

**EFFECTO DEL GLICEROL RESIDUAL EN LA DEPOSICIÓN DE LÍPIDOS Y
CARBOHIDRATOS EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 COMO MATERIA PRIMA
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA
GENERACIÓN**

**VANESSA EDITH BLANCO SUÁREZ
SUSAN STEPHANY VILLAMIZAR SÁNCHEZ**

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

2014

**EFFECTO DEL GLICEROL RESIDUAL EN LA DEPOSICIÓN DE LÍPIDOS Y
CARBOHIDRATOS EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 COMO MATERIA PRIMA
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA
GENERACIÓN**

**VANESSA EDITH BLANCO SUÁREZ
SUSAN STEPHANY VILLAMIZAR SÁNCHEZ**

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

Director

**CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA
Ingeniero Químico, M.Sc.**

Codirector

**ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO
Biólogo**

**ANA MARÍA ARDILA ALVAREZ
Ingeniero Químico**

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

2014

AGRADECIMIENTOS

Al Ingeniero Crisóstomo Barajas, por la oportunidad de trabajar en el grupo de investigación CIDES y por su respaldo como directores del proyecto.

Al biólogo Andrés Barajas, por su apoyo y guía durante la realización de este trabajo.

A la ingeniera Ana María Ardila Álvarez por el tiempo dedicado y su apoyo incondicional en el laboratorio.

A la química, M. Sc., Ángela María Vásquez Cardeño por su disposición, apoyo y enseñanza en la utilización del equipo para cromatografía líquida de alta eficacia.

A la universidad Industrial de Santander, especialmente a la escuela de Ingeniería química y su cuerpo docente, por hacer parte activa en el proceso de formación como profesionales íntegros.

DEDICATORIA

A Dios, pues es un perfecto cumplidor de sueños

A mis padres, hermanas, sobrinos y cuñado pues han sido mi principal motor e infaltables promotores de mi futuro

A cada persona que durante el trayecto de esta etapa ha sido inspiración, aportando a mi crecimiento integral, pues hacen parte de lo que soy y seré.

Vanessa Edith Blanco Suarez

DEDICATORIA

A mi madre, a quien amo hasta donde las palabras no pueden describir; por sus innumerables esfuerzos y sacrificios; por no dejarme desfallecer en los momentos más difíciles de esta etapa de mi vida; por convertirse en mi mayor ejemplo y motivación; por enseñarme el valor del trabajo duro.

A mi Alejandrino, el ángel guardián de mi vida; por su apoyo incondicional, por su sincera amistad; por su tierno amor; por sus enseñanzas idiomáticas y por acompañarme con paciencia y cariño en todos los avatares de esta carrera.

Susan Villamizar Sánchez

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|-------------|
| INTRODUCCIÓN | 16 |
| 1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA | 19 |
| 1.1 DISEÑO EXPERIMENTAL | 20 |
| 1.2 METODOLOGÍA DE CULTIVO | 21 |
| 1.2.1 Etapa de inoculación | 21 |
| 1.3 ETAPA EXPERIMENTAL | 22 |
| 1.3.1 Cuantificación de biomasa | 23 |
| 1.3.2 Cuantificación carbohidratos | 23 |
| 1.3.3 Cuantificación de lípidos | 23 |
| 1.3.4 Cuantificación de proteínas | 24 |
| 1.3.5 Consumo de glicerol | 25 |
| 1.3.6 Consumo de nitrógeno | 25 |
| 1.3.7 Consumo de fósforo | 26 |
| 2. RESULTADOS Y ANÁLISIS | 27 |
| 2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 27 |
| 2.1.1 Concentración de carbohidratos | 27 |
| 2.1.2 Concentración de proteínas | 29 |
| 2.2 CONSUMO DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y CARBONO | 31 |
| 3. CONCLUSIONES | 37 |
| 4. RECOMENDACIONES | 38 |
| BIBLIOGRAFÍA | 39 |
| ANEXOS | 44 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Figura 1. Metodología desarrollada. | 19 |
| Figura 2. Diagrama de Pareto para carbohidratos en el día 12. | 28 |
| Figura 3. Superficie de respuesta para la concentración de carbohidratos [g/L], glicerol [% v/v] vs fuente de nitrógeno [g/L] para el día 12. | 29 |
| Figura 4. Diagrama de Pareto para proteínas en el día 12. | 30 |
| Figura 5. Superficie de respuesta para la obtención de proteínas, fuente de nitrógeno [g/L] vs glicerol [%v/v] para el día 12. | 31 |
| Figura 6. Consumo fuente de nitrógeno a), fósforo b) y Glicerol c) Vs producción carbohidratos [%], tratamiento 3. | 32 |
| Figura 7. Consumo fuente de nitrógeno a), fósforo b) y Glicerol c) Vs producción lípidos [%], tratamiento 15. | 33 |
| Figura 8. Consumo fuente de nitrógeno a), fósforo b) y Glicerol c) Vs producción proteínas [%], tratamiento 9. | 35 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Tabla 1. Diseño de experimentos. | 20 |
| Tabla 2. Medio de cultivo. | 22 |
| Tabla 3. Comparación mejores tratamientos día 12 para carbohidratos. | 28 |
| Tabla 4. Comparación mejores tratamientos día 12 para proteínas. | 31 |
| Tabla 5. Producción porcentual carbohidratos respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento | 32 |
| Tabla 6. Producción porcentual lípidos respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento | 33 |
| Tabla 7. Producción porcentual proteínas respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento | 34 |
| Tabla 8. Resumen mejores tratamientos y control, producción carbohidratos, proteínas y lípidos, para el mejor día de experimentación (día 12) | 36 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|---|-------------|
| ANEXO A. Curva de calibración glicerol – Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) | 44 |
| ANEXO B. Caracterización glicerol residual obtenida a escala laboratorio (Estévez et al., 2013) | 45 |
| ANEXO C. Tiempo de retención glicerol, según cromatograma obtenido usando columna Aminex HPX-87H. | 46 |
| ANEXO D. Algunas Imágenes cultivo <i>C. vulgaris</i> , etapa experimental | 47 |

RESUMEN

TÍTULO: EFECTO DEL GLICEROL RESIDUAL EN LA DEPOSICIÓN DE LÍPIDOS Y CARBOHIDRATOS EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA GENERACIÓN*

AUTORES: VANESSA EDITH BLANCO SUÁREZ**
SUSAN STEPHANY VILLAMIZAR SÁNCHEZ

PALABRAS CLAVES: *Chlorella vulgaris*, glicerol, nitrógeno, fósforo, proteínas, carbohidratos, lípidos, inmovilización.

El objetivo del presente estudio es investigar la influencia del glicerol crudo como fuente de carbono (1, 3 y 5 % v/v) con modificaciones iniciales en la fuente de fósforo y nitrógeno sobre la producción de metabolitos (carbohidratos, proteínas y lípidos) en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. Además, se ha utilizado la técnica de inmovilización pasiva como parte de una estrategia de adaptabilidad de la microalga al sustrato, así como para aumentar la concentración de biomasa y facilitar la extracción de la misma.

Se encontró, a través del análisis estadístico, que las mejores condiciones para la acumulación de carbohidratos se logra con una concentración inicial de 5% [v/v] de glicerol, y con una concentración inicial alta en la fuente de nitrógeno de 0,37 [g/L], mientras que para la obtención de mayores cantidades de lípidos es necesaria una concentración inicial de glicerol del 3% [v/v] y una limitación severa en la fuente de nitrógeno de 0,04 [g/L].

En cuanto al mejor tratamiento para las proteínas, éste se logra con una concentración inicial de glicerol del 5% [v/v], no obstante, para que esto ocurra, es indispensable que no existan limitaciones en los nutrientes, por lo cual se deben usar las más altas concentraciones iniciales de nitrógeno y fósforo, correspondientes a 0,37 [g/L].

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: M. Sc. Crisóstomo Barajas. Codirector: Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano, Ingeniero Químico. Ana María Ardila Álvarez

ABSTRACT

TÍTULO: THE EFFECT OF RESIDUAL GLYCEROL IN LIPID AND CARBOHYDRATE DEPOSITION IN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 AS RAW MATERIAL IN THIRD-GENERATION BIOFUEL PRODUCTION

AUTHORS: VANESSA EDITH BLANCO SUÁREZ**
SUSAN STEPHANY VILLAMIZAR SÁNCHEZ

KEYWORDS: *Chlorella vulgaris*, glycerol, nitrogen, phosphorus, proteins, carbohydrates, lipids, immobilization.

The aim of the present study is to do some research about the influence of crude glycerol as a carbone source (1, 3 and 5 % v/v), considering modifying the initial conditions in the phosphorus and nitrogen source, on the metabolite production (carbohydrates, proteins and lipids) in *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. Furthermore, the passive immobilization technique as part of a microalgae adaptability strategy to the given substrate has been used. Besides, the same technique has also been used to increase the biomass concentration and facilitate its extraction.

It was found, by using statistical analysis, that the best conditions for carbohydrate accumulation are achieved with a 5% [v/v] glycerol initial concentration, added to a high initial concentration in the nitrogen source of 0,37 [g/L], while, for obtaining higher amounts of lipids, a 3% [v/v] glycerol initial concentration is absolutely necessary, together with a severe limitation in the nitrogen source of 0,04 [g/L].

