

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBONO, NITRÓGENO Y FÓSFORO
EN LA OBTENCIÓN DE CARBOHIDRATOS, PROTEÍNAS, CLOROFILAS Y
LÍPIDOS A PARTIR DE CULTIVOS AUTOTRÓFICOS DE *Chlorella vulgaris*
UTEX 1803.**

FREDY ALEXANDER BRAVO CARVAJAL

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

2014

**EFEECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBONO, NITRÓGENO Y FÓSFORO
EN LA OBTENCIÓN DE CARBOHIDRATOS, PROTEÍNAS, CLOROFILAS Y
LÍPIDOS A PARTIR DE CULTIVOS AUTOTRÓFICOS DE *Chlorella vulgaris*
UTEX 1803.**

FREDY ALEXANDER BRAVO CARVAJAL

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

Director

CRISÓSTOMO BAJARAS FERREIRA

Ingeniero Químico M.Sc.

Codirector

ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO

Biólogo

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

2014

DEDICATORIAS

A **Dios** por ser mi fortaleza en todos los momentos de mi vida.

A mi madre **Beatriz Carvajal Bohórquez**. Cada día soy una mejor persona por tus consejos y tu amor. Te amo madre con todo mi ser. Este y todos mis triunfos son por y para ti.

A mi tía **Diosa** por ser un ejemplo para valorar cada momento de mi vida. Por ayudarme a comprender que en la vida no hay que sufrir por nada. Te quiero mucho Tía, gracias por todo tu apoyo.

A mis hermanos **Sandra y Giovanni** que estuvieron presentes a lo largo de este proceso.

A mi sobrina **Valery** que aún no ha llegado a este mundo, pero el amor que siento por ti es inmenso.

A mis grandes amigos y compañeros de estudio **Orlando, Nathalie, Carlos, Daniela, Yuli, Harli, Yaritza, Marlys, Stephanie, Esthephania, Eloísa, David, Carolina, Fernanda, Genny, Silvia, Ximena, Erika, Saily, Richard, William, Jose, Leidy, Patricia, Vannesa, Jenny e Iván**, por su apoyo, sus consejos y su ayuda he salido adelante.

Fredy Alexander Bravo Carvajal

AGRADECIMIENTOS

Solo quiero decirle a todos los de la lista que no habría ningún libro sin ellos, y les doy las gracias con todo mi corazón:

A **Dios** por darme la vida, la salud y la oportunidad de estudiar.

A mis padres **BEATRIZ Y VICTOR** por ser mi ejemplo de vida y todo mi apoyo. Los quiero mucho.

A mis tíos **DIOSELINA, ERNESTINA, ARACELY Y CARLOS** y todos mis primos por contribuir de una u otra forma en mi estudio.

A mis amigos y compañeros por su ayuda, explicaciones, apoyo y paciencia. Gracias de todo corazón.

A mi codirector **ANDRÉS BARAJAS** por su orientación, comprensión y apoyo para contribuir al buen desarrollo del presente proyecto. Al profesor **CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA** por su colaboración.

Al grupo de **investigación de Biomasa** por brindarme el apoyo para llevar a cabo este proyecto.

Por último a la **Universidad Industrial de Santander** y a los **profesores de ingeniería química** que hicieron parte de mi formación como ingeniero químico.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN.....	13
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA.....	17
1.1. Microalga y condiciones de crecimiento	17
1.2. Bioreactores.....	18
1.3. Diseño experimental.....	18
1.4. Cuantificación de la biomasa.....	19
1.5. Cuantificación de carbohidratos	20
1.6. Cuantificación de proteínas totales.....	20
1.7. Cuantificación de clorofilas	21
1.8. Cuantificación de lípidos	21
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	23
2.1. Producción de biomasa	23
2.2. Producción de metabolitos en <i>C. vulgaris</i>	24
2.2.1. Producción de carbohidratos	24
2.2.2. Producción de proteínas	25
2.2.3. Producción de clorofilas	26
2.2.4. Producción de lípidos.....	27
2.3. Análisis estadístico	29
2.3.1. Producción de carbohidratos	29
2.3.2. Producción de proteínas	31
2.3.3. Producción de clorofilas	34

2.3.4. Producción de lípidos.....	35
3. CONCLUSIONES.....	38
4. RECOMENDACIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño experimental de los cultivos de <i>C. vulgaris</i>	17
Tabla 2. Tratamientos que maximizan la producción de biomasa de <i>C. vulgaris</i> . .	24
Tabla 3. Tratamientos que maximizan la producción de carbohidratos totales.	24
Tabla 4. Tratamientos que maximizan la producción de proteínas totales.	25
Tabla 5. Tratamientos que maximizan la producción de clorofilas totales.....	26
Tabla 6. Tratamientos que maximizan la producción de lípidos totales.	28

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Metodología Experimental	19
Figura 2. Diagrama de Pareto de la extracción de carbohidratos.....	29
Figura 3. Superficie de respuesta para la producción de carbohidratos en (A) Carbonato de amonio vs Fosfato de potasio, (B) Nitrato de sodio vs Fosfato de potasio.....	30
Figura 4. Diagrama de Pareto de la extracción de proteínas	32
Figura 5. Superficie de respuesta para la producción de proteínas en (A) Carbonato de amonio vs Nitrato de sodio, (B) Nitrato de sodio vs Fosfato de potasio.....	33
Figura 6. Diagrama de Pareto de la extracción de clorofilas	34
Figura 7. Superficie de respuesta para la producción de clorofilas en (A) Nitrato de sodio vs Fosfato de potasio	35
Figura 8. Diagrama de Pareto de la extracción de lípidos.....	36
Figura 9. Superficie de respuesta para la producción de lípidos en (A) Carbonato de amonio vs Fosfato de potasio, (B) Nitrato de sodio vs Fosfato de potasio	37

RESUMEN

TÍTULO: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBONO, NITRÓGENO Y FÓSFORO EN LA OBTENCIÓN DE CARBOHIDRATOS, PROTEÍNAS, CLOROFILAS Y LÍPIDOS A PARTIR DE CULTIVOS AUTOTRÓFICOS DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

AUTOR: FREDY ALEXANDER BRAVO CARVAJAL

PALABRAS CLAVES: *Chlorella vulgaris*, proteínas, carbohidratos, lípidos, clorofilas, cultivo autotrófico.

DESCRIPCIÓN:

C. vulgaris es un microorganismo de importancia industrial por la producción de metabolitos como pigmentos, carbohidratos y proteínas de gran valor económico. En el presente estudio se determinó el efecto de la relación entre las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo en la producción de metabolitos en *Chlorella vulgaris*. Para esto se desarrollaron cultivos autotróficos durante 15 días con diferentes concentraciones de carbonato de amonio (1,074, 2,149 y 3,223mM), nitrato de sodio (0,98, 1,96 y 2,94mM) y fosfato de potasio (0,574, 1,147 y 1,721mM). De los resultados obtenidos se concluyó que el mejor cultivo para la producción de biomasa fue T₁₅ (2,149mM carbonato, 1,960mM nitrato y 2,107mM fosfato) con una producción de 2,165 g/L en el día 10 de cultivo. Para el caso de carbohidratos y clorofilas el mejor cultivo fue T₂ (1,074mM carbonato: 0,98mM nitrato: 1,721mM fosfato) con una producción de 0,82 g/L de carbohidratos (66,1%) en el día 15 y 0,094 g/L de clorofilas (7,6%) en el día 12 de cultivo. Para el caso de proteínas el mejor cultivo fue T₈ (3,223mM carbonato: 2,94mM nitrato: 0,574mM fosfato) con una producción de 0,370 g/L (34,3%) en el día 7. En cuanto a la producción de lípidos el diseño experimental propuesto no es selectivo para su producción. Por último se observa que al aumentar la concentración de nitrógeno en el medio aumenta la producción de proteínas y clorofilas y disminuye la producción de carbohidratos y lípidos. Mientras que la concentración de fosfato de sodio sólo influye significativamente la producción de clorofilas.

*Trabajo de grado

** Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director: Crisóstomo Barajas Ferreira, M.Sc. Codirector: Andrés Fernando Barajas Solano, Biólogo.

ABSTRACT

TITLE: THE EFFECT OF CARBON, NITROGEN AND PHOSPHORUS CONCENTRATION TO OBTAIN CARBOHYDRATES, PROTEINS, LIPIDS AND CHLOROPHYLLS FROM AUTOTROPHIC CULTURES OF *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

AUTHOR: FREDY ALEXANDER BRAVO CARVAJAL

KEYWORDS: *Chlorella vulgaris*, proteins, carbohydrates, lipids, chlorophylls, autotrophic culture.

