



**Evaluación de algunos factores abióticos que favorecen la producción de biomasa y de ácidos grasos totales en la microalga nativa *Chlorella* sp en cultivo heterotrófico**

Catalina Andrea Lugo De Ossa

Tesis de maestría presentada para optar al título de Magíster en Ingeniería

Tutor

Mariana Peñuela Vásquez, Doctor (PhD)

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ingeniería

Medellín, Antioquia, Colombia

2022

<b>Cita</b>	(Lugo, 2022)
<b>Referencia</b>	Lugo De Ossa, C. (2022). <i>Evaluación de algunos factores abióticos que favorecen la producción de biomasa y de ácidos grasos totales en la microalga nativa Chlorella sp en cultivo heterotrófico</i> . [ Tesis de maestría]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
<b>Estilo APA 7 (2020)</b>	



Maestría en Ingeniería, Cohorte XXII.

Grupo de Investigación Bioprocesos.

Centro de Investigación Ambientales y de Ingeniería (CIA).



Centro de documentación Ingeniería (CENDOI)

**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

**Rector:** John Jairo Arboleda Céspedes

**Decano/Director:** Jesús Francisco Vargas Bonilla.

**Jefe departamento:** Lina María González Rodríguez.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

## **Agradecimientos**

Quiero darles las gracias a mis padres, mi hermana, mi novio y mi familia, por apoyarme en todo este camino, creer en mí y alentarme siempre en los momentos más difíciles. También quiero agradecer muy especialmente a mis asesoras Mariana Peñuela Vásquez y Natalia Andrea Gómez Vanegas, por ayudarme a aliviar mi estrés y frustración cuando se me presentaban inconvenientes con la experimentación, por ser más que mis asesoras, mis amigas, y encontrar siempre alguien con quien hablar en momentos de crisis y felicidad. Por último, agradezco al grupo de Bioprocesos, que es como mi segundo hogar, a mis compañeros de grupo, de los cuales aprendí mucho y me tuvieron paciencia todos estos años de investigación y sin los cuales esto no hubiera sido posible. A la Universidad de Antioquia, por darme la oportunidad de ser estudiante instructor y al CODI por la financiación recibida para el desarrollo de mi trabajo de grado.

## Tabla de contenido

1	INTRODUCCIÓN .....	10
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	13
3	OBJETIVOS.....	15
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
4	MARCO TEÓRICO.....	16
4.1	Los lípidos.....	16
4.2	Las microalgas como fuente de ácidos grasos .....	17
4.3	Biosíntesis de ácidos grasos en las microalgas .....	19
4.4	Ruta metabólica para la producción de AGPIs .....	20
4.5	Biosíntesis de Triacilglicerol .....	22
4.6	Morfología y taxonomía de <i>Chlorella</i> sp.....	23
4.7	Condiciones de cultivo y requerimientos nutricionales para la microalga <i>Chlorella</i> sp	25
4.8	Factores abióticos que afectan la producción de ácidos grasos .....	28
4.8.1	Fuente de nitrógeno .....	30
4.8.2	Fuente de Fósforo .....	33
4.8.3	Temperatura.....	34
4.8.4	pH .....	35
4.9	Sistemas de cultivo .....	36
4.10	Extracción de aceites .....	38
4.10.1	Cosecha de biomasa: .....	38
4.10.2	Proceso de extracción y purificación de lípidos: .....	39
5	METODOLOGÍA .....	41
5.1	Revisión bibliográfica.....	41
5.2	Métodos analíticos .....	41

5.2.1	Concentración de biomasa.....	41
5.2.2	Concentración de nitratos. ....	41
5.2.3	Concentración de fosfatos .....	41
5.2.4	Concentración de glucosa.....	42
5.2.5	Extracción y contenido de lípidos .....	42
5.3	Microorganismo y medio de cultivo.....	42
5.4	Preparación del inóculo .....	43
5.5	Diseño experimental .....	43
5.5.1	Evaluación de la relación Carbono/Nitrógeno y relación Carbono/Fósforo ..	43
5.5.2	Evaluación del pH y la Temperatura de cultivo .....	44
5.5.3	Validación de los factores abióticos que inducen la producción de lípidos en reactor de 1Litro.....	44
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
6.1	Evaluación de la Relación C/N.....	45
6.2	Evaluación de la Relación C/P.....	49
6.3	Evaluación de la Temperatura y el pH en medio de cultivo.....	52
6.4	Validación de las condiciones de cultivo para la producción de lípidos en un Biorreactor de tanque agitado de 1litro.....	57
7	CONCLUSIONES .....	61
8	BIBLIOGRAFÍA.....	63
9	ANEXOS.....	72

## Lista de tablas

<b>Tabla 1</b> Parámetros de cultivo: cultivos heterotróficos de <i>Chlorella</i> sp. para las diferentes relaciones C/N evaluadas al día 9.....	46
<b>Tabla 2</b> Parámetros de cultivo heterotrófico para <i>Chlorella</i> sp. a diferentes relaciones C/P evaluadas al día 9.....	51
<b>Tabla 3</b> Parámetros de cultivo heterotrófico para <i>Chlorella</i> sp. a diferentes temperaturas y pH evaluados al día 9.....	54
<b>Tabla 4</b> Parámetros de cultivo heterotrófico de <i>Chlorella</i> sp. para las diferentes temperaturas y pH evaluados al día 10 en un biorreactor de tanque agitado de 1L, con una temperatura de 25°C/pH 7 y relación C/N y C/P 50/1 y 400/1 .....	59

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> Síntesis de Novo de ácidos grasos en los cloroplastos (Hu et al., 2008). .....	19
<b>Figura 2</b> Ruta biosintética de producción de ácidos poli insaturados tipo omega 3 y omega 6 en microalgas. ....	21
<b>Figura 3</b> Esquema simplificado que muestra la biosíntesis de triacilglicerol en algas (Hu et al., 2008). ....	22
<b>Figura 4</b> Micrografía de la microalga <i>Chlorella</i> sp en medio de cultivo heterotrófico, tomada con un microscopio óptico 100X (fuente propia). ....	23
<b>Figura 5</b> Curvas Cinéticas para el cultivo heterotrófico de <i>Chlorella</i> sp., a 28°C, 120rpm y pH inicial 6.0 con las diferentes relaciones C/N 10:1, 25:1 y 50:1. a) Producción de Biomasa y Consumo de Carbono. b). Consumo de Nitratos .....	46
<b>Figura 6</b> Curvas Cinéticas para el cultivo heterotrófico de <i>Chlorella</i> sp, a 28°C, 120rpm y pH inicial 6.0, con las relaciones C/P 200/1, 300/1 y 400/1. a) Producción de Biomasa y Consumo de Carbono. b) Consumo de Fosfatos .....	50
<b>Figura 7</b> Producción de Biomasa en cultivo heterotrófico de <i>Chlorella</i> sp, con relación C/N 25/1 y C/P 300/1 a diferentes temperaturas 20°C, 25°C y 30°C, 120rpm y pH inicial 5.0, 7.0 y 8.0. ....	52
<b>Figura 8</b> Contenido de lípidos en el cultivo heterotrófico de <i>Chlorella</i> sp, con relación C/N 25/1 y C/P 300/1 a diferentes temperaturas 20°C, 25°C y 30°C, 120rpm y pH inicial 5.0, 7.0 y 8.0. ....	55
<b>Figura 9</b> Curvas Cinéticas para el cultivo heterotrófico de <i>Chlorella</i> sp., a 25°C, 120rpm y pH inicial 7.0, con las relaciones C/N 50/1 y C/P 400/1. a) Producción de Biomasa y Consumo de Carbono. b) Consumo de Nitratos y Fosfatos .....	58

---

## RESUMEN

Las microalgas son el primer eslabón de la cadena trófica en las fuentes de agua y por ende el alimento de los peces. Por tal razón, estos microorganismos están siendo estudiados como fuente de ácidos grasos que son esenciales para la producción de alimentos con alto valor agregado. Existen algunas especies de microalgas que han sido reconocidas por su contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs), los cuales pueden ser inducidos bajo condiciones de estrés nutricional y ambiental. En el presente trabajo, se estudió el efecto que tienen algunos factores abióticos como la concentración de nutrientes (en especial la fuente de nitrógeno y fósforo), además de la temperatura y el pH inicial del cultivo, en la producción de biomasa y en la síntesis de lípidos intracelulares de la microalga nativa *Chlorella* sp. en un cultivo heterotrófico bajo completa oscuridad, esta investigación se realizó con el fin de avanzar en el desarrollo de subproductos con alto valor agregado como son los ácidos grasos poliinsaturados que pueden ser utilizados en la industria alimenticia como suplemento dietario.

La microalga nativa *Chlorella* sp. fue cultivada en erlenmeyer de forma heterotrófica con glucosa como fuente de carbono a diferentes relaciones carbono/nitrógeno (C/N) y carbono/fósforo (C/P), debido a que la producción de biomasa y la composición de ácidos grasos se ven afectadas por estos nutrientes. La máxima concentración de biomasa que se obtuvo fue de 9.7g/L y 9.17g/L con las relaciones C/N 10/1 y C/P 200/1 en 9 días de cultivo. los ácidos grasos totales se ven favorecidos con las relaciones C/N 50/1 y C/P 400/1 alcanzando un 24.27% y 20.48% respectivamente de ácidos grasos totales sobre la biomasa seca. Estos resultados indican que tener relaciones C/N y C/P bajas favorecen la producción de biomasa y disminuyen la producción de ácidos grasos totales, por el contrario relaciones C/N y C/P altas, favorecen la producción de ácidos grasos totales y la productividad de lípidos en la biomasa.

En la evaluación del efecto de la temperatura y el pH inicial en el cultivo de la microalga *Chlorella* sp, se tuvieron en cuenta las mejores condiciones para el crecimiento de la microalga obtenidas anteriormente para asegurar que el cultivo no presentará deficiencia de nutrientes que pudieran inducir a la producción de lípidos, por lo tanto se trabajó con

---

glucosa a 20g/L y una relación C/N 25/1 y C/P 200/1. Se realizó un diseño factorial  $2^3$  con dos factores (Temperatura y pH) y 3 niveles para cada factor (20, 25, 30°C y pH 5, 7 y 9), el análisis estadístico no mostró interacción entre los factores por lo tanto se analizaron por separado. La mejor concentración de biomasa se encontró con la temperatura de 30°C y un pH inicial de 8, obteniéndose 11,27g/L de biomasa y el mejor contenido de lípidos se obtuvo con la temperatura de 20°C a un pH inicial de 7 arrojando un 23.45% de lípidos contenidos en la biomasa seca de la microalga.

