

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/ NITRÓGENO EN LA DEPOSICIÓN DE
LÍPIDOS, CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS EN UN CULTIVO INMOVILIZADO
DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 Y *Nannochloropsis* sp.**

**LAURA ANGELICA URIZA JOYA
MARTHA PATRICIA TRIANA TOLOZA**

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

2014

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/ NITRÓGENO EN LA DEPOSICIÓN DE
LÍPIDOS, CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS EN UN CULTIVO INMOVILIZADO
DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 Y *Nannochloropsis* sp.**

**LAURA ANGELICA URIZA JOYA
MARTHA PATRICIA TRIANA TOLOZA**

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

**Director
VIATCHESLAV KAFAROV
Ingeniero Químico Dr. Sc.**

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

2014

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	16
1.1 RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO	16
1.2 MATRIZ POLIMÉRICA	17
2. CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA	19
2.1 CUANTIFICACIÓN DE PESO SECO	19
2.2 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES	19
2.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	19
2.4 CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS	20
3. RESULTADOS	22
4. CONCLUSIONES	28
9. RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	35

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Poliuretano matriz elegida.	18
Figura 2. Dimensiones de la matriz, poliuretano de baja densidad	18
Figura 3. Crecimiento algal <i>Nannochloropsis</i> y algal <i>Chlorella</i>	18
Figura 4. Producción de <i>C. vulgaris</i> inmovilizada en medios de cultivo modificados	22
Figura 5. Porcentaje de carbohidratos, proteínas y lípidos de <i>C vulgaris</i> en los experimentos	24
Figura 6. Producción de <i>Nannochloropsis</i> sp inmovilizada en medios de cultivo modificados	25
Figura 7. Porcentaje de carbohidratos, proteínas y lípidos de <i>Nannochloropsis</i> sp en los experimentos	26

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentración Carbono/Nitrógeno	17

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Medio bold basal	35

RESUMEN

TÍTULO: EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/ NITRÓGENO EN LA DEPOSICIÓN DE LÍPIDOS, CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS EN UN CULTIVO INMOVILIZADO DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 Y *Nannochloropsis* sp.

AUTORES: LAURA ANGELICA URIZA JOYA, MARTHA PATRICIA TRIANA TOLOZA**

PALABRAS CLAVES: Microalgas, biomasa, inmovilización, polímero, productividad y concentración.

DESCRIPCIÓN

Las microalgas son parte fundamental en el desarrollo de investigaciones de biocombustibles, pues se estima que el 40% de la fotosíntesis global es realizada por ellas. Como consecuencia de su pequeño tamaño celular, surgen una serie de técnicas una de ellas es la inmovilización de microalgas, donde su objetivo es la productividad y crecimiento de la biomasa. Para este trabajo de investigación se evaluó el efecto de la relación Carbono/nitrógeno en la producción de biomasa. Se realizaron tres tratamientos (A, B y C), cada uno con su respectiva réplica, utilizando como medio inmovilizante de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis* sp el poliuretano de baja densidad. Se puede concluir que para los tratamientos realizados con *Chlorella vulgaris*, el mejor fue el C, ya que se observa que aunque su crecimiento surge de manera más lenta, su producción de biomasa final es más alta que las de cultivo libre, debido a ello nos permite evidenciar una mejora en la producción final de biomasa sin necesidad de aumentar el volumen de cultivo. Para los tratamientos realizados con *Nannochloropsis* sp se reportan bajos valores de producción de biomasa, donde en el tratamiento A sería el mejor relativamente pues al octavo día se obtienen la mayor producción de biomasa (4 g/L) pero después surge una disminución en la concentración; estos resultados pueden deberse a la baja fijación de *Nannochloropsis* sp en las paredes del polímero, lo que permite la liberación de concentraciones considerables de biomasa al medio de cultivo.

* Proyecto de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Físico-Químicas, Escuela de Ingeniería Química, Director VIATCHESLAV KAFAROV”.

SUMMARY

TITLE: THE EFFECT OF CARBON/NITROGEN RATIO IN LIPIDS, CARBOHYDRATES, AND PROTEIN DEPOSITION IN AN IMMOBILIZED CROP OF *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 Y *Nannochloropsis* sp.

AUTHORS: LAURA ANGELICA URIZA JOYA, MARTHA PATRICIA TRIANA TOLOZA**

KEY WORDS: Microalgae, biomass, immobilization, polymer, concentration, productivity.

DESCRIPTION

Microalgae are a crucial part in the development of research related to biofuel as 40% of the global photosynthesis is done by them. Because of their tiny cellular size, there are several methods and one of them is the microalgae immobilization which has as objective the biomass development and productivity. In the present research it was evaluated the effect of carbon/nitrogen ratio in the biomass production. Three methods or treatments were applied (A, B, C) each one with its corresponding copy and as immobilizer for the *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis* sp microalgae it was used polyurethane of low density.