DESCRIPTION:

C. vulgaris is an important industrial microorganism for the production of metabolites such as pigments, carbohydrates and proteins of great economic value. In the present study, the effect of the relationship between the sources of carbon, nitrogen and phosphorus in the production of carbohydrates, proteins, chlorophylls and total lipids in *Chlorella vulgaris* was determined. For this autotrophic cultures were grown for 15 days with different concentrations of ammonium carbonate (1,074, 2,149 and 3,223mM), sodium nitrate (0,98, 1,96 and 2,94mM) and potassium phosphate (0,574, 1,147 and 1,721mM). From the results obtained it was concluded that the best culture for biomass production was T₁₅ (2,149mM carbonate, 1,960mM nitrate and 2,107mM phosphate nitrate) with a yield of 2,165 g/L on day 10 of culture. In the case of carbohydrates and chlorophyll the best culture was T₂ (1,074mM carbonate, 0,98mM nitrate and 1,721mM phosphate) with a production of 0,82 g/L of carbohydrate (66,1%) on day 15 and 0,094 g/L of chlorophyll (7,6%) on day 12 of culture. For proteins the best culture was T₈ (3,223mM carbonate, 2,94mM nitrate and 0,574mM phosphate with production of 0,370 g/L (34%) on day 7. The proposed experimental design is not selective for the production of lipids. Finally is noted that increasing the nitrogen concentration in the medium increases the production of proteins and chlorophylls and decreases the production of carbohydrates and lipids. While the concentration of sodium phosphate only significantly affects the production of chlorophylls.

* Graduation project

** Industrial University of Santander, Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering department. Director: Crisóstomo Barajas Ferreira, M.Sc. Co-director: Andrés Fernando Barajas Solano, Biologist.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos eucarióticos fotosintéticos que pueden crecer bajo condiciones autótrofas empleando luz como fuente de energía y sustratos inorgánicos como fuentes de carbono (metabolismo fotosintético), heterótrofas empleando sustratos orgánicos como fuentes de carbono y energía (metabolismo oxidativo) y mixotróficas combinando el metabolismo fotosintético y oxidativo (Márquez *et al.* 1993, Borowitzka 1999, Chisti 2007). Tienen la ventaja de tener una velocidad de crecimiento aproximadamente 6 veces más alta que la de las plantas normales, no compiten con fuentes de alimentos ni con zonas arables y poseen la habilidad de crecer en condiciones poco comunes como aguas marinas o residuales, por tanto la producción de alimentos no se verá afectada (Scott *et al.* 2010, Chisti 2007, Heredia *et al.* 2011, Jae *et al.* 2010).

El crecimiento autotrófico proporciona ventajas al emplear la energía lumínica, nutrientes inorgánicos, recursos naturales de bajo costo como agua y CO₂ absorbido por los cloroplastos de diferentes fuentes como son la atmósfera, CO₂ en gases de descarga industrial y CO₂ de carbonatos solubles para producir diferentes metabolitos valiosos industrialmente lo que contribuye a la reducción global del CO₂ (Brennan & Owende 2010, Liang *et al.* 2009, Yanna *et al.* 2009).

Mediante el proceso de la biorefinería los metabolitos presentes en la biomasa (carbohidratos, clorofilas, proteínas, lípidos) son separados y aprovechados usando diferentes tecnologías con el fin de ser transformados por diferentes mecanismos en productos de valor agregado (González & Kafarov 2011). Entre los productos de valor agregado se encuentran suplementos alimenticios ricos en nutrientes y proteínas; pigmentos empleados como colorantes naturales en la industria de alimentos, cosméticos; en la industria farmacéutica para el tratamiento de enfermedades (Borowitzka 1999).

Además de los productos mencionados anteriormente, se pueden obtener una serie de biocombustibles renovables como: biodiesel derivado del aceite de microalgas es obtenido a partir de los lípidos (Harun *et al.* 2010), metano generado de la digestión anaeróbica de la biomasa de la microalga, biohidrógeno producido fotobiológicamente (Chisti 2007) y el bioetanol obtenido a partir de carbohidratos como la glucosa y el almidón (Rojan *et al.* 2011).

Para hacer rentable el aprovechamiento industrial mencionado anteriormente es necesario incrementar la producción de la biomasa, para obtener una mayor cantidad de metabolitos, por esto se han venido desarrollando estudios sobre el efecto de la concentración de diferentes nutrientes en el cultivo y de variables como la temperatura, entre otras (Ulloa *et al.* 2012). La composición química de la biomasa está relacionada con el diseño del medio de cultivo; donde factores como la concentración de los nutrientes presentes en el medio juegan un papel fundamental en la optimización de la producción de biomasa (Bhola *et al.* 2011). El nitrógeno constituye uno de los nutrientes que más afecta el crecimiento celular en la microalga y la producción de lípidos (Borowitzka 1999, Hu *et al.* 2008). Cambios en la concentración de nitrógeno en el medio puede incrementar la productividad en la composición de la biomasa (Sánchez *et al.* 2000), especialmente los pigmentos y proteínas. El fosfato constituyente del ATP aporta la energía para las actividades metabólicas contribuyendo con el crecimiento de la microalga, mientras que el carbono se considera un factor clave que rige el modelo de crecimiento en el mecanismo autotrófico. El nitrógeno en forma de nitrato se asimila en las células de la microalga y se emplea como fuente de nutrientes para mejorar el crecimiento (M. Prathima *et al.* 2012).

En los últimos años los estudios realizados por Dragone *et al.* (2011) en *C. vulgaris* obtuvieron un rendimiento máximo de carbohidratos del 40% empleando urea como fuente de nitrógeno y FeNa-EDTA como fuente de hierro para el medio de cultivo. Brennan & Owende (2010) obtuvieron el 55% del total de la biomasa al

disminuir la concentración de nitrógeno en el medio. Chinnasamy *et al.* (2009), reportaron un incremento en el contenido de azúcares a mayores concentraciones de acetato. Uslu *et al.* (2011) reportaron un incremento en el contenido de proteínas de la biomasa al incrementar la concentración de nitrógeno en el medio. Li *et al.* (2008) reportaron que el contenido de clorofilas en la biomasa está ligado con el acceso de las células a fuentes externas de nitrógeno. Por último Converte *et al.* (2009), Li *et al.* (2008), Widjaja *et al.* (2009) reportaron que la reducción de nitrato de sodio en el medio de crecimiento incrementa la fracción de lípidos en *C. vulgaris*.

En el grupo de transformación de biomasa de la universidad Industrial de Santander se han desarrollado estudios sobre la extracción de metabolitos presentes en *C. vulgaris*. Beleño & Villamizar (2013) realizaron la extracción de carbohidratos presentes en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 utilizando un tratamiento con una solución acidificada con clorito de sodio a una temperatura de 70 °C, relación biomasa/solvente de 1:80 g/mL, durante 4h, obteniendo hasta 0,322 g de carbohidratos/g de biomasa y rendimiento del 81%. Gutiérrez & Marmolejo (2013) realizaron la extracción de proteínas y carbohidratos utilizando un pre-tratamiento alcalino, logrando extraer cantidades altas de carbohidratos de 2,92 g/L , obteniendo un rendimiento de los carbohidratos iniciales del 41 %, a temperatura de 85°C, molaridad de 3M y relación solvente / biomasa de 45 mL/g.

A pesar que se han realizado estudios en cuanto a la determinación de metabolitos presentes en algas a partir de cultivos heterotróficos y mixotróficos, no se han realizado estudios para determinar carbohidratos, proteínas, clorofilas y lípidos modificando la concentración de los nutrientes en el medio a partir de cultivos autotróficos de *Chlorella vulgaris*. Por tanto, el objetivo de este estudio analizar el efecto de la concentración de carbono, nitrógeno y fósforo en la

obtención de carbohidratos, proteínas, clorofilas y lípidos presentes en *C. vulgaris* UTEX 1803 realizando diferentes modificaciones al medio de cultivo Bold Basal.

1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

1.1. Microalga y condiciones de crecimiento

Chlorella vulgaris UTEX 1803 fue adquirida de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA); inicialmente la cepa se cultivó en medio Bold Basal, cuya composición en mg/L de macronutrientes es: NaNO_3 (2,94), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,04 \times 10^{-1}$), NaCl ($4,28 \times 10^{-1}$), K_2HPO_4 ($4,31 \times 10^{-1}$), KH_2PO_4 (1,29), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,70 \times 10^{-1}$) y micronutrientes (mg/L) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,07 \times 10^{-2}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($7,28 \times 10^{-3}$), MoO_3 ($4,93 \times 10^{-3}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,29 \times 10^{-3}$), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,68 \times 10^{-3}$), H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-1}$), EDTA ($1,71 \times 10^{-1}$), KOH ($5,53 \times 10^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-2}$).