La validación de las condiciones de cultivo para inducir la producción de lípidos en la microalga nativa *Chlorella* sp que fueron establecidas en las experimentaciones previas, se realizó en un biorreactor de tanque agitado de 1 litro marca Biostat® A plus, con volumen efectivo de 800 mL, Sartorius stedim, operado en batch a una temperatura de 25°C, pH inicial de 7, relación C/N 50/1 y C/P 400/1. Los resultados obtenidos mostraron que, la concentración de biomasa máxima se alcanzó a los 10 días de cultivo, en este punto, la concentración de biomasa fue de 4.5g/L y el contenido de lípidos de 24.38%. Este cultivo realizado bajo condiciones óptimas para la producción de lípidos totales en esta microalga se pudo observar que a medida que aumenta el tiempo de deficiencia de nutrientes N y P, los cuales se agotan a partir del día 4 del cultivo, se comienza a dar la acumulación de lípidos intracelulares hasta alcanzar un valor máximo de 28.07% y una productividad de lípidos de 23.39mg/gd, en el día 12 de cultivo. La desventaja de este cultivo fue la baja concentración de biomasa alcanzada en el batch, por lo tanto, se recomienda realizar un cultivo en dos etapas, en la primera etapa cultivar la microalga bajo condiciones óptimas para alcanzar la máxima producción de biomasa, de tal forma que en la etapa de agotamiento nutricional debido a la deficiencia de N y P y a baja temperatura, se puedan inducir la elongación de las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados como respuesta a las condiciones de estrés y así obtener mayores productividades de lípidos.

Palabras claves: Biomasa, *Chlorella* sp, contenido de lípidos, glucosa, heterotrófico, lípidos, microalgas, pH, productividad, relación carbono/nitrógeno/fosforo, temperatura,

---

## 1 INTRODUCCIÓN

Los lípidos son constituyentes esenciales en todas las células vegetales. La mayoría de los lípidos de las plantas y las microalgas son derivados de los ácidos grasos, existen otros muchos compuestos de carácter lipídico con funciones muy importantes como los terpenoides, las hormonas, pigmentos fotosintéticos, carotenoides, componentes estructurales de membrana, entre otros. Muchos de estos son considerados metabolitos secundarios, debido a que no se encuentran en todas las células y es probable que no sean esenciales para el crecimiento, sin embargo la ruta biosintética de los ácidos grasos es una ruta primaria porque está en todas las células y es esencial para el crecimiento. Los lípidos que forman las membranas de los cloroplastos están enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados. En muchas algas los ácidos grasos más comunes son los altamente insaturados y de cadena larga como el ácido araquidónico (AA,20:4), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 20:6) (Leyva soto, 2014).

En general, los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son denominados ácidos grasos esenciales, se denominan esenciales porque no pueden ser sintetizados y deben obtenerse a través de la dieta, además, son necesarios para ciertas funciones en el organismo. El aceite de pescado es la fuente de AGPI más comúnmente utilizada en el mundo y en nuestro país. Del pescado, se obtienen aceites esenciales de tipo DHA (Ácido Docosahexaenoico, C22:6 n-3) y EPA (Ácido Eicosapentaenoico, C20:5 n-3). Sin embargo, la bioacumulación de toxinas como el mercurio, cianuro, ácidos y metales pesados derivados de la actividad minera; así como, de pesticidas, plaguicidas, herbicidas y fertilizantes agroindustriales que contaminan las fuentes hídricas, han convirtiéndose nuestros peces en fuentes de ácidos grasos esenciales que representan un riesgo para la salud humana (Belarbi, Molina, & Chisti, 2000; Fraeye et al., 2012; Lacerda, 1997; Olivero & Solano, 1998). Es bien conocido que los peces no producen ácidos grasos a través de su metabolismo, sino que los ingieren al consumir zooplancton, fitoplancton o microalgas, estas últimas corresponden a los productores primarios de la cadena trófica en las fuentes de agua natural. Es por esto, que estos microorganismos están siendo estudiados como fuente potencial de ácidos grasos

---

para la producción de alimentos funcionales con alto valor agregado. Se han realizado estudios comparativos de las características fisicoquímicas del aceite de pescado con el de algunas microalgas, concluyendo que ambos aceites presentan cantidades similares de AGPIs  $\omega$ -3, aunque el aceite microalgal presenta mejores propiedades organolépticas, menor concentración de colesterol, contiene escualeno (antioxidante) y fitoesteroles (reductores del colesterol), que ofrecen beneficios adicionales en la salud humana. De igual manera, la producción de aceites a partir de microalgas presenta ventajas en comparación al aceite de pescado, ya que, las microalgas son fáciles de cultivar bajo ambientes controlados, lo que permite aislarlas del estrés causados por los factores climáticos y lo cual vuelve sus cultivos muy atractivos desde el punto de vista industrial (Conchillo, Valencia, Puente, Ansorena, & Astiasarán, 2006).

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos y por lo general tienen estructura unicelular lo que les permite realizar la conversión de energía solar en energía química de una manera más eficiente (Harun, Singh, Forde, & Danquah, 2010). Estos microorganismos han recibido especial interés en los últimos años por su particular manera de acumular aceites, entre un 30-50% de su peso seco en lípidos, utilizando CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y luz solar como fuente de energía. Los lípidos pueden ser almacenados en forma de triglicéridos constituidos por ácidos grasos de cadena largas (C16 y C18) (Yen et al., 2013b). De la misma forma, pueden producir ácidos grasos con alto grado de insaturación o ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), ubicados principalmente en la membrana celular o en las organelas en forma de glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos y lipoproteínas (Guedes, Amaro, Barbosa, Pereira, & Malcata, 2011). Existen algunas especies de microalgas que han sido reconocidas por presentar altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs), como *Cryptocodinium cohnii* (31.1% de DHA), *Schizochytrium mangrove* (33-39% de DHA) y *Chlorella minutissima* (31.3% de EPA). El contenido de AGPIs como EPA y DHA en las microalgas, depende tanto de la especie como de los factores abióticos asociados a su crecimiento, como: tipo de cultivo empleado, composición del medio de cultivo, régimen de aireación, intensidad de luz, temperatura, pH y madurez del cultivo (Guedes et al., 2011; Yen et al., 2013b).

Las microalgas tienen unos requerimientos nutricionales específicos para asegurar un buen funcionamiento celular y asegurar la producción de biomasa, cuando estas condiciones de cultivo se ven afectadas, las células generan una respuesta al estrés ocasionado por las condiciones adversas y de esta manera inducen la producción de lípidos (principalmente triglicéridos) y de AGPI. Por esta razón muchos autores han enfocado sus estudios en la evaluación de medios de cultivo y el efecto que tienen algunos factores que llegan a interferir en el metabolismo de las microalgas ocasionando la inducción de aceites por medio de estrés nutricional, físico y químico (Lemahieu et al., 2013).

Los medios de cultivos heterotróficos vienen siendo muy estudiados como una alternativa de cultivo pues solo necesitan de una fuente de carbono orgánico como la glucosa, una temperatura de cultivo que oscila generalmente entre 25 y 30 °C para un óptimo crecimiento y un pH entre 6-9 dependiendo de la microalga y condiciones de incubación bajo completa oscuridad. Además, necesitan los nutrientes adecuados para asegurar altas concentraciones de biomasa y las condiciones de estrés abióticas indicadas para inducir la producción de ácidos grasos (Harun et al., 2010). Los parámetros de cultivo mencionados anteriormente son el caso de estudio de este trabajo de grado, en el cual se evaluaron las condiciones de cultivo adecuadas para potenciar la producción de biomasa y lípidos en la microalga nativa *Chlorella* sp modificando la relación C/N y C/P y encontrando las condiciones óptimas de temperatura y pH inicial de cultivo.

---

## 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El contenido de aceites en las microalgas puede aumentar o disminuir debido a cambios en factores abióticos en el cultivo. Entre los factores que tienen mayor relevancia en los cultivos microalgas se resaltan la concentración de nitrógeno, fósforo, hierro, CO<sub>2</sub>, intensidad de luz, fotoperiodo, temperatura y pH (Tonon, Harvey, Larson, & Graham, 2002). Bajo condiciones de estrés ambiental la célula disminuye su división celular y cambia su metabolismo hacia el almacenamiento de lípidos y carbohidratos como fuente de reserva de energía (Xin, Hong-ying, Ke, & Ying-xue, 2010). La limitación de nitrógeno y fósforo puede causar disminución del contenido proteico de la célula, así como disminución de los tilacoides en la membrana celular y activar las enzimas que estimulan la hidrólisis de fosfolípidos y triglicéridos (Beuckels, Smolders, & Muylaert, 2015; Guedes et al., 2011; Wu, Chen, & Lee, 2013; Xin et al., 2010). La temperatura también es un factor importante que afecta al crecimiento y el tipo de ácidos grasos producidos por la célula. Muchas especies aumentan sus ácidos grasos insaturados cuando disminuye la temperatura y aumentan sus ácidos grasos saturados cuando aumenta la temperatura (Wu et al., 2013).

La adecuada composición del medio de cultivo favorecerá entonces el crecimiento de las células, por esta razón muchos medios de cultivo comerciales han sido modificados y optimizados, a fin de establecer el efecto que tiene el aumento o la disminución de la concentración de algunos nutrientes sobre la producción de biomasa y lípidos. Quevedo en el 2011 presenta en su trabajo de grado una cepa nativa Colombiana de *Chlorella* sp. un perfil lipídico con un excelente potencial, esta microalga contiene ácidos grasos de tipo oleico 9.01 (%p/p), Linoléico 9.90 (%p/p) (omega 6) y Linolénico 26,06 (%p/p) (omega 3). Este trabajo se desarrolló en el grupo de Bioprocesos de la Universidad de Antioquia, donde fue diseñado un sistema de cultivo que permitió determinar el efecto de los macronutrientes y las condiciones de cultivo autotrófico sobre la producción de biomasa en fotobiorreactores de 10 L (Quevedo, 2011). Sin embargo, esta microalga *Chlorella* sp. por ser un microorganismo nativo aislado no se le conoce aún su comportamiento bajo un

sistema de cultivo heterotrófico, con lo cual según la literatura, se pueden aumentar las productividades de biomasa y lípidos en las células.