As for the best protein treatment, this one is only achieved with a 5% [v/v] glycerol initial concentration. However, for this to happen, it is essential the non-existence of nutrient limitations, so the highest nitrogen and phosphorus initial concentrations must always be used, corresponding to 0,37 [g/L], in this particular case.

* Graduation project

** Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department. Director: M. Sc. Crisóstomo Barajas. Co-director: Biologist. Andrés Fernando Barajas Solano, Chemical Engineer. Ana María Ardila Álvarez

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, se ha presentado un significativo interés por la producción de combustibles a partir de recursos renovables, mejor conocidos como “biocombustibles”. Esto se debe, principalmente, a la creciente preocupación con relación al calentamiento global y al cambio climático, a la disminución de las reservas del crudo y al aumento sostenido de la demanda de combustibles (Yang *et al.*, 2012).

Como una de las alternativas más viables para dar solución a dichos problemas se presenta la producción de Biodiésel. Sin embargo, durante este proceso, el glicerol surge como un subproducto impuro (Pyle, 2008), generado en grandes cantidades, aproximadamente de un 10% (p/p) (Fan *et al.*, 2010), lo que correspondería a 46,415 toneladas en el mercado colombiano para el año 2013 (Federación Nacional de Biocombustibles en Colombia, 2013). Dicha producción generó una sobreoferta, lo que promovió una disminución considerable en su precio. Por todo esto, se hace necesario que dicho glicerol se utilice como materia prima y sea transformado en productos de alto valor agregado (Johnson, 2007). Bajo este escenario, diversos estudios han sido realizados logrando generarse propuestas para aprovechar este exceso de glicerol (Pyle, 2008), entre ellas: combustión (Johnson & Taconi, 2007), compostaje y alimentación animal (Cerrate *et al.*, 2006), conversiones termoquímicas (Alhanash *et al.*, 2008), métodos de conversiones biológicas que permiten transformar el glicerol en ácidos orgánicos tales como ácido láctico, succínico y acético, alcoholes como etanol, y además como fuente de carbono en cultivos microalgales para generar productos de alto valor lipídico que luego pueden ser convertidos en biocombustibles (Chen *et al.*, 2011), esta última beneficiando directamente al medio ambiente, promoviendo el uso del biodiésel y reduciendo la dependencia del petróleo.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos procariotas o eucariotas que producen carbohidratos, proteínas y lípidos como resultado de la fotosíntesis.

Pueden crecer rápidamente y vivir en condiciones muy duras (Bahadar *et al.*, 2013). Estos organismos fotosintéticos han sido utilizados para producir alimentos de alto valor nutricional, en cosméticos, en la acuicultura, biocombustibles e industria farmacéutica, recibiendo en las últimas décadas una considerable atención (Borowitzka *et al.*, 1988). El particular interés de éstas en la producción de biocombustibles se basa en el potencial productivo de las mismas, es decir, teniendo en cuenta la considerable acumulación de lípidos que alcanzan algunas microalgas (Alvarez & Steinbüchel, 2002; Bröker *et al.*, 2009; Chisti, 2007; Metzger & Largeau, 2005). Otras ventajas de las microalgas son su capacidad para ser cultivadas en agua de mar, en terrenos no aptos para la agricultura, con lo que no se afectaría la seguridad alimentaria, además requieren de grandes cantidades de CO₂ por lo cual pueden captar los gases de combustión emitidos por las instalaciones industriales (Hu *et al.* 2008).

La microalga *Chorella vulgaris* ha sido investigada bajo condiciones de crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico, encontrándose la mayor productividad de lípidos en condiciones mixotróficas (Liang *et al.*, 2009). Existe una gran variedad de fuentes de carbono usadas en el estudio de cultivos mixotróficos (Estévez *et al.*, 2013), entre ellas: acetato, glicerol, etanol, ácidos orgánicos, azúcares, almidón de yuca y maíz hidrolizado y subproductos de procesos industriales como alpechín (Loera Quezada & Olgún, 2010).

Estudios realizados anteriormente en el Laboratorio de Biomasa de la Universidad Industrial de Santander (Pestana *et al.*, 2012; Estévez *et al.*, 2013) confirman la viabilidad de la utilización de glicerol pre-tratado (libre de jabones y

metales) como fuente de carbono en cultivos con *C.vulgaris*, así como la influencia positiva de la variabilidad en fuentes de nitrógeno.

Con el ánimo de avanzar en este campo se busca, entonces, utilizar el glicerol residual de la producción de biodiesel directamente sin pre-tratamiento. La inmovilización pasiva se presenta como la técnica más idónea para abordar el presente estudio ya que, en comparación con la tecnología de microorganismos suspendidos, la inmovilización celular aumenta la resistencia de los cultivos a productos químicos tóxicos (Silveira *et al.*, 2013), además de facilitar la extracción de biomasa y metabolitos debido al pequeño tamaño celular que dificulta el empleo de estos microorganismos (Moreno-Garrido, 2007).

La selección del soporte es una de las decisiones cruciales que se deben tomar en el curso de la preparación del proceso de inmovilización (Zacheus *et al.*, 2000). Los materiales de soporte deben cumplir con los siguientes criterios: ser insolubles, no biodegradables, no tóxicos, de bajo peso, flexibles, tener alta estabilidad mecánica y química y, preferentemente, tener un bajo costo (Leenen *et al.*, 1996).

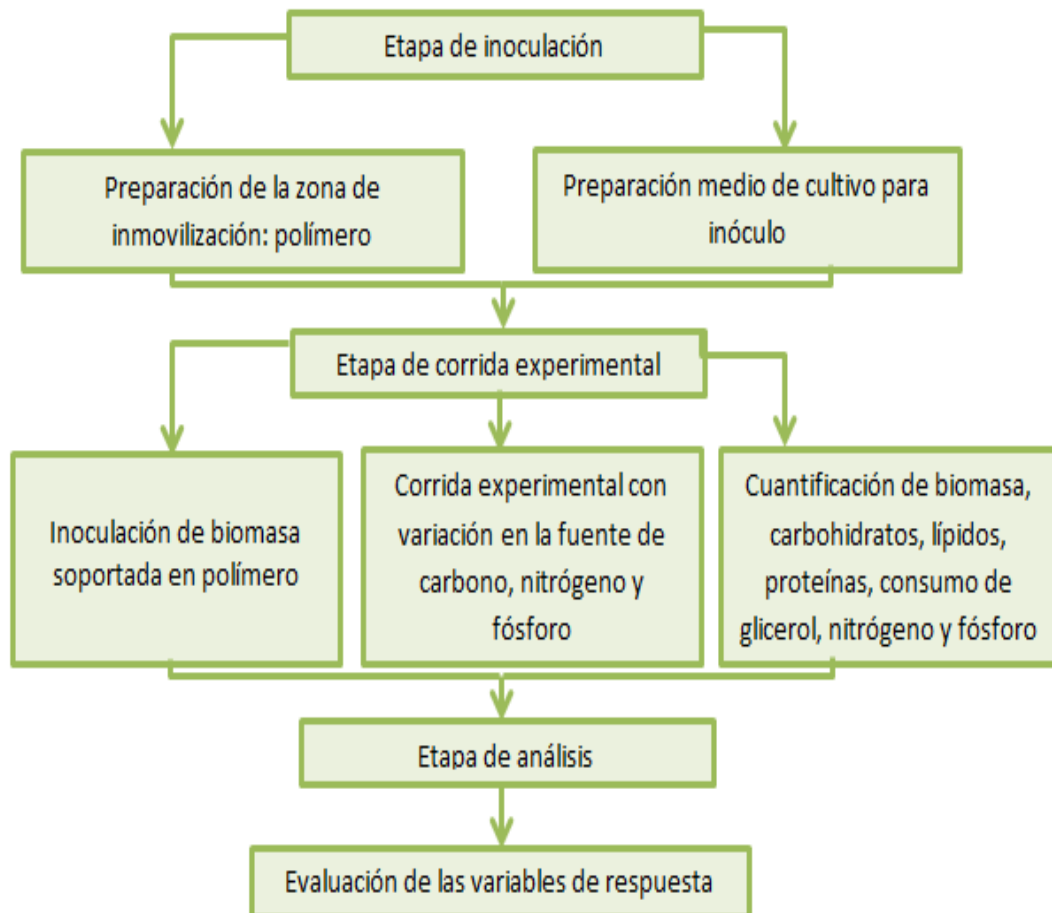
Las espumas de poliuretano son excelentes candidatos, ya que existen referencias y estudios previos que apoyan su aplicabilidad en los campos bioquímicos y biotecnológicos, además de cumplir con todos los requerimientos anteriormente mencionados (Patil *et al.*, 2006).

Se plantea, entonces, para este nuevo estudio, evaluar la productividad de proteínas, lípidos y carbohidratos totales, así como la acumulación de biomasa en cultivos mixotróficos inmovilizados, soportados en espuma de poliuretano, con *C.vulgaris* UTEX 1803, bajo la influencia de diferentes concentraciones de glicerol residual como fuente de carbono, al igual que diferentes concentraciones en las fuentes de nitrógeno y fósforo.