Esta se mantuvo en crecimiento en el medio Bold Basal (MBB) siguiendo las metodologías del manual de Algal Culture Techniques (Andersen 2005) y condiciones de temperatura de $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH} \pm 7$, sin ningún suministro complementario de CO_2 e iluminado con lámparas fluorescentes con un ciclo de luz-oscuridad 12-12 horas.

Posteriormente, se realizaron cultivos con carbonato de amonio a tres concentraciones diferentes 1,074mM, 2,149mM y 3,223mM, de igual manera se modificó la cantidad de solución de nitrato de sodio y fosfato de potasio establecidas para el medio Bold Basal, estas concentraciones fueron 0,97mM; 1,94mM y 2,94mM y 0,574mM, 1,147mM y 1,721mM respectivamente (Tabla 1). Se realizó mediciones para cada tratamiento, durante los días 0, 2, 5, 7, 10, 15 de cultivo en los que se cuantificó la producción de biomasa y metabolitos respectivamente.

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

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Carbonato Amonio(mM)	1,074	1,074	3,223	3,223	2,149	1,074	1,074	3,223
Nitrato sodio(mM)	2,94	0,98	2,94	0,98	1,96	2,94	0,98	2,94
Fosfato potasio(mM)	0,574	1,721	1,721	0,574	1,147	1,721	0,574	0,574
	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	
Carbonato Amonio(mM)	3,223	0,351	3,947	2,149	2,149	2,149	2,149	
Nitrato sodio(mM)	0,98	1,96	1,96	3,6	0,32	1,96	1,96	
Fosfato potasio(mM)	1,721	1,147	1,147	1,147	1,147	0,187	2,107	

1.2. Bioreactores

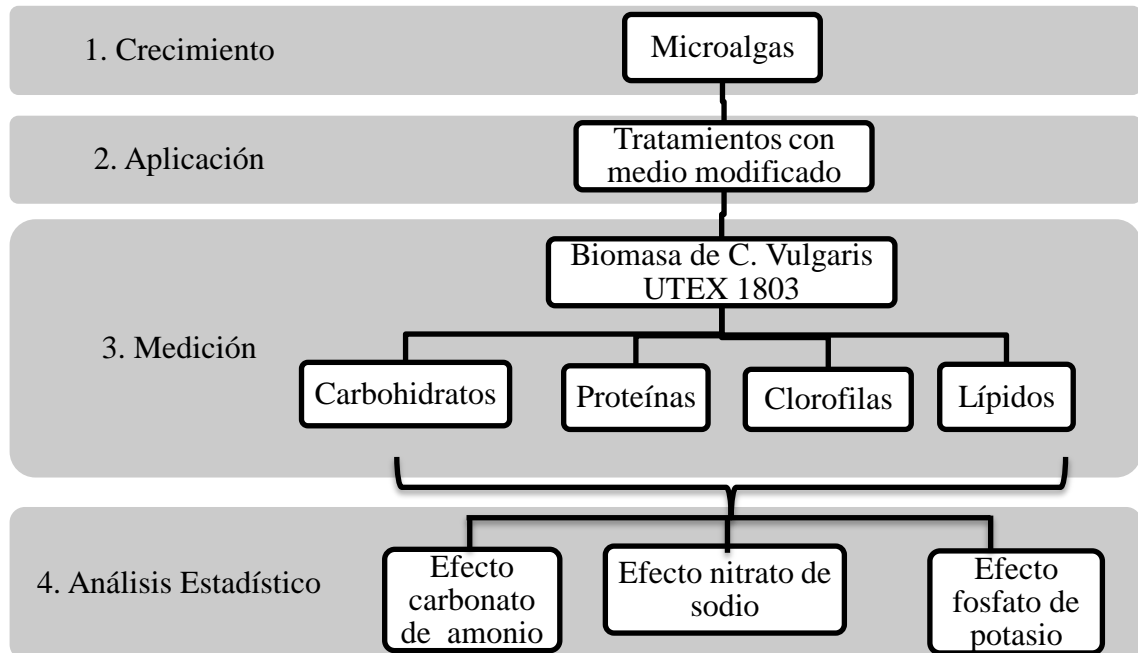
Se usaron botellas de vidrio de 2L de capacidad, con volumen de trabajo de 1L. En el extremo superior de cada uno de los reactores se encuentra un sistema de suministro de aire continuo por burbujeo (tubo-difusor) con el fin de proveer de aire los cultivos y garantizar que todas las células estén expuestas a la luz y los nutrientes del medio. Se utilizaron en total 51 reactores (original y 2 réplicas).

1.3. Diseño experimental

Se realizó el diseño experimental mediante el software STATISTICA 7 (StatSoft. Inc. 1984-2007). El diseño experimental está fundamentado en una composición central, no factorial 3^3 de 17 experimentos con dos réplicas (ver tabla 1). El objetivo del diseño experimental fue evaluar la influencia de las concentraciones de carbonato de amonio, nitrato de sodio y fosfato de potasio (variables independientes) en las productividades de proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos fotosintéticos de la biomasa (variables dependientes).

Se seleccionó el método de varianza (Anova) porque permitió analizar las diferencias y similitudes entre las variables analizadas. Posterior al Anova se realizó una prueba de comparaciones a posteriori, de Tukey, para las variables que reporten diferencias significativas en el ANOVA ($p > 0,05$).

Figura 1. Metodología Experimental



1.4. Cuantificación de la biomasa

Para cada uno de los tratamientos se tomó 5mL de muestra durante los días 0, 2, 5, 7, 10, 15 de cultivo. La concentración de biomasa se estimó por lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 500nm (densidad óptica) en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck). La densidad óptica (DO) fue correlacionada contra una curva estándar de la cantidad de biomasa (g/L) de acuerdo a la ecuación de calibración determinada a partir de la biomasa seca del laboratorio:

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

1.5. Cuantificación de carbohidratos

Se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). Se toma 1mL de cada extracto y a estos se les adicionan por separado, 0,5 mL de fenol al 5% se homogeniza la mezcla y adiciona 2,5 mL de ácido sulfúrico al 95%. Por último la concentración de carbohidratos se determina por lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300, Merck) a longitudes de onda de 480nm, 485 nm y 490nm para identificar Xilosa, Arabinosa, glucosa y Fructosa presentes en la biomasa.

1.6. Cuantificación de proteínas totales

La extracción de proteínas se desarrolló siguiendo el procedimiento empleado por Chen & Vaidyanathan (2013). En el proceso se centrifugó 10mL de la muestra a 3400 rpm durante 20 minutos, 1mL 1M de NaOH se añadió al sedimento y se extrajo a 80°C por 10 minutos con agitación ocasional. Después de enfriar y centrifugar, el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. La extracción alcalina fue repetida 3 veces. La última repetición fue calentada a 100 °C por 10 minutos para extraer completamente las proteínas. Las tres extracciones fueron combinadas y mezcladas antes del análisis.

El contenido de proteínas totales en el extracto fue estimado usando el método de proteínas por reacción de folin (Lowry *et al.* 1951). Un volumen de 1,4mL de solución Lowry (A-B-C) fue añadido junto con 1mL de la muestra obtenida a un tubo de ensaño. La mezcla se agitó por 3 minutos. Después de 20 minutos fue agregado 0,2mL del reactivo de folin en solución con agua, el cual se dejó reaccionar por 30 minutos con agitación ocasional. La concentración de proteínas en la muestra se estimó por lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300, Merck) a una longitud de onda de 750nm.

