgalprotein.

DESCRIPTION:

Worldwide production of microalgae and obtaining its derivatives have been perhaps one of the most studied fields in recent times. However, the low productivity of crops has prevented implement a large-scale production. In the case of *Chlorella vulgaris*, has been able to grow under autotrophic and mixotrophic, showing greater growth in mixotrophic. Based on this theory, in this paper, we optimize the culture time and assess the effect of carbon / nitrogen ratio in the production of total proteins present in the microalgae *C. vulgaris* UTEX 1803 for the valorization of biomass.

For this purpose, mixotrophic culture made during 15 days at different concentrations of acetate (0, 5, 10 and 20 mM) and sodium nitrate (1.029, 1.47 and 2.94 mM). The highest value in terms of protein concentration was obtained in the control culture medium on the fifth day, with a productivity of 0.527 g of protein / g of biomass, with a consumption of nitrogen (79%). Based on the data obtained and the analysis thereof, it was found experimentally and statistically dependent protein content of the carbon / nitrogen present in the medium and culture time, with lead more productive culture of *C. vulgaris* until the fifth day to get as much protein.

* Draft grade

** Faculty of Engineering Physical-Chemical. School of Engineering Chemistry. Directors: Ph.D. Viatcheslav Kafarov and M.Sc. Crisóstomo Barajas. Co-Director: Biologist Andrés Fernando Barajas S.

1. INTRODUCCIÓN

Desde la década de 1950 se han hecho intensos esfuerzos para explorar nuevas fuentes de proteínas alternativas como complementos alimenticios, sobre todo en previsión de un insuficiente suministro de proteínas a futuro.

El cultivo comercial de microalgas tiene más de 40 años de historia, durante las dos últimas décadas sólo tres géneros han tenido un gran interés comercial, *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella*, como resultado de sus cualidades nutricionales: alto contenido de proteínas (50 - 60 %, en peso seco), ácidos grasos esenciales, vitaminas y pigmentos [2].

Entre algunas de las principales especies cultivadas se encuentran *Spirulinaplatensis* (como suplemento alimenticio), *Dunaliella salina* y *Haematococcuspluvialis* (producción de carotenoides), [5] y en mayor importancia se encuentra *Chlorellasp.* por su valor económico y nutricional, tanto para el uso animal como humano. *Chlorella vulgaris* ha sido utilizada por su calidad proteica [19] e incluso presenta propiedades antitumorales [21]. Actualmente, representa un sistema biológico ideal para diferentes líneas de investigación y además presenta una alta eficiencia por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio.

El contenido de proteína es un factor importante para determinar el valor nutricional de las microalgas, [13, 19 y24], realizaron estudios sobre la composición bioquímica y las características del perfil aminoacídico de la microalga *C. vulgaris*, cultivada en régimen autotrófico y evaluaron la calidad de su proteína mediante métodos químicos, encontrando que la composición aminoacídica de *Chlorella vulgarises* comparable con la proteína de referencia de la FAO, excepto por los bajos contenidos de los aminoácidos sulfurados (Met + Cys), fenómeno muy común en otros microorganismos. Sin embargo, comparados con el patrón de referencia de WHO/FAO/UNU (1985) para adultos no presenta

ningún limitante, lo que la convierte en una proteína de alta calidad [1]. En cambio, presentó niveles de lisina superiores al patrón FAO y similares al huevo entero; aminoácido que es el limitante en muchos cereales, por lo que ésta microalga constituye una fuente apropiada para mejorar la calidad de dichos alimentos, en función de su composición de aminoácidos [1 y 20].

Ésta alga además de crecer fotosintéticamente, pueden aprovechar sustratos orgánicos para la biosíntesis y mantenimiento celular; por lo tanto, la adición de ciertos compuestos orgánicos puede suministrar la energía adicional necesaria en situaciones de limitación de luz [17]. La mixotrofia es el crecimiento en el cual el CO₂ y el carbono orgánico se asimilan al mismo tiempo y, por ende, los metabolismos celulares (fotosintético y fosforilación oxidativa) funcionan simultáneamente [16 y 22] combinando la habilidad metabólica heterótrofa y autótrofa de las microalgas [30]. Muchos estudios sobre crecimiento mixotrófico han utilizado algas verdes como *C. vulgaris* [15]. Esta microalga puede usar el acetato como fuente de carbono para su crecimiento en la oscuridad [18]; además, puede hacer su proceso metabólico a partir de fuentes inorgánicas y fotosintéticamente por medio de la luz, confirmando así, que tiene la capacidad de crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas [2], se ha encontrado que su metabolismo incrementa, debido a una alta incorporación de carbono orgánico a partir del acetato dentro de las células, llevando así a la formación de lípidos, polisacáridos y proteínas [28].

Se ha reportado que las fuentes de nitrógeno son un factor de estrés para el crecimiento de algas donde el suministro limitado podría cambiar significativamente la composición del organismo [26 y 29]. El estrés generado por déficit de nitrógeno, en comparación con el recurso de carbono, puede afectar la respuesta de las células a la disponibilidad de nutrientes y por tanto afectar las tasas de crecimiento y la fijación de CO₂ [10]. Además se ha indicado que las especies de *Chlorellasp.*, cuando se cultivan en un medio pobre en nitrógeno, pero