1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

La metodología empleada en el desarrollo de este proyecto de investigación, se presenta en la figura 1.

Figura 1. Metodología desarrollada.



1.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se siguió un diseño de experimentos factorial 3^3 de composición central tomando como variables la fuente de carbono (glicerol), de nitrógeno y fósforo (Tabla 1), el cual fue desarrollado con la ayuda del software STATISTICA versión 7.0, obteniéndose un total de 17 tratamientos; todos ellos llevados a cabo por triplicado.

Tabla 1. Diseño de experimentos.

| Tratamiento | Glicerol [% v/v] | KH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄ [g/L] | NaNO ₃ [g/L] |
|-------------|------------------|---|-------------------------|
| 1 | 1 | 0,1255 | 0,1249 |
| 2 | 1 | 0,3765 | 0,3747 |
| 3 | 5 | 0,1255 | 0,3747 |
| 4 | 5 | 0,3765 | 0,1249 |
| 5 | 3 | 0,2510 | 0,2498 |
| 6 | 1 | 0,1255 | 0,3747 |
| 7 | 1 | 0,3765 | 0,1249 |
| 8 | 5 | 0,1255 | 0,1249 |
| 9 | 5 | 0,3765 | 0,3747 |
| 10 | 3 | 0,2510 | 0,2498 |
| 11 | 0 | 0,2510 | 0,2498 |
| 12 | 6 | 0,2510 | 0,2498 |
| 13 | 3 | 0,0409 | 0,2498 |
| 14 | 3 | 0,4610 | 0,2498 |
| 15 | 3 | 0,2510 | 0,0408 |
| 16 | 3 | 0,2510 | 0,4587 |
| 17 | 3 | 0,2510 | 0,2498 |

1.2 METODOLOGÍA DE CULTIVO

1.2.1 Etapa de inoculación. Las microalgas se mantuvieron durante 16 días en biorreactores rectangulares de vidrio con medidas de 20 cm largo, 20 cm altura, 10,5 cm ancho y un volumen correspondiente a 2 L.

Sin embargo, el volumen de cultivo fue de 1,8 L; esta reducción en el volumen se debe a la inclusión del soporte polimérico donde se llevó a cabo la inmovilización. Este soporte fue cortado y armado previamente a partir de láminas de espuma de poliuretano de 1 cm de espesor.

Dicho sistema reactor-polímero tiene acoplado un difusor de hule en su parte inferior, para burbujear constantemente el aire suministrado desde un compresor; esto con el fin de garantizar la homogeneidad de todo el cultivo así como evitar la sedimentación celular.

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Biomasa de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander, bajo condiciones controladas de temperatura $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e iluminación artificial con periodos de 12h luz/12h oscuridad.

Para esta etapa el medio de cultivo se inoculó con 0,5 L de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, la cual fue adquirida de la colección de cepas de microalgas de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA), y en un medio Bold Basal (Bischoff & Bold, 1963) mostrado en la tabla 2.

Tabla 2. Medio de cultivo.

| Compuesto | [g/L] |
|--|-------------------------|
| NaNO ₃ | 2,94 x 10 ⁻³ |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 3,04 x10 ⁻⁴ |
| NaCl | 4,28 x10 ⁻⁴ |
| K ₂ HPO ₄ | 4,31 x 10 ⁻⁴ |
| KH ₂ PO ₄ | 1,29 x 10 ⁻³ |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 1,70 x 10 ⁻⁴ |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 3,07 x 10 ⁻⁵ |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 7,28 x 10 ⁻⁶ |
| MoO ₃ | 4,93 x 10 ⁻⁶ |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 6,29 x 10 ⁻⁶ |
| Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | 1,68 x 10 ⁻⁶ |
| H ₃ BO ₃ | 1,85 x 10 ⁻⁴ |
| EDTA | 1,71 x 10 ⁻⁴ |
| KOH | 5,53 x 10 ⁻⁴ |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 1,79 x 10 ⁻⁵ |

1.3 ETAPA EXPERIMENTAL

Una vez terminada la etapa de inoculación, se da inicio a los tratamientos propiamente dichos por el diseño de experimentos. Para ello se utilizaron bioreactores y condiciones idénticas a las mencionadas anteriormente. La diferencia radica en que, en esta etapa, el medio de cultivo sufre las siguientes modificaciones:

1. El polímero con las células ya inmovilizadas es ahora el nuevo inóculo.
2. En el medio de cultivo cambian, según el diseño de experimentos, las concentraciones de NaNO₃, K₂HPO₄, KH₂PO₄, además de agregarse el glicerol residual como sustrato.

Esta etapa tiene una duración total de 16 días, en los que cada 4 días, se tomaron muestras para la cuantificación y seguimiento de la producción de biomasa, carbohidratos, lípidos, proteínas, consumo de glicerol, nitrógeno y fósforo.

1.3.1 Cuantificación de biomasa. La cuantificación de la biomasa fue evaluada utilizando el parámetro de peso seco, mediante toma de alícuotas de 5mL, a partir de un raspado uniforme realizado a las caras frontal, posterior e inferior del polímero. Las muestras se filtraron al vacío (Filtros MUNKTELL 110mm) y secaron durante 24 h en el horno (WTC BINDER) a 105 °C para posteriormente transferirlas a un desecador por 12h. Finalmente por diferencia de peso mediante balanza analítica (Precisa Gravimetrics AG) se obtuvieron las cantidades en gramos de biomasa.

1.3.2 Cuantificación carbohidratos. Los carbohidratos fueron cuantificados siguiendo el método colorimétrico fenol- ácido sulfúrico propuesto por Dubois *et al* (1956). Para esto se tomó una muestra de entre 0,01-0,0625mL (según dilución necesaria) y se adicionó a tubos de ensayo de vidrio con 0,5mL de fenol al 5% y 2,5mL de ácido sulfúrico al 95,5%, dejándolo reaccionar por 30 minutos. Finalizado este tiempo se midió la absorbancia a 480nm, 485nm, 487nm y 490nm en un espectrofotómetro (Pharo300 Merck) para identificar Xilosa, Arabinosa, glucosa, Galactosa y Fructosa, respectivamente.

1.3.3 Cuantificación de lípidos. La extracción de lípidos fue realizada siguiendo una modificación al protocolo propuesto por Chen *et al* (2012), el cual consistió en tomar 1mL de muestra en un tubo de ensayo plástico, añadir 0,25 g de vidrio molido, junto con 2,4mL de una solución 25% metanol en 1N NaOH, agitando este conjunto por 3 minutos con ayuda de un vortex (Heidolph REAX top). Seguido se adicionaron 2,5mL de la misma solución y se agitó de nuevo por 3 minutos. Después de este proceso, se calentaron los tubos en baño María usando plancha

de calentamiento (WiseStir MSH-20D) a 90°C por 30 minutos, agitándolos cada 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se transvasó una muestra de 3mL a nuevos tubos de ensayo. A esta nueva muestra se adicionaron 4,5mL de una solución cloroformo/metanol, 2:1 v/v, agitando por 3 minutos y centrifugado a 3600 rpm (Centrifuga PowerSpin™ MX) por otros 3 minutos. Una vez realizado este proceso, se observó una separación de fases, de donde se tomaron 2,5mL de la fase orgánica (fondos) para adicionar 2,5mL de una solución compuesta por Trietanolamina/ácidoacético/Cu(NO₃)₂·3H₂O en proporción 9:1:10 v/v, repitiéndose el procedimiento de agitación y centrifugado inmediatamente anterior. Finalmente, se tomaron 2,5mL del fondo del tubo de ensayo y se evaluó la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Pharo300 Merck).

1.3.4 Cuantificación de proteínas. El proceso de cuantificación de proteínas inició con la extracción de las mismas por medio del método de Rausch (1981) empleado por Chen & Vaidyanathan (2013). Para aplicar el método se tomó 1mL de muestra en un tubo de ensayo plástico seguido de centrifugación a 3400 rpm durante 10 minutos (Centrifuga PowerSpin™ MX), se eliminó el sobrenadante y se añadió al pellet 1mL de solución 1M de NaOH. Posteriormente, se calentaron los tubos a 80°C durante 10 minutos en una placa de calentamiento, se dejó enfriar y se realizó una centrifugación a 3400 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido luego de la centrifugación se agregó en tubos de ensayo adicionales forrados con papel aluminio para garantizar ausencia de luz. La extracción alcalina se realizó una vez más añadiendo en todas las ocasiones el sobrenadante obtenido en los tubos de ensayo en ausencia de luz. Para extraer completamente las proteínas se realizó la última extracción añadiendo 1mL de solución 1M de NaOH, seguido de calentamiento a 100°C durante 10 minutos en la placa de calentamiento y centrifugación durante 10 minutos.