1.7. Cuantificación de clorofilas

Un volumen de 10mL de muestra de cada tratamiento se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se añadió al sedimento 3 ml de etanol al 95%. La mezcla se calentó al baño maría durante 10 minutos a 80°C. Después de enfriar se aforó hasta 5 mL con etanol al 95% y se centrifugó nuevamente a 3400 rpm durante 15 minutos para eliminar la biomasa libre de pigmento. La concentración de la clorofila a (C_a) y clorofila b (C_b) en el sobrenadante se cuantificó al usar el método espectrofotométrico propuesto por Jeffrey & Humph (1975) por lectura de la absorbancia a longitudes de onda de 645nm y 663nm en un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300, Merck). La relación de la cantidad de clorofila (a) y (b) en el sobrenadante C_a (mg/L) y C_b (mg/L) con el valor de la absorbancia fue correlacionado de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$C_a(\text{mg/L}) = 12,7 * (A_{663}) - 2,49 * (A_{645}) \quad (2)$$

$$C_b(\text{mg/L}) = 22,9 * (A_{645}) - 4,68 * (A_{663}) \quad (3)$$

1.8. Cuantificación de lípidos

La extracción de lípidos se desarrolló siguiendo el procedimiento de medición de ácidos grasos después de la saponificación empleado por Chen & Vaidyanathan (2012). En el proceso se añadió 0,1 mL de Tris - HCl (1 M, pH 8,0) en 0,05 g de biomasa y aproximadamente 250 mg de perlas de vidrio de 0,1mm (Sigma - Aldrich). Seguidamente, se añadió 2,4 mL de reactivo de saponificación (25 % de metanol en 1 M NaOH). Se realizó la ruptura celular mediante la agitación vigorosa durante 3 min. Se añadió 2,5 mL de reactivo de saponificación (25 % de metanol en 1 M NaOH) y la mezcla fue saponificada a 90 °C durante 30 minutos agitando

vigorosamente cada 5 minutos para liberar los ácidos grasos. Después de la saponificación la muestra fue enfriada a temperatura ambiente, un volumen de 3 mL de la muestra saponificada junto con 4,5 mL de una mezcla de cloroformo y metanol (2:1 v/v) se añadió a un tubo Eppendorf y se agitó por 2 minutos. La mezcla se centrifugó a 5.000 rpm durante 2 minutos. Después de centrifugar, se tomó 2,5 mL de la fase orgánica de la muestra y se transfirió a un tubo de ensayo que contenía una mezcla de reactivo de cobre, ácido acético y trietanolamina (9 vol. AQ. 1 TEA M, 1 vol. Ácido acético 1 M, 10 vol. 6,45 % w / v de Cu (NO₃) 2.3 H₂O). La mezcla fue agitada de nuevo por 2 minutos y centrifugada a 5.000 rpm durante dos minutos. Finalmente la fase orgánica fue transferida a una cubeta de cuarzo y directamente medida a 260nm en un espectrofotómetro UV/Visible.

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

2.1. Producción de biomasa

La tabla 2 sintetiza la producción de biomasa (g/L) en función de la concentración de la concentración de carbonato de sodio, nitrato de sodio y fosfato de potasio para los diferentes cultivos. La concentración inicial de la biomasa para todos los cultivos presentó una concentración uniforme de 0,2 g/L (día 0). Se observa que el tratamiento T15 con 2,149 mM de carbonato de amonio, 1,960 mM de nitrato de sodio, 2,107 mM de fosfato de potasio obtuvo la mayor producción de biomasa con una concentración de 2,165 g/L \pm 0,074 al día 10 de cultivo, que corresponde a una productividad de 0,1965 g/ (L*Día).

La producción de biomasa obtenida en este estudio resulta ser mayor a la obtenida por Yanna *et al.* (2009) donde la mayor concentración fue de 2 g/L empleando glucosa al 1% (w/v) como fuente de carbono. M. Prathima *et al.* (2012) reportaron una concentración máxima de biomasa de 1,69 g/L en un cultivo con mecanismo heterotrófico el cual combinó la modificación de carbono, fósforo y nitrógeno; también indicaron que los nitratos y los fosfatos tienen efectos positivos en el crecimiento de la microalga. Los estudios de Li *et al.* (2008) reportaron que la concentración de la biomasa se duplicó cuando el nitrógeno en el medio se agotó. En el presente estudio las mayores producciones de biomasa se observan con una concentración de 1,960 mM de nitrato de sodio. Cabe mencionar que se empleó una sola fuente de carbono para el medio de cultivo, que corresponde al carbonato de amonio para el crecimiento autotrófico. Los estudios de Liling *et al.* (2011) reportaron baja producción de biomasa cuando se emplea una única fuente de carbono. Por otro lado Yanna *et al.* (2009) reportaron indicaron baja productividad de la biomasa en el crecimiento autotrófico en comparación al heterotrófico o mixotrófico.

Tabla 2. Tratamientos que maximizan la producción de biomasa de *C. vulgaris*.

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
g/L	1,470	1,248	1,476	1,020	1,376	1,807	1,302	1,289	1,328	2,121	1,230	1,404	1,055	1,239	2,165
σ	0,085	0,012	0,001	0,078	0,191	0,763	0,165	0,005	0,181	0,902	0,068	0,059	0,086	0,244	0,074
DÍAS	12	12	15	15	15	12	12	15	12	10	15	12	15	15	10

2.2. Producción de metabolitos en *C. vulgaris*.

2.2.1. Producción de carbohidratos

La tabla 3 sintetiza los tratamientos con mayor producción de carbohidratos (g/L) en función de la concentración de carbonato, nitrato y fosfato en el medio de cultivo. La concentración inicial de carbohidratos para todos los cultivos presentó una concentración uniforme de 0,03 g/L (día 0). Se observa que el tratamiento T₂ con 1,074 mM de carbonato de amonio, 0,98 mM de nitrato de sodio y 1,721mM fosfato de potasio alcanzó la mayor producción de azúcares, obteniendo una concentración de $0,82 \pm 0,092$ g/L que corresponde al 66,1% de la biomasa en el día 15 de cultivo.

Tabla 3. Tratamientos que maximizan la producción de carbohidratos totales.

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
g/L	0,658	0,82	0,421	0,323	0,295	0,56	0,648	0,252	0,632	0,709	0,37	0,357	0,575	0,343	0,486
%	45,2	66,1	28,5	31,6	21,4	42,6	59,8	23,4	49,8	52,9	30,1	26,5	54,5	52,1	35,8
σ	0,439	0,092	0,133	0,224	0,180	0,101	0,225	0,212	0,262	0,081	0,360	0,064	0,065	0,144	0,203
Día	15	15	15	15	15	15	12	7	15	15	15	10	15	10	15

La producción de carbohidratos resulta tener mayor eficiencia a la reportada por Dragone *et al.* (2011) donde el rendimiento máximo fue de 41%, empleando urea

como fuente de nitrógeno para el medio de cultivo de *C. vulgaris*. También el rendimiento resultó ser mayor al obtenido por los experimentos realizados por Brennan & Owende (2010), que reportaron eficiencias del 55% de azúcares totales en la biomasa, lo que resulta en un incremento del 11% aproximadamente. Yanna *et al.* (2009) reportaron un porcentaje de carbohidratos del 44% empleando glucosa al 1% en el medio como fuente de carbono. Los estudios de Xin *et al.* (2010) mencionaron que la deficiencia del fósforo tiene como resultado un cese de la división celular y la síntesis de carbono es encaminada al almacenamiento de energía como carbohidratos por tal motivo su porcentaje aumenta.

2.2.2. Producción de proteínas

Durante los primeros días de cultivo algunos tratamientos presentaron baja producción debido a que las microalgas presentan cambios en la composición interna producido por la adaptación al nuevo medio de cultivo. El contenido de proteínas totales se incrementa a partir del día 2 de cultivo, obteniéndose el mayor porcentaje de proteínas al día 7 (ver tabla 4) por el tratamiento T₈ (3,223mM carbonato de amonio: 2,94mM nitrato de sodio: 0,574mM fosfato de potasio) con una concentración de proteínas totales de 0,370 ± 0,042 g/L correspondiente al 34,3% de la biomasa. La mayor producción de proteínas totales se observó en los tratamientos con concentraciones de nitrato de sodio de 2,94 mM.

Tabla 4. Tratamientos que maximizan la producción de proteínas totales.

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
g/L	0,17	0,149	0,326	0,231	0,268	0,279	0,098	0,37	0,319	0,286	0,371	0,381	0,293	0,210	0,292
%	33,8	29	33,7	22,7	24,4	21,2	20,3	34,3	25,1	30,9	31,4	33,1	32,7	24,5	32,9
σ	0,051	0,032	0,016	0,026	0,043	0,056	0,046	0,042	0,006	0,034	0,028	0,025	0,021	0,069	0,041
Día	2	2	5	15	7	15	15	7	15	5	12	7	12	5	5

El contenido de proteínas del estudio resulta ser más eficiente que la obtenida por Yanna *et al.* (2009) donde el mayor contenido de proteínas totales corresponde al 32%, empleando glucosa al 1% como fuente de carbono en el medio de cultivo. Sin embargo los estudios de Uslu *et al.* (2011) reportaron un aumento en el contenido de proteínas de 8% a 54% al aumentar la concentración de nitrógeno en el medio. Los estudios de Porras & Prada (2012) reportaron un rendimiento del (54% p/p) de la proteína en la biomasa, cultivada en medio Bol Basal al 5º día. En la tabla 4 se observa que la mayoría de tratamientos obtuvieron un contenido superior al 28% de proteínas en la biomasa al emplear un cultivo bifásico de nitrógeno con nitrato de sodio y carbonato de amonio. Los estudios realizados por Uslu *et al.* (2011) indicaron que la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo causó una reducción en el contenido de proteínas (53,5 a 5,6%). Otros autores como Bulut (2009) cultivaron medios con deficiencia de nitrógeno y fósforo, reportando el menor contenido de proteínas en *C. vulgaris* del 13,01% en el cultivo con menor concentración de nitrógeno.