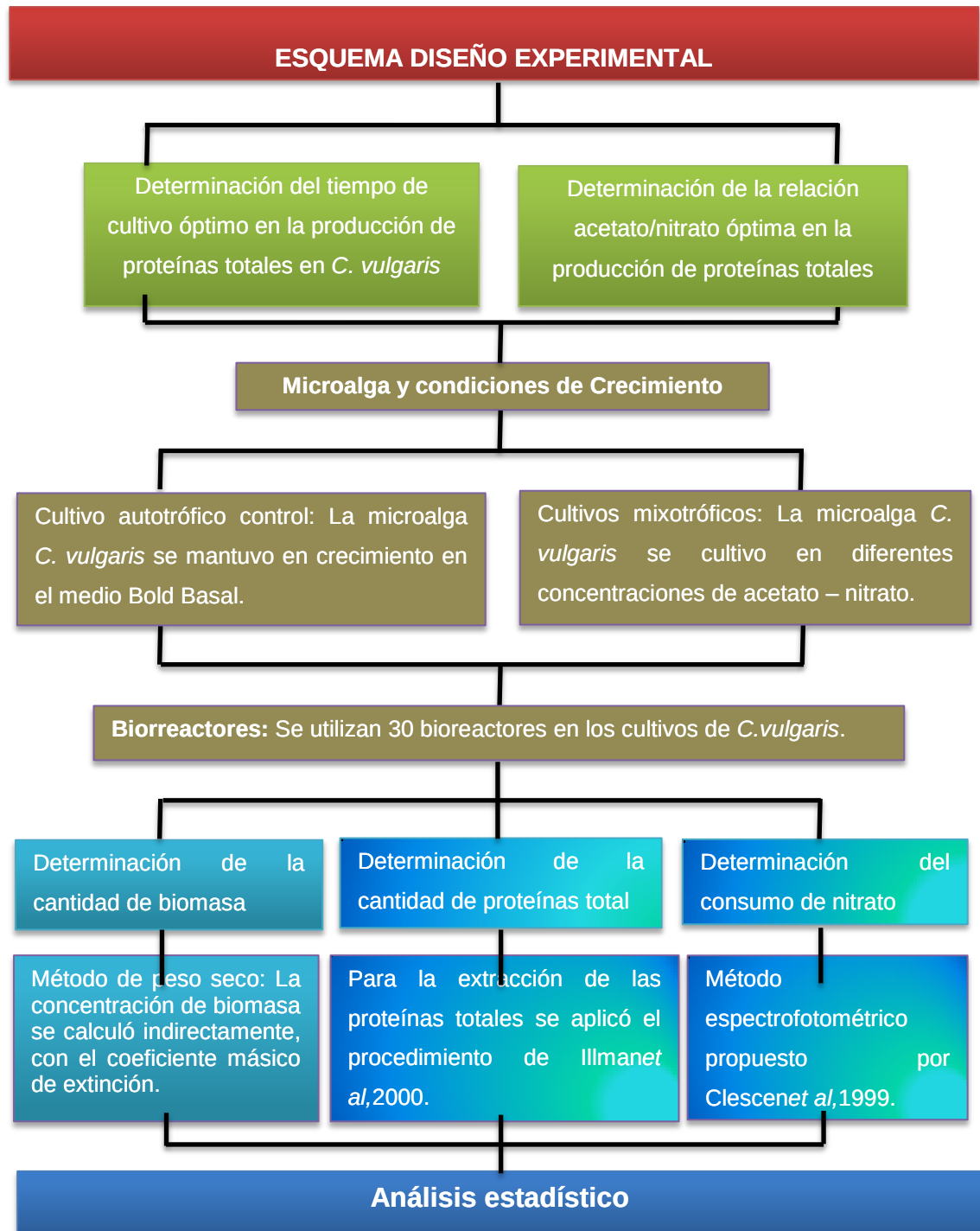
con suficiente luz y / o de fuentes orgánicas de carbono acumulan lípidos o almidón dentro de sus células [11]. Esto probablemente refleja cambios en el metabolismo y el almacenamiento de C/N a mayor estrés.

Normalmente, si se modifica el medio de cultivo, cambia la composición bioquímica de la biomasa, fundamentalmente lo que corresponde a proteínas, lípidos, hidratos de carbono y pigmentos [26]. Si se varía la concentración de carbono y nitrógeno puede hacer más productiva el alga en algunos componentes de la biomasa [12]. Con base en estas teorías, en este trabajo, se analizará el tiempo de cultivo y evaluará el efecto de la relación del acetato de sodio y nitrato de sodio (NaNO_3), como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente, en la producción de proteínas totales presentes en la microalga *C. vulgaris* para la valorización de la biomasa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 1 se presenta el diseño experimental desarrollado en este estudio donde se esquematiza las siguientes etapas: El plan de trabajo, materiales e insumos, toma de datos y análisis estadístico.

Figura 2. Diseño experimental para medir la cantidad de biomasa, proteínas y consumo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$).



2.1 MICROALGA Y CULTIVOS

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 el 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 ($5,53 \times 10^{-4}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-5}$). El cultivo se mantuvo a condiciones de temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, pH neutro, sin ningún suministro complementario de CO_2 y la iluminación del cultivo fue proporcionada con lámparas fluorescentes a ambos lados de los reactores.

Se realizaron cultivos mixotróficos con acetato de sodio a tres concentraciones: 5, 10 y 20 mM y se modificó la cantidad de solución de nitrato de sodio establecida para el medio Bold Basal, estas concentraciones fueron: 1,03; 1,47 y 2,94 mM como se muestra en la Tabla 1.

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

Acetato de sodio				
	0mM	5mM	10mM	20mM
Nitrato	1,03mM	R1	R2	R3
de sodio	1,47mM	R4	R5	R6
	2,94mM	Control	R7	R8
			R9	

2.2 BIORREACTORES

Se utilizaron fotobiorreactores con las siguientes características: botellas de plástico transparentes con una capacidad de 2,5 Litros, con un volumen de trabajo de 2 Litros. Se utilizaron un total de 30 reactores (1 original y 2 réplicas). En el extremo superior de cada uno de los reactores, se insertó un sistema de continuo suministro de aire por burbujeo (tubo-difusor), con el fin de proveer de aire los cultivos como se muestra en la figura 2. Las células se cultivaron en ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad durante 15 días.

Figura 3. Fotografía del fotobiorreactor utilizado en el estudio.



2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Todos los montajes se hicieron por triplicado, de igual forma en todas las mediciones se tomaron muestras de cada una de las copias.

2.3.1 Determinación de Biomasa.

Para determinar la concentración de biomasa, se tomó 5mL de cada uno de los tratamientos durante los días 5, 10 y 15 del cultivo y posteriormente, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 500 nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck), a las 9 am (fase oscuridad) y 4 pm (fase día). La

densidad óptica (D.O) fue correlacionada con la cantidad de biomasa (g/L) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C_B(g/L) = 1,316 * (D.O)_{500} + 0,173 \quad (1)$$

2.3.2 Determinación de Proteínas Totales

Para la extracción de las proteínas totales se aplicó el procedimiento de Illmanet al, (2000), el cual consiste en tomar 10mL de muestra algal, centrifugar a 3400 rpm durante 20 min., luego resuspender el pellet en 1mL de NaOH 1M. La mezcla del NaOH 1M y el pellet de nuevo son centrifugados a 3400 rpm durante 20 min. Finalmente, el contenido de proteínas totales es determinado espectrofotométricamente utilizando el método de Biuret, empleado por Dorey&Draves1998. La curva de calibración es preparada usando ovoalbúmina con una concentración máxima de 2 g/L (Anexo A).