Para el cálculo de la cantidad de proteínas totales en la muestra se empleó el método de cuantificación de proteínas por reacción de Folin (Lowry *et al.*, 1951) empleado por Dorey & Draves (1998). Para esto se tomó 1mL de las tres extracciones realizadas anteriormente en un tubo de vidrio forrado con aluminio garantizando ausencia de luz, para posteriormente agregar 1,4mL de solución Lowry (A-B-C). Se agitó durante 5 minutos con ayuda de vortex (Heidolph REAX top) y se dejó reaccionar durante 20 minutos. Finalmente se añadió 0,2mL de Folin en solución con agua, se agitó durante 5 minutos con ayuda de vortex y se dejó reaccionar durante 30 minutos. Por último, la concentración de proteínas en la muestra se evaluó por lectura de absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Pharo300 Merck).

1.3.5 Consumo de glicerol. Para la cuantificación del consumo de glicerol, se filtraron 1,5mL de muestra de medio de cultivo, usando membranas PVDF (Difluoruro de polivinilideno) OlimPeak de 0,22 μm . La técnica empleada fue la de cromatografía líquida de alta eficacia con una columna Biorad Aminex HPX-87H acoplada a un equipo UFLC 20AD (Shimadzu), seguida de un detector de índice de refracción RID-10A. El equipo operó a una temperatura de 65°C, con flujo de 0,6mL/min. La fase móvil empleada fue una solución de ácido sulfúrico 5mM. El tiempo de cada análisis fue 30 minutos, aunque el tiempo de retención del glicerol con esta columna es de 14 minutos; sin embargo, se dejó más tiempo como factor de seguridad para no contaminar posteriores muestras.

1.3.6 Consumo de nitrógeno. El consumo de nitrógeno está representado por la cuantificación de Nitrato (NO_3) que se realizó por medio del método espectrofotométrico ultravioleta (Clesceri, Greenberg & Eaton 1999). Para ello se tomaron 50mL de medio de cultivo, se filtró al vacío y se añadió 1mL de solución 1N HCl. Se dejó reaccionar durante 10 minutos y finalmente se realizó la lectura de la absorbancia a 220 y 275 nm en un espectrofotómetro (Pharo300 Merck). La

corrección de los valores obtenidos debido al material orgánico presente (Clesceri, Greenberg & Eaton, 1999), fue realizada mediante la ecuación 1.

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

1.3.7 Consumo de fósforo. El consumo de fósforo está representado por la cuantificación de fosfato (PO_4), para lo cual se empleó el método colorimétrico del ácido Metavanadato Molibdato (Clesceri, Greenberg & Eaton 1999). Su aplicación se basó en tomar 3mL de medio de cultivo en un vaso de precipitado, que posteriormente se filtró al vacío. Adicionalmente se añadió 1mL de agua destilada y 1mL del ácido Metavanadato Molibdato, se dejó reaccionar durante 10 minutos para finalmente realizar la lectura de la absorbancia una longitud de onda de 750 nm en espectrofotómetro.

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

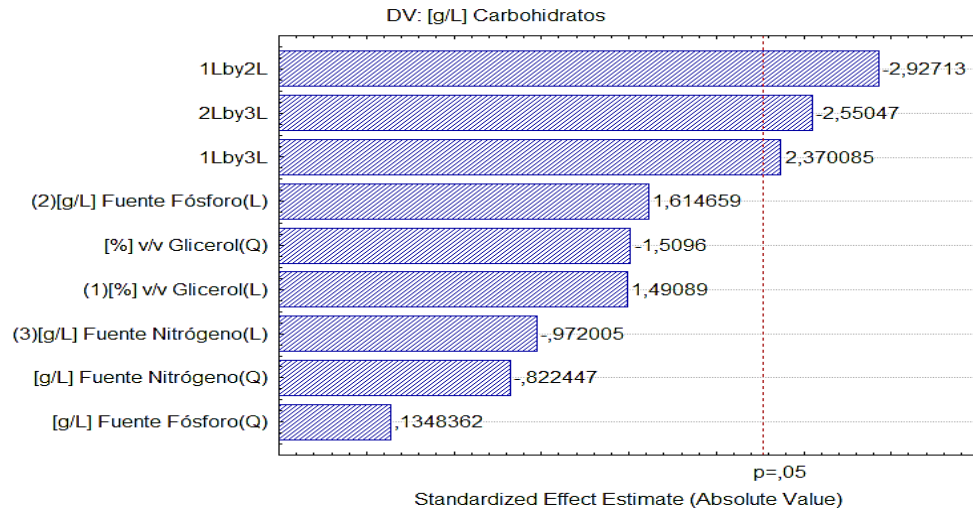
2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la influencia que tiene la concentración inicial del glicerol, nitrógeno (NaNO_3) y fósforo ($\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$) sobre la producción de metabolitos, se realizaron diagramas de Pareto para todos los días de toma de muestras (0, 4, 8, 12, 16), encontrando que existe una influencia estadísticamente significativa de la interacción entre variables para el día 12 en la concentración de metabolitos.

2.1.1 Concentración de carbohidratos. Se observa, según el diagrama de Pareto (Figura 2), que la interacción entre la fuente de glicerol/nitrógeno es la más significativa para obtener altas concentraciones de carbohidratos.

Como constituye un valor positivo, dicha interacción tiene una relación directamente proporcional entre sí para aumentar la concentración del metabolito; es decir que, a mayor concentración inicial en la fuente de glicerol y mayor concentración inicial en la fuente de nitrógeno, o viceversa, se obtendrán las cantidades más altas de carbohidratos.

Figura 2. Diagrama de Pareto para carbohidratos en el día 12.



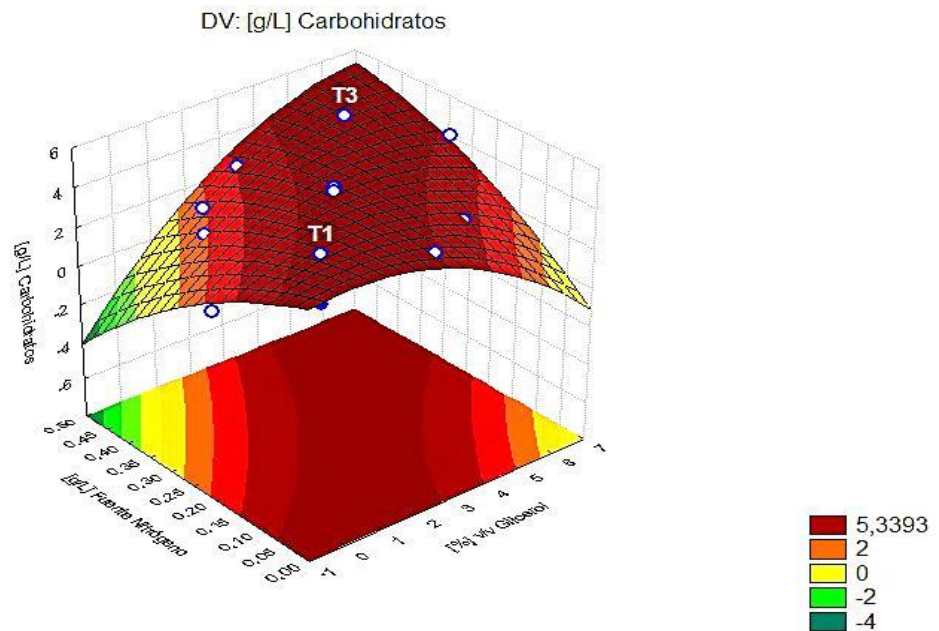
Analizando el diagrama de superficie de respuesta, Figura 3, se concluye que los mejores tratamientos han sido el número 1 y el número 3, lo que comprueba lo anteriormente mencionado para la influencia de la interacción glicerol/nitrógeno. Sin embargo, la mayor concentración de carbohidratos fue obtenida en el tratamiento número 3 (Tabla 2). Este alcanza 5,34 [g/L] de carbohidratos (correspondiente a 46% de la biomasa), con una concentración inicial alta de glicerol del 5% [v/v] y una concentración inicial alta de nitrógeno 0,37 [g/L].

Tabla 3. Comparación mejores tratamientos día 12 para carbohidratos.

| Tratamientos | Glicerol [%v/v] | Fuente de Nitrógeno[g/L] | Carbohidratos [g/L] | Biomasa [g/L] |
|--------------|-----------------|--------------------------|---------------------|---------------|
| 1 | 1 | 0,12 | 1,78 | 9,81 |
| 3 | 5 | 0,37 | 5,34 | 11,62 |

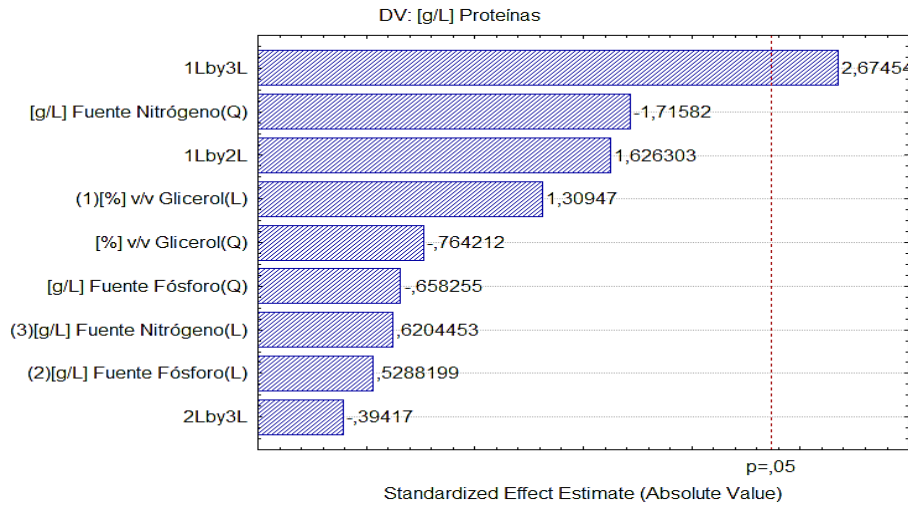
Esto concuerda con lo reportado por Abreu *et al.* (2012) y por Kong *et al.* (2013), en cuyos estudios se encontró que, bajo condiciones de crecimiento mixotrófico (utilización de glicerol en altas cantidades), *C.vulgaris* aumenta la acumulación de carbohidratos.