2.2.3. Producción de clorofilas

En la tabla 5 se puede observar que la mayor extracción de pigmentos fue obtenida por el tratamiento T₂ con 1,074 mM de carbonato de amonio, 0,98 mM de nitrato de sodio y 1,721 mM de fosfato de potasio al día 12 de cultivo, con una concentración de 0,094 ± 0,020 g/L que corresponde al 7,6% de la biomasa de *C.vulgaris*.

Tabla 5. Tratamientos que maximizan la producción de clorofilas totales.

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
g/L	0,033	0,094	0,062	0,07	0,045	0,073	0,033	0,035	0,033	0,045	0,017	0,059	0,032	0,027	0,022
%	6,6	7,6	4,2	6,9	3,8	5,9	3,7	3,5	6,9	4,9	4,0	3,8	4,8	4,1	4,8
σ	0,011	0,020	0,012	0,017	0,013	0,010	0,015	0,007	0,005	0,005	0,002	0,011	0,008	0,012	0,001
Día	2	12	12	15	10	10	5	10	2	5	2	15	10	10	2

La producción de clorofilas en el presente estudio resulta ser más eficiente que la obtenida por Li *et al.* (2008) donde la mayor producción de clorofilas corresponde al 5,6% al día 1 de cultivo, empleando 5mM de nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. Por tanto se observa un incremento del 2% en el contenido de clorofilas en la biomasa al emplear un medio de cultivo bifásico de nitrógeno.

Li *et al.* (2008) encontraron que el contenido de clorofilas en la biomasa está ligado con el acceso de las células a fuentes externas de nitrógeno, de esta forma la célula acumula contenidos elevados de clorofila cuando el nitrógeno en el medio es abundante, pero cuando su concentración disminuye, baja la producción de pigmentos debido a que las células utilizan las clorofilas como fuente de nitrógeno intracelular.

2.2.4. Producción de lípidos

La tabla 6 sintetiza la producción de lípidos (g/L) en función de la concentración de carbonato, nitrato y fosfato en el medio de cultivo. Se observa que los tratamientos T₁₃ con 2,149mM de carbonato, 0,32mM de nitrato 1,147mM de fosfato inicial, y T₁ con 1,074mM de carbonato, 2,94mM de nitrato 0,574mM obtuvieron los mayores contenidos de concentración lipídica de los tratamientos del 0,3% y 0,28% de contenido lipídico respectivamente. Dicho porcentaje corresponde con una producción de 0,0031 g/L \pm 0,0006 (T₁₃) y 0,0041 g/L \pm 0,0003 (T₁). La producción de lípidos en el presente estudio resulta ser menos eficiente que la obtenida por Uslu *et al.* (2011) que indicaron que la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo incrementó el contenido lipídico de 5,78 a 17.05%. También es menor a la obtenida por Porras & Prada (2012) donde la mayor producción de lípidos corresponde al 32% empleando un medio de cultivo Bol Basal modificado con nitrato de sodio y glicerol. Se concluye que el diseño experimental propuesto no es selectivo para la producción de lípidos en *C. vulgaris* UTEX 1803.

El bajo porcentaje obtenido en el presente estudio puede ser atribuido a diferencias en la concentración celular de la biomasa al momento de inocular el medio de cultivo modificado (Liling *et al.* 2011), las condiciones del medio de cultivo con dos fuentes de nitrógeno en este caso el carbonato de amonio y el nitrato de sodio y a la forma en que la microalga se adapta a las condiciones de cultivo. Los estudios realizados por Yanna *et al.* (2009) reportaron el mayor contenido de lípidos del 38% bajo crecimiento autotrófico en un medio sin presencia de nitrato; también como se mencionó anteriormente indicaron baja productividad de la biomasa en el crecimiento autotrófico en comparación al heterotrófico o mixotrófico, lo que genera una muy baja productividad de lípidos en las algas.

Tabla 6. Tratamientos que maximizan la producción de lípidos totales.

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
g/L	0,0041	0,0029	0,0032	0,0020	0,0033	0,0028	0,0020	0,0030	0,0031	0,0032	0,0028	0,0035	0,0031	0,0027	0,0032
%	0,28	0,23	0,22	0,23	0,24	0,23	0,26	0,23	0,25	0,24	0,23	0,26	0,3	0,21	0,24
σ	0,0003	0,0005	0,0009	0,0001	0,0005	0,0012	0,0003	0,0002	0,0001	0,0003	0,0006	0,0003	0,0006	0,0004	0,0003
día	15	15	15	10	15	10	5	15	15	15	15	15	15	15	15

En el estudio la disminución de la concentración de nitrato de sodio en el medio un 89% en relación a los valores óptimos del medio Bold basal, incrementó el contenido de lípidos en *C. vulgaris* de 0,16 a 0,3%, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Converti *et al.* (2009), los cuales reportaron un incremento de 5.90 a 16.41% del contenido de lípidos al limitar el nitrato de sodio el 75 % en relación a la concentración del tratamiento de control.

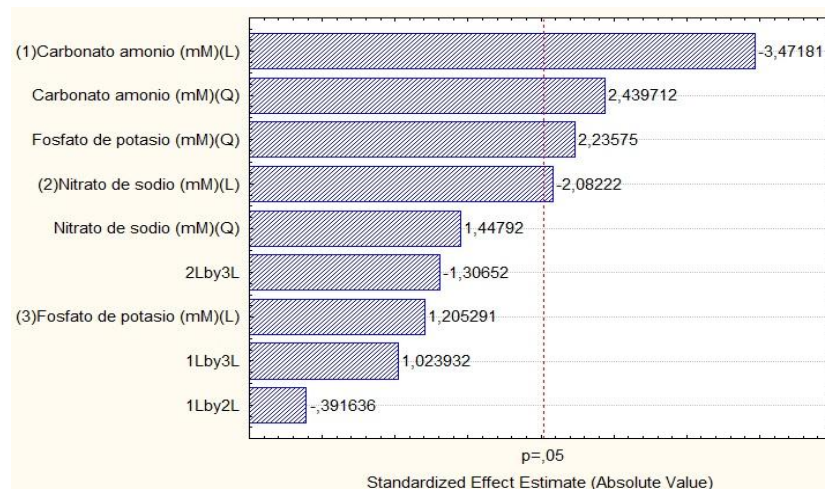
2.3. Análisis estadístico

Por medio del diagrama de Pareto se determinó la influencia positiva o negativa de las concentraciones de carbonato de amonio, nitrato de sodio, fosfato de potasio en la producción de carbohidratos, proteínas, clorofilas, y lípidos totales en la biomasa.

2.3.1. Producción de carbohidratos

En el diagrama de Pareto en la producción de carbohidratos (figura 2) se puede observar que las variables que ejercen un efecto positivo en la producción de azúcares en la biomasa fueron las concentraciones de carbonato de amonio y nitrato de sodio.

Figura 2. Diagrama de Pareto de la extracción de carbohidratos

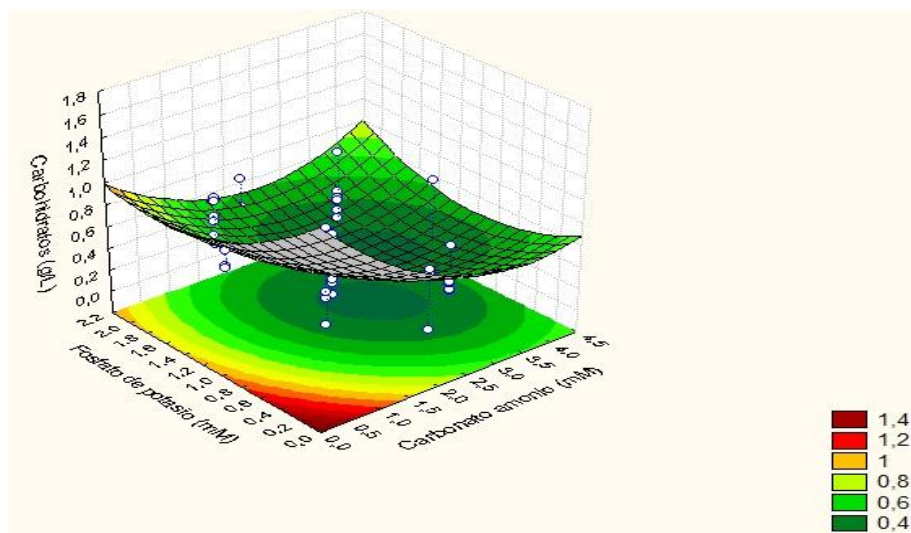


En la Fig. 2, la presencia o ausencia de fosfato de potasio no causan una diferencia significativa. Por otro lado las interacciones nitrato – fosfato, carbonato – nitrato y carbonato – fosfato no representan una influencia positiva en su producción.