2.3.3 Determinación del Consumo De Nitrato (No3-N)

El nitrato (NO₃-N) consumido fue medido utilizando el método espectrofotométrico propuesto por Clescenet al, (1999). El cual consiste en tomar 50 mL de muestra algal, centrifugar por 20 min. a 3400 rpm, para separar el alga del medio y asegurar que el medio estuviera libre de células, la muestra es filtrada usando papel filtro (2 µm), luego al filtrado se le agrega 1mL de solución de HCl₁N, agitándose vigorosamente durante un minuto, seguido por 10 min. para permitir una reacción completa. Finalmente, la muestra se lee a 220 y 275 nmy los valores son remplazados en la ecuación 1 (Anexo B). El blanco es preparado con la misma cantidad de muestra usada para el experimento, utilizando el agua destilada como agente diluyente.

$$valor\ corregido = (2 * \lambda_{275}) - \lambda_{220} \quad (1)$$

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados en el software STATISTIC 8 utilizando el método de varianza (Anova Factorial), evaluando como variables dependientes las productividades de biomasa y proteínas. Y como factores los tratamientos, tiempo y el % de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) consumido. Donde se pudo observar la relación que existe entre los medios de cultivo y la cantidad de proteínas totales producida por la microalga.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO.

3.1.1 Efecto de la Relación Carbono/Nitrógeno en la Producción de Biomasa en *C. vulgaris*.

Como se muestra en la Tabla 2, se observó que los cultivos que proporcionaron más altas productividades de biomasa fueron R3 (3,57 g/L), R6 (3,55 g/L) con concentraciones iniciales de nitrato de 1,029 y 1,47 mM y concentraciones de acetato de 20 y 20 mM respectivamente a los cinco días de cultivo, también, R9 (3,83 g/L) con concentración inicial de nitrato de 2,94 mM y de acetato de 20 mM, al décimo día de cultivo.

Tabla 2. Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa en *C. vulgaris*.

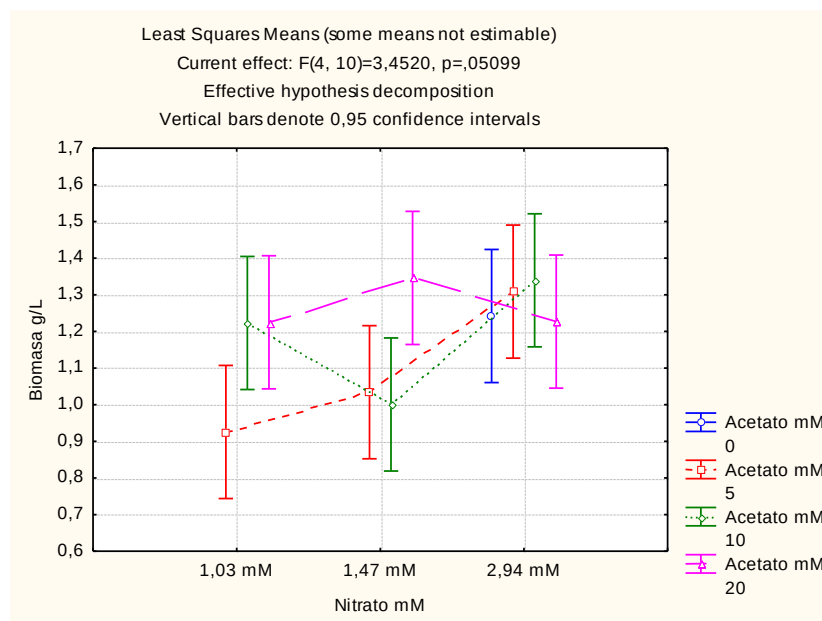
Cultivo	Tiempo de Cultivo		
	Biomasa (g/l) 5 día	Biomasa (g/l) 10 día	Biomasa (g/l) 15 día
R1	1,62	1,94	2,49
R2	2,29	2,65	2,61
R3	3,57	3,15	2,56
R4	0,93	1,85	2,69
R5	1,28	2,03	2,90
R6	3,55	2,69	2,87
R7	1,89	2,36	2,54
R8	2,16	3,01	2,19
R9	3,24	3,83	2,77
CONTROL	1,12	1,84	2,43

En los resultados de todos los experimentos mixotróficos se observó un incremento marcado en la concentración de biomasa en el quinto día y son superiores al control durante todo el periodo de experimentación (15 días) estos resultados son congruentes con los presentados en estudios anteriores [3, 15, 14 y 11].

De igual forma, la productividad de biomasa fue mayor en los cultivos mixotróficos comparado con el cultivo autotrófico, lo que ratifica que las células obtuvieron sus recursos de energía y carbono no solo por fotosíntesis del CO₂ presente en el aire, sino también de los aportados por la fosforilación oxidativa del acetato tal como se indica en la literatura [7 y 11], demostrando que las dos rutas metabólicas están activas.

Según la prueba estadística Anova, se determinó que no existen diferencias significativas con respecto a la productividad de biomasa, puesto que el p-valor fue mayor a 0,05 ($p= 0,05099$) (Figura 3), concluyendo que la relación carbono/nitrógeno no afecta de manera importante el contenido de biomasa, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, se puede observar que se produce mayor cantidad de biomasa en cultivos con grandes cantidades de acetato.

Figura 4. Relación carbono/nitrógeno en la producción de biomasa.



3.1.2 Efecto de la Relación Carbono/Nitrógeno en la Producción de Proteínas Totales en *C. vulgaris*.

En la Tabla 3 se observa, que al comienzo del experimento hay un incremento continuo en el contenido de proteínas del cultivo debido a que el nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) es abundante, sin embargo, en algún punto del tiempo la producción diverge y los resultados difieren significativamente en cuanto a la producción de proteínas ($p=0,00077$, Figura 4), que es atribuible a una limitación de los nutrientes. Durante el tiempo de cultivo se pudo apreciar que los tratamientos R1, R2 y Control con concentración inicial de nitrato de 1,029; 1,029; 2,94mM y acetato 5, 10, 0 mM respectivamente al quinto día y R8, con una concentración de nitrato de 2,94mM y una concentración de acetato de 10mM, al decimoquinto día, son los tratamientos con la mayores productividades de proteínas (R1=0,287, R2= 0,225, Control= 0,527 y R8=0,258 g proteína/g biomasa respectivamente).