Figura 3. Superficie de respuesta para la concentración de carbohidratos [g/L], glicerol [% v/v] vs fuente de nitrógeno [g/L] para el día 12.



2.1.2 Concentración de proteínas. Teniendo en cuenta el diagrama de Pareto (Figura 4), la interacción entre la fuente de glicerol/nitrógeno fue la única estadísticamente significativa para aumentar la concentración de proteínas. Ésta presenta una relación directa de proporcionalidad, es decir que, para aumentar la concentración de proteínas es necesario que la concentración inicial de la fuente de carbono y nitrógeno sea alta o baja.

Figura 4. Diagrama de Pareto para proteínas en el día 12.

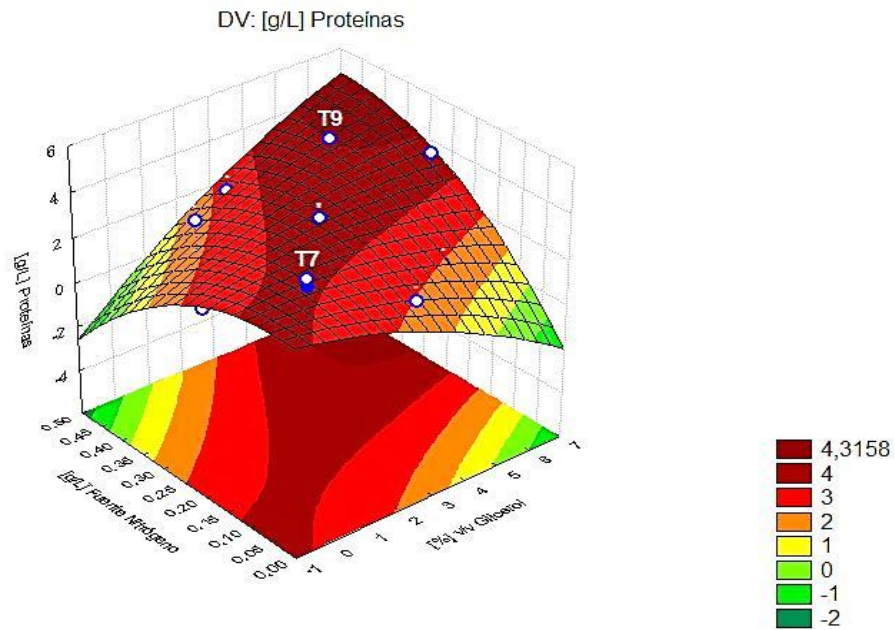


Mediante el diagrama de superficie para proteínas (Figura 5) es posible determinar que la producción de proteínas aumentó a mayores concentraciones de glicerol y nitrógeno; lo que permite comprobar la proporcionalidad directa entre las mismas, evidenciada anteriormente en el diagrama de Pareto. La mejor concentración de proteínas se logró en el tratamiento 9, trabajando bajo una concentración inicial alta de glicerol 5% [v/v], junto con una concentración inicial alta de nitrógeno 0,37 [g/L]; logrando así una concentración de proteínas de 4,32 [g/L] correspondiente al 20% de la biomasa (Tabla 3).

Tabla 4. Comparación mejores tratamientos día 12 para proteínas.

| Tratamientos | Glicerol [%v/v] | Nitrógeno [g/L] | Proteínas [g/L] | Biomasa [g/L] |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| 7 | 1 | 0,12 | 3,34 | 19,31 |
| 9 | 5 | 0,37 | 4,32 | 21,53 |

Figura 5. Superficie de respuesta para la obtención de proteínas, fuente de nitrógeno [g/L] vs glicerol [%v/v] para el día 12.



2.2 CONSUMO DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y CARBONO

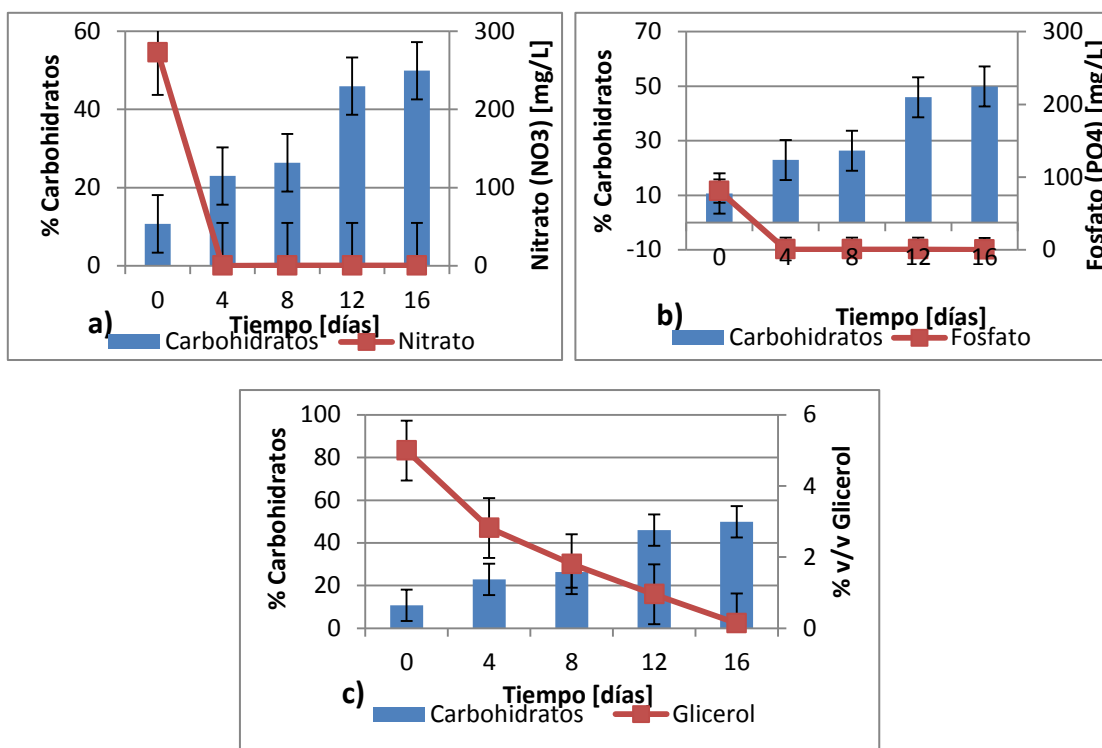
Como se encontró en el análisis estadístico, los mejores tratamientos, bajo condiciones iniciales, para la obtención de la mayor concentración de carbohidratos y proteínas, fueron los tratamientos 3 y 9, respectivamente. No obstante, para la producción de lípidos, estadísticamente no se encontró día o tratamiento significativo, pero se evidencia, a través del análisis de datos, que hubo una producción superior de estos durante todos los días del tratamiento 15.

Con el fin de tener un panorama general, en las siguientes figuras se muestra el comportamiento desde el primer hasta el último día de experimentación para la producción porcentual de metabolitos (carbohidratos, lípidos y proteínas) correspondiente a la biomasa obtenida para cada día de experimentación, a partir del consumo de la fuente de nitrógeno, fósforo y carbono (glicerol) en los mejores tratamientos.

Tabla 5. Producción porcentual carbohidratos respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento

| Tiempo [día] | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Biomasa [g/L] | 16,69 | 12,42 | 11,31 | 11,62 | 11,27 |
| Carbohidratos % | 11 | 23 | 26 | 46 | 50 |

Figura 6. Consumo fuente de nitrógeno a), fósforo b) y Glicerol c) Vs producción carbohidratos [%], tratamiento 3.