Las Fig. 3A y 3B (superficie de respuesta) permite observar que la concentración de carbonato de amonio y nitrato de sodio (fuentes de nitrógeno) en el medio de cultivo son inversamente proporcionales a la producción de azucares totales en la biomasa. Estos resultados son similares a los obtenidos por D'Souza & Kelly (2000) donde el aumento en el contenido de carbohidratos está relacionado con la disminución en el contenido de nitrógeno en el medio de cultivo. No se toma en cuenta el efecto del fosfato de potasio porque como se mencionó en el análisis de Pareto su concentración en el medio no afecta la producción de azucares.

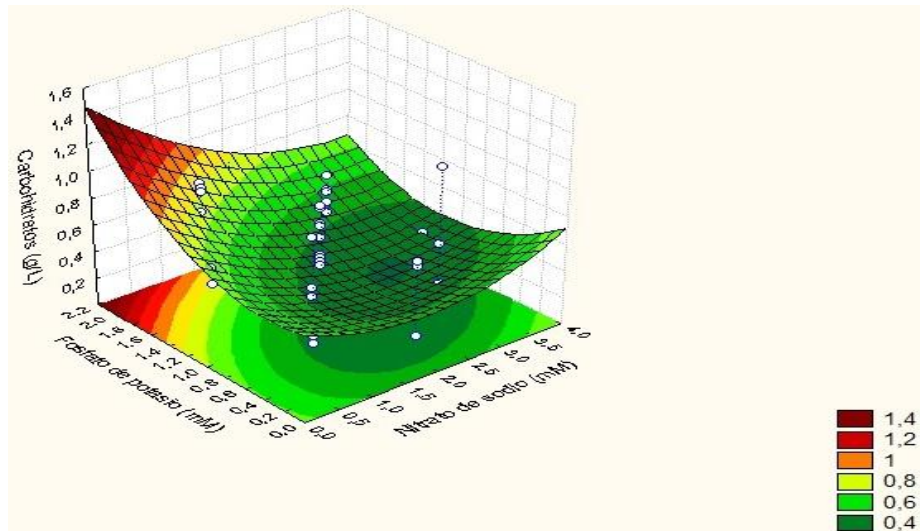
Figura 3. Superficie de respuesta para la producción de carbohidratos en (A) Carbonato de amonio vs Fosfato de potasio, (B) Nitrato de sodio vs Fosfato de potasio

(A)



Como se muestra en la Fig. 3A, la máxima concentración de azúcares producidos fue 1,4 g/L a concentraciones de 0,351 mM de carbonato de amonio, 0,187 mM de fosfato de potasio y 3,6 mM de nitrato de sodio.

(B)



En la Fig. 3B, la máxima concentración fue 1,4 g/L a concentraciones de 0,32 mM de nitrato de sodio, 2,107 mM de fosfato de potasio y 3,947 mM de carbonato de amonio.

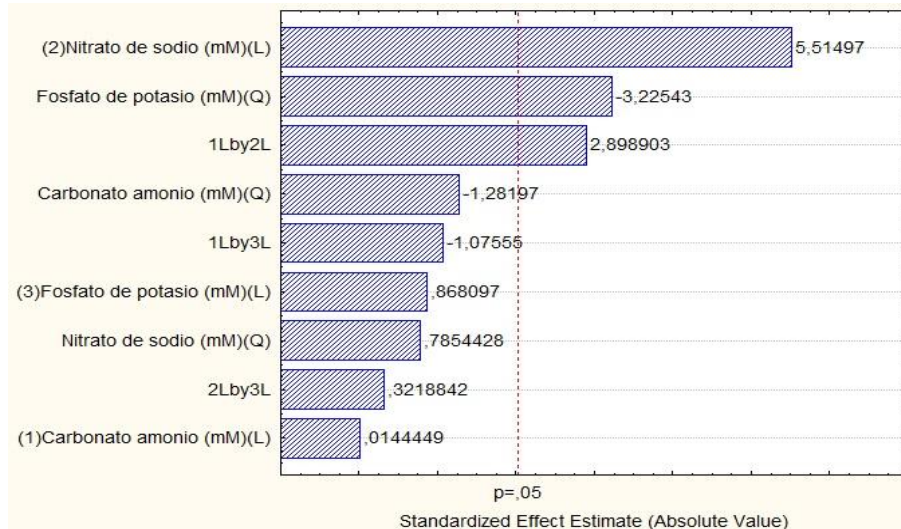
2.3.2. Producción de proteínas

En el diagrama de Pareto en la producción de proteínas (figura 4) se observa que la concentración de nitrato de sodio y la interacción entre la concentración nitrato de sodio – carbonato de amonio en el medio de cultivo de *C. vulgaris* ejercen una influencia significativa en la producción de proteínas.

La Fig. 5A Y 5B permite observar que la concentración de carbonato de amonio y nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo son directamente proporcionales a la producción de proteínas totales en la biomasa. Esta observación concuerda con los estudios realizados por Converti *et al.* (2009)

y Ördög *et al.* (2011) que reportaron un incremento en la concentración de proteínas los días con mayor reserva de nitrógeno, pero cuando el nitrógeno se convierte en un limitante, sus concentraciones disminuyeron debido a la disminución de la síntesis de proteínas.

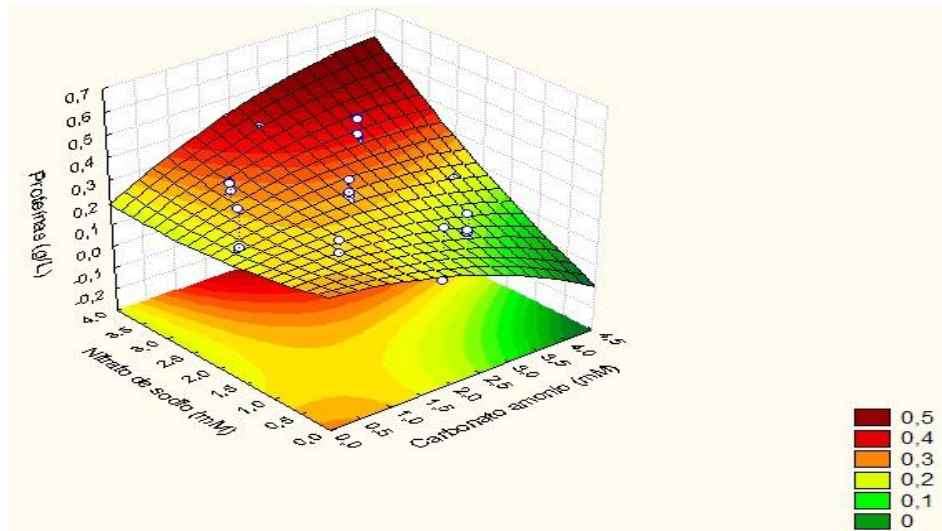
Figura 4. Diagrama de Pareto de la extracción de proteínas



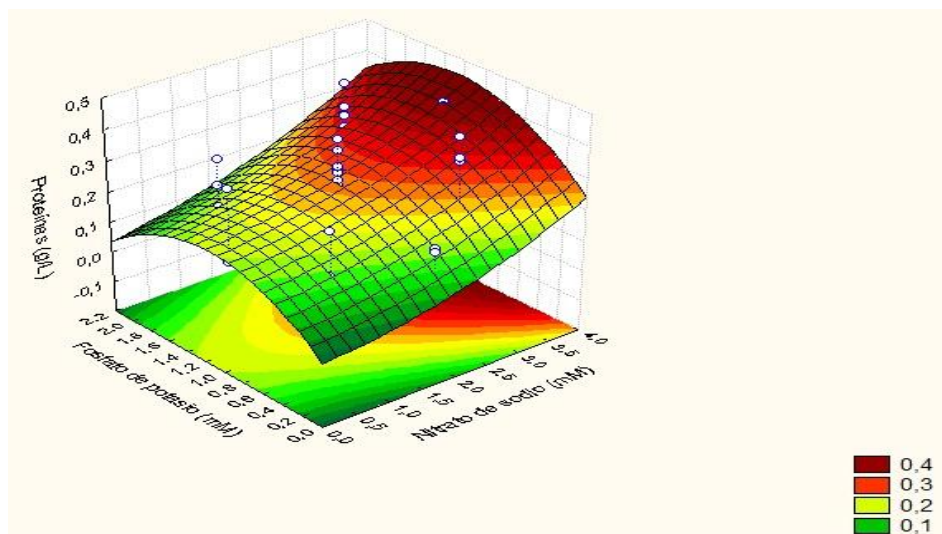
En el presente estudio no se toma en cuenta el efecto del fosfato de potasio en la producción de proteínas porque como se mencionó en el análisis de Pareto su concentración en el medio no afecta dicha producción. En la figura 5A la mayor concentración de proteínas producidas fue 0,5 g/L con concentraciones de 3,947 mM de carbonato de amonio, 3,6 mM de nitrato de sodio y 1,147 mM de fosfato de potasio. En la Fig. 5B la mayor concentración de proteínas producidas fue 0,4 g/L con concentraciones de 3,6 mM de nitrato de sodio, 2,107 mM de fosfato de potasio y 2,149 mM de carbonato de amonio.

