

**INFLUENCIA DE UNA FUENTE CARBONO ORGÁNICO (ÁCIDO ACÉTICO) EN
EL CRECIMIENTO CELULAR DE *Chlorella vulgaris* EN FOTOBIOREACTORES
A ESCALA LABORATORIO.**

**Ana Maria Ardila Alvarez
Sandra Marcela Rodríguez Rodríguez**

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

2011

**INFLUENCIA DE UNA FUENTE CARBONO ORGÁNICO (ÁCIDO ACÉTICO) EN
EL CRECIMIENTO CELULAR DE *Chlorella vulgaris* EN FOTOBIOREACTORES
A ESCALA LABORATORIO.**

**Ana Maria Ardila Alvarez
Sandra Marcela Rodríguez Rodríguez**

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

Ingeniero Químico

Directores

Ph. D Viatcheslav Kafarov

M.Sc. Crisóstomo Barajas

Codirector

Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano

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

2011

A Dios por iluminarme en todo momento.

A mis padres Jorge Eliecer y Lucía, por colaborarme y orientarme a cada momento.

A mi hermano Jorge Eduardo por ayudarme en los momentos que he requerido de su ayuda.

A mis compañeros y amigos por la colaboración recibida a lo largo de la carrera y en especial para la realización del proyecto.

A mis amigas del equipo de baloncesto UIS por compartir momentos de sano esparcimiento y alegría

+QA.

Ana María

A Dios por darme la sabiduría y fortaleza a través de todo este tiempo.

A mi madre Esperanza Rodríguez por su cariño, ayuda y apoyo en este proyecto de vida tan importante y a mi padre Pedro J., por ese apoyo incondicional.

A mis hermanitos Jhon F., y Jaime por sus palabras de aliento y ayuda.

A mi compañerita de trabajo de grado por aguantarme en todo este tiempo y darme la oportunidad de trabajar con ella.

A mi amiguita Andrea por su comprensión y aliento.

A mis amigas (o) (A, M, D, M, B, L, I) y a todos los que compartieron momentos buenos y malos que quedaran siempre marcados en mi corazón.

Sandra Marcela

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a:

- *El biólogo Andrés Fernando Barajas por ofrecernos la oportunidad de trabajar en un proyecto tan innovador y prometedor*
- *Centro de investigación de Biomasa y sus integrantes.*
- *A la comunidad de la escuela de Ingeniería Química docentes, personal administrativo y operativo*
- *A todas y cada una de las personas que contribuyeron en alguna forma a la realización de este proyecto*

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1 CRECIMIENTO MICROBIANO.....	18
1.1.1 Fase logarítmica.....	19
1.1.2 Fase Exponencial.....	19
1.1.3 Fase Estacionaria.....	19
1.1.4 Fase de Muerte	20
1.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	20
1.3 AUTOTROFÍA.....	221
1.4 HETEROTROFÍA.....	221
1.5 MIXOTROFÍA	22
1.6 METABOLISMO DEL CARBONO	22
1.7 ASIMILACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO	23
1.8 ASIMILACIÓN Y/O RELACIÓN NITRÓGENO	24
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	26
2.1 DIAGRAMA DEL PROCESO.....	26
2.1.1 Diagrama de funciones de la parte experimental	26
2.2. INÓCULO	29
2.3 FOTOBIOREACTOR.....	29
2.4 ÁCIDO ACÉTICO	29
2.5 CARACTERIZACIÓN	29

2.5.1 Concentración de biomasa.....	299
2.5.2 Determinación de concentración celular por contenido de Clorofila.....	30
2.5.3 Determinación del pH.....	30
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	31
3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
3.1.1 Variable de respuesta: Productividad de biomasa.	38
3.1.2 Variable de respuesta: Concentración de clorofila total.....	40
4. CONCLUSIONES.....	43
RECOMENDACIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	51

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Prueba de homogeneidad de varianza para el día 5 (tarde)	38
Tabla 2: Prueba de significancia para la productividad de biomasa para el día 5 (tarde)	39
Tabla 3: Prueba de homogeneidad de varianza para el día 5 efecto ácido acético/nitrato sobre la concentración de clorofila total (mg/L)	40
Tabla 4: Prueba de significancia para la concentración de clorofila total (mg/L) en el día 5.	41

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Crecimiento microbiano	19
Figura 2: Células de <i>C. vulgaris</i> en cultivo autotrófico (1000x).	21
Figura 3: Diagrama de bloques del proceso	26
Figura 4: Descripción del proceso y condiciones de operación1.	27
Figura 5: Descripción del proceso y condiciones de operación 2.	28
Figura 6: Producción de biomasa durante los 5 días de cultivo (120 horas). (a) Concentración 0,89mM ácido acético. (b) concentración 2,52mM ácido acético...31	31
Figura 7: Producción de biomasa de la tasa de mejoramiento durante los 5 días de cultivo (120 horas). (a) Concentración 1,26mM ácido acético. (b) concentración 1,68mM ácido acético. (c) Concentración 2,10mM ácido acético.	332
Figura 8: Productividad de biomasa para condiciones iniciales de ácido acético/nitrato.....	34
Figura 9: Comportamiento de pH.....	35
Figura 10: Mejoramiento de la tasa de productividad de biomasa para ácido acético/nitrato.....	36
Figura 11: Productividad de clorofila.....	37
Figura 12: Productividad del mejoramiento de clorofila.	37
Figura 13: (a) Efecto ácido acético/nitrato sobre productividad día 5 (tarde). (b) Mejoramiento Efecto ácido acético/nitrato sobre productividad día 5 (tarde).....	40
Figura 14: (a) Efecto acido acético/nitrato sobre la clorofila día 5 (tarde) y (b) mejoramiento del efecto acido acético/nitrato sobre la clorofila día 5 (tarde).	42

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXOS A: EQUIPOS	51
ANEXOS B: MEDIO DE CULTIVO BOLD BASAL	52
ANEXOS C: CÁLCULO DEL COEFICIENTE MÁSIKO DE EXTINCIÓN	53

RESUMEN

TITULO: INFLUENCIA DE UNA FUENTE CARBONO ORGÁNICO (ÁCIDO ACÉTICO) EN EL CRECIMIENTO CELULAR EN *Chlorella vulgaris* EN FOTOBIOREACTORES A ESCALA LABORATORIO.*

AUTORES: Ana Maria Ardila Alvarez, Sandra Marcela Rodruiguez Rodriquez. **

PALABRAS CLAVES: Microalgas, Crecimiento microbiano, Influencia del sustrato, Mixotrófia, Autotrófia, *Chlorella vulgaris*.

A nivel mundial, la producción de microalgas y la obtención de sus derivados ha sido tal vez uno de los campos más estudiados en los últimos tiempos; por tal motivo ya no solo se habla de algas, sino específicamente de microalgas como las potenciales despensas mundiales de proteína.

Dadas las propiedades atribuidas a las microalgas, el presente trabajo tiene como objetivo analizar la influencia de una fuente de carbono orgánico (ácido acético) en el crecimiento celular en *Chlorella vulgaris* en fotobioreactores a escala laboratorio.

Como primer paso se definió los parámetros de crecimiento para la producción de lípidos en *C. Vulgaris*, evaluando diferentes concentraciones de ácido acético (0,84mM; 2,52mM; 4,20mM) y nitrato (0mM; 1,47mM; 2,94mM).

Tomando como base los resultados de la primera etapa, se buscó adecuar las condiciones propuestas, ya que los modelos no presentan un rango de discrepancia significativo. Los experimentos se realizaron por triplicado con aireación constante, ciclo luz-oscuridad 12:12h, temperatura de 23±2°C, durante un periodo de 5 días. En el estudio se encontró que no existe un mejor local, sino un rango de crecimiento el cual se encuentra entre 0,84; 2,52mM de ácido acético y 1,47mM; 2,94mM de nitrato, con una productividad promedio de 2,909 g/L de biomasa.

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible de la Industria y la Energía (CIDES) de la escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander con apoyo del Ministerio de Agricultura y el Instituto Colombiano de Petróleo (ICP). Proyecto, Bioprospección de Microalgas Colombianas para la producción de biodiesel.

* Proyecto de grado

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

ABSTRACT

TITLE: INFLUENCE OF AN ORGANIC CARBON SOURCE (ACETIC ACID) IN CELLULAR GROWTH IN *Chlorella vulgaris* AT LABORATORY SCALE PHOTOBIOREACTORS.*

AUTHORS: Ana Maria Ardila Alvarez, Sandra Marcela Rodriguez Rodriguez.**

KEY WORDS: Microalgae, Microbial Growth, Influence of the substrate, mixotrophy, Autotrophy, *Chlorella vulgaris*.

Globally, the production of microalgae and its derivatives has been, perhaps, one of the most studied fields in recent times, for this reason not just the algae, but specifically microalgae is now talked as a potential global protein pantry.

Given the properties attributed to the microalgae, this work aims to analyze the influence of an organic carbon source (acetic acid) in cellular growth in *Chlorella vulgaris* at laboratory scale photobioreactors.

As a first step it was defined the parameters for lipids production in *C. Vulgaris*, assessing different acetic acid concentrations (0,84mM; 2,52mM; 4,2mM) and nitrogen (0mM; 1,47mM; 2,94mM).

Based on the results of the first stage, the proposed conditions were adapted, as the models did not show a significant discrepancy range. The experiments were performed by triplicate with constant aeration, light-dark cycle 12:12 h, 23 ± 2 ° C over a period of 5 days. The study showed that there is no best place, but a range of growth which is between 0,84 to 2,52mM acetic acid and nitrogen 1,47mM; 2,94mM, with an average productivity of 2,909 g / L of biomass.

This study was conducted at the Research Centre for Sustainable Development of Industry and Energy (CIDES) School of Chemical Engineering of the Universidad Industrial de Santander (UIS) with support from the Ministry of Agriculture and the Colombian Petroleum Institute (ICP). Project, Colombian Microalgal Bioprospecting for biodiesel production.

* Research project

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

INTRODUCCIÓN

Las microalgas presentan características promisorias para la producción de biocombustibles, ya que son capaces de canalizar la energía química hacia la biosíntesis de lípidos, los cuales son una excelente fuente para la producción de biodiesel [1].