From the above, it could be concluded that the best method or treatment was method C. It was observed that despite the fact microalgae grew slower with this treatment, the biomass production was higher. An improvement in the final biomass production was evident without the need of increasing the crop volume. In the treatments with *Nannochloropsis* sp low rates of biomass production were reported, so the best method would be A as in the eighth day, the highest production occurs (4 g/L); there is then a concentration decrease, though. These results can be the cause of the little *Nannochloropsis* sp attachment to the polymer walls allowing the release of high biomass concentrations to the crop environment.

* Proyecto de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Físico-Químicas, Escuela de Ingeniería Química, Director VIATCHESLAV KAFAROV”.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que pueden crecer en diferentes tipos de agua, desde salada hasta residual, requieren luz solar, nutrientes y una fuente de carbono (Aslan *et al.*, 2006), además forman parte de la alimentación humana, ofrecen la posibilidad de integrar procesos, recircular corrientes de agua, capturar dióxido de carbono (producto de la combustión) y hacer uso integral de la biomasa mediante el aprovechamiento de los metabolitos y los subproductos resultantes (Van Vooren *et al.*, 2012) que poseen un alto valor agregado; sin embargo una de las principales barreras para la masificación de productos derivados a partir de microalgas es su tamaño celular (Saeed *et al.*, 2006), por lo cual dificultan su separación del medio de cultivo; aunque se han desarrollado diferentes tecnologías para cumplir con este propósito tales como: centrifugación y microfiltración, solo en algunos casos este tipo de procesos son rentables, debido al costo final de la biomasa (Lam & Lee 2012). Otro método es la floculación química el cual es mucho más barato, sin embargo la adición de grandes cantidades de floculante químico tienen un efecto ambiental negativo a largo plazo (Chen *et al* 2011).

Una de las posibles alternativas es la inmovilización celular en matrices (biológicas o inertes), esta técnica restringe la movilidad de las células, permitiendo un rápido crecimiento celular en un espacio restringido (Bashan & Bashan 2010), además permite la remoción de cantidades sustanciales de nutrientes (Moreno-Garrido, 2008; Bashan & Bashan 2010).

Inmovilizar microalgas tiene varios beneficios: 1) evita que las células se diluyan en el medio, 2) permite obtener altas concentraciones de biomasa y 3) permite el uso de microalgas como bio-filtros para el tratamiento de aguas residuales con

altas concentraciones de metales pesados (El-Sayed *et al.*, 2010). La matriz utilizada para la inmovilización puede ser de un polímero sintético (acrilamida o poliuretano) o de un polímero natural (agar, colágeno, loofa), sin embargo cualquiera que sea el material este debe cumplir con ciertas características como: 1) permita una incidencia solar alta, 2) no sea toxica, 3) que no se degrade por el medio de cultivo y 4) permita una retención celular alta (Mallick, 2002).

Generalmente se considera que la relación C/N influye en la concentración de los diferentes metabolitos celulares (Lin *et al.*, 2004). 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 (Solovchenko *et al.*, Takagi *et al.*, 2000). Además se ha indicado que las especies *Chlorella* 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 (Heredia-Arroyo *et al.*, 2010).

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 (Flynn, 1991). Esto se relaciona con la historia previa de nutrición de la célula, se ha reportado en estudios anteriores, que algunas células que sufrieron estrés por una ligera disminución en la disponibilidad de nitrógeno (afecta el transporte y las funciones de asimilación de nitrato, aunque no necesariamente la limita la tasa de crecimiento), no pueden utilizar el nitrato en la noche; en contraste, las células que tuvieron altas limitaciones de nitrato pueden hacerlo (Caperon, 1968), esto probablemente refleja cambios en el metabolismo y el almacenamiento de C/N a mayor estrés.

Aun conociendo su existencia, no es posible generalizar la relación C/N para las microalgas, dado que existe un potencial para perturbar los organismos simplemente alterando el nivel de iluminación durante el muestreo, la

manipulación de la muestra e incubaciones experimentales (Hitchcock *et al.*,1986). También hay, sin duda, diferencias entre las especies y grupos de microalgas, tanto en la rapidez y magnitud de las respuestas como en el umbral que hace significativas estas respuestas (Flynn, 1991).

Por todo lo anterior el objetivo de este trabajo de investigación es evaluar el efecto de la relación Carbono/nitrógeno en la producción de biomasa, con especial interés en la obtención de carbohidratos, proteínas y lípidos en cultivos inmovilizados de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis* sp.

1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Chlorella vulgaris UTEX 1803 fue obtenida de la colección de algas de la Universidad de Texas (UTEX) y *Nannochloropsis* sp, fue proporcionada por la Corporación Instituto de Morrosquillo (Colombia). Las microalgas se mantuvieron en crecimiento en medio Bold Basal (MBB) cuya composición en mg/L es: NaNO₃ (2,94), MgSO₄.7H₂O (3,04 X 10⁻¹) NaCl (4,28 X 10⁻¹), K₂HPO₄ (4,31 X 10⁻¹), KH₂PO₄ (1,29), CaCl₂.2H₂O (1,70 X 10⁻¹) y micronutrientes (mg/l) ZnSO₄.7H₂O (3,07 X 10⁻²), MnCl₂.4H₂O (7,28 X 10⁻³), MoO₃ (4,93 X 10⁻³), CuSO₄.5H₂O (6,29 X 10⁻³), Co(NO₃)₂.6H₂O (1,68 X 10⁻³), H₃BO₃ (1,85 X 10⁻¹), EDTA (1,71 X 10⁻¹), KOH (5,53 X 10⁻¹), FeSO₄.7H₂O (1,79 X 10⁻²).