Para lograr buenos rendimientos de aceites en esta microalga nativa se debe asegurar una alta concentración de biomasa en una etapa inicial de cultivo. Los aceites, por ser considerados metabolitos secundarios, pueden ser inducidos al someter las microalgas a condiciones de estrés, en una segunda etapa del cultivo (Guedes et al., 2011). Pero estas condiciones de estrés dependen tanto de la especie como de los factores asociados a su crecimiento (Tonon et al., 2002).

Por lo tanto, este trabajo propone por medio de un cultivo heterotrófico determinar de qué manera los factores abióticos como la concentración de nitrógeno y fósforo, la temperatura y el pH, favorecen el cultivo de la microalga nativa *Chlorella* sp., para poder aumentar la concentración de biomasa y de ácidos grasos, los cuales tienen un alto valor agregado, compitiendo fuertemente con el aceite de pescado en la industria alimenticia.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de algunos factores abióticos sobre la producción de biomasa y ácidos grasos totales en la microalga nativa *Chlorella* sp. en cultivo heterotrófico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la relación carbono/nitrógeno y carbono/fosforo que favorezcan la producción de biomasa y ácidos grasos en la microalga.
- Establecer el efecto del pH y la temperatura en la producción de biomasa y ácidos grasos.
- Validar las condiciones de cultivo para la producción de ácidos grasos en un biorreactor de tanque agitado de 1 litro.

---

## 4 MARCO TEÓRICO

### 4.1 Los lípidos

Los lípidos desempeñan una serie de funciones en los organismos vivos y se pueden dividir en dos grupos principales: los lípidos no polares (acilgliceroles, esteroides, ácidos grasos libres no esterificados, ceras y ésteres) y lípidos polares (fosfoglicéridos, glicosilglicéridos). Los lípidos y esteroides polares son componentes estructurales importantes de las membranas celulares que actúan como una barrera permeable selectiva para las células y los orgánulos, mantienen funciones de membrana específicas que proporcionan la matriz para una gran variedad de procesos metabólicos y participan en la fusión de la membrana. Además de una función estructural, algunos lípidos polares pueden actuar como intermediarios o precursores de compuestos intermedios en vías de señalización celular (como el inositol, los esfingolípidos y los productos oxidativos) y juegan un papel en la respuesta a cambios en el entorno. De los lípidos no polares, los triacilgliceroles son abundantes productos de almacenamiento, que pueden catabolizarse fácilmente para proporcionar energía metabólica. Las ceras son compuestos extracelulares comunes que cubren la superficie pero pueden actuar como reservas de energía (en forma de ésteres de cera), especialmente en organismos de hábitats fríos (Guschina & Harwood, 2006).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs por sus siglas en inglés) son esenciales en el desarrollo y fisiología humana, además de tener un rol importante en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Actualmente, las fuentes más importantes de estos compuestos son los peces, donde la utilización de sus aceites es limitada debido al riesgo de acumulación de toxinas, olor y sabor a pescado, pobre estabilidad oxidativa y mezcla entre diferentes tipos de ácidos grasos (Brennan & Owende, 2010a; Harun et al., 2010; Hernández Pérez & Labbé, 2014).

Además de los peces, existen diversos microorganismos capaces de sintetizar triglicéridos intracelulares, entre estos se encuentran algunas levaduras como *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Trichosporom pullulan* y *Yarrowia lipolytica*, también se han

---

reportado algunos actinomicetos como *Mycobacterium spp.*, *Rhodococcus spp.* y *Nocardia spp.*, otros microorganismos como los Thraustochytridos, las algas terrestres, los líquenes heterótrofos, los hongos micorrizicos arbusculares y los hongos saprofitos como *Mortierella*, todos estos son capaces de sintetizar triglicéridos intracelulares, bajo ciertas condiciones de cultivo, alcanzando hasta en un 80% de su peso seco en lípidos utilizando diversas fuentes de carbono como azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes y aceites entre otras, y/o utilizando subproductos y residuos industriales o agrícolas como suero de leche, hidrocarburos, aceites vegetales, melazas de caña de azúcar, salvado de trigo y desechos de frutas y verduras (Gladyshev, Sushchik, & Makhutova, 2013; Li, Horsman, Wang, Wu, & Lan, 2008a). El problema al utilizar este tipo de microorganismos, es el costo de producción, dado que requieren un alto consumo de oxígeno. Recientemente, se han destacado a las microalgas como una alternativa más conveniente que cualquier otro tipo de organismo para la producción de triacilglicéridos, ya que algunas especies oleaginosas, siendo organismos fotosintéticos, sólo requieren energía solar, agua, CO<sub>2</sub> y algunas sales para producir altos rendimientos de biomasa rica en lípidos. De hecho, estos organismos fotosintéticos son más eficientes, absorben más CO<sub>2</sub> y liberan más O<sub>2</sub> que las plantas, crecen extremadamente rápido y llegan a acumular grandes cantidades de diversos productos (Arts, Michael. Brett, Michael. Kainz, 2009; Li, Horsman, Wang, Wu, & Lan, 2008b).

#### **4.2 Las microalgas como fuente de ácidos grasos**

Las algas son componentes importantes de los ecosistemas acuáticos, que representan más de la mitad de la producción primaria total en la base de la cadena alimentaria en todo el mundo. Los lípidos algales son los principales componentes de la dieta para los consumidores primarios, donde son una fuente de energía y nutrientes esenciales. El papel de los ácidos grasos poliinsaturados de algas (incluidos los ácidos grasos esenciales humanos linoleico (LIN; 18: 2 n-6) y  $\alpha$ -linoleico (ALA; 18: 3n-3), así como el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20: 5n- 3) y el ácido docosahexaenoico (DHA; 22: 6n-3) proporcionan una contribución sustancial a la calidad de los alimentos para los invertebrados y son vitales para el mantenimiento somático y crecimiento poblacional, supervivencia y el éxito reproductivo. los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)

---

componentes importantes de la membrana, están involucrados en la regulación de procesos fisiológicos al servir como precursores en la biosíntesis de moléculas bioactivas como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, y resolvinas, que pueden afectar la producción de huevos, el desove y la eclosión, la mediación de respuestas inmunológicas a las infecciones y tienen una amplia gama de otras funciones (Guschina & Harwood, 2006).

La capacidad de las algas para sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales se refleja en la diversidad y el patrón inusual de lípidos celulares, así como en la capacidad de modificar el metabolismo de los lípidos de manera eficiente en respuesta a cambios de las condiciones ambientales. Los lípidos microalgales pueden incluir los lípidos neutros, lípidos polares, ésteres de cera, esteroides e hidrocarburos, derivados como los tocoferoles, carotenoides, terpenos, quinonas y las clorofilas. En condiciones óptimas de crecimiento, las algas sintetizan ácidos grasos principalmente para la esterificación en lípidos de membrana a base de glicerol, que constituyen aproximadamente 5-20% de su peso seco. Los ácidos grasos incluyen especies de cadena media (C10-C14), larga (C16-18), muy larga ( $\geq$ C20) y derivados de ácidos grasos (Hu et al., 2008).

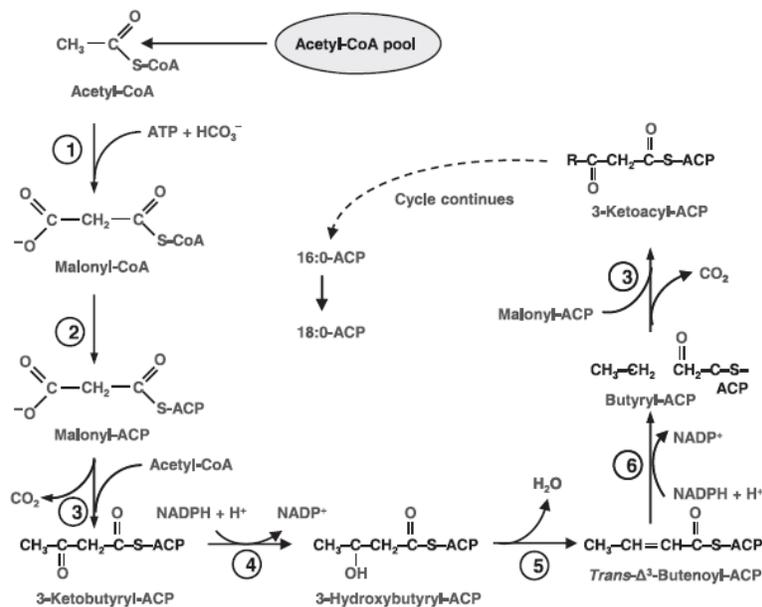
En condiciones ambientales desfavorables o de estrés, muchas algas alteran sus rutas biosintéticas hacia la formación y acumulación de lípidos neutros (20-50% del peso seco), principalmente en forma de triacilglicérols (TAG). A diferencia de los glicerolípidos que se encuentran en las membranas, los TAG no desempeñan un papel estructural, sino que sirven como una forma de almacenamiento de carbono y energía. Después de sintetizarse, los TAG se depositan en cuerpos lipídicos densamente agrupados localizados en el citoplasma, aunque también se produce la formación y acumulación de cuerpos lipídicos en el espacio entre los tilacoides del cloroplasto en ciertas algas verdes, como *Dunaliella bardawil* (Gladyshev et al., 2013; Hu et al., 2008; Saha et al., 2013; Shekh et al., 2016).

Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son predominantes en la mayoría de las algas, en las clorofíceas predominan los ácidos oleico C16:0 y palmítico C18:1 y algunos ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que contienen dos o más dobles enlaces en su estructura, en función del número de dobles enlaces, los ácidos grasos individuales se denominan ácidos grasos dienoico, trienoico, tetraenoico, pentaenoico y hexaenoico.