Chlorella vulgaris es un microorganismo unicelular fotosintético, que utiliza la luz, el dióxido de carbono y el agua para obtener biomasa, cuyo uso final puede encontrarse en los sectores energéticos, alimentarios o en otro tipo de aplicaciones industriales [2,3,]. La concentración de nutrientes, temperatura, intensidad luminosa, pH, fotoperiodo, aireación, variables ambientales, concentración celular, etc., permiten establecer sistemas de cultivos dirigidos a la obtención de biomasa microalgal enriquecida con sustancias de interés comercial como son los lípidos [4, 5, 6].

La principal fuente de carbono para el crecimiento de microalgas es el CO₂, sin embargo éstas son capaces de sintetizar compuestos orgánicos, en nuestro caso ácido acético, que junto con el nitrógeno (nitrato de sodio) es el compuesto más importante para crecimiento de biomasa [7]. Cuando la microalga es capaz de mantener un crecimiento estable y sostenido como producto del metabolismo de algún sustrato orgánico en ausencia de iluminación, se conoce como heterotrofia. En el caso que utilice simultáneamente para su crecimiento luz y sustratos orgánicos, la microalga manifiesta una capacidad mixotrófica [8].

Estudios basados en el crecimiento microalgal tanto experimentales como teóricos, en cultivos autotróficos, mixotróficos y heterotróficos sugieren que la mayores productividades se obtienen bajo condiciones mixotróficas [9]. Es por ello que en este trabajo se evalúa el efecto del ácido acético, como fuente de carbono orgánico, sobre el crecimiento y producción de biomasa en *C. vulgaris*.

1. MARCO TEÓRICO

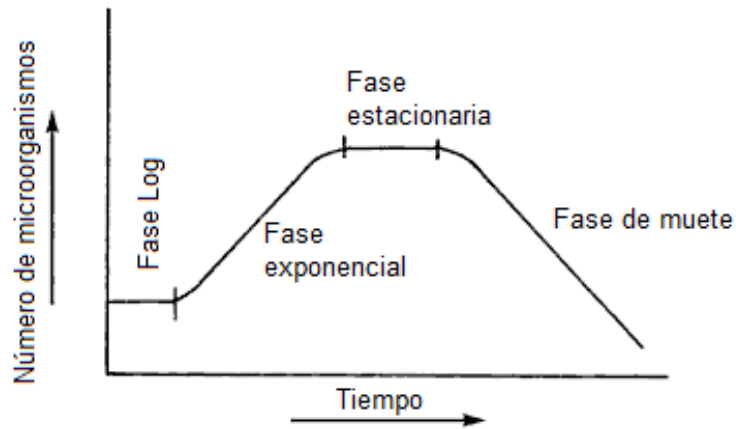
Las microalgas son organismos microscópicos, unicelulares y fotosintéticos que pueden ser cultivadas muy rápidamente[11], haciendo una pequeña similitud con las plantas en donde podemos concluir que existen algunas semejanzas y diferencias; dado que en las microalgas al igual que las plantas convierten la energía lumínica, en presencia de anhídrido carbónico, agua y nutrientes en energía química útil para su supervivencia; sin embargo, difieren en tanto que las microalgas, poseen una estructura unicelular sin tallos, hojas o raíces permitiendo que la extracción de los productos sea más fácil [12]; algunas especies de microalgas son capaces de canalizar gran parte de esta energía química hacia la biosíntesis de lípidos neutros, sustrato ideal para la producción de biodiesel, resolviendo el agotamiento de los recursos no renovables.[13]

Para el incremento celular y la deposición de lípidos el cultivo debe poseer ciertas condiciones, entre estas, que el medio sea rico en nutrientes [14, 15, 16, 17], que exista una buena transferencia de luz [18], una dinámica del medio [19], un tamaño de burbuja y distribución dentro del sistema [20], así mismo un intercambio gaseoso [21,22] y por ultimo una transferencia de masa [23].

1.1 CRECIMIENTO MICROBIANO

Cuando se habla de crecimiento microbiano en realidad se refiere al crecimiento poblacional de los microorganismos, no al aumento de tamaño de ellos [24]. Además este crecimiento depende del tiempo y la adaptación del microorganismo al sustrato. A continuación se presenta la tasa de crecimiento donde se aprecia claramente varias etapas Figura 1.

Figura 1: Crecimiento microbiano



Fuente: Introducción a la Microbiología VERA GARCIA.

1.1.1 Fase logarítmica: Periodo de adaptación al medio. En este tiempo los microorganismos se adaptan al nuevo entorno, tomando los nutrientes necesarios para iniciar el proceso de división. Los microorganismos se encuentran metabólicamente muy activos pero la población se mantiene temporalmente sin aumentar. El tiempo de esta fase dependerá del tamaño del inóculo [25].

1.1.2 Fase Exponencial: Etapa en la que los microorganismos se dividen y crecen en forma exponencial, con una velocidad máxima de crecimiento y un tiempo mínimo de generación. En esta etapa los microorganismos consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio, sin embargo los microorganismos son muy sensibles a las condiciones adversas [24].

1.1.3 Fase Estacionaria: En ella no se incrementa el número de microorganismos. Durante esta fase se produce una acumulación o liberación de metabolitos secundarios. Los microorganismos entran en fase estacionaria puesto que se agota algún nutriente esencial del medio, o porque los productos de

desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano [25].

1.1.4 Fase de Muerte: Los microorganismos ya no crecen ni realizan actividades metabólicas, esta fase continua hasta que la población disminuye a una pequeña fracción de células más resistentes o hasta que todos sus integrantes mueren. En ocasiones los microorganismos involucionan y se hace difícil su identificación.

Los requerimientos para el crecimiento microbiano pueden dividirse en dos categorías; físicos y químicos. En el presente trabajo se estudiara el aspecto químico, influyendo sobre estos la fuente de carbono orgánico y nitrógeno. Otro aspecto de gran importancia es el pH sobre el microorganismo, el cual puede variar en un rango de $2 < \text{pH} < 11$. En general los microorganismos que toleran pH ácidos no toleran pH alcalinos y viceversa [26].

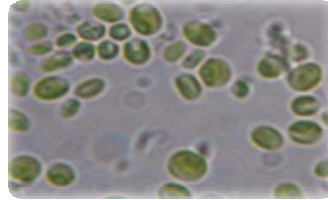
1.2 *Chlorella vulgaris*

Chlorella sp. pertenece al reino eucariota en la división *Chlorophyta* o algas verdes [27], de la especie *vulgaris*. Es un alga verde unicelular, de agua dulce, de forma esférica (figura 2), cerca de 2 a 10 micrones de diámetro [28]. Comparada con otras plantas, *C. vulgaris* Beijerinck 1980 tiene una alta concentración de clorofila; esto significa que mediante el proceso de la fotosíntesis, puede capturar CO_2 y asimilar la energía solar para producir biomasa.

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de *C. vulgaris* son: disposición y calidad de nutrientes, energía lumínica, pH, turbulencia y temperatura [29].

Estudios realizados de *C. vulgaris* [30, 31, 32], confirman la capacidad de crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas, sin embargo se ha mostrado una mayor productividad de biomasa en el cultivo mixotrófico [33].

Figura 2: Células de *C. vulgaris* en cultivo autotrófico (1000x).



Fuente: los autores

1.3 AUTOTROFÍA

Los organismos autotróficos son capaces de sintetizar todas las sustancias esenciales para su metabolismo. Para su crecimiento requieren de energía lumínica, fuentes orgánicas de carbono y nitrógeno (dióxido de carbono y nitrato respectivamente), agua, nutrientes, trazas de algunos elementos y turbulencia [34].

Los autótrofos se pueden subdividir en dos grupos: fotoautótrofos y quimioautótrofos, clasificación que se hace de acuerdo a la forma en la que se obtiene la energía para su metabolismo. Los organismos que no son autótrofos se conocen como heterótrofos [27, 35].

1.4 HETEROTROFÍA

Las microalgas que presentan comportamiento heterotrófico, asimilan fuentes de carbono orgánico, para cubrir sus necesidades energéticas y ser capaces de

crecer en completa oscuridad. Las sustancias orgánicas respiradas por las mitocondrias utilizan el oxígeno como aceptor de electrones [35,36].

Los compuestos orgánicos que utilizan las mitocondrias para su respiración son la glucosa, el acetato o el glicerol, que son sustancias de moléculas pequeñas, ya que las microalgas no son capaces de metabolizar moléculas grandes como las proteínas [37].

1.5 MIXOTROFÍA

El crecimiento mixotrófico es la asimilación de carbono orgánico en presencia de luz, integrando la fijación de CO₂, en donde los metabolismos celulares (fotosintéticos y fosforilación oxidativa) funcionan simultáneamente, produciendo altas concentraciones de biomasa [38-6].

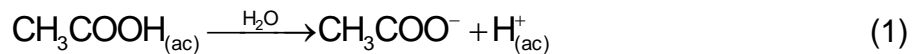
1.6 METABOLISMO DEL CARBONO

C. vulgaris puede desempeñarse como un organismo fotosintético para producir oxígeno, utilizando luz como fuente de energía y sintetizar moléculas orgánicas a partir de dióxido de carbono y agua [39]. Las células almacenan energía lumínica en los fotosistemas durante su exposición a la luz; esta energía será utilizada posteriormente en su metabolismo cuando se encuentre en la oscuridad [22].

Según Sirett *et al.* [40] la luz estimula la incorporación del acetato en lípidos e incrementa la síntesis de proteínas y carbohidratos.

1.7 ASIMILACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO

El ácido acético al ser un ácido débil no se ioniza por completo en el agua, al ocurrir la disociación se encuentra tanto el ácido no ionizado como los iones hidronios (H^+). La ecuación 1 muestra la disociación que ocurre en el ácido acético, para la formación del ion acetato [41].

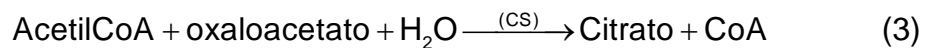


Según Pérez *et al* [42], la asimilación del ácido acético se comporta igual que el acetato.

Las microalgas en especial *C. vulgaris* utiliza el ion acetato como fuente de carbono orgánico en la producción de lípidos [43]. Para ello es necesario convertir el ion acetato en acetil-CoA ecuación 2, esta reacción es llevada a cabo en el citoplasma.