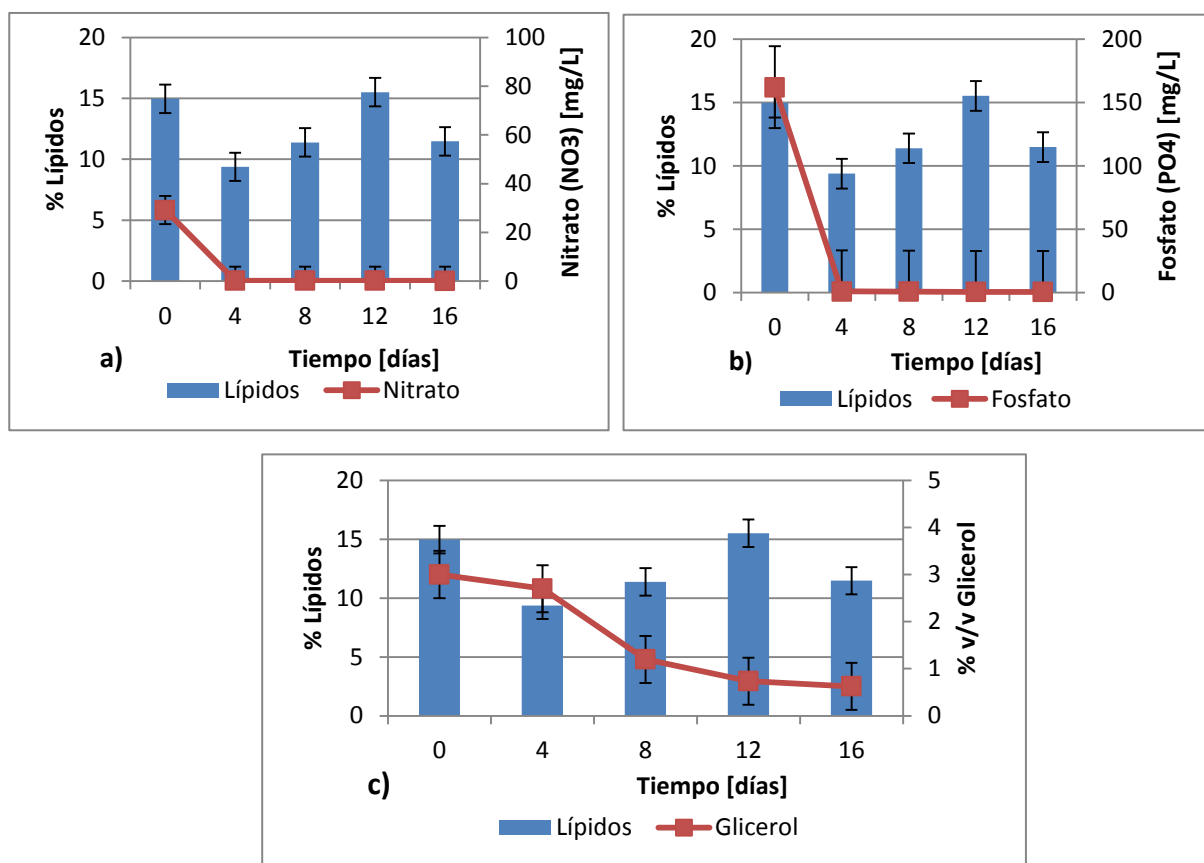


En las figuras 6 y 7 se observa que para el día 4 se ha consumido casi la totalidad de nitrato y fosfato, utilizados para el mantenimiento y producción de metabolitos, por lo que hubo una limitación de estos nutrientes hasta el final de los días experimentales. Este hecho aumentó la acumulación de lípidos y carbohidratos; coincidiendo con lo reportado por Brányiková *et al.* (2011) y Belotti *et al.* (2013).

Tabla 6. Producción porcentual lípidos respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento

| Tiempo [día] | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Biomasa [g/L] | 14,13 | 30,03 | 22,73 | 24,07 | 20,23 |
| Lípidos [%] | 15 | 9 | 11 | 15 | 11 |

Figura 7. Consumo fuente de nitrógeno a), fósforo b) y Glicerol c) Vs producción lípidos [%], tratamiento 15.

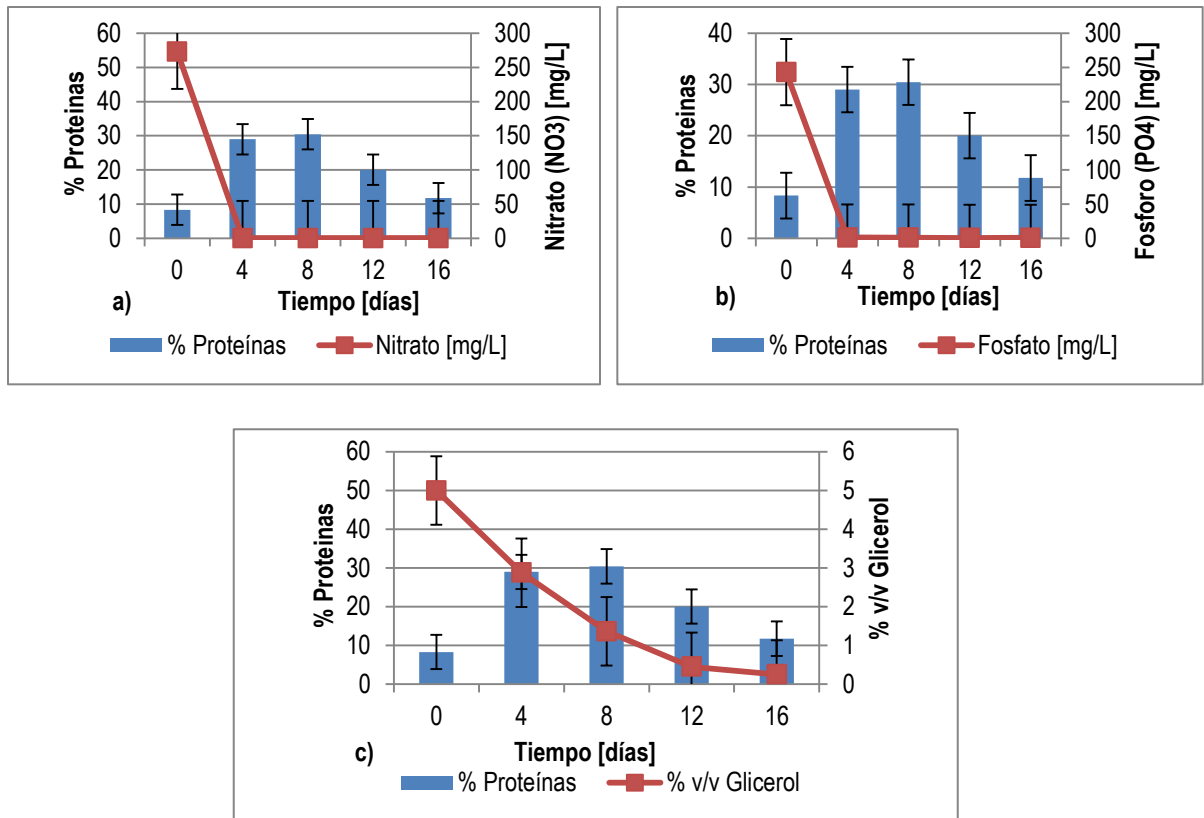


Sin embargo, analizando la interacción de dicha limitación de nutrientes en la producción de proteínas cabe destacar la posibilidad de ver los comportamientos predichos en el análisis estadístico. Hasta el día 4 existe un aumento de proteínas acompañado posteriormente por un descenso de las mismas al existir la limitación de nutrientes, Figura 8, confirmado lo reportado en la literatura con respecto al descenso en la concentración de nitrógeno, pues según Shifrin *et al.* (1981): “mientras el contenido de nitrógeno es deficiente, en general, la concentración de proteínas disminuye a su vez”.

Tabla 7. Producción porcentual proteínas respecto a la producción de biomasa [g/L] mejor tratamiento

| | | | | | |
|----------------------|------|------|------|-------|-------|
| Tiempo [día] | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 |
| Biomasa [g/L] | 3,53 | 4,49 | 6,03 | 21,53 | 17,36 |
| Proteínas [%] | 8 | 29 | 30 | 20 | 12 |

Figura 8. Consumo fuente de nitrógeno a), fósforo b) y Glicerol c) Vs producción proteínas [%], tratamiento 9.



Respecto al glicerol crudo cabe resaltar que fue consumido totalmente por la microalga *C.vulgaris* en todos los tratamientos, lo que demuestra su viabilidad como fuente de carbono. De la misma manera, se prueba que la inmovilización constituye una parte fundamental en la adaptación de la microalga a este sustrato, además de impedir posibles procesos de inhibición (Silveira *et al.* 2013).

El alto contenido de lípidos hace atractiva a las microalgas para la producción de biocombustibles, según Hu *et al.* (2008). Sin embargo, es posible aprovechar los demás metabolitos presentes en la biomasa, tal es el caso del uso de éstas como fuente de proteínas, para la producción de alimentos altamente nutricionales (Becker *et al.*, 2007).

Tabla 8. Resumen mejores tratamientos y control, producción carbohidratos, proteínas y lípidos, para el mejor día de experimentación (día 12)

| Tratamiento | | Biomasa [g/L] | Proteínas [%] | Carbohidratos [%] | Lípidos [%] |
|-------------|-----------------------------------|---------------|---------------|-------------------|-------------|
| T9 | 5% G 0,37[g/L] P – 0,37[g/L] N | 21 | 20 | 14 | 0.015 |
| T15 | 3% G 0,25[g/L] P – 0,04[g/L] N | 14 | 15 | 29 | 15.5 |
| T3 | 5% G 0,12[g/L] P – 0,37[g/L] N | 12 | 22 | 46 | 0.025 |

3. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo mostraron que el uso del glicerol crudo como fuente de carbono aumenta la producción de metabolitos cuando esta consume mayores cantidades del mismo (entre 3 y 5% v/v), en comparación con tratamientos a bajas concentraciones de glicerol y en ausencia del mismo.