Se utilizaron reactores cilíndricos tipo air-lift con un diámetro interno de 14cm y 35cm altura con un volumen del cultivo de 2 L. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 0.5 L/min.

1.1 RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO

Con el fin de mejorar la productividad de biomasa, carbohidratos, proteínas y lípidos en cultivos inmovilizados tanto de *C. vulgaris* como *Nannochloropsis* sp y teniendo en cuenta resultados previos obtenidos por el Centro de Investigación CIDES se probaron 2 relaciones carbono/nitrógeno variando la fuente de carbono (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración Carbono/Nitrógeno

Experimento	NaNO ₃ (mM)	C ₂ H ₃ NaO ₂ (g/L)	(NH ₄) ₂ CO ₃ (g/L)
A	1,96	-	0,42
B	0,98	0,82	-
C	2,94 (Control)	-	-

Cada uno de los experimentos (incluyendo el control) se realizaron por triplicado en fotobiorreactores tipo flat panel con volumen de trabajo de 2 litros durante veinte días, en ciclos de luz: oscuridad de 12:12 y un flujo de aire de 0,5 L/min filtrado utilizando filtro de membrana de 0.2 μm ; el pH inicial, temperatura e intensidad lumínica fueron $6,5 \pm 1$, $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y $480 \pm 1 \mu\text{mol fotones/m}^2/\text{s}$. Se agregó un volumen de inóculo suficiente para lograr una concentración celular inicial de aproximadamente 0,4 g/L (peso seco), esto se logró controlando la densidad óptica inicial (aproximadamente 0,8 de absorbancia a 500 nm) utilizando un espectrofotómetro (Spectroquant 300 Merck).

1.2 MATRIZ POLIMÉRICA

Como material inmovilizante se empleó el poliuretano de baja densidad de 1 centímetro de grosor. En promedio el área del polímero cultivable en cada experimento fue de $0.0561\text{m}^2 \pm 0.0003$.

Figura 1. Poliuretano matriz elegida.



Figura 2. Dimensiones de la matriz, poliuretano de baja densidad

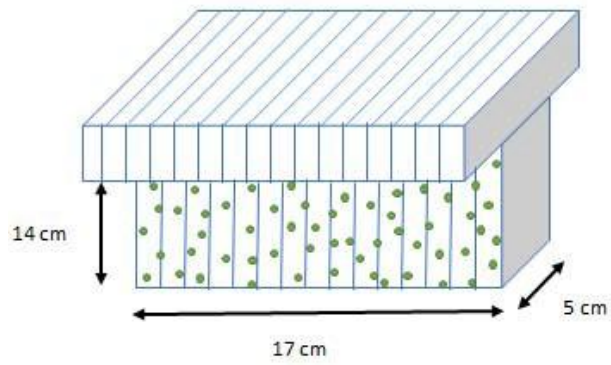
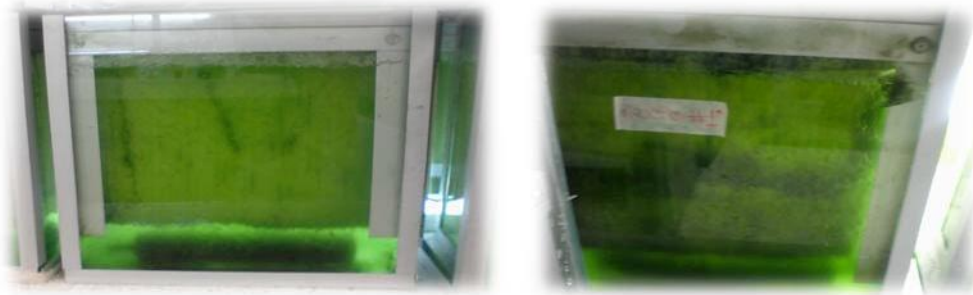


Figura 3. Crecimiento algal *Nannochloropsis* sp y algal *Chlorella*



2. CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA

2.1 CUANTIFICACIÓN DE PESO SECO

La recolección de biomasa se hizo cada 4 días. El procedimiento para la recolección de biomasa consistió en raspar el biofilm (biopelícula de biomasa formada sobre el polímero), se tomaron varias muestras de 1 mL y se filtró utilizando papel filtro de 0.45 μm , al papel filtro para proceder a su secado en un horno de convección forzada a una temperatura de 105° C durante 24 horas. Posteriormente las muestras se llevaron al desecador durante 12 horas y finalmente se pesaron en una balanza digital obteniéndose los datos de producción de biomasa en peso seco.