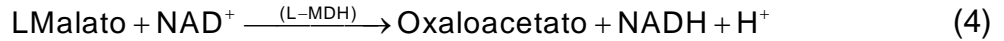


La asimilación del acetil-CoA se realiza mediante dos rutas metabólicas. Para la primera ruta el acetil-CoA entra al ciclo del glioxilato y así formar malato en las glixosomas. En la segunda ruta el acetil-CoA es convertido en citrato utilizando el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) [44], para que ocurra esta reacción es necesario utilizar la coenzima citrato sintasa (CS), y así convertir el oxaloacetato en citrato, ecuación (3).



El oxaloacetato requerido en la ecuación 3 se forma a partir de malato-L y dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD^+) en presencia del malato-

deshidrogenasa (L-MDH). En esta reacción, (NAD^+) se reduce a NADH, ecuación 4.



Las microalgas utilizan el ion acetato como fuente de carbono y energía para el crecimiento en la oscuridad [45, 46], esto se conoce como cultivo heterotrófico. Cuando *C. vulgaris* está expuesta a un régimen heterotrófico, el carbono orgánico es incorporado más rápido en la célula produciendo lípidos, carbohidratos y proteínas, demostrando así que el acetyl-CoA no es obtenido a partir del piruvato, sino del ion acetato [47].

1.8 ASIMILACIÓN Y/O RELACIÓN NITRÓGENO

El nitrato es una fuente importante de nitrógeno; causa un fuerte impacto en el metabolismo y crecimiento de las plantas en general [43], además la limitación de este compuesto cambia significativamente la composición del microorganismo. [48], siendo este un factor de estrés para el crecimiento de microalgas. Se ha demostrado que *Chlorella* sp. cuando se cultiva en medios pobres en nitrógeno, pero con suficiente luz y / o de fuentes orgánicas de carbono acumulan grasa o almidón en las células [49].

Para la asimilación de nitratos la célula debe transportarlo a través de las membranas y así reducirlo en amonio, consumiendo grandes cantidades de energía, carbono y protones para el proceso llevado a cabo [50]. Estudios de plantas y microalgas sugieren que sólo dos enzimas, la nitrato reductasa y el nitrito reductasa, trabajan secuencialmente para catalizar nitrato en amonio [51,52].

Otros aspectos de gran importancia para la asimilación de nitrato son las variables ambientales, luz y/o oscuridad [53, 54, 55]. En el caso de la oscuridad la asimilación de nitratos tiene un efecto negativo, en cambio en microalgas cultivadas con luz el nitrato se asimila con mayor rapidez [56].

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 DIAGRAMA DEL PROCESO

El diagrama del proceso mostrado en la figura 3 tiene como objetivo ilustrar de forma general el procedimiento llevado a cabo durante el desarrollo de esta tesis.

Figura 3: Diagrama de bloques del proceso



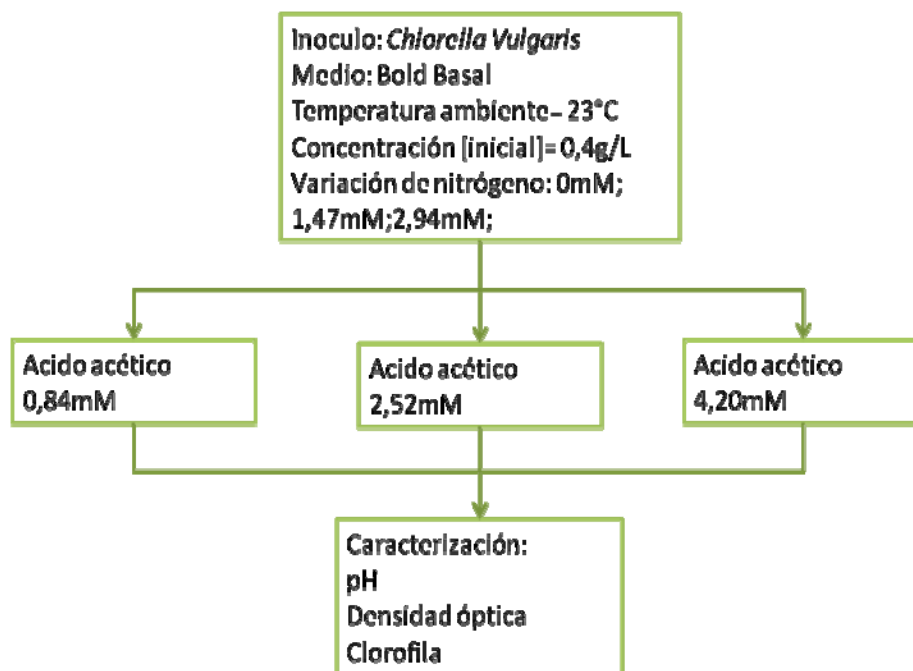
Fuente: Los autores

2.1.1 Diagrama de funciones de la parte experimental: A continuación se presenta la descripción del proceso a escala laboratorio y las condiciones de operación para el crecimiento celular de la microalga *C. Vulgaris*, en función del ácido acético como fuente de carbono.

Se realizó un cultivo utilizando nueve fotobioreactores, con un volumen de trabajo de dos litros de medio Bold Basal (Anexo B), con una concentración celular inicial de 0,40 g/L, manteniendo una aireación constante. Tomando como referencia la máxima concentración de ácido acético en el vinagre (0,833M), se procedió a realizar el proceso mostrado en la figura 4. Para el primer montaje se tomó un fotobioreactor, adicionando 0,84mM de ácido acético; al procedimiento

mencionado se realizaron dos replicas con el fin de analizar su comportamiento y crecimiento; así mismo se tomó un segundo fotobioreactor agregando 2,52mM de ácido acético, finalmente en un tercer fotobioreactor se adicionó 4,20mM de ácido acético. También se modificó la cantidad de solución de nitrato de sodio a 0mM, y 1,47mM y 2,94mM a estas concentraciones, con el fin de encontrar la relación carbono/nitrógeno adecuada para mejorar la productividad de biomasa de *C. vulgaris*.

Figura 4: Descripción del proceso y condiciones de operacion1.

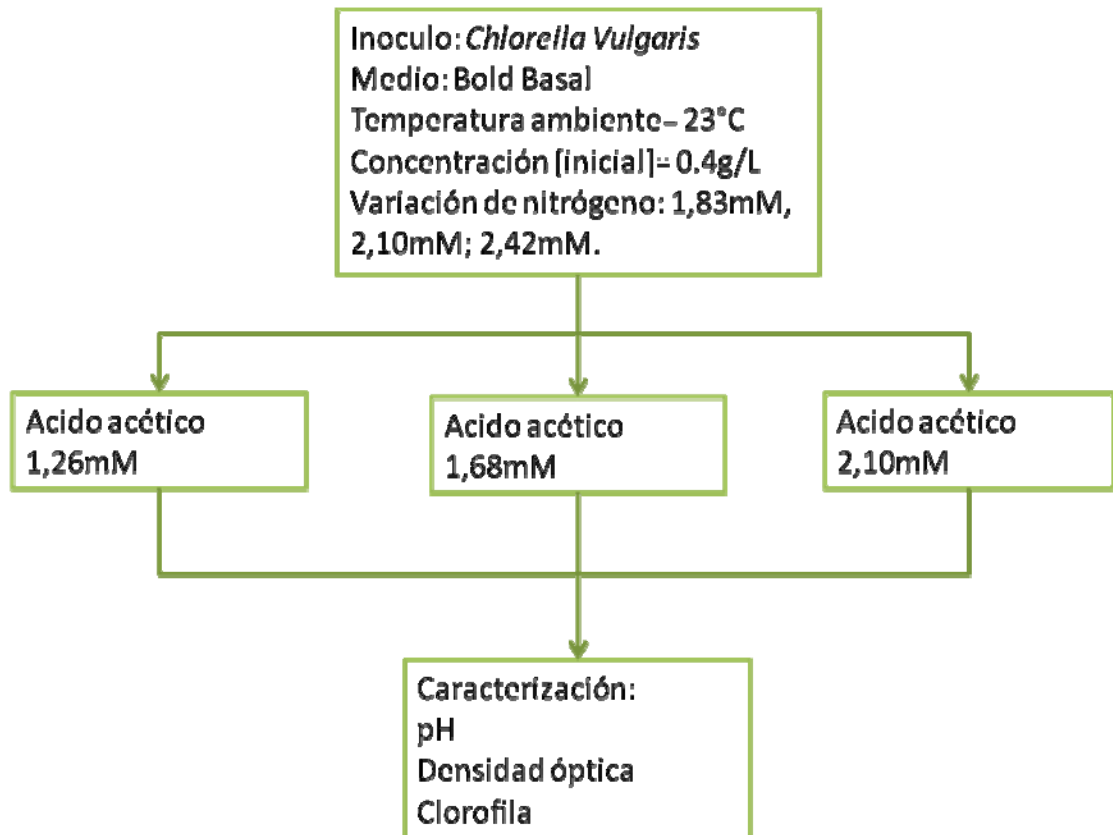


Fuente: Los autores

A partir de los datos y análisis obtenidos en la primera etapa del proceso se encontró un intervalo en el cual hay mayor productividad de biomasa al variar ácido acético y nitrato de sodio. Por lo tanto se planteó nuevas condiciones de operación como se muestra en la figura 5.

En esta segunda etapa del proceso se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito, para las nuevas concentraciones.

Figura 5: Descripción del proceso y condiciones de operación 2.



Fuente: Los autores

La mayoría de las especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27°C esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada [57]. Las microalgas se cultivaron a una temperatura de 23°C; la aireación se logra por medio de dispersores de 2,5cm de diámetro, lo cual es necesario para prevenir que las células se sedimenten o se adhieran a las paredes del fotobioreactor, asegurando que todas las células estén igualmente expuestas a la luz y a los nutrientes, para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire [18].

Las microalgas fueron cultivadas bajo luz artificial continua durante un periodo de 12h, utilizando tubos fluorescentes marca Opalux de 11w, proporcionando una distribución de luz homogénea, luego fueron sometidas a 12h de oscuridad.