Además, dependiendo de la posición del primer doble enlace del extremo metilo terminal ( $\omega$ ) de la cadena carbonada, un ácido graso puede ser un PUFA  $\omega$ 3 (es decir, el tercer carbono del extremo del ácido graso) o un PUFA  $\omega$ 6. (es decir, el sexto carbono del final del ácido graso). Los PUFA principales para las algas verdes son el linoleico, linolénico, araquidónico C18:2 $\omega$ 6 C18:3 $\omega$ 3 y C20:4 $\omega$ 6 (Hu et al., 2008; Shekh et al., 2016).

### 4.3 Biosíntesis de ácidos grasos en las microalgas

Los ácidos grasos en las microalgas se producen principalmente en el cloroplasto. En general, la ruta metabólica produce un ácido graso de 16 ó 18 carbonos o ambos. Estos se utilizan luego como precursores para la síntesis de cloroplastos y otras membranas celulares, así como para la síntesis de lípidos de almacenamiento, principalmente TAG, que pueden acumularse en condiciones adversas (Hu et al., 2008).



**Figura 1.** Síntesis de Novo de ácidos grasos en los cloroplastos (Hu et al., 2008).

La figura 1. Muestra la síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto de las células algales, en esta síntesis, el paso más importante es la conversión de acetil CoA en malonil CoA, catalizada por acetilCoA carboxilasa (ACCase). En el cloroplasto, la fotosíntesis

---

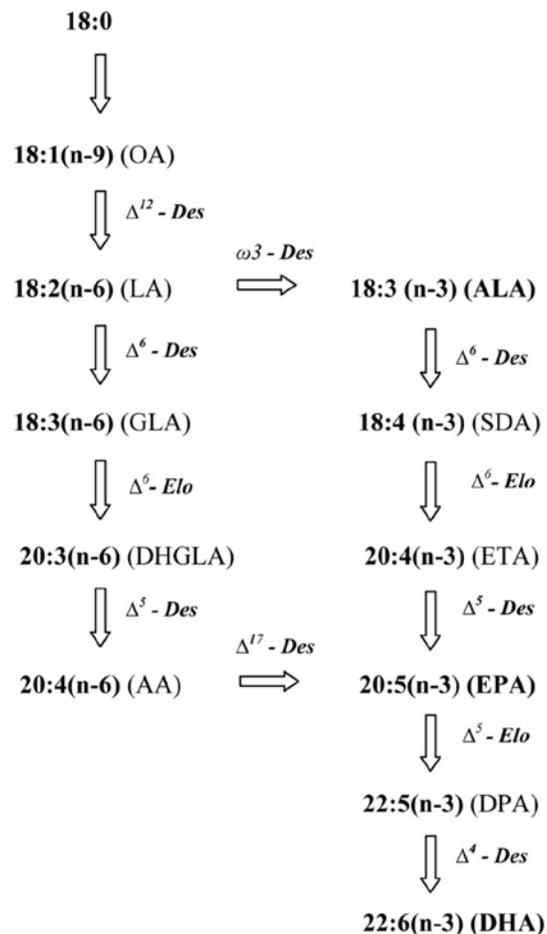
proporciona una fuente endógena de acetil CoA, y más de una vía puede contribuir a donar acetil CoA. En las algas verdes, la piruvato quinasa (PK de la glucólisis), que cataliza la síntesis irreversible de piruvato a partir de PEP, derivado de la glucólisis sea el fotosintato principal para la formación de acetil CoA para la síntesis de ácidos grasos de novo. En general, se considera que una ACCasa cataliza la primera reacción de la ruta biosintética de los ácidos grasos: formando malonil CoA a partir de acetil CoA y CO<sub>2</sub>. El malonil CoA producto de la reacción de carboxilación, es el donador central de carbono para la síntesis de ácidos grasos. El grupo malonilo se transfiere de CoA a un co-factor de proteína en la proteína transportadora de acilo (ACP). Todas las reacciones posteriores de la vía implican la ACP hasta que los productos terminados estén listos para la transferencia a glicerolípidos o para la exportación desde el cloroplasto. El grupo malonilo de la malonil-ACP participa en una serie de reacciones de condensación con aceptores de acil ACP (o acetil CoA). La primera reacción de condensación forma un producto de cuatro carbonos y es catalizada por la enzima de condensación, 3-cetoacil ACP sintasa III (KAS III). Otra enzima de condensación, KAS I, es responsable de producir las diferentes cadenas de carbono elongadas (6-16 carbonos). Tres reacciones adicionales ocurren después de cada condensación. Finalmente para formar un ácido graso saturado, el producto 3-cetoacilACP se reduce mediante la enzima 3-cetoacilACP reductasa, se deshidrata con hidroxiacilcetamida ACP deshidratada y luego se reduce con la enzima enoilACP reductasa. Estas cuatro reacciones conducen a un alargamiento del ácido graso precursor. La ruta de biosíntesis de ácidos grasos produce cadenas elongadas de 16:0-ACP y 18:0-ACP saturados (Hu et al., 2008).

#### **4.4 Ruta metabólica para la producción de AGPIs**

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) están compuestos de ácidos monocarboxílicos (ácidos grasos) unidos a una cadena alifática con múltiples instauraciones. el nombre específico de cada molécula deriva de la cantidad y posición de dichas instauraciones (Guedes et al., 2011).

La biosíntesis de AGPI a partir de microalgas, involucra varias rutas metabólicas, compuestas por una serie de reacciones de desaturación y elongación de las cadenas de

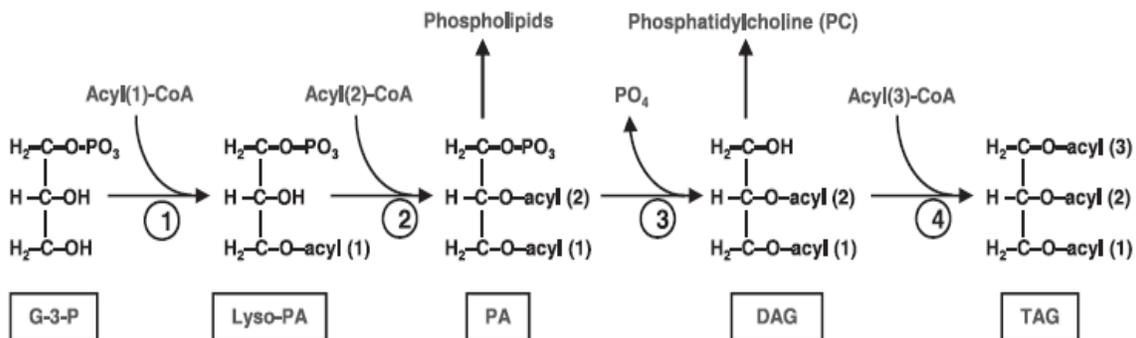
ácidos grasos de 18 carbonos. El primer ácido graso en formarse es el ácido oleico (OA) y a partir de este se sintetizan los ácidos linoléico (LA) y  $\alpha$ -linolénico (ALA). El DHA se sintetiza a partir del ALA por la adición de un doble enlace por la  $\Delta^6$ -desaturasa formando el ácido estearidónico (SDA) que se elonga formando el ácido eicosatetraenoico (ETA), a este se le adiciona otro doble enlace por una  $\Delta^5$ -desaturasa formando el ácido eicosapentaenoico (EPA), este se elonga hasta formar el ácido  $\omega$ 3-docosapentaenoico ( $\omega$ 3 – DPA), y finalmente la adición de una doble cadena por la  $\Delta^4$ -desaturasa para formar el DHA. La formación de EPA a partir del LA, sigue los mismos pasos de elongación y desaturación hasta llegar al DHA (ver figura 2) (Guedes et al., 2011).



**Figura 2.** Ruta biosintética de producción de ácidos poli insaturados tipo omega 3 y omega 6 en microalgas.

#### 4.5 Biosíntesis de Triacilglicerol

La biosíntesis de triacilglicerol en algas (figura 3) se produce a través de la ruta directa del glicerol. Los ácidos grasos producidos en el cloroplasto se transfieren secuencialmente del acetyl CoA a las posiciones 1 y 2 del glicerol-3-fosfato, lo que da como resultado la formación del ácido fosfatídico (PA), metabolito central. La desfosforilación de PA catalizada por una fosfatasa específica libera diacilglicerol (DAG). En el paso final de la síntesis de TAG, un tercer ácido graso se transfiere a la posición vacante 3 DAG, y esta reacción es catalizada por la diacilglicerol aciltransferasa, una reacción enzimática que es única para la biosíntesis de TAG. El PA y el DAG también se pueden usar directamente como sustrato para la síntesis de lípidos polares, como fosfatidilcolina (PC) y galactolípidos. Las aciltransferasas implicadas en la síntesis de TAG pueden exhibir preferencias por moléculas de acil CoA específicas y, por lo tanto, pueden desempeñar un papel importante en la determinación de la composición del acilo final de TAG (Hu et al., 2008).



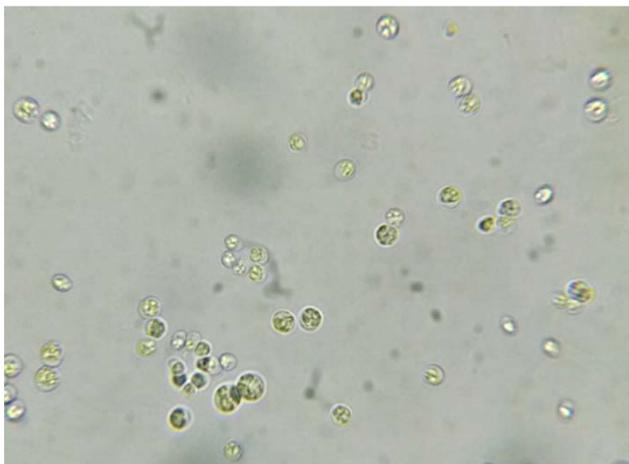
**Figura 3.** Esquema simplificado que muestra la biosíntesis de triacilglicerol en algas (Hu et al., 2008).