2.2 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

Una vez al día se tomaron 15 mL de medio de cultivo, se centrifugo la muestra a 3400 RPM durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante y se re-suspendió en 5 mL de H_2SO_4 .1M; a la mezcla se agregó 5 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm y se homogenizo durante 5 minutos a velocidad media. Una vez la mezcla se homogenizo, se incubaba a 100°C durante 60 minutos; transcurrido el tiempo se enfrió la muestra y se llevó a centrifugar a 3400 rpm durante 10 minutos. Del sobrenadante se tomó 2 mL y se agregó 1 mL de fenol al 5% (p/v) y se agitó usando un vortex durante 3 minutos y se añadió 5 mL de H_2SO_4 concentrado. La muestra fue leída siguiendo la metodología de Dubois *et al* (1956).

2.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Una vez al día se tomó 15 mL de medio de cultivo, se centrifugó la muestra a 3400 rpm durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante y se re-suspendió el pellet en 5 mL de reactivo de biuret; a la mezcla se agregó 5 mg de perlas de vidrio de 0.5

mm y se homogenizó con el vortex a velocidad máxima durante 10 minutos, una vez terminado el tiempo se agregó otros 5 mL del reactivo de biuret y se incubó a 100°C durante 60 minutos.

Transcurrido el tiempo se adicionó 0.5 mL de reactivo de Folin-fenol y se agitó en un vortex a velocidad media durante 5 minutos.

La muestra se llevó a baño frío (10-15°C) durante 20 minutos; transcurrido el tiempo se centrifugó a 3400 rpm durante 10 minutos; el sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro a 660 nm.

2.4 CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

La cuantificación de lípidos se encontró siguiendo las indicaciones de Chen (2012). Para este procedimiento, se tomó 1 mL de biomasa de cada tratamiento. Se preparó una disolución de 0,1214g de tris (Hydroxymethyl $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$) en 1ml de agua. Seguidamente se adicionó 0,250 gramos de perlas de vidrio a cada una de las muestras y se agitó con un vortex durante 3 min para la realización de la ruptura celular. Luego se preparó tres mezclas por separado: Mezcla 1= 2 g de NaOH; 12,5ml de CH_4O y 37,5 mL de H_2O , Mezcla 2= 10,3ml de CH_4O y 20,66 ml CHCl_3 (cloroformo), Mezcla 3 = 3,14 gramos de Copper (II) (Nitrate $_3$ -hydrate PRS 13 ml de H_2O . Despues 1,55 ml de TEA (threthanoline). 10,147ml de H_2O y por último se añadió 0,074mL de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (ácido acético) con 1,2256mL de H_2O . Se utilizaron tubos falcón de 15mL donde se agregó 1ml de biomasa (*C. vulgaris*) para cada uno de los tubos, en el caso de *Nannochloropsis sp* se procede como se planteó anteriormente, con una concentración: 0,05g de biomasa diluida en 1 ml de agua destilada, a cada muestra les agregó 0,1 ml de tris, 2,4 ml de la mezcla 1, esta solución se debió agitar por 3 minutos en el agitador vortex, después adicionó nuevamente 2,5 ml de la mezcla 1, se agitó por 3 minutos, y luego se calentó a 90°C durante

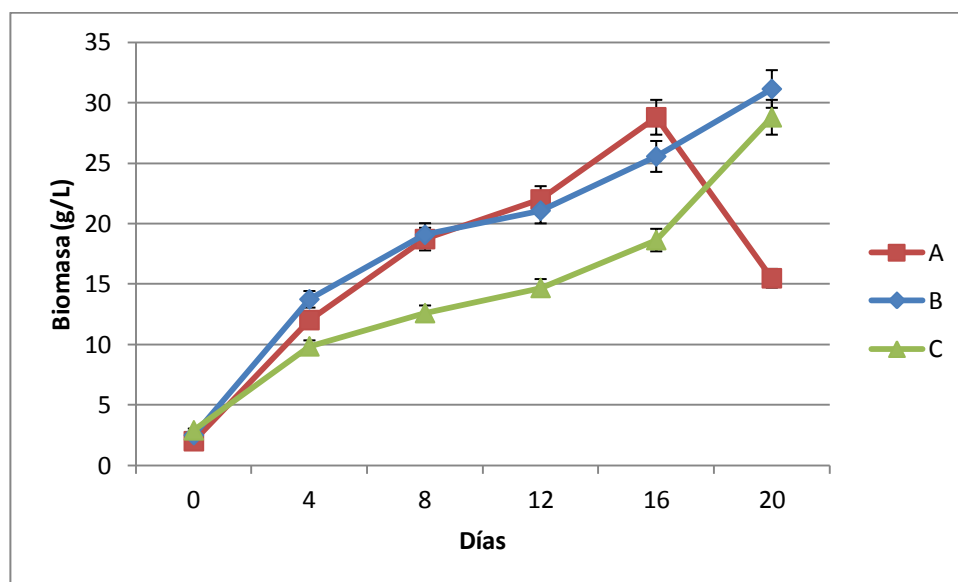
30 min agitando cada 5 min. Posteriormente se dejó enfriar los tubos con la solución, en la cámara de extracción hasta alcanzar la temperatura ambiente. Logrando esta temperatura, se tomó 3ml de esta solución y se llevó a otros tubos falcón, para adicionar 4,5 ml de la mezcla 2, se agitó por 2 minutos, después se llevó a centrifugar a 5000rpm (centrifuga Universal 320 R) por un tiempo de 2 minutos.