2.2. INÓCULO

Se trabajó con *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, perteneciente al Orden Chlorellales obtenida en la colección de cultivo de algas de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA). Las microalgas se mantuvieron en crecimiento en medio Bold Basal, en un pH neutro y a 23°C.

2.3 FOTOBIOREACTOR

Los fotobiorreactores a escala laboratorio son botellas de plástico con capacidad de 2½L, 32 cm de diámetro, y un volumen de cultivo de 2L, el cual fue implementado para cada tratamiento.

2.4 ÁCIDO ACÉTICO

Se utilizó ácido acético glacial al 99,8% de pureza, densidad de 1,049 g/L. Para la preparación de la fuente de carbono se tomo como referencia la máxima concentración del ácido acético contenida en el vinagre 0,833M.

2.5 CARACTERIZACIÓN

2.5.1 Concentración de biomasa: Para cada concentración se tomaron 6mL de cultivo (original y réplica), diluyendo cada muestra tres veces con 3mL de agua destilada y luego se midió la absorbancia a una longitud de onda de 500nm en un espectrofotómetro (Anexo A). Las muestras se tomaron cada 12 horas para hacer

su respectivo análisis. La concentración celular se determinó de acuerdo a la Ley de Beer Lambert:

$$\text{Abs} = KXL \quad (5)$$

Donde, Abs es la Absorbancia, K es el Coeficiente de extinción molar, X es la concentración y L es el espesor de la cubeta.

2.5.2 Determinación de concentración celular por contenido de Clorofila:

Para preparar el pellet, se tomaron 10mL de cultivo y se centrifugaron a 3400rpm durante 7 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 3ml de etanol al pellet, se calentó durante 5 minutos en baño maría. Después del baño se llevó el volumen hasta 5mL, finalmente se midió su absorbancia a una longitud de onda 650nm y 665nm en un espectrofotómetro (Anexo A).

$$\text{Clorofila a+b} = (4,0 \times A_{665}) + (25,5 \times A_{650}) \quad (6)$$

2.5.3 Determinación del pH: De cada fotobioreactor se tomó una pequeña muestra de cultivo para hacerle un análisis de pH, con la ayuda de un pH-metro (anexo A), con el fin de comprender el comportamiento de la microalga, las mediciones se realizaron cada 24 horas.

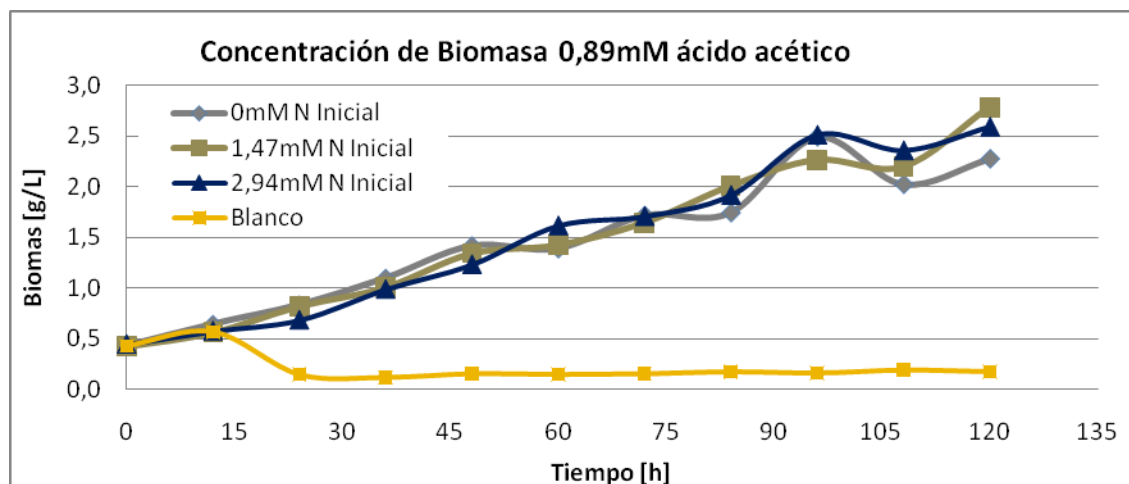
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el software STATISTICA 7, utilizando varianza factorial (ANOVA), para analizar la influencia del carbono y el nitrógeno, involucrados en la productividad de biomasa de *C. vulgaris* en cultivos mixotróficos, para 5 niveles de ácido acético y 6 niveles de nitrógeno, teniendo como variable de respuesta para el primer análisis la productividad de biomasa, y para el segundo la concentración de clorofila total en el cultivo.

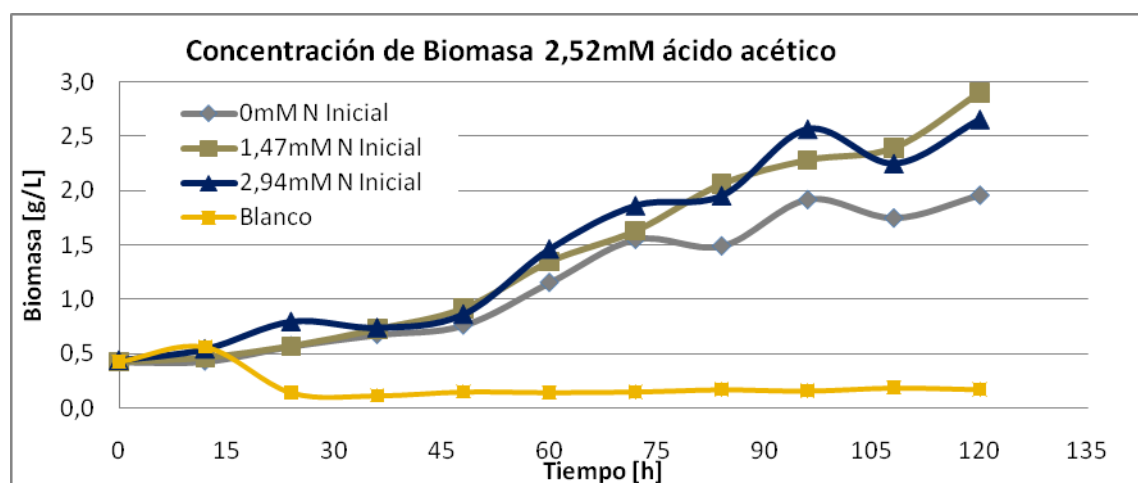
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

A continuación se puede apreciar el comportamiento y la concentración de la microalga *C. vulgaris*, en los diferentes tratamientos de ácido acético, variando el nitrato durante la fase experimental (120 horas).

Figura 6: Producción de biomasa durante los 5 días de cultivo (120 horas). (a) Concentración 0,89mM ácido acético. (b) concentración 2,52mM ácido acético.



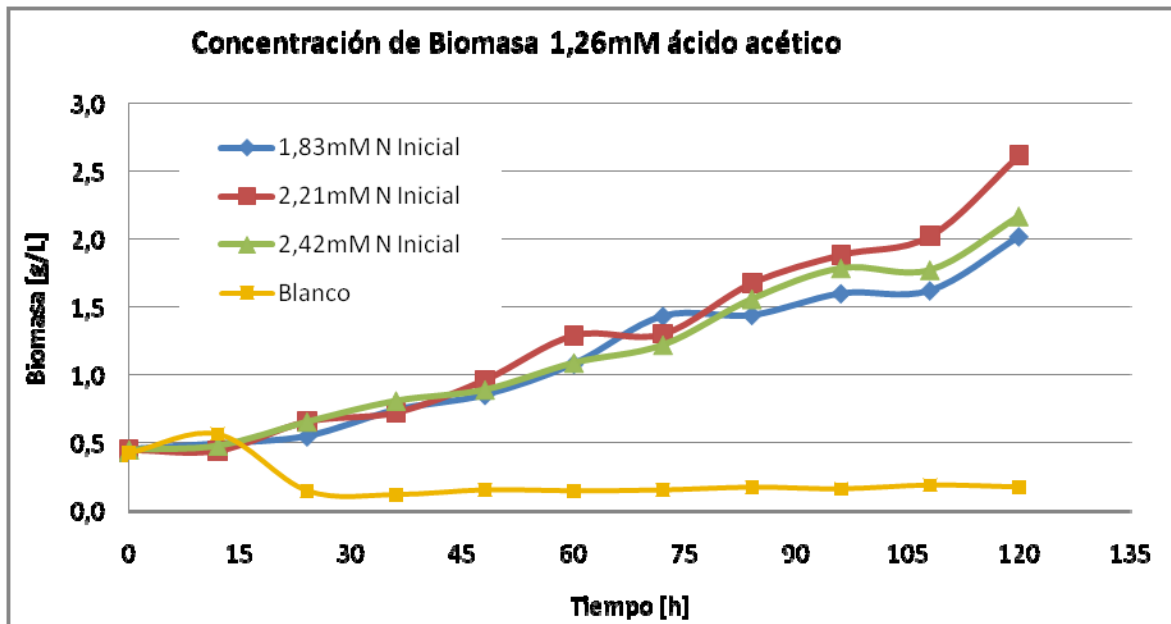
(a)



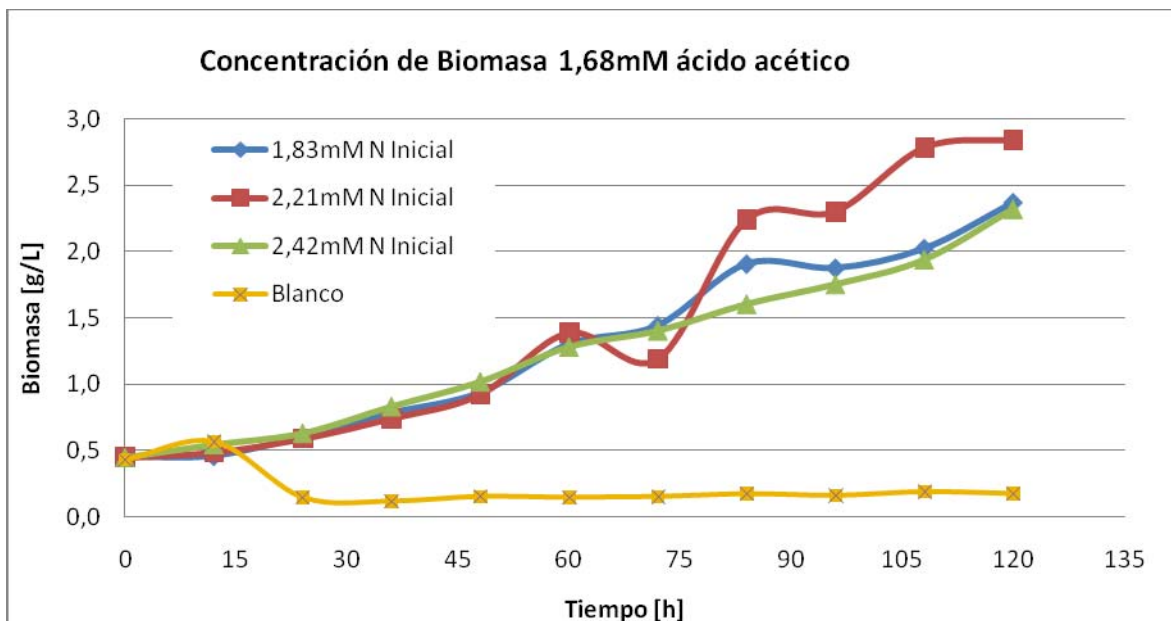
Fuente: Los autores

(b)