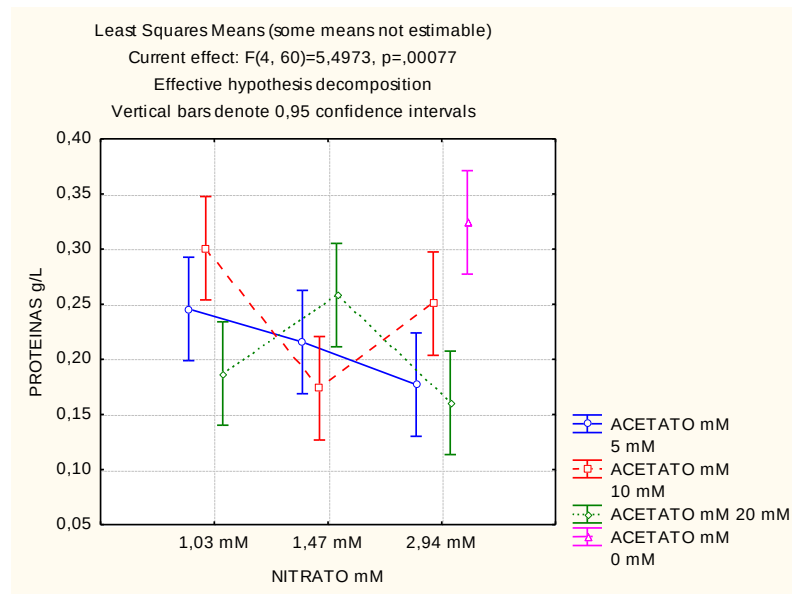
Tabla 3. Efecto de la Relación Carbono/Nitrógeno en la Productividad de Proteínas Totales en *C. vulgaris*.

CULTIVO	g de proteína/g de biomasa día 5	g de proteína/g de biomasa día 10	g de proteína/g de biomasa día 15
R1	0,287	0,057	0,109
R2	0,225	0,074	0,137
R3	0,094	0,047	0,051
R4	0,178	0,151	0,105
R5	0,087	0,146	0,052
R6	0,112	0,117	0,065
R7	0,102	0,026	0,126
R8	0,087	0,038	0,258
R9	0,128	0,003	0,029
CONTROL	0,527	0,129	0,138

Estos resultados muestran que se produce mayor productividad de proteínas en cultivos con pequeñas cantidades de acetato, y altas concentraciones de nitrato, encontrándose los valores más altos en relación a la concentración de proteínas, lo cual implicaría que la variación carbono/nitrógeno en el medio de cultivo afecta la producción de proteínas totales. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Fábregas et al, 1989, y Farrillet al, 2003 en donde el contenido de proteínas para *C. vulgaris* es menor en medios de cultivo con baja fuente de nitrógeno. Además, se ha encontrado que la deficiencia de nitrógeno también afecta otros aspectos de la fisiología celular, incluyendo una disminución en la cantidad de clorofila, afectando así la habilidad de las células para realizar fotosíntesis y los resultados se ven reflejados en la disminución de la tasa de crecimiento microalgal [23].

A todos los valores se les aplicó el análisis de varianza para determinar la significancia de la relación carbono/nitrógeno. Según la prueba estadística Anova, se determinó que existen diferencias significativas con respecto a la productividad de proteínas, puesto que el p-valor fue menor a 0,05 ($p=0,00077$) (Figura 4), concluyendo que la relación carbono/nitrógeno afecta de manera importante el contenido de proteínas, siendo evidente que el tratamiento control difiere significativamente de los otros tratamientos. Esta prueba estadística nos asegura que el efecto de la relación carbono/nitrógeno es relevante en cuanto al contenido de proteínas se refiere. Siendo más productivo el cultivo de *C. vulgaris* en el medio de cultivo control con una concentración inicial de nitrato 2,94 mM y concentración inicial de acetato de 0 mM para poder obtener la mayor cantidad de proteínas.

Figura 5. Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la producción de proteínas.



3.2 EFECTO DEL TIEMPO CON RESPECTO AL PORCERCENTAJE DE PROTEÍNAS Y LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN *C. vulgaris*.

En la Figura 5,6 y 7 se puede observar, que el porcentaje de proteínas promedio en la biomasa al quinto día fue más alto en comparación con el décimo día y décimo quinto día de cultivo para todos los tratamientos mixotróficos, siendo significativamente mayor su porcentaje de proteínas en el tratamiento control con el 52,7 % del total de biomasa ($p=0,002$) (Figura 8).

Figura 6. Porcentaje de proteínas totales durante el día 5 del cultivo.

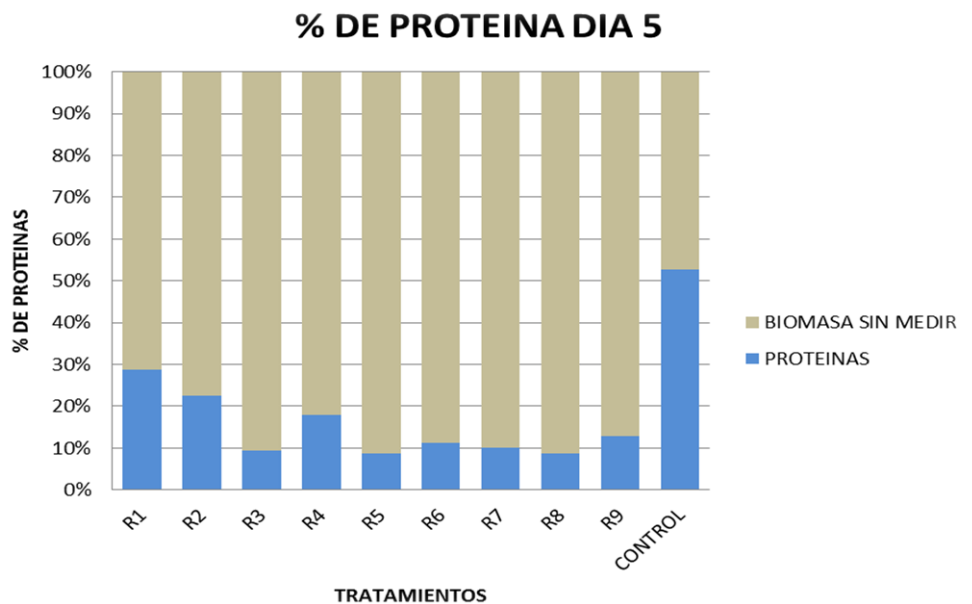


Figura 7. Porcentaje de proteínas totales durante el día 10 del cultivo.