También se encontró que para estimular la acumulación de lípidos y carbohidratos, debe existir una limitación en las fuentes de nitrógeno y fósforo. Sin embargo, para favorecer la acumulación de proteínas se debe aplicar totalmente lo opuesto.

El uso de la inmovilización pasiva favoreció la adaptabilidad de la microalga al sustrato y aumentó significativamente la concentración de biomasa, logrando superar la cantidad de la misma en comparación con estudios anteriores.

Todo lo anterior ayuda a constituir una manera viable para reducir el costo en la producción de biocombustibles a partir de microalgas; esto por la utilización de un sustrato de bajo costo como el glicerol así como la reducción de costos en el uso de nutrientes en el medio de cultivo.

4. RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio para determinar la influencia que tienen los diferentes componentes del glicerol crudo (ver Anexo B) sobre la producción de biomasa y metabolitos, empleando *C.vulgaris* UTEX 1803.
2. Se sugiere además, realizar un escalado del proceso para la producción de carbohidratos, proteínas, lípidos a partir de la utilización de glicerol crudo como fuente de carbono, empleando *C.vulgaris* UTEX 1803.

BIBLIOGRAFÍA

ABREU A., FERNANDES B., VICENTE A., TEIXEIRA J., DRAGONE G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbón source. En: Bioresource Technology. 2012. Vol. 118. p. 61–66.

ALHANASH A., KOZHEVNIKOVA EF & KOZHEVNIKOV IV. Hydrogenolysis of glycerol to propanediol over Ru: Polyoxometalate bifunctional catalyst. En: Catal. Lett, 2008. Vol. 120. p. 307-311

ALVAREZ HM & STEINBUCHER A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. En: Appl Microbiol Biotechnol, 2002. Vol. 60. p. 367-376

BAHADAR A., KHAN M. Progress in energy from microalgae: A review. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2013. Vol. 27. p. 128-148.

BECKER EW. Microalgae as a source of protein. En: Biotechnol. Adv. 2007. Vol. 25. P 207-210.

BELOTTI G., BRAVI M., DE CAPRARIIS B., DE FILIPPIS P., SCARSELLA M. Effect of Nitrogen and Phosphorus Starvations on *Chlorella vulgaris* Lipids Productivity and Quality under Different Trophic Regimens for Biodiesel Production. En: American Journal of Plant Sciences. 2013. Vol. 4. p. 44-51.

BISCHOFF H., BOLD H. Phycological Studies. IV. Some Algae from Enchanted Rock and Related Algae Species. University of Texas Publications. 1963. p. 1-95.

BOROWITZKA MA & BOROWITZKA JL. Microalgal biotechnology. En: Cambridge University Press, Cambridge

BRÁNYIKOVÁ I., MARŠÁLKOVÁ B., DOUCHA J., BRÁNYIK T., BIŠOVÁ K., ZACHLEDER V., VÍTOVÁ M. Microalgae novel highly efficient starch producers. En: Biotechnology Bioengineering. 2011. Vol. 108(4). p. 766–776.

BROKER D., ELBAHLOUL Y., STEINBUCHER A. Production of lipids for biofuels using bacteria. En: Ratledge C (ed) Monograph on single cell oils, AOCS Press, Urbana USA, 2009. p. 67-90 (in press)

BROWN MR., JEFFREY SW., GARLAND CD. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: A literature review. En: CSIRO Mar. Lab. Rep. 1989. Vol. 205. p. 44.

CERRATE S., YAN F., WANG Z., COTO C., SACAKLI P & WALDROUP PW. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. En: Int. J. Poult. Sci, 2006. Vol. 5(11). p. 1001-1007

CHEN Y., VAIDYANATHAN S. A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids. En: Analytica Chimica Acta. 2012. Vol. 724. p. 67-72.

CHEN Y., WALKER T. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. En: Biotechnol Lett. 2011.

CHISTI Y. Biodiesel from microalgae. En: Biotechnol. Adv, 2007. Vol. 25. p. 294-306.

CLESCERI LS., GREENBERG AE & EATON AD. Standard methods for examination of water and wastewater. En: American Public Health Association. 1999. 20th ed. Washington, DC.

DUBOIS M. GILLES K., REBERS P., SMITH F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. En: Analytical Chemistry. 1956. Vol. 3(28). p. 350-356.

ESTÉVEZ L., BARAJAS A., BARAJAS C., KAFAROV V. Improvement of Lipid Productivity on *Chlorella vulgaris* Using Waste Glycerol and Sodium Acetate. En: Ciencia, Tecnología y Futuro. 2013. Vol. 5 (2). p. 113-126.

FAN X., BURTON R., ZHOU Y. Glycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals – Mini Review. En: The Open Fuels and Energy Science Journal. 2010. Vol. 3. p. 17-22.

HU Q., SOMMERFELD M., JARVIS E., GHIRARDI M., POSEWITZ M., SEIBERT M., DARZINS A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. En: Plant J. 2008. Vol. 54. p. 621-639.

JOHNSON D & TACONI K. Glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. En: The Environmental Progress, 2007. Vol 26(4). p. 338-348

KONG W., YANG H., CAO Y., SONG H., HUA S., XIA C. Effect of Glycerol and Glucose on the Enhancement of Biomass, Lipid and Soluble Carbohydrate Production by *Chlorella vulgaris* in Mixotrophic Culture. En: Biotechnology. 2013. Vol. 51(1). p. 62–69.

LEENEN E., DOSSANTOS V., GROLLE K., TRAMPER J., WIJFFELS R. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. En: Water Res. 1996. Vol. 12. p. 2985-2996.

LIANG Y., SARKANY N., CUI Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. En: Biotechnol Lett. 2009. Vol. 31. p. 1043-1049.

LOERA QUEZADA MM & OLGUÍN EJ. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: Retos y oportunidades. En: Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal, 2010. Vol. 1(1). p. 91-116.

LOWRY OH., ROSENBROUGH NJ., FARR AL., RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. En: J Biol Chem, 1951. Vol. 193. p. 265-275.

METZGER P & LARGEAU C. Botryococcus braunii: A rich source for hydrocarbons and related ether lipids. En: Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 66. p. 486-496.

MORENO-GARRIDO I. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. En: ScienceDirect. Bioresource Technology. 2008. Vol. 99. p. 3949-3964.

PATIL N., VEERANAGOUDA Y., VIJAYKUMAR M., NAYAK S., KAREGOUDAR T. Enhanced and potential degradation of o-phthalate by *Bacillus* sp. Immobilized cells in alginate and polyurethane. En: International Journal of Biodetergents Biodegradable. 1996. Vol. 57. p. 82-87.

PESTANA R., PESTANA R. Producción de microalgas *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 usando como sustrato glicerol residual a escala laboratorio. Trabajo de grado ingeniero químico. Bucaramanga. Universidad industrial de Santander, 2012. 39 p.

PYLE D. Use of biodiesel-derived crude glicerol for the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids by the microalga *Schizochytrium limacinum*. En: M. Sc. Thesis, faculty of Biological Systems Engineering, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, 2008. pp.72

SILVEIRA MARTINS S., MARTINS C., CIDRAO L., SANTAELLA S. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. En: African Journal of Biotechnology. 2013. Vol. 12 (28). p. 4412-4418.

SHIFRIN NS., CHISHOLM SW. Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light/dark cycles. En: J. Phycol. 1981. Vol 17. P. 372-384.

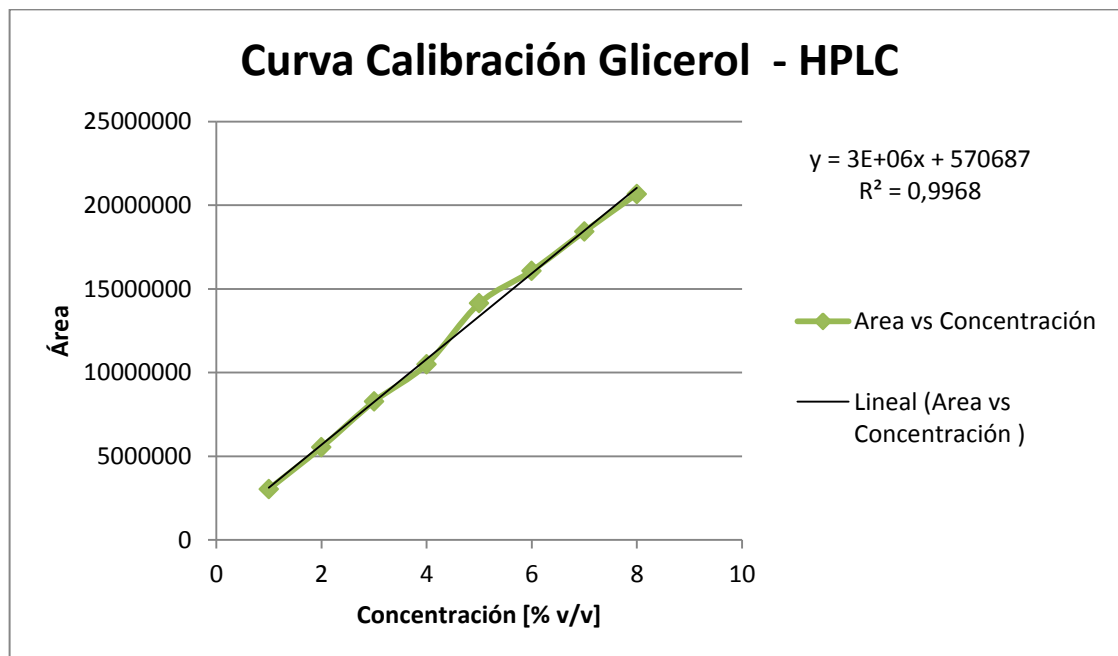
YANG F., MILFORD A., RUNCANG S. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. En: Biotechnology for Biofuels. 2012. Vol.5. No.13.