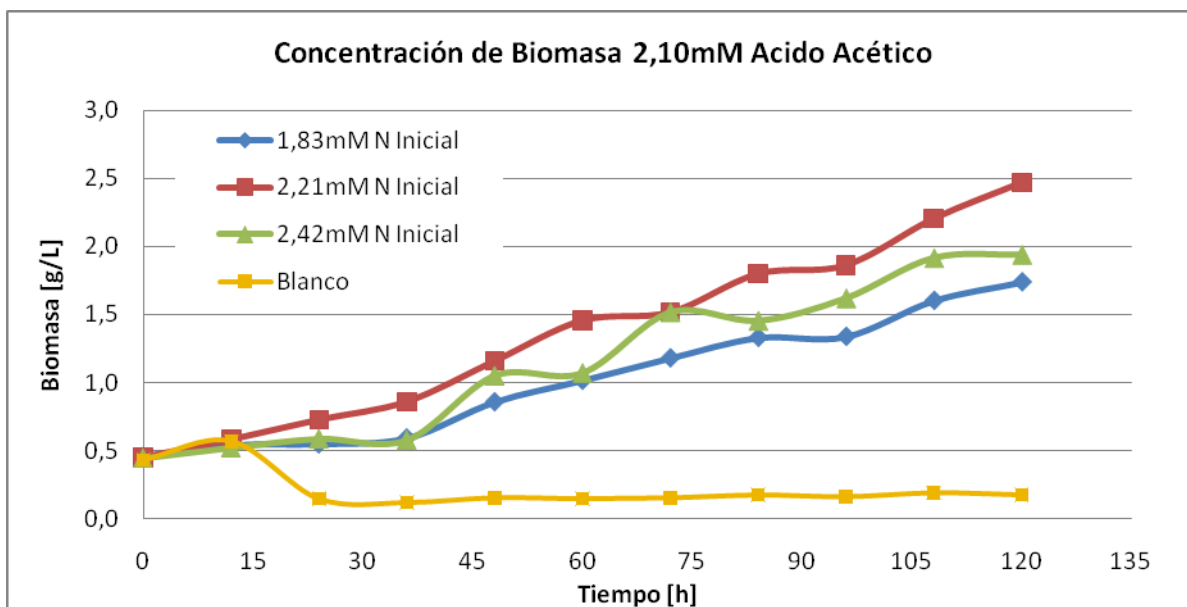
Figura 7: Producción de biomasa de la tasa de mejoramiento durante los 5 días de cultivo (120 horas). (a) Concentración 1,26mM ácido acético. (b) concentración 1,68mM ácido acético. (c) Concentración 2,10mM ácido acético.



(a)



(b)

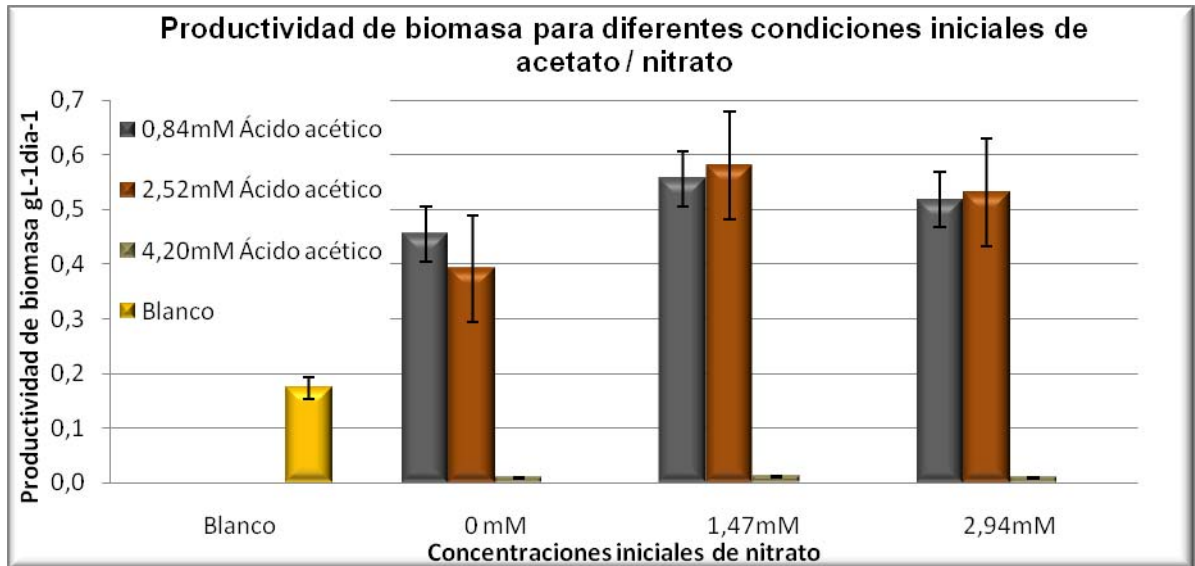


Fuente: Los autores

(C)

En la figura 8 se comparan las productividades después de cinco días de cultivo a partir de las diferentes concentraciones iniciales de ácido acético/nitrato. Como se puede observar, en todos los tratamientos de nitrógeno al aumentar la concentración de ácido acético hasta 4,20mM ocurre una disminución en la productividad de biomasa; esta reducción del crecimiento posiblemente se debe a la inhibición de algún proceso metabólico o la limitación de algún nutriente esencial por la interferencia de la concentración de ácido acético utilizado [57]. Al utilizar concentraciones de 0,84mM; 2,52mM de ácido acético y 1,47mM; 2,94mM de nitrógeno, la productividad no presenta una discrepancia en el crecimiento celular, por tal motivo se diseña una nueva metodología en el intervalo de estos datos, con el fin de analizar el comportamiento de la microalga.

Figura 8: Productividad de biomasa para condiciones iniciales de ácido acético/nitrato.

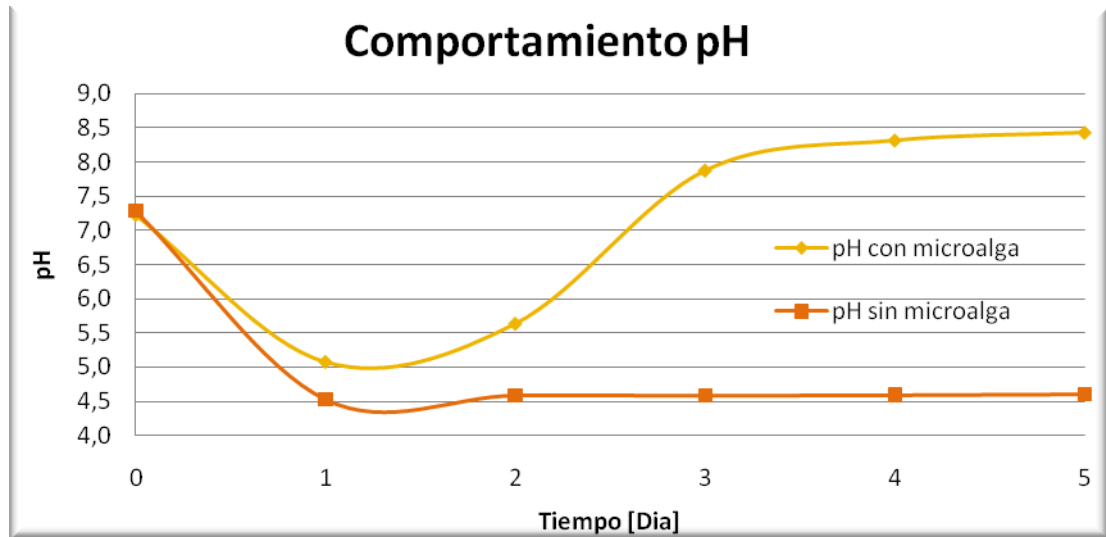


Fuente: Los autores

Como se puede apreciar en la figura 9 cuando se inocula la microalga con ácido acético el pH desciende hasta que la capacidad de carga del medio se estabiliza. En ese momento la microalga empieza a disociar el ácido acético en exceso presente en el medio, permitiéndole así asimilar el ion acetato, presentando un aumento de pH y finalmente estabilizándose en un rango de 8 y 9; tal como aparece en la literatura [41].

Para conocer como es la asimilación del ácido acético se realiza un blanco de pH (medio Bold Basal y ácido acético). Se puede apreciar que al momento de agregar la fuente orgánica al blanco, hay una caída de pH y posterior estabilización de este sin sufrir grandes cambios, lo que indica que la microalga es la que realiza el proceso de disociación del ácido en exceso en los diferentes tratamientos.