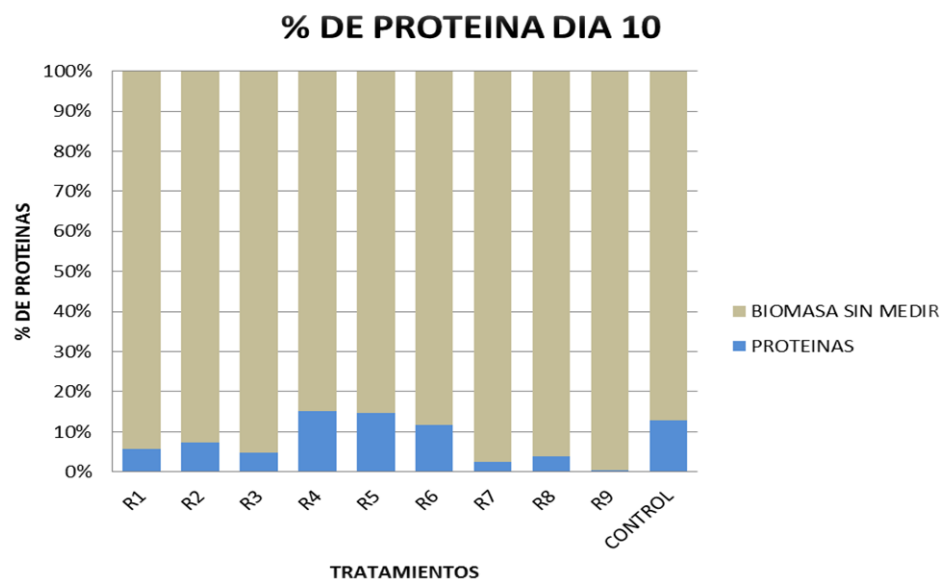
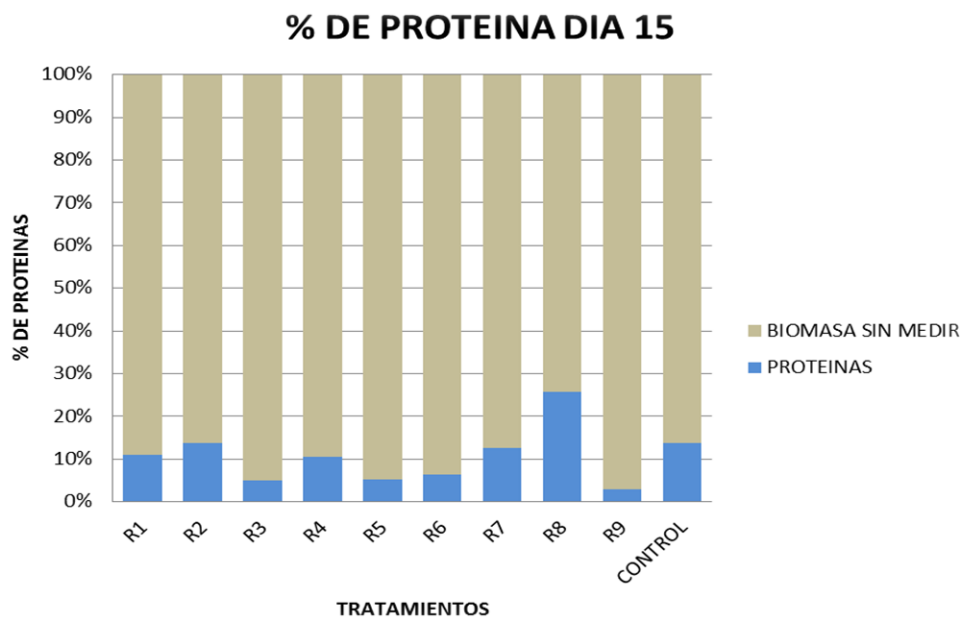
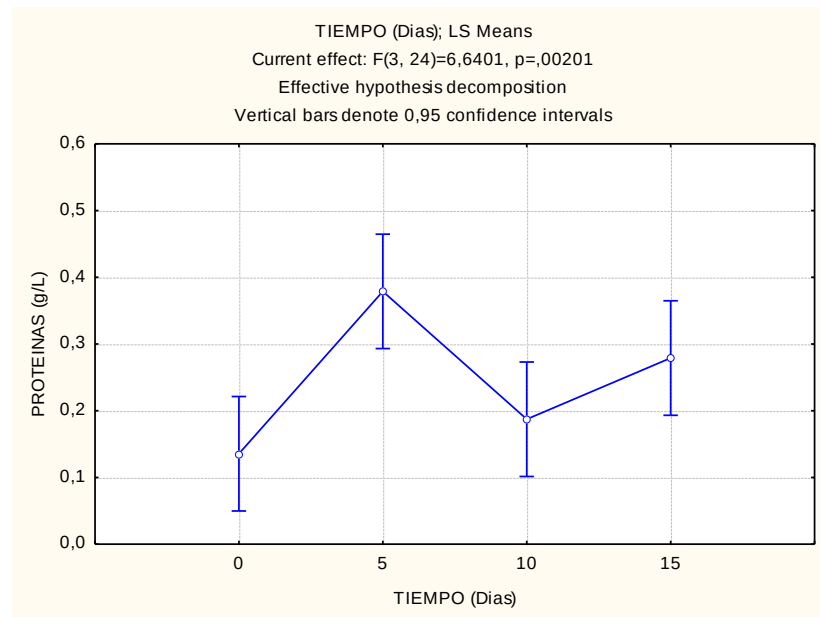


Figura 8. Porcentaje de proteínas totales durante el día 15 del cultivo.



A todos los valores se les aplicó el análisis de varianza para determinar la significancia del tiempo de cultivo. La prueba Anova, determinó que existen diferencias significativas con respecto a la concentración de proteínas, puesto que el p-valor fue menor a 0,05 ($p=0,002$) (Figura 8), concluyendo que el tiempo de cultivo afecta de manera importante el contenido de proteínas, siendo evidente que el día cinco de cultivo difiere significativamente de los otros días de cultivos. Esta prueba estadística nos asegura que el efecto del tiempo es relevante en cuanto al contenido de proteínas se refiere. Siendo más productivo llevar el cultivo de *C. vulgaris* hasta el día quinto para poder obtener la mayor cantidad de proteínas. Esto coincide con los resultados reportados por Farrillet al, 2003; quien plantea que la concentración de proteínas depende de la edad del cultivo.

Figura 9. Productividad de proteínas en el tiempo.



3.3 RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS Y EL CONSUMO DE NITRATO (NO₃-N) EN MEDIOS MIXOTROFICOS DE *C. vulgaris*.