Se observó dos fases, por consiguiente se retiró 2,5 ml de la fase orgánica y se trasladó a un tubo nuevo, añadiendo 2,5 ml de la mezcla 3, se agitó por 2 minutos, luego se llevó a la centrifugadora como se indicó anteriormente, esta mezcla se dividió en dos fases, donde la fase de interés para este caso fue el espesante o fase orgánica. Finalmente se midió en un espectrofotómetro (Spectroquant 300) a 260 nm.

3. RESULTADOS

En todos los tratamientos se observa un aumento marcado en la concentración de biomasa de *C. vulgaris*, lo cual se debe en principal medida a la cantidad de acetato de sodio y carbonato de amonio utilizado en los diferentes tratamientos (A y B) respectivamente permitiendo obtener hasta 30 g/L de biomasa (ver Figura 4), mientras que en cultivos libres, las mayores concentraciones oscilan entre 5 y 7 g/L. Comparando los tratamientos con modificación de C/N con el control (tratamiento C) nos permite evidenciar que el crecimiento es más lento debido a la ausencia de una fuente de carbono extra la producción de biomasa final es mucho más alta que las de un cultivo libre, lo cual permite evidenciar una mejora sustancial en la producción final de biomasa sin tener que aumentar el volumen del cultivo.

Figura 4. Producción de *C. vulgaris* inmovilizada en medios de cultivo modificados



Uno de los principales problemas en el ajuste de las concentraciones entre los nutrientes, es el efecto a largo plazo en la calidad de la biomasa, uno de los ejemplos se encuentra en la síntesis y acumulación de triglicéridos, acompañada de alteraciones en la composición de lípidos y ácidos grasos. La carencia de nitrógeno, es respecto a los nutrientes el factor que más afecta la producción de lípidos (Hu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009). En las Figura 5 se muestra la productividad de los diferentes metabolitos (carbohidratos, proteínas y lípidos) bajo medios modificados en la relación carbono/nitrógeno que se obtiene después de veinte días de cultivo en una matriz inmovilizante, se obtienen un 54% de proteínas, mientras que los carbohidratos presentan un 30%, los lípidos representan un 4% de la biomasa.

Estudios sobre el cultivo microalgal variando la fuente de carbono se han enfocado en algas verdes como *C. vulgaris* (Liu *et al.*, 2009), debido a que éstas han demostrado la capacidad de oxidar y utilizar el acetato como fuente de carbono para su crecimiento en la oscuridad (Merrett & Syrett, 1960). Adicionalmente, se ha determinado 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 (Syrett *et al.*, 1964). Según Huppe & Turpin (1994), la variación en la concentración de carbono y nitrógeno puede incrementar la productividad de ciertos componentes generados por el alga.

Figura 5. Porcentaje de carbohidratos, proteínas y lípidos de *C. vulgaris* en los experimentos

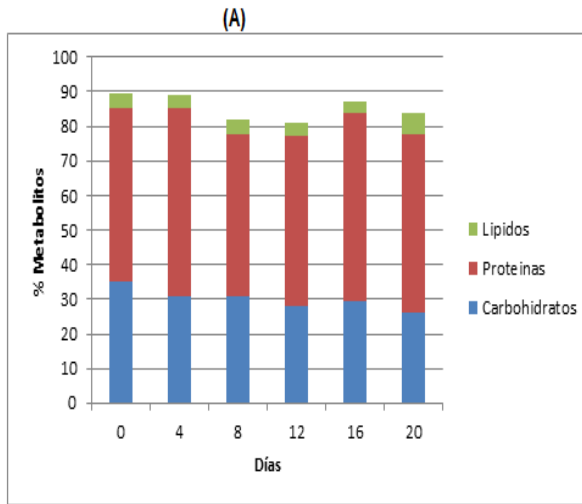


Figura 2. Porcentaje de Carbohidratos, proteínas y lípidos de *C. vulgaris* en el experimento A

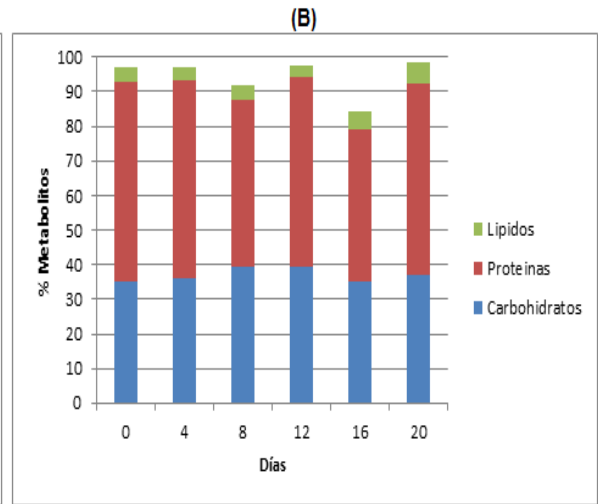


Figura 3. Porcentaje de Carbohidratos, proteínas y lípidos de *C. vulgaris* en el experimento B.