ZACHEUS O., IIVANAINEN E., NISSINEN T., LEHTOLA M., MARTIKAINEN P. Bacterial biofilm formation on polyvinylchloride, polyethylene and stain less steel exposed to zoned water. En: Water Res. 2000. Vol. 34. p. 63-70.

ANEXOS

ANEXO A. Curva de calibración glicerol – Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

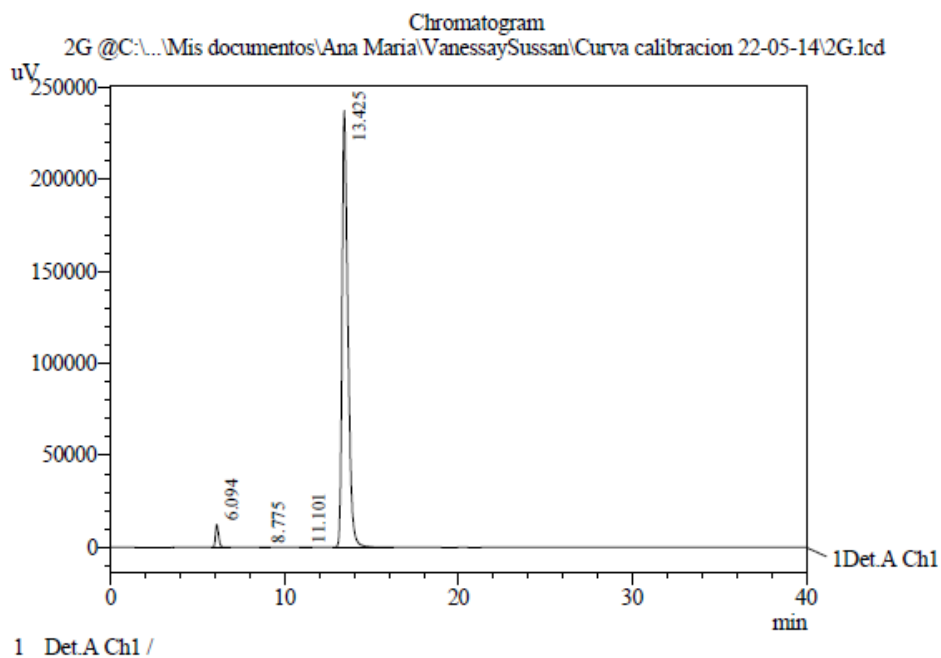
| Concentración [% v/v] | Área |
|-----------------------|----------|
| 1 | 3041973 |
| 2 | 5540536 |
| 3 | 8272887 |
| 4 | 10496998 |
| 5 | 14134792 |
| 6 | 16080576 |
| 7 | 18427886 |
| 8 | 20671403 |



**ANEXO B. Caracterización glicerol residual obtenida a escala laboratorio
(Estévez et al., 2013)**

| Producto | % (p/p) |
|----------|---------|
| Glicerol | 74,2 |
| Metanol | 10,2 |
| Humedad | 11,6 |
| Cenizas | 4 |

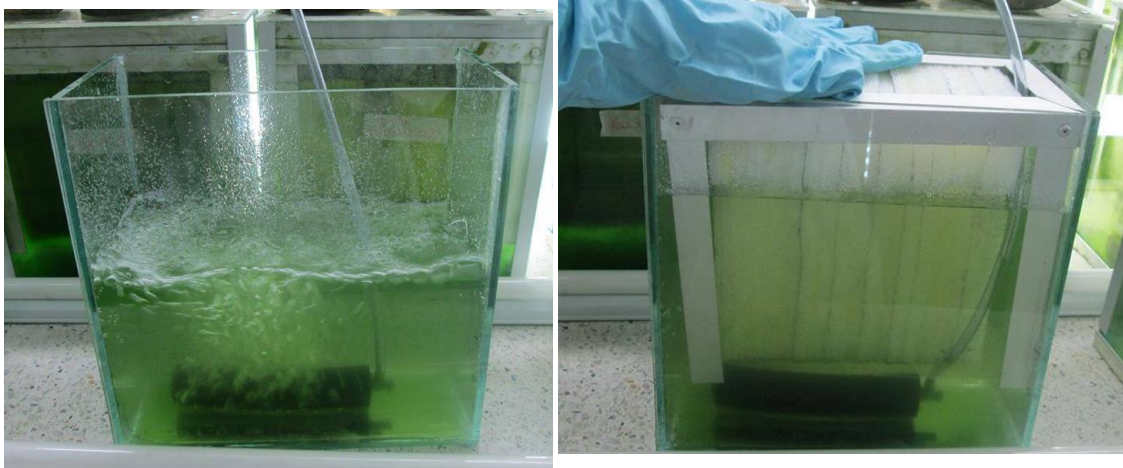
ANEXO C. Tiempo de retención glicerol, según cromatograma obtenido usando columna Aminex HPX-87H.



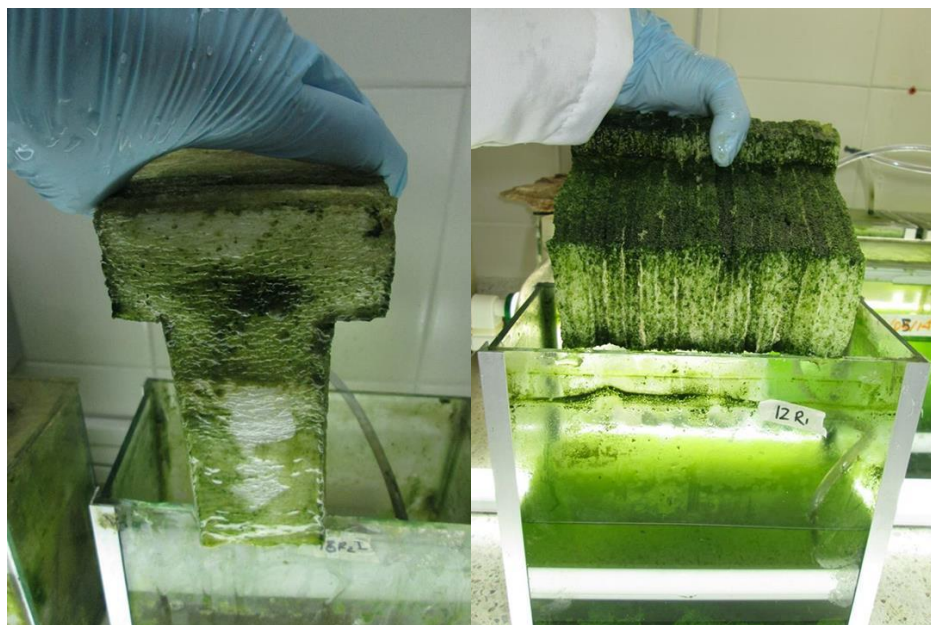
PeakTable @C:\...Administrador\Mis documentos\Ana Maria\VanessaySussan\Curva calibracion 22-05-14\2G.lcd
Detector A Ch1

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 6.094 | 157577 | 12546 | 2.763 | 5.012 |
| 2 | 8.775 | 1628 | 105 | 0.029 | 0.042 |
| 3 | 11.101 | 2567 | 140 | 0.045 | 0.056 |
| 4 | 13.425 | 5540536 | 237525 | 97.163 | 94.890 |
| Total | | 5702307 | 250315 | 100.000 | 100.000 |

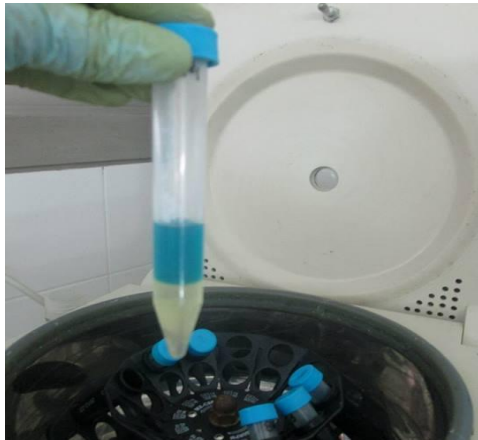
ANEXO D. Algunas Imágenes cultivo *C. vulgaris*, etapa experimental



A) Reactor e Inmovilización acoplada al reactor



B) Biomasa concentrada



C) Cuantificación lípidos y carbohidratos



D) Separación biomasa del medio de inmovilización y peso seco