Figura 5. Superficie de respuesta para la producción de proteínas en (A) Carbonato de amonio vs Nitrato de sodio, (B) Nitrato de sodio vs Fosfato de potasio

(A)



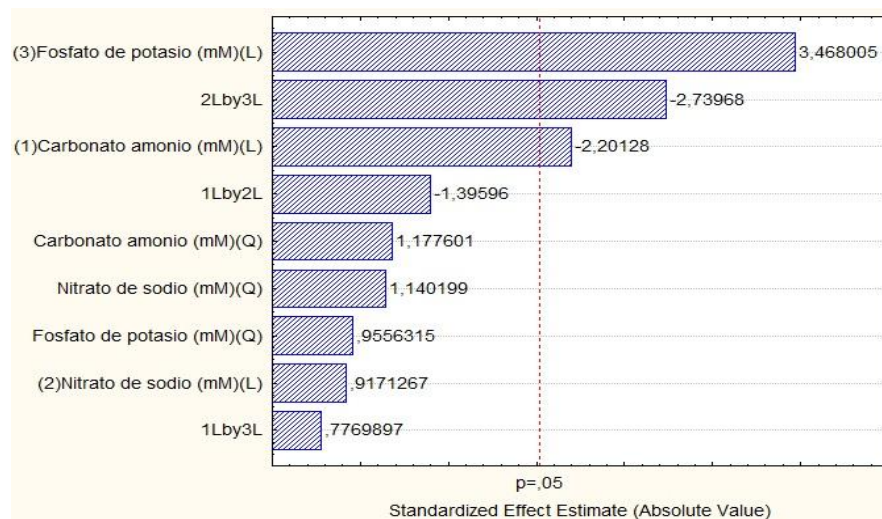
(B)



2.3.3. Producción de clorofilas

Se observa en el diagrama de Pareto (figura 6) que las variables que ejercen un efecto positivo en la producción de clorofilas fueron las concentraciones de fosfato de potasio y carbonato de amonio, así como la interacción fosfato de potasio – nitrato de sodio. En el diagrama se observa que la concentración del carbonato de amonio tiene símbolo menos, es decir al disminuir su concentración, aumenta la producción de clorofilas. Por otro lado las interacciones carbonato – nitrato y carbonato - fosfato no representan una influencia positiva en mayores porcentajes de producción de clorofilas en la biomasa.

Figura 6. Diagrama de Pareto de la extracción de clorofilas

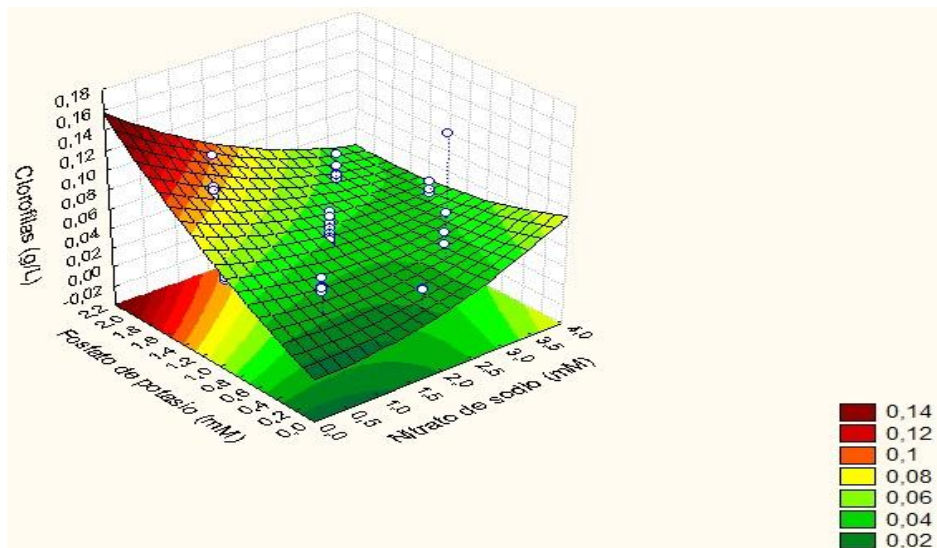


La superficie de respuesta Fig. 7A permite observar que la concentración de fosfato de sodio como fuente de fósforo en el medio de cultivo es directamente proporcional a la producción de clorofilas totales en la biomasa. Estadísticamente la máxima concentración de clorofilas en la Fig. 7A fue 0,14 g/L con concentraciones de 0,32 mM de nitrato de sodio, 2,107 mM de fosfato de potasio y 3,947 mM de carbonato de amonio. Según los estudios de Li *et al.* (2008) y Uslu *et*

al. (2011) observaron que al incrementar la concentración de nitrógeno en el medio, aumenta el contenido de clorofila en la biomasa.

Figura 7. Superficie de respuesta para la producción de clorofilas en (A) Nitrato de sodio vs Fosfato de potasio

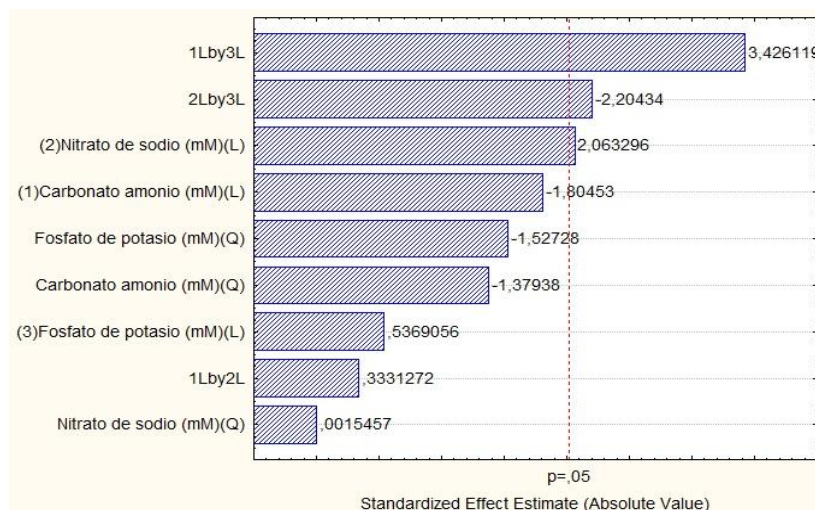
(A)



2.3.4. Producción de lípidos

En el diagrama de Pareto en la producción de lípidos (figura 8) se puede observar que las variables que ejercen una influencia significativa en la producción de azúcares en la biomasa fueron las interacciones carbonato de amonio – fosfato de potasio, nitrato de sodio – fosfato de potasio y la concentración de nitrato de sodio.