En las figuras 9, 10 y 11 se muestran las concentraciones de proteínas totales y el porcentaje de nitrato (NO₃-N) consumido en todos los experimentos durante los 15 días de cultivo. Según los resultados, los cultivos R1, R2 y control, son los tratamientos con mayores concentraciones de proteínas en el quinto día y R8 registró el mayor valor en cuanto al contenido de proteínas en el décimo quinto día, de igual manera estos cultivos corresponden a los que consumieron menores cantidades de nitrato (NO₃-N) con valores de R1= 53%, R2=56%, control = 79% al quinto día, a excepción R8 con el 100% del consumo de nitrato (NO₃-N) al decimoquinto día (Tabla 4). Sin embargo, el cultivo control fue el más productivo en la obtención de proteínas totales (0,527 g de proteína/g de biomasa) y bajo consumo de nitrato (NO₃-N) (79% del total del nitrato (NO₃-N) presente en el medio), en tan solo cinco días de cultivo, siendo el mejor cultivo para la obtención de proteínas.

Figura 10. Producción de proteínas totales y consumo de nitrato (NO₃-N) del día 5.

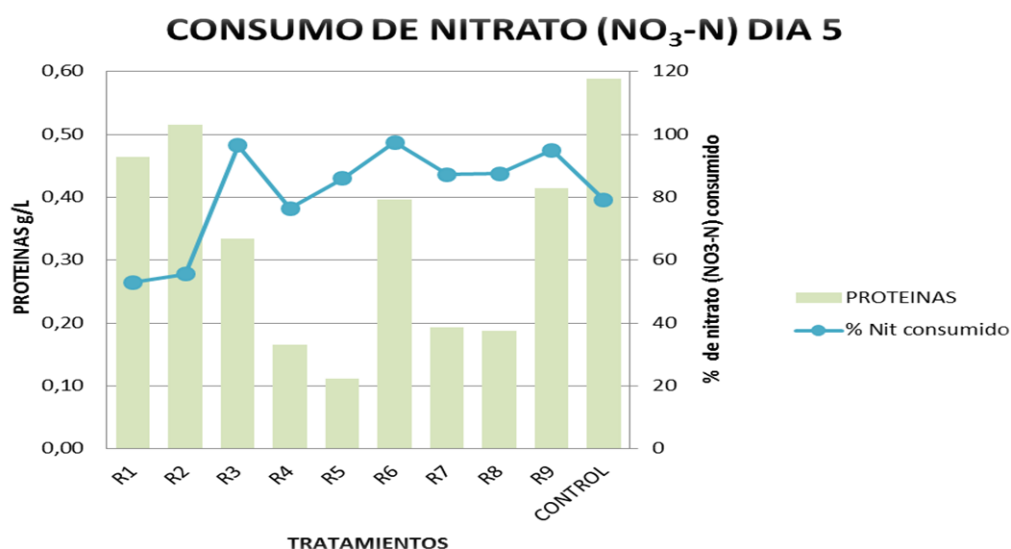


Figura 11. Producción de proteínas totales y consumo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) del día 10.

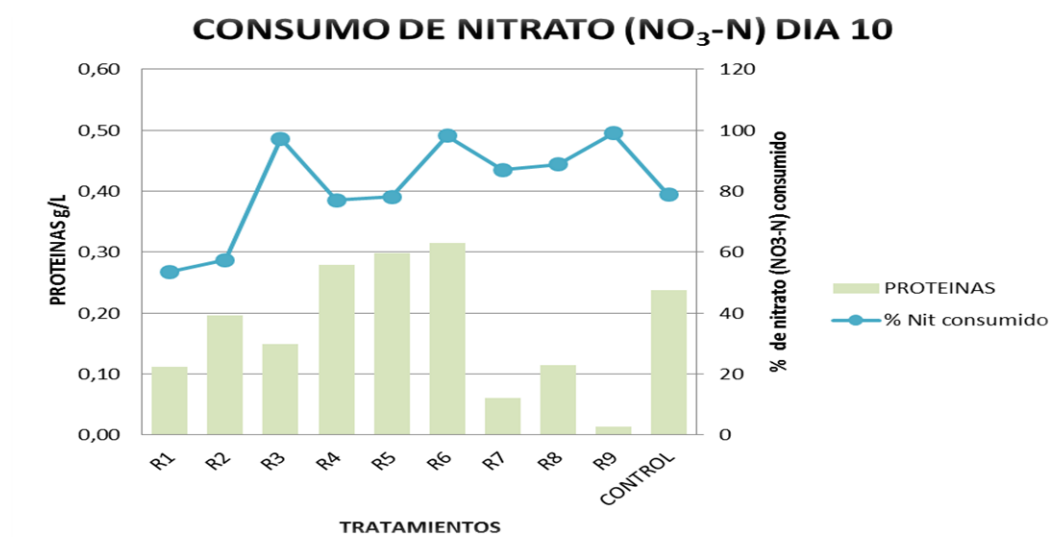
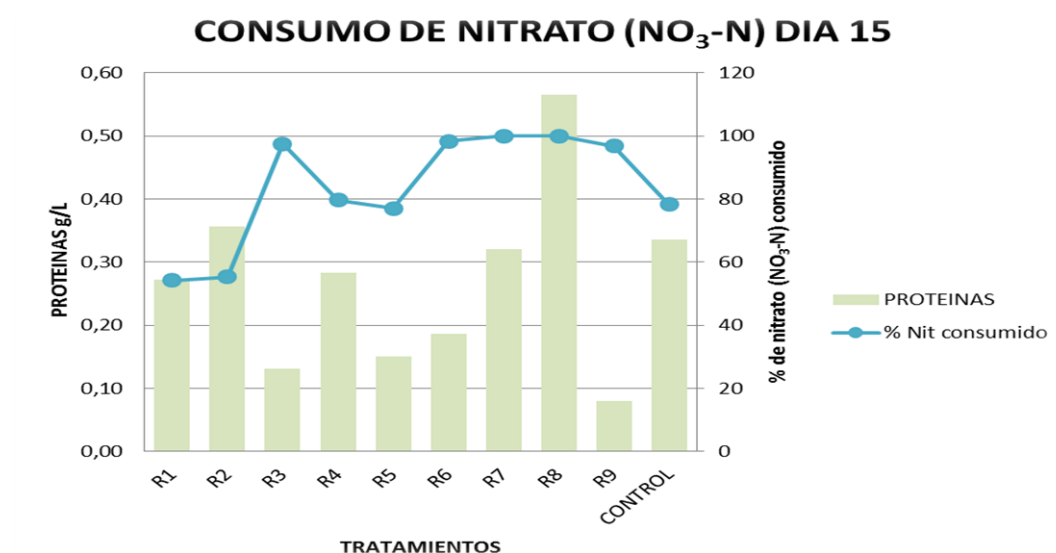


Figura 12. Producción de proteínas totales y consumo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) del día 15.