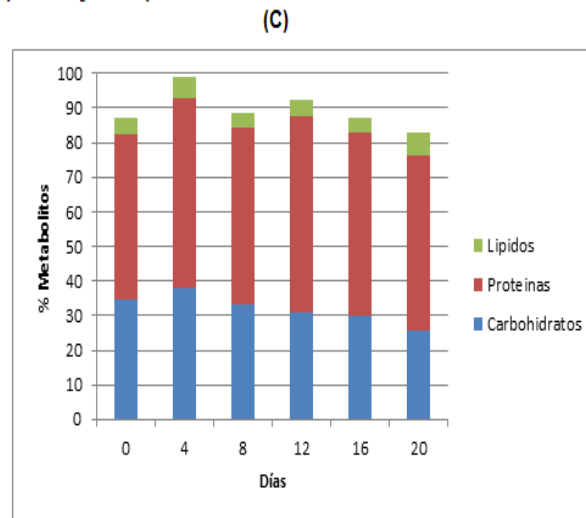
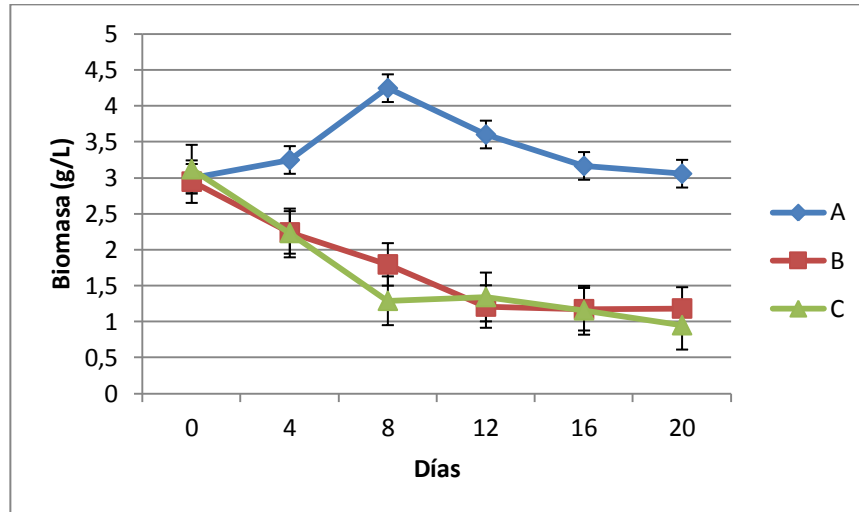


Figura 4. Porcentaje de Carbohidratos, proteínas y lípidos de *C. vulgaris* en el experimento C.

A diferencia de los resultados obtenidos para *C. vulgaris*, en *Nannochloropsis* sp se reportan bajos valores de producción de biomasa, donde en el tratamiento A al octavo día se obtienen la mayor producción de biomasa (4 g/L) seguido por una marcada disminución en la concentración; estos resultados pueden deberse a la baja fijación de *Nannochloropsis* sp en las paredes del polímero, lo que permite la liberación de concentraciones considerables de biomasa al medio de cultivo.

Figura 6. Producción de *Nannochloropsis* sp inmovilizada en medios de cultivo modificados



En la Figura 7, se presentan rendimientos considerables de los metabolitos de estudio, obteniendo 51% de carbohidratos en los primeros 8 días de cultivo , mientras que la mejor producción de proteínas se obtiene para el día 20 con un 47%, finalmente se obtienen 4% de lípidos.

Figura 7. Porcentaje de carbohidratos, proteínas y lípidos de *Nannochloropsis* sp en los experimentos