Figura 9: Comportamiento de pH

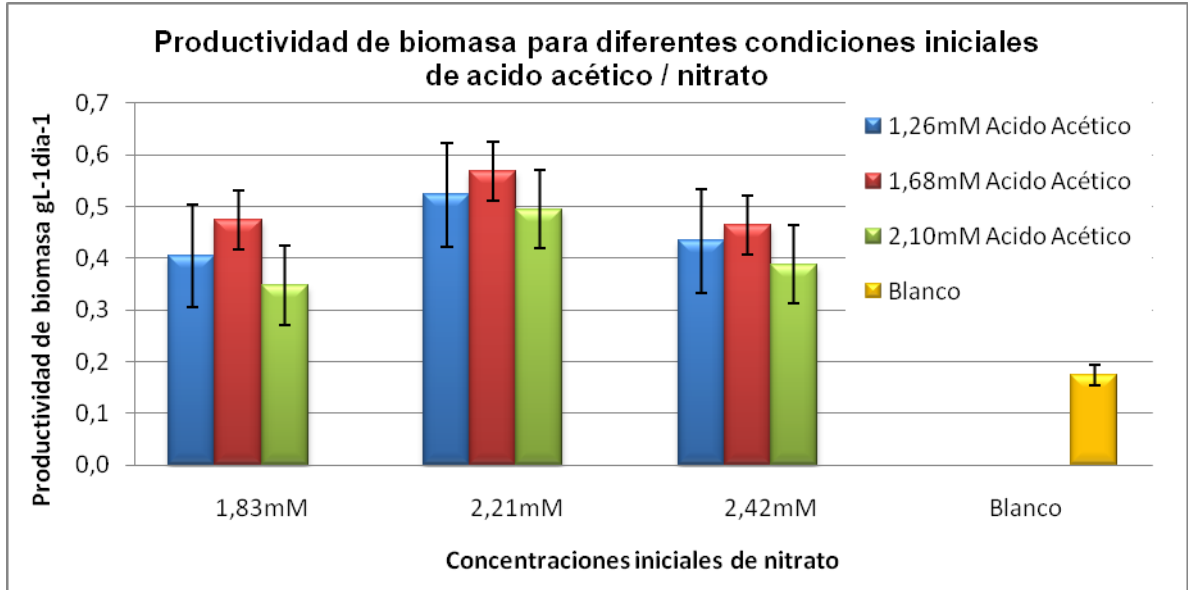


Fuente: Los autores

Observando los diferentes resultados, mostrados en la figura 10 las mejores tasas de productividad corresponde al tratamiento con 1,68mM de ácido acético en las diferentes concentraciones de nitrato (1,83; 2,10; 2,42mM).

Al comparar las productividades de 0,84; 4,20mM de ácido acético y 1,47mM; 2,94mM de nitrato mostrados en la figura 8 con respecto a la mayor productividad obtenida en el nuevo rango de estudio (1,68mM de ácido acético y 2,10mM de nitrato), no hay diferencia considerable, por tal motivo se puede decir que se encontró una zona donde hay un buen crecimiento de biomasa y no un máximo local como ocurre cuando se utiliza acetato de sodio como fuente de carbono orgánico para la productividad de biomasa[42].

Figura 10: Mejoramiento de la tasa de productividad de biomasa para ácido acético/nitrato.

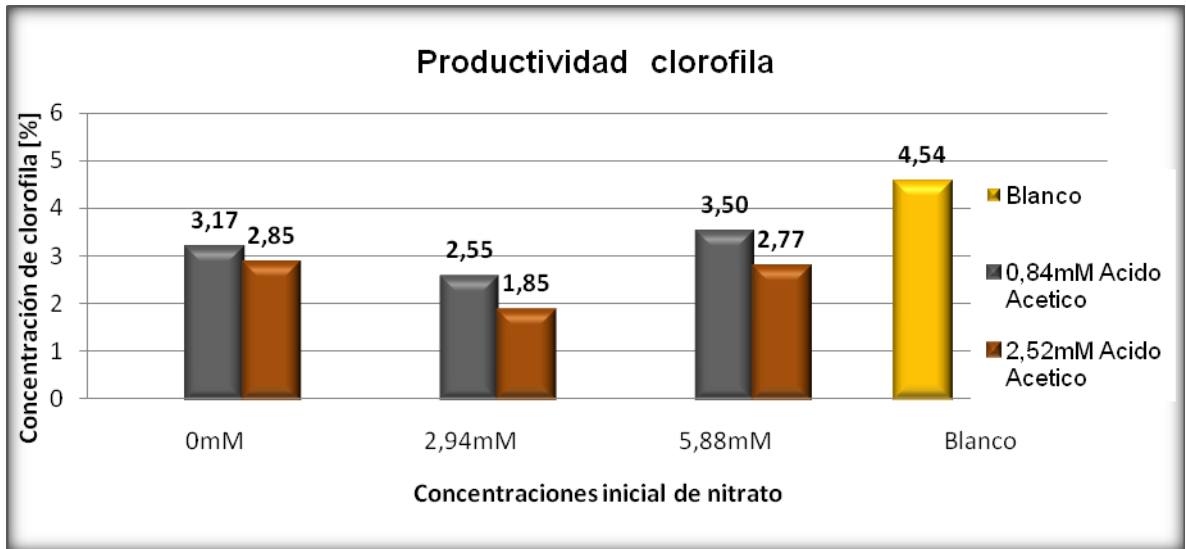


Fuente: Los autores

Para comprobar si el cultivo se comporta de manera mixotrófica, se realizó un análisis de la productividad de clorofila, este es presentado en las siguientes figuras; tanto para las condiciones iniciales como para el mejoramiento propuesto.

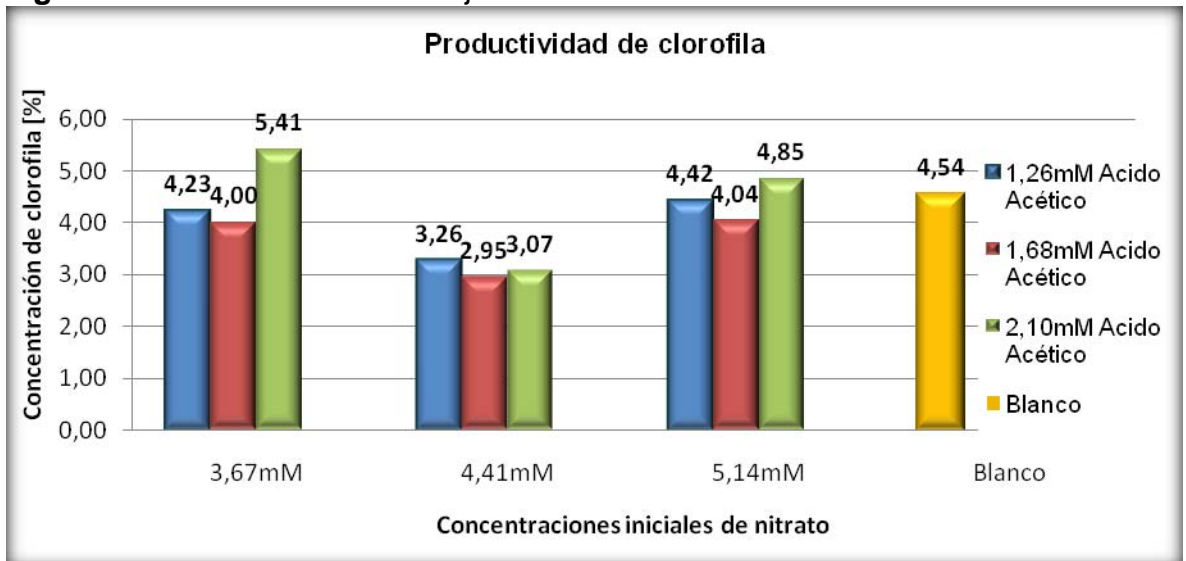
De acuerdo a la productividad de clorofila a+b observada en las graficas 11 se evidencia un descenso en las concentraciones de la clorofila con respecto al blanco en los diferentes tratamientos. Esto ocurre debido a una menor secuestro de CO₂ ya sea inorgánico proveniente del aire inyectado o generado a partir del metabolismo celular, preponderando el sistema heterotrófico.

Figura 11: Productividad de clorofila



Fuente: Los autores

Figura 12: Productividad del mejoramiento de clorofila.



Fuente: Los autores

La figura 12 representan la cantidad de clorofila a+b presente en *C. vulgaris* para el mejoramiento de la tasa de biomasa, en la cual se observa un aumento en la cantidad de clorofila producida por la microalga. La productividad de clorofila en este caso es más cercana al blanco. Al aumentar la concentración de nitrato para

las diferentes tratamientos de ácido acético existirá un aumento en la clorofila dado que a mayor concentración mayor fotosíntesis; esto a su vez no significa que la cantidad de clorofila por célula sea constante, pues en lo observado se vio que la biomasa aumentaba aun cuando la concentración de clorofila disminuía.

C.vulgaris aumenta su actividad metabólica, cuando los tratamientos son ajustados a estos nuevos rangos, demostrando que la microalga se comporta mixotróficamente, lo cual nos indica una mayor asimilación de diferentes fuentes de carbono en presencia de luz.

3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.1.1 Variable de respuesta: Productividad de biomasa.

Inicialmente se aplicó una prueba de homogeneidad de varianza del efecto ácido acético/nitrato sobre la productividad, como se muestra en la Tabla 1, empleando el *software* STATISTICA 7, de este análisis se concluyó que los valores de la variable de respuesta no están dispersos dentro de un mismo tratamiento ($p > 0,05$), esta homogeneidad se presenta en todos los intervalos de concentración de ácido acético y nitrato propuestos.

Tabla 1: Prueba de homogeneidad de varianza para el día 5 (tarde)

Concentración 0,89; 2,52mM de ácido acético y 0; 1,47; 2,94mM de nitrógeno					
Prueba de Homogeneidad de Varianza (día 5 medición de la tarde)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
28,75981	0,507586	7,486916	5	0,186872	SI
Concentración 1,26; 1,68; 2,10mM de ácido acético y 1,83; 2,10; 2,42mM de nitrógeno					
Prueba de Homogeneidad de Varianza (día 5 medición de la tarde)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
16,42075	0,248113	5,053501	8	0,751843	SI

Fuente: Los autores

Posteriormente se aplicó la prueba de significancia para determinar si los tratamientos, ácido acético y nitrato de forma individual y su interacción tienen significancia sobre la variable de respuesta; los resultados se pueden observar en la Tabla 2, donde los valores en rojo indican que se presenta una significancia, como es el caso del nitrógeno, así mismo la relación entre ácido acético y nitrato está siendo significativa para la variable de respuesta.