Como se muestra en la Tabla 4 se encontró que en todos los tratamientos el consumo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) aumenta durante los primeros cinco días de cultivo y se mantiene aproximadamente constante hasta el día 15 de cultivo. Además, se observa un consumo significativo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) para los cultivos con mayor concentración de acetato. Esto puede deberse a que por la presencia del acetato el nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) se consume casi en su totalidad debido a que éste es rápidamente incorporado y utilizado en la producción de polisacáridos y proteínas.

Tabla 4. Consumo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) por parte de *C. vulgaris* en el medio de cultivo Bold Basal modificado bajo la relación carbono/nitrógeno.

CULTIVO	% $\text{NO}_3\text{-N}$ consumido día 5	g de proteína/g de biomasa día 5	% $\text{NO}_3\text{-N}$ consumido día 10	g de proteína/g de biomasa día 10	% $\text{NO}_3\text{-N}$ consumido día 15	g de proteína/g de biomasa día 15
R1	53	0,287	54	0,057	54	0,109
R2	56	0,225	57	0,074	55	0,137
R3	97	0,094	97	0,047	98	0,051
R4	76	0,178	77	0,151	80	0,105
R5	86	0,087	78	0,146	77	0,052
R6	97	0,112	98	0,117	98	0,065
R7	87	0,102	87	0,026	100	0,126
R8	87	0,087	89	0,038	100	0,258
R9	95	0,128	99	0,003	97	0,029
CONTROL	79	0,527	79	0,129	78	0,138

Con base en estos resultados se puede decir que las células después de cinco días de cultivo, dejan de consumir nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) como una medida para regular la concentración interna y externa. Richardson et al, 1969, encontraron que en algún punto en el tiempo, después del agotamiento del nitrógeno en el medio, todo el nitrógeno es aparentemente utilizado en enzimas y estructuras celulares esenciales.

Los datos experimentales demuestran, que la respuesta de la microalga a las diferentes concentraciones de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) y acetato es variable en términos de contenido de proteínas. Ördöget al, 2011 reportó que el nitrógeno es requerido para la biosíntesis de proteínas y por ende la limitación de este nutriente afecta la concentración de proteínas, que son requeridas en otros procesos como la división celular.

Tabla 5. Cultivos más eficientes en producción de proteínas totales en *C. vulgaris* en el tiempo de cultivo.

CULTIVO	% $\text{NO}_3\text{-N}$ consumido o día 5	g de proteína/ g de biomasa día 5	% $\text{NO}_3\text{-N}$ consumido o día 10	g de proteína/ g de biomasa día 10	% $\text{NO}_3\text{-N}$ consumido o día 15	g de proteína/ g de biomasa día 15
R1	53	0,287	54	0,057	54	0,109
R2	56	0,225	57	0,074	55	0,137
R8	87	0,087	89	0,038	100	0,258
CON	79	0,527	79	0,129	78	0,138
T						

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

pigmentos, lípidos, entre otros). En este caso, como se muestra en la Tabla 5, es importante resaltar que en el cultivo control hay una alta productividad de proteínas totales (0,527 g de proteína/g de biomasa) en una gran concentración (52,7 % p/p) en tan solo cinco días de cultivo, además el consumo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) no fue tan elevado (79% del total del nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) presente en el medio), siendo el mejor cultivo para la obtención de la mayor cantidad de proteínas.

4. CONCLUSIONES

Con base en los datos obtenidos en este estudio y el análisis de los mismos, se comprobó experimental y estadísticamente que el contenido de proteínas dependen de la relación carbono / nitrógeno presentes en el medio ($p=0,00077$), destacándose el tratamiento control (0 mM Acetato: 2,94 mM Nitrato), con la mayor productividad (0,527 g de proteína/g de biomasa), la mayor concentración de proteínas (52,7 %) y un consumo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) del 79% en tan sólo cinco días de cultivo.

El tiempo afecta de manera importante el contenido de proteínas, siendo evidente que, es mas óptimo llevar el cultivo de *C. vulgaris* hasta el día quinto para poder obtener la mayor cantidad de proteínas.

La relación carbono/nitrógeno no tuvo efectos significativos sobre la producción de la biomasa ($p= 0,05099$), sin embargo, se pudo observar que se produce mayor cantidad de biomasa en cultivos con grandes cantidades de acetato.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un análisis del perfil aminoacídico de la proteína producida por *C. vulgaris* en los tratamientos con las mejores productividades.
- Se recomienda cuantificar otros metabolitos como por ejemplo clorofila, carbohidratos, lípidos, en *C. vulgaris* para dar valor agregado a su biomasa.
- Se recomienda en estudios posteriores encontrar el punto óptimo de fuente de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) y tiempo, donde se maximice la producción de proteínas.
- Para llevar los estudios de proteína de la microalga *C. vulgaris* a la producción industrial, se debe encontrar el punto óptimo de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) y tiempo de tal manera que su producción sea maximizada con el mínimo costo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrade, R., Torres R., Montes, E. y Fernández, A. 2006. Obtención de harina a partir del cultivo de *Chlorellavulgarisy* su análisis proteico. Temas agrarios - Vol. 12:(1), Enero - Junio 2007 (50 - 57).
2. Borowitzka, M in: Borowitzka, M.Borowitzka, L.1988. Micro-algalBiotechnology, Cambridge UniversityPress, Sydney,, p. 477.
3. Borowitzka, M. 1999. ComMercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*. 70: 313–321.
4. Clescen, L. S., Greenberg, A. E., Eaton, A. D. 1999. Standar Methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association*. 20: 708-710.
5. Carvalho, P., Meireleles, L. A., Malcata, F. X. 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol*. 22: 1490–1506.
6. Dorey, F., Draves, G. 1998. Quantitative Analysis Laboratory: A New Approach Funded by the National Science Foundation. *University of Central Arkansas*. 1-3.
7. Endo H., Sansawa H. and Nakajima K. 1977. *Studies on Chlorella regularis: heterotrophic fast-growing strain. II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration*. PlantCellPhysiology.
8. Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C. 1989. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliellatertiolecta* (Butcher) with different amMonium nitrogen concentration as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aguaculture*. 83: 289-304.
9. Farrill, N. E., Travieso, L., Benítez, F., Bécares, E., Romo, S., Borja, R., Weiland, P. and Sánchez, E. 2003. Population Dynamic of Algae and Bacteria in an Oxidation Channel. *Journal of Environmental Science and Health*. 38: 697-709.