Bajo diversas condiciones de estrés, algunas microalgas experimentan una rápida degradación de la membrana fotosintética con la formación y la acumulación de cuerpos lipídicos enriquecidos en TAG citosólicos. Cuando se identifica un compuesto de tipo PDAT (fosfolípido diacilglicerol aciltransferasa) en una célula algal, especialmente en el cloroplasto, entonces es concebible que ese compuesto pueda usar PC (fosfatidilcolina), PE (fosfatidiletanolamina) o incluso galactolípidos derivados de la membrana fotosintética

como donantes de acilo en la síntesis de TAG. Como tal, la síntesis independiente de acilCoA de los TAG podría jugar un papel importante en la regulación de la composición de lípidos de membrana en respuesta a diversas condiciones ambientales (Hu et al., 2008).

#### 4.6 Morfología y taxonomía de *Chlorella* sp

La microalga *Chlorella* sp. es una microalga verde unicelular de forma esférica que tiene la siguiente clasificación y morfología (Krienitz, Huss, & Bock, 2015; Lee, 2008; Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014):



**Figura 4.** Micrografía de la microalga *Chlorella* sp en medio de cultivo heterotrófico, tomada con un microscopio óptico 100X (fuente propia).

Dominio: Eucariota  
Reino: protista  
Orden: *Chlorellales*  
Género: *Chlorella*  
División: *Clorophyta*  
Clase: *Trebouxiophyceae*  
Familia: *Chlorellaceae*  
Especie: *Chlorella* sp

Esta microalga nativa tiene un tamaño celular entre 2-10 $\mu$ m, un núcleo bien definido, Es una célula sin movimiento (autoespora) que se reproduce asexualmente por autoesporulación, este tipo de reproducción es la más común en algas, presenta un tiempo de duplicación de 18-24 horas y se caracteriza por poseer altos contenidos de clorofila a y b (Lee, 2008; Safi et al., 2014).

Ha sido muy estudiada debido a su alto contenido de:

- 
- **Proteínas y aminoácidos esenciales:** las proteínas están involucradas en el crecimiento, reparación y mantenimiento de la célula, poseen funciones como motores celulares, reguladores químicos y defensa a invasores. Esta constituida entre 42-58% de la biomasa seca de la célula y varía según las condiciones de cultivo, el 20% de las proteínas totales están inmersas en la pared celular, más del 50% son internas y el 30 % migran dentro y fuera de la célula (Safi et al., 2014).
  - **Carbohidratos:** está compuesta por algunos azúcares reductores (como rhamnosa, galactosa, glucosa, xilosa, arabinosa y manosa), polisacáridos como el almidón y la celulosa, el almidón se almacena en los cloroplastos y junto con los azúcares sirven como almacenamiento de energía. La celulosa es un polisacárido estructural con alta resistencia, localizado en la pared celular como barrera protectora (compuesta principalmente de  $\beta$ 1-3glucanos). En la pared celular también se encuentra quitosano, hemicelulosa, proteínas, lípidos y minerales (Safi et al., 2014). Además, el bajo contenido de celulosa en su pared celular la hace más fácilmente digerible que la celulosa proveniente de las plantas (Lee, 2008).
  - **Pigmentos:** el pigmento predominante es la clorofila (1-2% del peso seco) se encuentra en los tilacoides, atrapan la energía de la luz y la transfieren a los fotosistema, también, producen pigmentos accesorios como los B-carotenos que tienen propiedades antioxidantes, foto protectora, y fortifica el sistema inmune (Safi et al., 2014)..
  - **Lípidos:** es un grupo heterogéneo, solubles en solventes no polares, y relativamente insolubles en agua. Bajo condiciones óptimas de crecimiento la microalga está compuesta entre 4-5% de lípidos por peso seco de biomasa en su mayoría por glicolípidos, ceras, triacilgliceridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres. Son sintetizados en los cloroplastos y se localizan en pared celular y en membranas de organelas. Bajo condiciones desfavorables el contenido de lípidos (la mayoría compuestos de triacilgliceridos) pueden aumentar hasta un 58% y se acumulan como gotas de lípidos densas en el citoplasma y en el espacio intertilacoidal (Guschina & Harwood, 2006).

- otros compuesto de alto valor nutricional como vitaminas, microminerales, elementos traza, ácidos nucleicos.

Muchas de las especies de este género, pueden crecer heterotróficamente en oscuridad utilizando glucosa como fuente de carbono, autotróficamente en presencia de luz y CO<sub>2</sub>, o crecer de forma mixotrófica utilizando carbono orgánico, CO<sub>2</sub> y luz como fuente de energía (Sansawa & Endo, 2004).

El cultivo de estos microorganismos tiene generalmente un doble propósito, debido a que pueden ser empleadas simultáneamente en la remoción de compuestos contaminantes derivados del nitrógeno, fósforo y carbono (principalmente CO<sub>2</sub> y materia orgánica), para la producción de biomasa que puede ser utilizada en alimentación animal, humana y como fertilizante (Adams, 2005), además, de la producción de metabolitos como proteínas, aminoácidos, antioxidantes y lípidos. Siendo los lípidos de gran importancia para el desarrollo de ácidos grasos poliinsaturados y la producción de biocombustibles de tercera generación (Cooney, Young, & Pate, 2011; Yoo, Jun, Lee, Ahn, & Oh, 2010).

#### **4.7 Condiciones de cultivo y requerimientos nutricionales para la microalga *Chlorella sp***

Todos los microorganismos tienen condiciones de cultivo y requerimiento nutricionales específicos. Las microalgas deben ser cultivadas empleando los nutrientes adecuados para asegurar un buen desarrollo de las células y suplir sus necesidades nutricionales. Estos microorganismos utilizan macronutrientes como carbono, nitrógeno y fósforo, además de micronutrientes como magnesio, zinc, cobre y azufre que son empleados como elementos traza para la producción de enzimas y co-factores (Ohse et al., 2014).

El nitrógeno contribuye a la materia seca y a la composición bioquímica de las células, especialmente en proteínas, aminoácidos, nucleótidos, fosfolípidos y clorofila, además de estar asociado con el metabolismo de los ácidos grasos (Beuckels et al., 2015)

---

Por su parte, el fósforo interviene en la mayoría de los procesos celulares de transferencia de energía, síntesis de ácidos nucleicos y moléculas de alta energía como el ATP (Kozłowska-Szerenos, Bialuk, & Maleszewski, 2004).

El carbono, es un macronutriente que puede suministrarse en forma de carbono orgánico (como la glucosa, acetato, glicerol, fructosa, sacarosa, glicerol, acetato de sodio, ácido acético entre otras) en los cultivos heterotróficos y mixotróficos, y/o en forma de carbono inorgánico, siendo la principal fuente el CO<sub>2</sub> en los cultivos autotróficos (Brennan & Owende, 2010b).

La principal ventaja en los cultivos fotoautotróficos es la fijación del CO<sub>2</sub> (de tres fuentes diferentes: de la atmósfera, de los gases eliminados por la industria o en forma de carbonatos solubles como Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaHCO<sub>3</sub>) y el uso de la luz como fuente de energía química a través de la fotosíntesis, lo que ayuda a la descontaminación ambiental (Huang, Chen, Wei, Zhang, & Chen, 2010; Liu et al., 2011). La concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera es de 0,03 - 0,06 % (0,36 mg/ml) y la mayoría de las microalgas pueden tolerar altos niveles de CO<sub>2</sub>, por lo general hasta 150 mg/ml, por lo que los gases de combustión de algunas plantas de energía, que contienen hasta en 15 % de CO<sub>2</sub>, pueden ser alimentados al medio de cultivo de las microalgas. Las condiciones fotoautotróficas han sido las más utilizadas con fines de obtención de biodiesel y existe una gran variación en el contenido de lípidos obtenidos que va desde el 11 % al 63 %, dependiendo de la especie, generalmente asociado a la limitación de nitrógeno, adición de CO<sub>2</sub> e incremento de la intensidad luminosa, para aumentar el contenido de lípidos en la biomasa (Brennan y Owende, 2010). La proporción de ácidos grasos poliinsaturados en algunas microalgas que han sido estudiadas bajo condiciones de cultivo autotrófico, muestran perfiles de aceites tipo EPA y DHA adecuados y convenientes para la producción de suplementos alimenticios a partir de estos microorganismos, como la microalga *Chlorella vulgaris* que produce 0.009mg de DHA/Ld, 0.504 mg de ALA/L d y 0.550 mg de LA/L d, sin ningún tipo de inducción de aceites (Guedes et al., 2011). Sin embargo, para que este proceso se realice en ambientes controlados se requiere, en muchos casos, luz artificial; lo que obliga a que el proceso incurra en gastos adicionales de energía. Adicionalmente este tipo de cultivos obliga a tener

---

periodos largos de crecimiento y concentraciones no muy altas de biomasa; y aunque su contenido de aceite puede alcanzar hasta un 50% de su peso, su rendimiento no llega a ser competitivo en el mercado de aceites (Conchillo et al., 2006).

Mixotróficamente, las microalgas utilizan carbono orgánico e inorgánico como fuente de carbono y captan la energía de la luz y del carbono orgánico como fuente de energía (Chen, Yeh, Aisyah, Lee, & Chang, 2011; Krzemińska, Piasecka, Nosalewicz, Simionato, & Wawrzykowski, 2015). La principal diferencia entre cultivos mixotróficos y fotoheterotróficos es que estos últimos no requieren de luz para la incorporación del carbono orgánico. Por lo tanto, este tipo de cultivo necesita de luz y azúcares al mismo tiempo, pero este tipo de cultivo para la producción de lípidos en microalgas es poco común. El cultivo mixotrófico también ha mostrado ser una buena estrategia para aumentar la productividad de lípidos en algunas especies de *Chlorella* con el beneficio adicional de que se producen metabolitos fotosintéticos como  $\beta$ -caroteno, astaxantina y luteína (Arias, Martínez, & Cañizares, 2013) (Arias et al., 2013; Liang, Sarkany, & Cui, 2009; Trinidad et al., 2013; Yeh & Chang, 2012).