Figura 8. Diagrama de Pareto de la extracción de lípidos

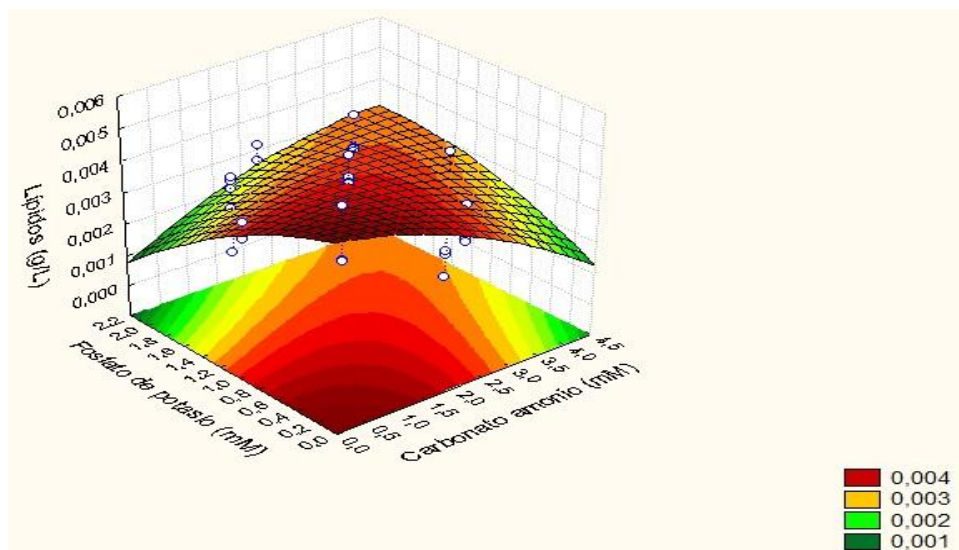


La superficie de respuesta de la Fig. 9A y 9B permite observar que la concentración de fosfato de sodio como fuente de fósforo es inversamente proporcional a la producción de lípidos. En la fig. 9A se observa que la concentración de carbonato de amonio como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo es inversamente proporcional a la producción de lípidos totales en la biomasa. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos por Converti *et al.* (2009), Li *et al.* (2008) y Widjaja *et al.* (2009) que reportaron disminución de la actividad enzimática e incrementos en la fracción de lípidos en *C. vulgaris* al reducir el contenido de nitrógeno en el medio. La máxima concentración de lípidos (fig. 9A) fue 0,004 g/L con concentraciones de 0,351mM de carbonato de amonio, 0,187mM de fosfato de potasio y 3,6mM de nitrato de sodio.

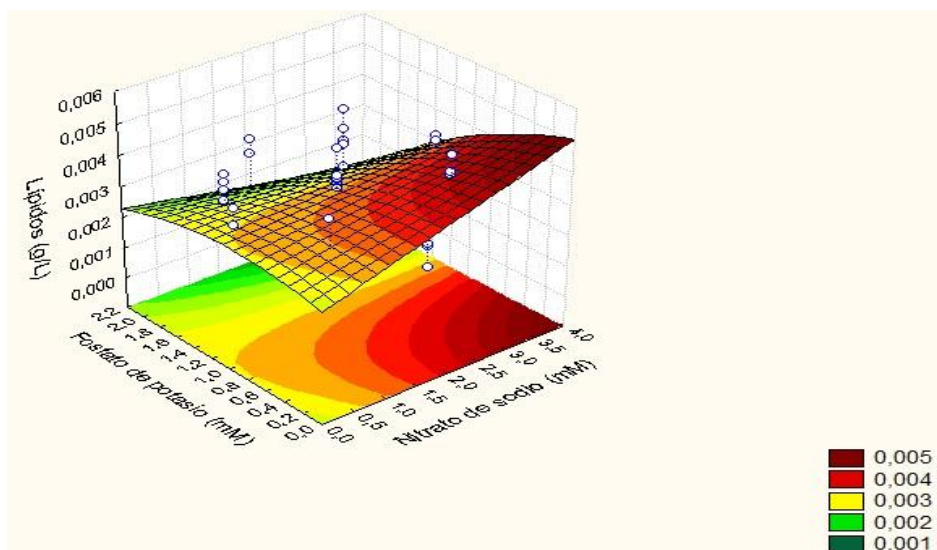
La superficie de respuesta de la Fig. 9B permite observar que la concentración de nitrato de sodio como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo tiene una relación directa con dicha producción. La máxima concentración de lípidos (Fig. 9B) fue 0,005 g/L con concentraciones de 3,6 mM de nitrato de sodio, 0,187 mM de fosfato de potasio y 0,351 mM de carbonato de amonio.

Figura 9. Superficie de respuesta para la producción de lípidos en (A) Carbonato de amonio vs Fosfato de potasio, (B) Nitrato de sodio vs Fosfato de potasio

(A)



(B)



3. CONCLUSIONES

- Bajas concentraciones de nitrógeno y carbono en el medio de cultivo favorecieron la producción de carbohidratos y lípidos totales. El mayor contenido de carbohidratos del 61% de la biomasa se obtuvo en el día 15 de cultivo con una concentración de 1,074 mM de carbonato de amonio, 0,98 mM de nitrato de sodio y 1,721 mM de fosfato de potasio. Por otro lado el diseño experimental propuesto no es selectivo en la producción de lípidos.
- Altas concentraciones de nitrógeno y carbono en el medio de cultivo favorecieron la producción de proteínas totales. El mayor contenido de proteínas del 34% en la biomasa se obtuvo en el día 7 de cultivo con una concentración de 3,223 mM de carbonato de amonio, 2,94 mM de nitrato de sodio y 0,574 mM de fosfato.
- Altas concentraciones de fósforo en el medio de cultivo favorecieron la producción de clorofilas totales. El mayor contenido de clorofilas del 8% en la biomasa se obtuvo en el día 12 de cultivo con una concentración de 1,074 mM de carbonato de amonio, 0,98 mM de nitrato de sodio y 1,721 mM de fosfato de potasio.
- El fosfato de potasio como fuente de fósforo no mostró una influencia significativa en la producción de carbohidratos y proteínas en la biomasa de *C. vulgaris* UTEX 1803.

4. RECOMENDACIONES

- Se sugiere determinar las concentraciones de carbohidratos y proteínas empleando otro tipo de fosfato en el medio de cultivo para ver cómo afecta su producción, ya que se observó estadísticamente que la concentración de fosfato de sodio no afectó de forma positiva la producción de dichos metabolitos.

BIBLIOGRAFÍA

Andersen, R. A. (2005). Algal Culturing Techniques. Academic Press.

Beleño , S., & Villamizar, J. (2013). MEJORAMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS PRESENTES EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 UTILIZANDO UNA SOLUCIÓN ACIDIFICADA DE CLORITO DE SODIO. Bucaramanga: Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de ingenierías físicoquímicas.

Bhola, V., Desikan, R., Santosh, S. K., Subburamu, K., Sanniyasi, E., & Bux, F. (2011). Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 111, 377-382.

Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology, 70, 1-3:313-321.

Brennan, L., & Owende , P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14, 558-573.

Bulut, Y. (2009). The investigations on the possibility of increase lipid content of *Chlorella* (Master Thesis). Cukurova Univ., Institute of science and technology, Biotechnology Department, 62 p. Turkey.

Chen, Y., & Vaidyanathan, S. (2012). A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids. *Analytica Chimica Acta*, 724, 67–72.

Chen, Y., & Vaidyanathan, S. (2013). Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids. *Analytica Chimica Acta*, 776, 31-40.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.

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

Dragone , G., Fernandes, B., Abreu, A., Vicente, A., & Texeira, J. (2011). Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, 88, 3331–3335.

D'Souza, F, & Kelly, G. . (2000). Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae . *Aquaculture*, 181, 311-329.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem*, 28 (3), 350-356.

González , A., & Kafarov, V. (2011). Microalgae based biorefinery: Issues to consider. *Ciencia, Tecnología y Futuro*, 4, 5-22.

Gutierrez, D., & Marmolejo, C. (2013). Diseño de un sistema de dos etapas para la extracción de proteínas de microalgas. Bucaramanga: Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de ingenierías físicoquímicas.

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

Jeffrey, S.W. & Humphrey. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a1, b1, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz*, 167, 191-194.

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

Liling, J., Shengjun, L., Xiaolei, F., Zhiman , Y., & Rongbo , G. (2011). Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Applied Energy*, 88, 3336–3341.

Lowry, O.H., Rosenbrough,N.J., N.J., Fair, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.

M. Prathima Devi, G. V. (2012). Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*, 43, 276-283.

Ördög, V., W.A. Stirk, P. Balint, J. van Staden & C. Lovasz. (2011). Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J. Appl. Phycol*, 24, 907-914.

Porras , T., & Prada, C. (2012). Efecto del tiempo de cultivo en la productividad de metabolitos de valor agregado en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander-Libro de tesis.

Prathima Devi, M., Venkata Subhash , G., & Venkata Mohan, S. (2012). Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*, 43, 276-283.

Rojan, J., Anisha, G., Nampoothiri, M., & Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102, 186-193.

Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea Smith, D. J., & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 277-286.

Ulloa, G. O. (2012). Effect of Mg, Si and Sr on growth and antioxidant activity of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1229-1236.

Uslu, L., Isik, O., Koç, k., & Göksan , T. (2011). The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. *African Journal of Biotechnology*, 10, 386-389.

Widjaja, A., Chien, C. & Ju, Y. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40, 13-20.

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G. & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101 (14), 5494-5500.

Yanna , L., Nicolas , S., & Yi , C. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett*, 31, 1043–1049.