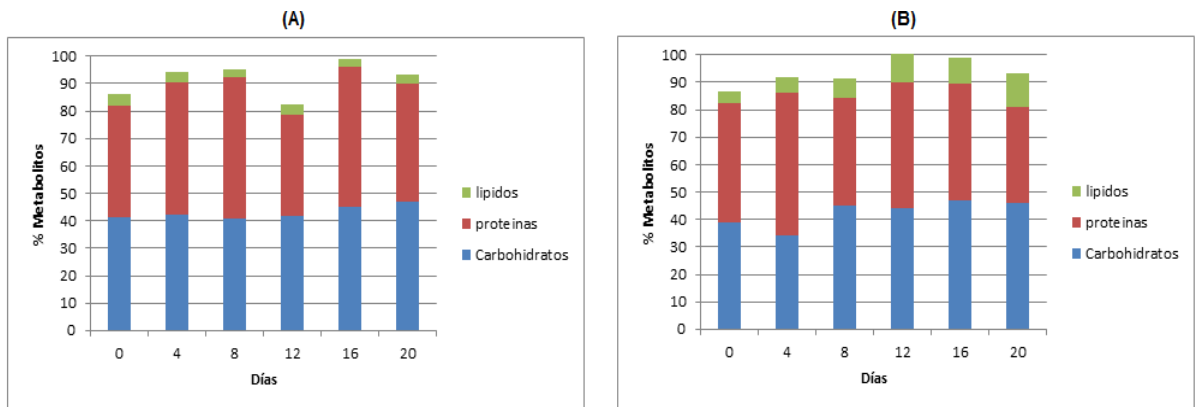


Figura 6. Porcentaje de Carbohidratos, proteínas y lípidos de *Nannochloropsis* sp en el experimento A.

Figura 7. Porcentaje de Carbohidratos, proteínas y lípidos de *Nannochloropsis* sp en el experimento B.

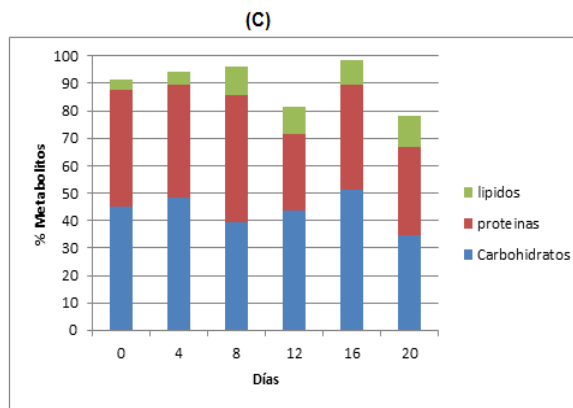


Figura 8. Porcentaje de Carbohidratos, proteínas y lípidos de *Nannochloropsis* sp en el experimento C.

La concentración de acetato está relacionada con la producción de carbohidratos, permitiendo afirmar que trabajar con este nutriente incrementan la productividad de éste metabolito en el tiempo, lo que concuerda con estudios realizados por Chinnasamy *et al.* (2009), Quien plantea que las elevadas concentraciones de acetato, promueven la síntesis de clorofila y la producción de lípidos, sin embargo en el siguiente proyecto el porcentaje de lípidos fue bajo en comparación a otros estudios en los cuales se alcanzan presencias del metabolito del 21% con un medio de cultivo Bold Basal modificado con nitrato de sodio y acetato de sodio. Para la producción de proteína estudios realizados por el joven investigador Ivan Quintero (2014) del grupo CIDES, demostró que la concentración de nitrógeno en

forma de nitrato afecta de manera directa en la producción de proteínas, en el presente estudio la concentración de proteínas es alta pero no presenta un cambio significativo cuando se realiza la variación de los nutrientes esto es debido a que en el proceso de inmovilización no es influyente en la formación de metabolitos.

El consumo de nitrógeno juega un papel fundamental en el incremento o disminución de la productividad de proteínas; a nivel bioquímico el deficit de éste nutriente, influye directamente en la formación de aminoácidos y a su vez limita la traslación del mRNA, reduciendo la síntesis de proteínas (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Una de las principales ventajas de realizar modificaciones del medio de cultivo como es la concentración de nitrógeno, acetato de sodio y carbonato de amonio; conlleva a modificar drásticamente la proporción de los diferentes metabolitos celulares, es por esto que es posible separar los tratamientos propuestos y plantear escenarios de producción de biomasa de microalgas con miras a la obtención de metabolitos de valor agregado. La diferencia significativa entre los tratamientos nos permite escoger como mejor escenario de producción al control.

4. CONCLUSIONES

El uso de una fuente de carbono ayuda acelerar el crecimiento microalgal.

Por medio de los resultados obtenidos en los tratamientos realizados con *C. vulgaris* se puede concluir: que al inmovilizar la microalga se obtiene un aumento significativo en la concentración de dicha biomasa a diferencia de cultivos que se encuentran libres; sin embargo con relación al tratamiento de control se hacen menos favorables a largo plazo.

Adicionar acetato de sodio y carbonato de amonio en los tratamientos A y B inmovilizados con la microalga *C. vulgaris* favorece el aumento en la concentración de metabolitos presentes en la biomasa.

Se evidencio que en el tratamiento C con *Chlorella vulgaris* realizado en ausencia de una fuente de carbono, se obtuvo una producción de biomasa mucho más alta que la de un cultivo libre a pesar de que su crecimiento fue más lento.

Se observó que el comportamiento de la microalga *Nannochloropsis* sp en comparación con *Chlorella vulgaris*, tuvo una producción de biomasa más baja, esto se debe a la baja fijación de *Nannochloropsis* sp a las paredes del polímero, lo cual hace que se liberen concentraciones de biomasa al medio del cultivo.

La producción de carbohidratos se encuentra relacionada con la concentración de acetato, comprobándose que al trabajar con este nutriente se aumenta se la productividad de este metabolito.