Los cultivos heterotróficos desde una perspectiva de ingeniería provee ventajas competitivas ya que no se necesita luz, se utiliza una fuente de carbono orgánica lo que disminuye el tiempo de crecimiento y se obtienen altas concentraciones de biomasa; adicionalmente se mejoran los rendimientos en la producción de lípidos totales. Algunas especies de microalgas presentan mayor velocidad de crecimiento y productividad de lípidos en condiciones heterotróficas como es el caso de *Chlorella*, la cual ha sido ampliamente estudiada, en cultivos con glucosa y bajas concentraciones de nitrógeno, obteniéndose valores de lípidos 3,4 veces mayores que en condiciones fotoautotróficas (Conchillo et al., 2006; Miao & Wu, 2004; Safi et al., 2014; Shen, Liu, Chu, Lam, & Zeng, 2015). Algunas microalgas cultivadas bajo condiciones heterotróficas producen AGPI de tipo EPA y DHA sobre el total de ácidos grasos, en las siguientes proporciones: *Chlorella elongata* (28% de EPA), *Chlorella minutísima* (45% de EPA), *Isochrysis galbana* (15% de EPA y 7.5% de DHA) y *Rhodomonas sp* (8.7% de EPA y 4.6% de DHA) (Wen & Chen, 2003). Este tipo de cultivo tiene varias limitaciones entre las que se pueden mencionar los

---

problemas de contaminación y el costo del sustrato; por esta razón algunos estudios se han centrado en la búsqueda de fuentes de carbono orgánico más económicas, es el caso de los residuos orgánicos industriales como el polvo de maíz, el almidón de yuca hidrolizado o las aguas residuales municipales (Xu, Miao, & Wu, 2006).

#### **4.8 Factores abióticos que afectan la producción de ácidos grasos**

Las microalgas sintetizan ácidos grasos como precursores para la síntesis de varios tipos de lípidos, los cuales varían dependiendo de la especie: lípidos polares, lípidos neutrales, ceras, esteroides, fosfo-lípidos, glicolípidos, carotenoides, terpenos, tocoferoles, quinonas. Sin embargo, sólo los lípidos neutros como los triacilglicéridos y son usados para la producción de biodiesel y como fuente de AGPI (Hu et al., 2008).

El contenido total de los lípidos en las microalgas puede variar desde 1 hasta 90% del peso seco, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo. Las microalgas tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones diversas y extremas, lo cual se refleja en la enorme diversidad y muchas veces a su inusual patrón de lípidos intracelulares. Algunas microalgas pueden también modificar el metabolismo de los lípidos de manera eficiente en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (R. N. Singh & Sharma, 2012).

En condiciones óptimas de crecimiento, se producen grandes cantidades de biomasa microalgal, pero con contenidos lipídicos relativamente bajos, en condiciones ambientales desfavorables o estrés, muchas microalgas alteran sus rutas biosintéticas de lípidos hacia la formación y acumulación de lípidos neutros, principalmente en forma de triglicéridos, acompañada por considerables alteraciones en la composición de los lípidos y ácidos grasos, lo que permite que las microalgas puedan soportar estas condiciones adversas (Hu et al., 2008; Shekh et al., 2016).

Los principales estímulos químicos que generan estrés son: la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad y el pH del medio de cultivo; los estímulos físicos son la temperatura y la intensidad luminosa (Ra, Kang, Kim, Lee, & Kim, 2015; Renaud, Thinh, Lambrinidis, & Parry, 2002; Wu et al., 2013). La deficiencia de nitrógeno es, con respecto a los nutrientes, el factor que más afecta el metabolismo de los

lípidos, Además de estos factores, la fase de crecimiento y la edad del cultivo también afectan al contenido y composición de los ácidos grasos, observándose un mayor contenido de lípidos en la fase estacionaria con respecto a la fase exponencial (Hu et al., 2008; Li et al., 2008a; Singhasuwan, Choorit, Sirisansaneeyakul, Kokkaew, & Chisti, 2015a). Con respecto a la fase de crecimiento, la microalga *Parietochloris incisa* mostró un alto contenido de triacilgliceroles (43% del total de ácidos grasos) en la fase logarítmica, el cual aumentó hasta 77% en la fase estacionaria (Bigogno, Khozin-Goldberg, Boussiba, Vonshak, & Cohen, 2002).

En Colombia son pocos los estudios que se han realizado sobre la evaluación de los nutrientes del medio de cultivo para inducir la producción de aceites. Serrano (2011), evaluaron el efecto del ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) sobre el crecimiento y acumulación de lípidos totales de la microalga *Chlorella vulgaris*. El medio enriquecido con una concentración de  $10,0 \mu\text{M}$  de hierro produjo la máxima velocidad específica de crecimiento celular ( $0,76 \text{ día}^{-1}$ ), mientras que las máximas productividades de biomasa y de lípidos se presentaron a la concentración  $5,00 \mu\text{M}$  de hierro con valores de  $112,4 \text{ mg/Ldía}$  y  $6,52 \text{ mg/Ldía}$  respectivamente. Para las concentraciones más altas de hierro ( $21,5$  y  $50,0 \mu\text{M}$ ), la microalga presentó inhibición por sustrato. Finalmente, para concentraciones menores que  $10,0 \mu\text{M}$  se encontró que no afecta significativamente la productividad de biomasa y lípidos. Posteriormente, Serrano (2012) estudió la composición y capacidad de acumulación de lípidos en cuatro microalgas nativas de Colombia y un alga de referencia (*Botryococcus braunii*) como fuentes potenciales para la producción de biodiesel. Las microalgas *Scenedemus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* presentaron las mayores productividades de lípidos con  $18,8$  y  $18,7 \text{ mg/Ldía}$ , respectivamente, las microalgas marinas *Nannochloropsis* e *Isochrysis* tuvieron las menores productividades de lípidos:  $10,8$  y  $4,97 \text{ mg/Ldía}$ , *Botryococcus* fue  $10,07 \text{ mg/Ldía}$  (Serrano Bermúdez, 2012; Serrano Bermúdez, 2011))

Arias et al. (2013) realizaron una revisión literaria que abarcó los últimos 13 años, en esta se relacionaron algunas microalgas con gran potencial para la producción de biocombustibles de tercera generación. El cultivo de estas especies se realizó ante condiciones de estrés fisiológico que favorecen la producción de aceites, como son la

limitación de nutrientes, altas intensidades lumínicas, la presencia de pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> y la cosecha de la biomasa en fase estacionaria de crecimiento. En la revisión se rescatan algunas microalgas de agua dulce de la especie *Chlorella* que tienen un porcentaje de hasta 63% de su peso seco en lípidos, como es el caso de *Chlorella emersonii* (63%), *Chlorella protheicoides* (11-59%), *Chlorella pyrenoidosa* (27%), *Chlorella sorokiniana* (13-23%), *Chlorella sacchorophila* (18-54%), *Chlorella* sp (19-43%), *Chlorella vulgaris* (15-58%), y *Chlorella sofingiensis* (51%), además de algunas especies marinas como *Chlorella minutísima* (57%) *Chlorella* sp (35-52%) y *Chlorella vulgaris* (57%) altamente productoras de aceites (Arias et al., 2013)

En los estudios anteriores se observa claramente que cambiar las condiciones de cultivo inducen un estrés fisiológico en las células, lo que incrementa el contenido de lípidos, por tal razón, se están planteando nuevas metodologías de cultivo, como es el caso de los cultivos en dos etapas, estos sistemas se utilizan para maximizar la producción de biomasa utilizando un medio de cultivo rico en nutrientes, seguido de una segunda etapa de cultivo en el cual se inducen las condiciones de estrés fisiológico ya sea por limitación de nutrientes o por factores ambientales. Hasta el momento solo se ha realizado un estudio donde se utiliza esta metodología en dos etapas, en la cual se evaluaron cuatro especies de microalgas marinas, *Isochrysis galbana*, *Nanochloropsis oculata*, *Dunaliella salina* y *Dunaliella tertiolecta*, estas microalgas se cultivan en una primera etapa con un medio de cultivo rico en nitratos y concentración de sal adecuada para asegurar una buena productividad de biomasa y posteriormente se cambia el medio de cultivo por uno que tiene baja concentración de sal generando un estrés iónico y osmótico en la célula, el contenido de lípidos aumenta notablemente en las 4 especies de microalgas, *I. galbana* aumenta de 24%-47% en 2 días de cultivo, *N. oculata* aumenta de 17%-29% en 3 días de cultivo, *D. salina* aumenta de 22%-43% en 2 días de cultivo y *D. tertiolecta* aumenta de 23%- 40% en 2 días de cultivo (Ra et al., 2015).

#### 4.8.1 Fuente de nitrógeno

El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) o como amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Es también un factor crítico para

---

regular el contenido de lípidos de las microalgas (Amsler, 2008; Andersen, 2005). Típicamente, las microalgas tienen un contenido lipídico aproximadamente del 20%, pero cuando el nitrógeno se convierte en el factor limitante del crecimiento, la acumulación de los niveles de lípidos aumenta en más de 40%. Sin embargo, usando la limitación de nitrógeno para estimular la acumulación de lípidos en las células de algas, a menudo reduce la producción de algas, lo que sugiere que las 2 condiciones, alto contenido en lípidos y alta productividad, pueden ser mutuamente excluyentes (Fu et al., 2017; Sakarika & Kornaros, 2017; Xin et al., 2010).

Como el estudio realizado por Li *et al.* (2008) los cuales evaluaron el efecto de la fuente de nitrógeno y su concentración en el crecimiento celular y la acumulación de lípidos de la microalga *Neochloris oleoabundans*, esta microalga aumenta el contenido de aceites de 0.40 g aceites/g biomasa con la concentración más baja de nitratos (0.3mM) y alcanza una productividad de biomasa de 0,133 g/Ld, pero, con una concentración de nitratos de 5mM se obtienen 0.34 g aceites/g biomasa y una productividad de biomasa de 0,4 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, se evidencia que a mayor concentración de nitratos mejora la productividad de biomasa pero a bajas concentraciones de nitratos mejora la producción de lípidos por la célula (Li et al., 2008a). Otros autores evaluaron la producción de aceites de *Monoraphidium sp.* cultivada a diferentes temperaturas y fuentes de nitrógeno, esta microalga a 25°C y 3.6mM de KNO<sub>3</sub> aumenta de 34-50% sus AGPI sobre el total de ácidos grasos (Wu et al., 2013).