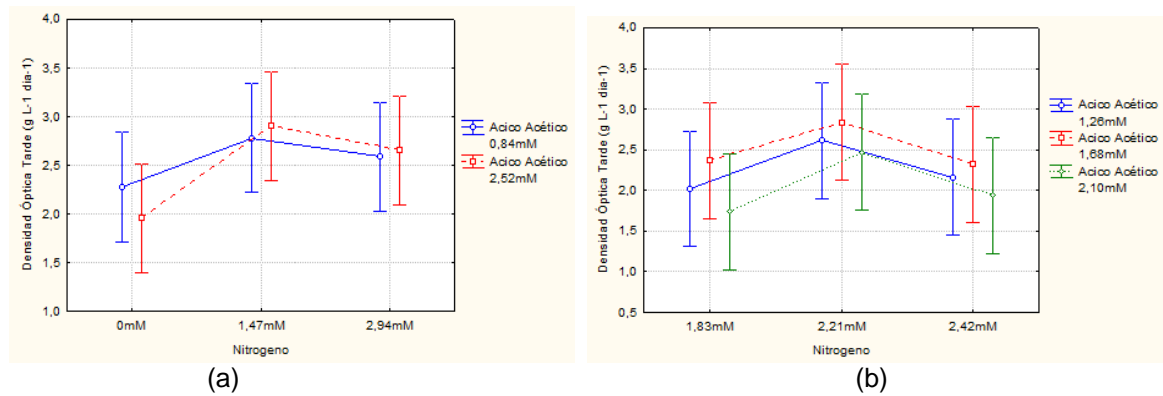
En la figura 11a se presenta un comportamiento heterotrófico en los 5 días de corrida para las diferentes concentraciones, es decir, la microalga alcanza mayor productividad en el periodo de oscuridad. Asimismo se puede inferir que la productividad para 1,47; 2,94mM de nitrato y 0,84mM; 2,52mM de ácido acético no presentan una diferencia significativa, razón por la cual se evaluó un nuevo intervalo presentado por la figura 11b, observándose un comportamiento mixotrófico. La mayor producción de biomasa se obtiene en 1,47mM de nitrato y 2,52mM de ácido acético, corroborando los resultados anteriores.

Tabla 2: Prueba de significancia para la productividad de biomasa para el día 5 (tarde)

Concentración 0,84; 2,52mM de ácido acético y 0; 1,47; 2,94mM de nitrógeno						
Prueba de significancia para productividad de biomasa (g L ⁻¹ día ⁻¹) (día 5 medición de la tarde)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	114,9981	1	114,9981	580,0709	0,000000	SI
ACIDO ACÉTICO	0,0084	1	0,0084	0,0426	0,840016	NO
NITRATO	1,6556	2	0,8278	4,1756	0,042029	SI
ACIDO ACÉTICO/NITRATO	0,1738	2	0,0869	0,4384	0,654975	NO
ERROR	2,3790	12	0,1982			
Concentración 1,26; 1,68; 2,10mM de ácido acético y 1,83; 2,10; 2,42mM de nitrógeno						
Prueba de significancia para productividad de biomasa (g L ⁻¹ día ⁻¹) (día 5 medición de la tarde)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	139,8575	1	139,8575	406,1287	0,000000	SI
ACIDO ACÉTICO	0,9563	2	0,4781	1,3884	0,274935	NO
NITRATO	1,8536	2	0,9268	2,6912	0,094937	NO
ACIDO ACÉTICO/NITRATO	0,0722	4	0,0181	0,0524	0,994383	NO
ERROR	6,1986	18	0,3444			

Fuente: Los autores

Figura 13: (a) Efecto ácido acético/nitrato sobre productividad día 5 (tarde). (b) Mejoramiento Efecto ácido acético/nitrato sobre productividad día 5 (tarde).



Fuente: Los autores

3.1.2 Variable de respuesta: Concentración de clorofila total.

Empleando la prueba de homogeneidad de varianza sobre la clorofila como se muestra en la Tabla 3, se concluye que para las muestras de 0,84 y 2,52mM de ácido acético presenta homogeneidad de varianza entre los tratamientos, sin embargo cuando se trabaja con concentraciones de 1,26; 1,68; 2,10mM ácido acético los valores de la variable de respuesta están dispersos dentro de un mismo tratamiento.

Tabla 3: Prueba de homogeneidad de varianza para el día 5 efecto ácido acético/nitrato sobre la concentración de clorofila total (mg/L)

Prueba homogeneidad de varianza (día 5)					
Efecto: Acido acético/Nitrato sobre la clorofila (mg/L)					
Concentración 0,84; 2,52mM de ácido acético y 0; 1,47; 2,94mM de nitrógeno					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
83,66753	0,563851	8,318092	5	0,139554	SI
Concentración 1,26; 1,68; 2,10mM de ácido acético y 1,83; 2,10; 2,42mM de nitrógeno					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
1826,727	0,640743	30,48829	8	0,000173	NO

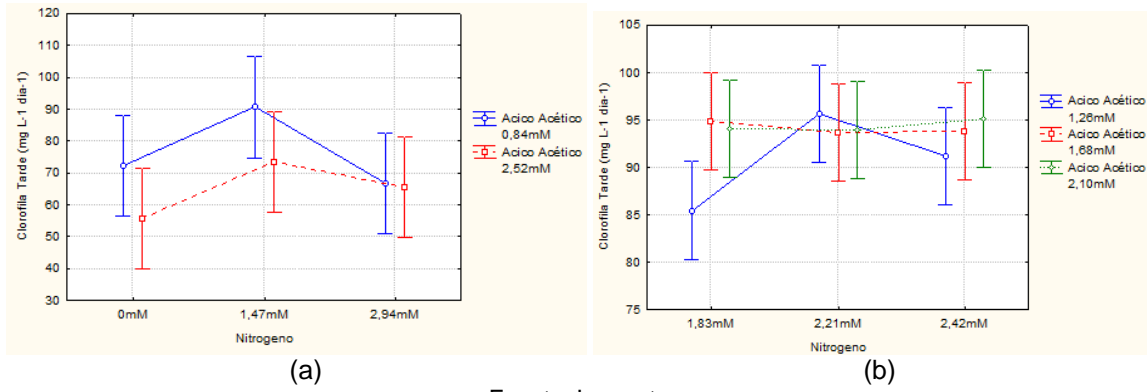
En la prueba de significancia mostrado en la tabla 4 se puede inferir que la relación entre ácido acético y nitrato presenta significancia en la productividad clorofila y producción de biomasa en los diferentes tratamientos.

Tabla 4: Prueba de significancia para la concentración de clorofila total (mg/L) en el día 5.

Efecto: Acido acético/Nitrato sobre la clorofila (mg/L)						
Concentración 0,84; 2,52mM de ácido acético y 0; 1,47; 2,94mM de nitrógeno						
EFEECTO	SC	GL	MC	F	P	Resultado
INTERCEPTO	90090,11	1	90090,11	567,3487	0,000000	SI
ACIDO ACÉTICO	603,27	1	603,27	3,7992	0,075040	NO
NITRATO	1170,55	2	585,27	3,6858	0,056506	NO
ACIDO ACÉTICO/NITRATO	249,37	2	124,69	0,7852	0,478107	NO
ERROR	1905,50	12	158,79			
Concentración 1,26; 1,68; 2,10mM de ácido acético y 1,83; 2,10; 2,42mM de nitrógeno						
EFEECTO	SC	GL	MC	F	P	Resultado
INTERCEPTO	233982,4	1	233982,4	13040,12	0,000000	SI
ACIDO ACÉTICO	74,1	2	37,0	2,06	0,155989	NO
NITRATO	41,9	2	20,9	1,17	0,333974	NO
ACIDO ACÉTICO/NITRATO	119,7	4	29,9	1,67	0,201097	NO
ERROR	323,0	18	17,9			

Fuente: Los autores

Figura 14: (a) Efecto ácido acético/nitrato sobre la clorofila día 5 (tarde) y (b) mejoramiento del efecto ácido acético/nitrato sobre la clorofila día 5 (tarde).



Fuente: Los autores

4. CONCLUSIONES

Se encontró un rango de operación a escala laboratorio donde se presenta mayor productividad de biomasa *C. vulgaris*, cuando se inyecta ácido acético como fuente de carbono orgánico.

La mayor productividad de biomasa de *C. vulgaris* a escala laboratorio se presenta en un rango de concentración entre 0,84; 2,52mM de ácido acético y 2,94; 5,88mM de nitrato, cuando se inyecta ácido acético como fuente de carbono orgánico.

Del análisis estadístico se puede inferir que el ácido acético y nitrato de forma individual y su interacción tienen significancia en la productividad de biomasa, haciendo de esta una alternativa viable para su cultivo.

Se demostró que hay diferencia en la asimilación cuando se utiliza ácido acético y acetato de sodio, ya que al disociarse el ácido disminuye el pH del medio, lo cual tiene el potencial de inhibir el crecimiento celular, sin embargo la productividad entre estas dos fuentes de carbono orgánico no es significativo.

RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuras investigaciones estudiar el efecto que tienen las diferentes concentraciones de ácido acético y nitrato en la deposición de lípidos, carbohidratos y proteínas, con el fin de comprobar que tan útiles son para la producción de biocombustibles.

Para confirmar el consumo total del ácido acético suministrado a los cultivos de *C. vulgaris* se sugiere realizar un seguimiento de la disociación del ion acetato en el medio de cultivo.