9. RECOMENDACIONES

Se sugiere plantear nuevos escenarios de producción de biomasa, variando las cantidades de carbono y nitrógeno hasta encontrar un rendimiento óptimo.

Se propone cambiar las fuentes de carbono y nitrógeno en los cultivos, con el fin de observar cómo se comporta la producción de biomasa microalgal.

Se propone emplear una matriz diferente en la inmovilización de la microalga *Nannochloropsis sp*, para lograr una mayor fijación y crecimiento de la misma en el polímero.

BIBLIOGRAFÍA

ASLAN, S., Kapdan, I.K. (2006) Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *ecological engineering* 28; 64–70

BARSANTI, L., Gualtieri, P. General Overview. *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. 2006.

CAPERON, J. 1968. Population growth response of *Isochrysis galbana* to nitrate variation at limiting concentrations. *Ecology*, 49:866-872.

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

CHINNASAMY, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A. & Keshav C. (2009). Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. *Int. J. Mol. Sci.* 10(2), 518-532.

C.Y. CHEN, K.L. Yeh, R. Aisyah, D.J. Lee, J.S. Chang, Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 71–81.

DE-BASHAN Luz E., BASHAN Yoav, (2010) Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology* 101 (2010) 1611–1627

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

EL-SAYED, A. B; El-Fouly, M.M and Abou El-Nour, E. A.A., Immobilized Microalga *Scenedesmus* sp. for Biological Desalination of Red Sea Water: I. Effect on Growth. *Nature and Science* 010;8(9) 69-76.

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.

HADJ-R. F., Jaouen P., Pruvost J., D. Grizeau a, G. Van Vooren a, P. Bourseau. (2012). Development and validation of a minimal growth medium for recycling *Chlorella vulgaris* culture. *Bioresource Technology* 123, 366–374.

HEREDIA-ARROYO, T., Wei, W., Hu, B. 2010. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 162:1978–1995.

HITCHCOCK, G., Goldman C. and Dennett, M. 1986. Photosynthate partitioning in cultured marine phytoplankton metabolic patterns in a marine diatom under constant and variable light intensities. *Marine Ecology Progress Series*, 30:77-84.
Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 1956; 28: 350-356.

HU, D., Liu, H., Yang, C., Hu, E. (2008). The design and optimization for light-algae bioreactor controller based on Artificial Neural Network-Model Predictive Control. *Acta Astronautica* 63; 1067 – 1075

HUPPE, H. & Turpin D. (1994). Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 577-607

LI, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81(4); 629-636.

LIN, C. Y., & Lay, C. H. 2004. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29:41-45.

LIU, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cai, Z., Hu, Z. (2009). Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. 21:239–246

MALLICK N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals* 15: 377–390, 2002.

MAN KEE LAM, Keat Teong Lee, (2012) Immobilization as a feasible method to simplify the separation of microalgae from water for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal* 191 263– 268 Contents lists

MERRETT, M. J. and Syrett, P. J. 1960. The Relationship Between Glucose Oxidation and Acetate Oxidation in *Chlorella vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 13:237–249.

MORENO-GARRIDO I. (2008). Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology* 99. (2008).3949–3964.

RODOLFI, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. (2009). Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. 102(1):100-12

SAEED A., Iqbal M., (2006). Immobilization of blue green microalgae on loofa sponge to biosorb cadmium in repeated shake flask batch and continuous flow fixed bed column reactor system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (2006) 22: 775–782.

SOLOVCHENKO, A., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., and Merzlyak, M. 3. 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.

SYRETT, P., Bocks, S. and Merrett, M. 1963. The Assimilation of Acetate by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Experimental Botany*, 36-47

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.

ANEXOS

Anexo A. Medio bold basal

Diferentes composiciones de las Stock Solutions, necesarias para preparar el medio de cultivo Bold Basal para un volumen de trabajo de un litro

Macronutrientes		
Soluciones Stock		Para 400 mL
1.	NaNO₃	10,0 g
2.	NaCl	1,0 g
3.	MgSO₄·7H₂O	3,0 g
4.	KH₂PO₄	7,0 g
5.	K₂HPO₄	3,0 g
6.	CaCl₂·2H₂O	1,0 g
Micronutrientes		
Soluciones Stock		Para 1 L
Solución de elementos de traza (autoclave para disolverse)	7. ZnSO₄·7H₂O	8,82 g
	MnCl₂·4H₂O	1,44 g
	MoO₃	0,71 g
	CuSO₄·5H₂O	1,57 g
	Co(NO₃)₂·6H₂O	0,49 g
	8. H₃BO₃	11,42 g
	9. EDTA	50,0 g
	KOH	31,0 g
	10. FeSO₄·7H₂O	4,98 g
	H₂SO₄ (concentrado)	1,0 MI
Medio Bold Basal		Para 1 L
Soluciones Stock 1-6 (Macronutrientes)		10 mL cada una
Soluciones Stock 7-10 (Micronutrientes)		1 mL cada una

Fuente: Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, UK