Dado que la disminución de nutrientes limita el crecimiento celular, al momento de seleccionar las condiciones de cultivo que favorezcan la acumulación de lípidos, es necesario maximizar su productividad volumétrica para cada cepa. Las microalgas son capaces de crecer y sintetizar lípidos empleando diversas fuentes de nitrógeno, y se ha reportado al nitrato como la mejor fuente de nitrógeno para *Chlorella protothecoides*, *Dunaliella tertiolecta* y *Neochloris oleoabundans*. Mientras que *Scenedesmus dimorphus* y *Scenedesmus rubescens* presentaron mayor afinidad por urea y amonio, respectivamente (Chen et al., 2011; Li et al., 2008a; Lv, Cheng, Xu, Zhang, & Chen, 2010) y en *Chlorella saccharophila* se observó mejor crecimiento con peptona como fuente de nitrógeno que con nitrato y amonio (Arias et al., 2013).

---

El nitrógeno es el nutriente más crítico de todos los que afectan el metabolismo de las microalgas. En términos generales el resultado de una disminución de nitrógeno disponible en el medio resulta en un aumento en la acumulación de lípidos, particularmente TAG, esto se ha observado en varias cepas y especies de microalgas. Particularmente en *Chlorella vulgaris* se ha visto un incremento de 40% y hasta de 2.5 veces cuando se cultiva en medios con deficiencia de N (R. N. Singh & Sharma, 2012). El cambio gradual hacia un medio deficiente de nitrógeno cambia la composición de los lípidos, pasando de lípidos ricos en ácidos grasos libres a lípidos ricos en TAG, además, los pigmentos (moléculas de carácter lipídico) también se ven incrementados con la deficiencia de Nitrógeno (Leyva soto, 2014).

La acumulación de metabolitos secundarios como pigmentos (carotenos) es otra característica de algunas microalgas cuando son cultivadas en medios con limitación del nitrógeno, el cual va acompañado de una disminución en el contenido de clorofila de las células y también puede aumentar el tamaño celular (Yen et al., 2013a). Específicamente se han observado aumentos notables en la producción de  $\beta$ -carotenos en cultivos de *Dunaliella* bajo condiciones de limitación de nitrógeno, y mayor cantidad de astaxantina en la microalga *Haematococcus pluvialis* produce (Molina E, 2011; Ruiz, Diana, Rodríguez, & Castro Gómez, 2016).

En los cultivos heterotróficos cuando se varía la relación carbono/nitrógeno del medio de cultivo se ve afectada la productividad de biomasa y el contenido de ácidos grasos en las microalgas, la microalga *Chlorella* sp TISTR8990 maximiza su producción de biomasa cuando la relación C/N es de 29/1 teniendo una productividad de biomasa de 0.68g/Ld, y un rendimiento de biomasa en glucosa de 0.62g/g, el contenido de ácidos grasos totales aumento a 495 mg/g biomasa cuando la relación C/N es de 95/1; cuando la relación C/N es más baja el contenido de ácidos grasos disminuye (Singhasuwan, Choorit, Sirisansaneeyakul, Kokkaew, & Chisti, 2015b). Cuando se optimizan las condiciones del cultivo heterotrófico de la microalga se pueden asegurar condiciones de cultivo óptimas para aumentar la producción de biomasa o la productividad de aceites en la misma, como en el estudio realizado por Xie *et al.* (2012) donde se obtuvieron mayores productividades

---

de lípidos (247mg/Ld) bajo condiciones de concentración de glucosa (26.2 g/L), nitratos (2.06g/L) y temperatura de 18°C (Xie et al., 2012)

#### 4.8.2 Fuente de Fósforo

El fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos para la transmisión de la información genética (ADN) y la transferencia de energía (ATP), transducción de señales, fotosíntesis y respiración. Aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1%, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones del crecimiento celular. En los medios de cultivo suele incorporarse en forma de  $\text{HPO}_4^{2-}$  o  $\text{HPO}_4$  que es la forma como se encuentra en las fuentes de agua (Arora, Patel, Pruthi, & Pruthi, 2016; P. Singh, Guldhe, Kumari, Rawat, & Bux, 2015)

El fósforo es un nutriente que influye positivamente en la síntesis de la biomasa microalgal, y en el contenido de lípidos, pues este último aumenta al incrementar los niveles de fósforo, bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno. El exceso de fósforo se puede almacenar en forma de polifosfato (Poly-P), proporcionando así la energía que esta almacenada en los enlaces fosfoanhídrido, esta forma de almacenamiento de energía también puede servir como una fuente similar al ATP que puede ser utilizada en los procesos anabólicos cuando hay inanición de nitrógeno, participando en la síntesis de material celular, producción de ácidos grasos, proteínas, ADN, ARN y productos metabólicos intermediarios (Chu et al., 2013; Fu et al., 2017). En el estudio realizado por Fu *et al.*, (2017) donde trabajaron con la microalga *Chlorella regularis* e identificaron que el fósforo se acumuló en la microalga en forma de diéster de ortofosfato. Los diésteres de orofosfatos. La combinación de la limitación de nitrógeno y la presencia abundante de fósforo en el medio es una estrategia efectiva para mejorar la producción de ácidos grasos en la microalga *C. regularis* durante el cultivo heterotrófico.

En otro estudio se encontró que la limitación de nitrógeno y fósforo aumenta el contenido de lípidos y desplaza la composición lipídica hacia los la producción de TAG, aunque se sabe poco sobre los mecanismos subyacentes, la limitación de nitrógeno (2,5 mg.L-1) y fósforo (0,1 mg.L-1) para la microalga *Scenedesmus* sp. LX1, causó un aumento

considerable del contenido de lípidos (30 y 53%, respectivamente), pero la productividad neta de lípidos se reduce porque hay una disminución de la tasa de crecimiento de la microalga. Pero otros autores han encontrado que bajo limitación de nitrógeno y fósforo se obtiene un aumento neto de la productividad de lípidos, a pesar de la reducción en las tasas de crecimiento (Xin et al., 2010).

### 4.8.3 Temperatura

La temperatura es un parámetro muy importante tanto en sistemas cerrados como abiertos, este factor influye en las reacciones fotoquímicas, afecta las reacciones celulares, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa, así como la solubilidad de los gases en el agua. Se considera a la temperatura letal cuando está por encima de 35°C, y si está por debajo de 16°C disminuye la tasa de crecimiento. La temperatura óptima varía entre las especies, pero en general está entre 25° y 35°C. La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie. Por encima de esta, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global. En un sistema de cultivo cerrado, la temperatura se puede controlar por varios mecanismos, tales como rociadores de agua, inmersión del colector solar en piscinas, reactor dentro de un invernadero, etc. Por el contrario, en un sistema de cultivo abierto es muy difícil de controlar, aunque se pueden realizar ciertas acciones simples para disminuir el efecto, como cubrir los estanques con plásticos y telas (Hernández Pérez & Labbé, 2014).

Las variaciones de temperatura provocan cambios en la velocidad de crecimiento, en el contenido de lípidos y en la composición de los ácidos grasos en la célula, además de que los efectos son específicos para cada especie. Se ha observado en muchas algas y cianobacterias que la insaturación de los ácidos grasos se incrementa cuando desciende la temperatura y, cuando la temperatura aumenta, aumenta la saturación de los ácidos grasos (Hu et al., 2008; Loera-Quezada & Olgún, 2010).

Estudios realizados por Converti *et al.* (2009) mostraron que en cultivos de *Nannochloropsis oculata* al modificar la temperatura de 25 a 20 °C el contenido de lípidos disminuyó de 13,89 a 7,9 %, pero al disminuir hasta 15 °C se incrementó nuevamente

---

hasta 14,92. Sin embargo como la tasa de crecimiento se vio afectada por los cambios de temperatura, la productividad de los lípidos no presentó variación. Por el contrario el crecimiento de *Chlorella vulgaris* se vio afectado a temperaturas superiores a los 35 °C y una variación en la temperatura de 30 a 25 °C permitió un incremento en el contenido de lípidos de 5,9 a 14,7 % y como la tasa de crecimiento no se vio afectada a estas temperaturas, la productividad de los lípidos aumentó de 8 a 20 mg/l.d (Converti, Casazza, Ortiz, Perego, & Del Borghi, 2009). Raghavan *et al.*, 2008 evaluaron el efecto de la temperatura, el nivel de CO<sub>2</sub> y la salinidad sobre el crecimiento y composición de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* y encontraron que el contenido de lípidos fue mayor a bajas temperaturas entre 20 y 25°C (Raghavan, Haridevi, & Gopinathan, 2008).

#### 4.8.4 pH

El pH del cultivo está influenciado por varios factores como la productividad algal, la respiración, la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica y heterotrófica y la eficiencia del sistema de adición de CO<sub>2</sub>. Como en los otros parámetros, cada especie necesita un rango determinado de pH que permita un crecimiento óptimo, siendo pH 8 el más indicado para especies dulceacuícolas. Por encima o debajo de éste, presentan un descenso en la productividad, que no solo afecta el crecimiento algal, sino también la capacidad de remover el nitrógeno en sistemas de tratamientos de aguas (Hernández Pérez & Labbé, 2014). La respuesta de las microalgas al pH varía ampliamente, debido a que este factor determina la solubilidad del dióxido de carbono y de los minerales en los cultivos e influye directa o indirectamente en su metabolismo, un adecuado pH en el medio de cultivo influye en la disponibilidad de nutrientes por lo que a pH altos (aproximado a 10) se da la precipitación de hidróxido férrico y fosfato férrico, y a pH bajos se ocasionan daños a nivel metabólico. El monitoreo del pH es importante ya que cualquier cambio brusco afecta a la composición bioquímica, crecimiento y producción de metabolitos secundarios. El pH óptimo de la cepa *Chlorella sp* está entre 9 y 8 (Valladares Peñaherrera, 2014).