10. Flynn, K. 2, 1991. *Algal carbon-nitrogen metabolism: a biochemical basis for modelling the interactions between nitrate and ammonium uptake*. Journal of Plankton Research, 13:373-387.
11. Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Hu, B. 2010. *Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic Chlorella protothecoides*. Applied Biochemistry Biotechnology, 162:1978–1995.
12. Huppe, H.C. y Turpin, D.H. 1994. Integration of carbón and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45 : 57?- 607.
13. Huss, V.; Frank, C.; Hartmann, E.; Hirmer, M.; Kloboucek, A.; Seidel, B.; Wenzeler, P. y Kessler, E. 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella sensulato* (Chlorophyta). Journal of Phycology 35(3):587-598.
14. Liang, Y. N., Sarkany, N., & Cui, Y. 2009. *Biomass and lipid productivities of Chlorella vulgaris under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions*. Biotechnological Letters, 31:1043–1049.
15. Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cay, Z., Hu, Z. 2009. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*. 21: 239-246.
16. Márquez, F. J., Saski, K., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S. 1993. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Ferment Bioeng.* 76: 408–410.
17. Martínez, Ma. E., Camacho, A. F., Jimenez, J. M., Espinola, J. B. 1997. Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of *Chlorella pyrenoidosa* mixotrophic growth. *Process Biochemistry*. 32: 93-98.
18. Merrett, M. J., and Syrett, P. J. 1960. The relationship between glucose oxidation and acetate oxidation in *Chlorella vulgaris*. *Physiologia*. 13: 237-49.
19. Morris, H.; Quintana, M.; Almarales, A. y Hernández, L. 1999. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y nutrición* 13(2):123-128.

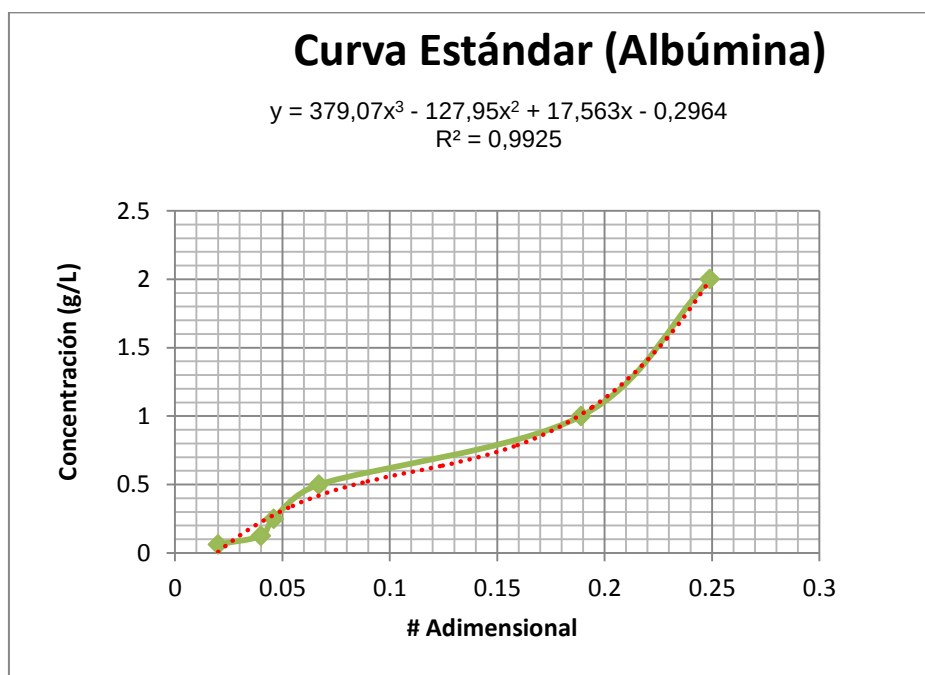
20. Morris, H. Carrillo, O. y Bermúdez, R. 2003. Enfoque integral en la utilización de los métodos químicos de evaluación de la calidad proteica. *Rev Cubana Salud Pública*; 29(1):42-7
21. Noda, K.; Ohno, N.; Tanaka, K. y Shoyama, Y. 1996. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Planta Médica* 62(5):423-426.
22. Ogawa, T., Aiba, S. 1981. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 23: 1121–1132.
23. Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., Staden, J. V., Lovász, C. 2011. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J Appl Phycol*. 97: 11-19.
24. Ortega, J.; Moronta, R. y Morales, E. 2004. Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp. *CIENCIA* 12(1):25-31
25. Richardson, B., Orcutt, D. M., Schwertner, H. A., Martinez, C. L., Wickline, H. E. 1969. Effects of Nitrogen Limitation on the Growth and Composition of Unicellular Algae in Continuous Culture. *Applied Microbiology*. 18: 245-250.
26. Sánchez, S., Martínez, M. A., Espinola, F. 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal*. 6: 13–18.
27. Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., and Merzlyak, M. 2000. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 20:245-251.
28. Syrett, P. J., Bocks, S. M., Merrett, M. J. 1964. The assimilation of acetate by *Chlorella vulgaris*. *Ibid.* 15: 35-47.
29. Takagi, M., Watanabe, K., Yamaberi, K., & Yoshida, T. 2000. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54:112-117.

- 30.Xiong, W., Gao, C., Yan, D., Wu, C., Wu, Q. 2010. Double CO₂ fixation in photosynthesis–fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 101: 2287–2293.

ANEXOS

Anexo A. Curva de calibración de proteínas.

Curva de Calibración		
Concentración (mg/mL)	Proteína 540 nm	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



Anexo B. Curva de calibración de nitrato (NO₃-N).

Curva Calibración nitrato (NO ₃ -N).			
Tubo	Nitrato (NO ₃ -N) [mMol]	Abs (220 nm)	Linealización
2,9	0,02	0,1	0,022425
2,0	0,05	0,2	0,050850
4,0	0,09	0,3	0,082190
8,0	0,18	0,6	0,188075
16,0	0,37	1,1	0,367938
32,0	0,74	2,0	0,747500
64,0	1,47	2,5	1,477363
128,0	2,94	2,9	2,951339