Se aconseja analizar diferentes ciclos de luz/oscuridad (6:18, 0:24), para el rango encontrado (0,84; 2,52mM de ácido acético y 2,94; 5,88mM de nitrato), para corroborar el comportamiento heterotrófico del cultivo y la posibilidad de aumentar las productividades.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 **Ma F.R., Hanna M.A.** (1999) Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol* 70:1–15.
- 2 **Dunstan G., Volkman J., Barret s., Garland C.** (1993). *J Applied Phycol* 5: 57-83,
- 3 **Borowitzka M.** (1995) *J Applied Phycology* 7: 3-15.
- 4 **Molina E., Sánchez J., García F., Fernández J., Ación F., Urda** (1995) *J. Appl Microbiol Biotechnol* 42: 658-663.
- 5 **Romero T.** (1998) Tecnología de cultivo de *Chlorella vulgaris* en los efluentes líquidos de la industria pesquera y subproductos derivados. *Anais dos 4 Congreso Latinoamericano de Ficología*. Brasil, pp. 475-495.
- 6 **Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M., Brzezinski, M.A.,** 2000. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *J. Phycol.* 36:821-840
- 7 **Chisti Y.** (2008). Response to Reijnders: Do biofiels from Microalgae beats biofuels from terrestrial plants. *Trends Biotech.* 26: 7-7.
- 8 **Prosperi, C., Boluda L., Luna C., Fernández E.** (1992) *J Appl Phycol* 4: 197-204.
- 9 **Lee H., Lee S., Park** (1989) *B. Biomass* 18:153-160.
- 10 **Tamarys Heredia-Arroyo, Wei Wei, Bo Hu.** (2010). Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl Biochem Bootechnol.* 162: 1978-1995.
- 11 **Avagyan A.B.** (2008). A contribution to global sustainable development: inclusion of microalgae and their biomass in production and bio cycles. *Clean.Tech. Environ. Policy.* 10:313-317.

- 12 **Miao X., Wu Q.** (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J. Biotech.* 110: 85-93.
- 13 **Paerl H.W., Fulton R.S., Moisander P.H.** (2001) Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *Scientific World Journal* 1:76–113
- 14 **Sellner K.G., Doucette G.J., Kirkpatrick G.J.** (2003) Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:383–406
- 15 **Liu Z.Y., Wang G.C., Zhou B.C. (2008)** Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*, *Bioresour. Technol.*, 99: 4717-22.
- 16 **Schenk, P. Thomas-Hall, S. Stephens, E. Marx, U. Mussnug, J. Posten, C. Kruse, O. Hankamer, B.** (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenerg. Res.* 1:20–43.
- 17 **Sastre, R. R. Csogor, Z. Perner-Nochta, I. Fleck-Schneider, P. Posten, C.** (2007). Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors—A conceptual approach. *Journ Biotechn* 132, 127–133.
- 18 **Barbosa, B. Jansen, M. Ham, N.** (2003). Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. *Biotechnol Bioeng* 82:170–179
- 19 **Barbosa, B. Hadiyanto, M. Wijffels, R.** (2004). Overcoming shear stress of microalgae cultures in sparged photobioreactors. *Biotechnol Bioeng* 85:78–85
- 20 **Poulsen, B. R. Iversen, J. J.** (1999). Membrane Sparger in Bubble Column, Airlift, and Combined Membrane–Ring Sparger Bioreactors. *Biotechnol Bioeng* Vol. 64, (4) 452-458.
- 21 **Eriksen, N. T.** (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnol Lett* 30:1525–1536.
- 22 **Molina Grima, E. Ación Fernández, F. G. García Camacho, F. Chisti, Y.** (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *J. Biotechnol.* 70, 231–248.
- 23 **Tortora Gerard J., Funke Berdell R., Case Christine L.** (2007). Introducción a la microbiología, Editorial medica Panameticana S.A., 9ª. P 187-188

- 24 **Ghasem D. Najafpour.** 2007 Biochemical Engineering and Biotechnology. First edition, p 98-99.
- 25 **Vera Garcia,** Introducción a la microbiología (1995), Editorial Universidad estatal a distancia. P 52-55
- 26 **Barsanti, L., Gualtieri, P.** General Overview. *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology.* 2006.
- 27 **Kanno, Toshihiro. Uyama, Kazie.** (2005). Chlorella vulgaris: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. Publicado por Woodland Publishing. Pág. 63
- 28 **Mayo, A.** (1.997). Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga Chlorella vulgaris cultures containing bacteria. Water Environment Research. 69 (1): 64-72.
- 29 **Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cay, Z. and Hu, Z.** (2009). Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of Phaeodactylum tricornutum. Journal of Applied Phycology, 21:239-246
- 30 **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. Plant Cell Physiology.
- 31 **Po-Fung Ip a, Chen F.** (2005). Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in Chlorella zofingiensis in heterotrophic culture. Process Biochemistry, 40:3491–3496.
- 32 **Borowitzka, M.** (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology, 70:313–321.
- 33 **Dayanandaa C., Saradaa R., Usha Ranib M., Shamalab T.R., Ravishankara G.A.,** (2006) Autotrophic cultivation of Botryococcus braunii for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media

- 34 **Tamarys Heredia-Arroyo a, Wei Wei b, Roger Ruan c, Bo Huc**, (2001) Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials
- 35 **Alberts, B et al**; (1996) *Biología Molecular de la Célula*. 3^{ra} Edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona pag. 427-450
- 36 **Samejima, J. Myers, J. Gen**, (1958). On the Heterotrophic Growth of *Chlorella pyrenoidosa* BY H. Laboratory of Algal Physiology, University of Texas, Austin Texas, U.S.A. *Microbiol.* 18, 107-117
- 37 **Ogawa, T. and Aiba, S.** 1981. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23:1121–1132.
- 38 **Marquez, F., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N. and Nagai, S.** 1993. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76:408-410.
- 39 **Sastre R. Csogor Z, Perner-Nochta I, Fleck-Schneider P, Posten C.** (2007). Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors—A conceptual approach. *Journal of Biotechnology*. 132 : 127–133.
- 40 **Syrett P. J., Bocks Sheila M., Merrett M. J.** (1964) The Assimilation of Acetate by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Experimental Botany*. 15:35-47.
- 41 **Chang Raymond, College William.** (2002) *Química*. Editorial Mc Hill. Séptima edición pag. 652-679
- 42 **Perez-Garcia Octavio, Froylan M.E. Escalante, Luz E. de-Bashan, Yoav Bashan** (2010) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Elsevier. 11-36
- 43 **Beutler, H. -O.** (1988). Determination with Acetyl-CoA Synthetase. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol.VI, pp. 639-645, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.
- 44 **Kornberg H.L. and H.A. Krebs.** (1957) *Nature* 179:988-991

- 45 **Merrett, M. J. and Syrett, P. J.** 1960. *The Relationship Between Glucose Oxidation and Acetate Oxidation in Chlorella vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 13:237–249.
- 46 **Goulding, K. and Merrett, M.** 1966. The Photometabolism of Acetate by *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Experimental Botany*.
- 47 **Voet, J., Voet, D.** 2006. Ciclo del ácido cítrico. *Bioquímica*. s.l.: Panamericana, 21.
- 48 **Morris By I., Syrett P. J. (1964)** The Effect of Nitrogen Starvation on the Activity of Nitrate, *Department of Botany, University College London, W.C.38:21-28*
- 49 **Crawford, N.M., Kahn, M.L., Leustek, T., Long, S.R.,** 2000. Nitrogen and sulfur. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Am. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD, USA, pp. 786e849.
- 50 **Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z., Aaronson, S.,** 1986. Algal nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook for Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, FL., USA, pp. 147e198.
- 51 **Fernandez, E., Galvan, A.,** 2007. Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *J. Exp. Biol.* 58, 2279e2287.
- 52 **Gewitz, H.S., Piefke, J., Vennesland, B.,** 1981. Purification and characterization of demolybdo nitrate reductase (NADH cytochrome c oxidoreductase) of *Chlorella vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 256, 11527e11531.
- 53 **Di Martino Rigano, V., Vona, V., Fuggi, V., Di Martino, C., Rigano, C.,** 1982. Regulation of nitrate reductase in *Chlorella* nitrate requirement for the appearance of nitrate reductase activity. *Plant Sci. Lett.* 28, 265e272.
- 54 **Sherman, T.D., Funkhouser, E.A.,** 1989. Induction and synthesis of nitrate reductase in *Chlorella vulgaris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 525e531.

- 55 **Morris, I.**, 1974. Nitrogen assimilation and protein synthesis. In: Stewart, W.D.P. (Ed.), *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 513e613.
- 56 **Abalde J., A. Cid, J. P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero.** (1995). *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. Universidad Da Coruña
- 57 **Stein J.** (1975) *Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. pp. 365,
- 58 **Hernandez Paola, Rosas Fernando.** (2011) Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa de *chlorella vulgaris* utex 1803 en fotobiorreactores a escala de laboratorio

ANEXOS

ANEXOS A: EQUIPOS

Figura: A Equipos empleados

	ESPECTROFOTOMETRO Spectroquant® Pharo 300, un rango de longitud de onda de 190-1100 nm.
	BALANZA ANALITICA Serie 320XB, marca Precisa Gravimetrics AG, máx. 220 g e=0,001, mín. 0,01 g d=0,0001 g.
	pH- METRO Handylab pH 11 SCHOTT Instruments
	CENTRIFUGADORA PowerSpin™ MX, velocidad variable 1000 a 3400 rpm, rotor para 24 tubos de 2 a 10 ml.
	HORNO Marca WTC binder, 115 V 60 Hz, 1,20 kW, temperatura máxima 300 °C.
	PLACA DE CALENTAMIENTO Modelo MSH-20D
	DESECADOR Desecador con gel de sílice.
	COMPRESOR Potencia 350 watts. 1650 rpm
	AUTOCLAVE CILÍNDRICA Capacidad 25 litros , Modelo 25-X
	Microscopio digital HIROX, KH7700

ANEXOS B: MEDIO DE CULTIVO BOLD BASAL

Tabla B 1: Preparación de las soluciones *Stock*

Macronutrientes		
<i>Soluciones Stock</i>	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		
<i>Soluciones Stock</i>	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 <i>Bold Basal</i>		
<i>Soluciones Stock</i>	Para 1 L	
Macronutrientes	10,0 mL de cada uno	
Micronutrientes	1,0 mL de cada uno	

Para los cultivos mixotróficos se varió la cantidad de *Stock 1* (solución de NaNO₃). Con el fin de obtener concentraciones de 0; 2,94; 3,67; 4,41; 5,14 y 5,88mM de nitrógeno con relación al medio *Bold Basal* original.

ANEXOS C: CÁLCULO DEL COEFICIENTE MÁSIKO DE EXTINCIÓN

Tabla C 1: Variación de la absorbancia con la concentración de la muestra.

Peso seco por vol. de muestra (concentración g/L)	Absorbancia
0	0
1	0,807
0,5	0,434
0,25	0,233
0,125	0,117

Figura C 1: Grafica de los datos de absorbancia en función de la concentración, para el cálculo del coeficiente másiko de extinción.