#### 4.9 Sistemas de cultivo

Los cultivos de microalgas se pueden llevar a cabo en sistemas de estanques abiertos (open ponds) o en sistemas cerrados (fotobiorreactores). Los sistemas abiertos son actualmente los más empleados, pero están limitados por algunos parámetros que son claves para el crecimiento celular, como la intensidad de la luz, la temperatura, el pH y la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto, además, requieren de grandes áreas para el cultivo, demandan mucha agua, no poseen sistemas de control, se obtienen bajas concentraciones de biomasa y requieren de largos periodos para el crecimiento celular (Rawat, Ranjith Kumar, Mutanda, & Bux, 2013). Los cultivos al aire libre son por tanto susceptibles a la contaminación por depredadores y por microorganismos que compiten por los nutrientes del medio. La contaminación puede limitar el sistema de cultivo a cepas que puede crecer sólo bajo condiciones severas como *Dunaliella* que soporta alta salinidad, *Spirulina* que crece a alta alcalinidad y *Chlorella* que soporta altas concentraciones de nutrientes (Harun et al., 2010). Entre los sistemas abiertos encontramos los estanques abiertos circulares, lagunas abiertas y raceway, constan de un estanque horizontal y poco profundo, en estos la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> es baja por lo que del 20-50% del gas inyectado es fijado por las microalgas. Es menos costoso y se consiguen altas tasas de producción, sin embargo se dificulta el crecimiento monoalgal ya que se puede contaminar con otras microalgas y se complica el control de agua por evaporación, de la temperatura, pH y la penetración de la luz en el cultivo, el sistema de mezclado es deficiente lo que origina una baja concentración celular, la cual a su vez, origina una baja productividad, además ocupa grandes extensiones de terreno (Loera-Quezada & Olguín, 2010; Valladares Peñaherrera, 2014).

Los sistemas cerrados denominados fotobiorreactores (FBR), aportan un mejor control de parámetros que los sistemas abiertos, la productividad de los fotobiorreactores puede ser hasta 13 veces mayor que en los sistemas abiertos (Rawat et al., 2013). Existen varias configuraciones de FBR como las columnas de burbujeo verticales, horizontales y helicoidales, los air-lift, los cilindros verticales, serpentines horizontales y paneles verticales. Los FBR necesitan de poco espacio, las concentraciones y rendimientos obtenidos son altos, no se contaminan fácilmente, hay una mayor disponibilidad del CO<sub>2</sub>, poseen una alta reproducibilidad y el crecimiento celular es rápido. Estos sistemas son

---

construidos de materiales transparentes y son comúnmente instalados a la intemperie para usar iluminación natural, además, permiten una gran relación entre área superficial y volumen de cultivo, lo que mejora sustancialmente los fenómenos de transferencia de masa y calor (Harun et al., 2010). Los cultivos heterotróficos proveen ventajas con respecto a los autotróficos ya que no se necesita luz, se utiliza una fuente de carbono orgánica como la glucosa, el glicerol, entre otras, se pueden realizar en tanques agitados, fermentadores, columnas de burbujeo y air-lift, aumentando la productividad de biomasa, disminuyendo el tiempo de crecimiento de la biomasa y los costos energéticos de la fuente lumínica (Safi et al., 2014).

Finalmente, muy pocos estudios sobre la inducción de lípidos por limitaciones de nutrientes se han realizado con reactores a escala piloto. Rodolfi et al., (2009) seleccionaron a *Nannochloropsis* sp por haber acumulado el 60% de lípidos bajo condiciones de limitación de nitrógeno. Realizaron experimentos con fotobiorreactores (FBRs) de 110 litros, y compararon las productividades de los cultivos en medio con suficiente nitrógeno, como en un medio que es deficiente de nitrógeno. Se encontró en el primer medio, que esta microalga marina contenía 32 % de lípidos, con una productividad de biomasa de 0.36 g/Ld y una productividad de lípidos de 117 mg/Ld. En contraste, en condiciones con limitación de nitrógeno, el contenido de lípidos aumentó al 60% y la productividad de lípidos a 204 mg/Ld, pero la productividad de biomasa disminuyó a 0.3 g/Ld. Los autores señalan que se pueden obtener entre 20 y 30 toneladas de lípidos por hectárea, aunque estos datos deben considerarse con reserva, dado que la unidad experimental utilizada para generarlos fue de un volumen de 110 litros (Rodolfi et al., 2009).

Una manera de evitar algunas de las principales desventajas del uso de las lagunas abiertas y de los fotobiorreactores, es optar por un cultivo que integra ambos sistemas, el sistema de cultivo híbrido. La combinación de ambos sistemas es probablemente la elección más adecuada para obtener la mayor productividad tanto de biomasa como de lípidos, ya que la mayoría de las microalgas no acumulan biomasa ni producen lípidos de manera simultánea. Este sistema se realiza en dos etapas, en la primera se incrementa la densidad celular y en la segunda se incrementa la acumulación de lípidos. La primera etapa se lleva a cabo en sistemas cerrados (FBRs), que pueden ser desde simples bolsas de plástico hasta FBRs de

---

alta complejidad. El objetivo en esta etapa, es obtener la mayor densidad celular posible y minimizar el riesgo de contaminación, bajo condiciones de suficiencia de nutrientes. La segunda etapa se realiza en lagunas abiertas usando el inóculo producido en el primer paso y se estimula la biosíntesis de lípidos bajo condiciones de limitación de nutrientes. El resultado esperado es una alta densidad celular y un alto contenido de aceite. Este sistema fue adaptado exitosamente para el cultivo a escala comercial de *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina y aceite (Loera-Quezada & Olguín, 2010)

#### **4.10 Extracción de aceites**

##### **4.10.1 Cosecha de biomasa:**

Después de obtener altas concentraciones de biomasa e inducir la producción de lípidos intracelulares se procede a cosechar la biomasa, la microalga tiene un tamaño entre 2-10 $\mu$ m el cual hay que tener en cuenta para su posterior recuperación o cosecha. El sistema de recolección de la biomasa se puede realizar por medio de diferentes operaciones unitarias como la filtración, sedimentación, floculación, o centrifugación (Harun et al., 2010).

La centrifugación es la manera más rápida y efectiva de recuperar la biomasa celular, obteniendo hasta un 95% de recuperación de biomasa a 13000xg, separándola del medio de cultivo, pero presenta problemas a escala industrial, debidas al aumento en el costo de separación por el alto consumo de energía haciendo de esta técnica económicamente desfavorable, sin embargo, la centrifugación es empleada cuando se obtienen productos de alto valor agregado, la biomasa de las microalgas se consigue separar del medio de cultivo más rápidamente aumentando el campo gravitacional al que se somete la suspensión, además, es eficiente y no rompe la biomasa de tal forma que se recuperan las células intactas para la posterior extracción de los productos intracelulares, pues si se rompen las células se pueden perder estos productos en el medio de cultivo (Loera-Quezada & Olguín, 2010; Rawat et al., 2013; Taberner, Martín del Valle, & Galán, 2012).

La sedimentación por gravedad es preferida debido a su bajo costo, pero la eficiencia de la sedimentación depende de la densidad y el tamaño de la microalga, la floculación es

---

utilizada para aumentar la densidad de la partícula y puede ser empleada como paso inicial para facilitar el proceso. La desventaja de la sedimentación es que se da muy lentamente ( $0.1-2.6 \text{ cm h}^{-1}$ ), a pesar de eso en el proceso solo se gasta energía en el bombeo de la suspensión del tanque de cultivo al tanque de sedimentación y se puede reutilizar el medio de cultivo, pero si se utilizan floculantes químicos estas sustancias pueden llegar a ser tóxicas para la microalga incluso pueden producir la muerte, por esto en los procesos de sedimentación que utilizan floculantes no se debe hacer reutilización del medio de cultivo, incurriendo en mayores gastos de producción (Rawat et al., 2013). Las microalgas tienen carga negativa en la superficie celular, por lo que se requiere floculantes químicos catiónicos para la coagulación de la biomasa, como el  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{FeCl}_3$ , o  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  (Harun et al., 2010). La carga negativa de la célula también disminuye cuando se aumenta el pH a más de 8,5 y puede causar auto floculación lo cual ha sido efectivo en la remoción de la microalga *Dunaliella testolata* (Rawat et al., 2013).

La filtración es otra técnica que puede ser utilizada pero es más efectiva para microalgas de mayor tamaño 30 - 70  $\mu\text{m}$  cuando funciona con presión, con el uso de ayudas filtro o incluso realizando una floculación previa, pero la filtración convencional es insuficiente para recuperar altos volúmenes de producción, debido a que puede ser muy lento el proceso de recuperación por el pequeño tamaño de las algas, es tedioso pues se satura fácilmente el filtro y consume mucha energía en el tiempo, los filtros prensa son recomendados para recuperar microalgas de gran tamaño como *Spirulina platensis*. La microfiltración y ultrafiltración es utilizada para pequeños tamaños de biomasa pero es costosa y se satura fácilmente por lo que no es adecuada para procesos a gran escala (Rawat et al., 2013).

#### **4.10.2 Proceso de extracción y purificación de lípidos:**

Después de recuperar la biomasa se realiza la extracción de los lípidos intracelulares de la biomasa, para esto se debe romper previamente la biomasa. La disrupción celular es el proceso de separación de lípidos y otras cadenas no lipídicas de la biomasa y el material celular como proteínas, ADN, entre otros. Este proceso es necesario antes de la etapa de extracción. Los agentes empleados para la disrupción celular no pueden degradar las cadenas lipídicas. Los cinco métodos más empleados de disrupción son: los mecánicos

---

como los sistemas a alta presión, las autoclaves, las perlas de vidrio, la sonicación y los procesos de choque osmótico. Los filtros prensa o prensa francesa, que utilizan altas presiones, la homogenización y los molinos de bolas son los más utilizados a escala industrial y proveen buenas eficiencias, aunque las células microalgales por ser unicelulares pueden escapar del proceso de compresión y así no romperse la pared celular, pero recientemente se está utilizando la electroporación en el cual se aplica un campo eléctrico a las células para perforar la pared para tener los lípidos disponibles (Rawat et al., 2013).

La extracción con solventes, como el hexano, cloroformo, benceno, dietileter y etanol son los más utilizados, se mezclan con la biomasa y son recuperados por destilación, después de extraer el aceite debe ser fraccionado para tener los ácidos grasos individuales si es el caso (Rawat et al., 2013).

La extracción con fluidos supercríticos no necesita de un catalizador, por lo tanto el fluido, que puede ser el CO<sub>2</sub> se calienta y se comprime hasta que alcanza el estado líquido-gas por encima de su punto crítico, luego se añade a la microalga y actúa como un disolvente. Este proceso requiere equipos que trabajan a altas presiones, alto consumo de energía y la implementación de gases como el CO<sub>2</sub> que son costosos, aumentando los costos, pero se obtiene una recuperación del 100% de los lípidos (Rawat et al., 2013; Tabernero et al., 2012)

---

## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 Revisión bibliográfica

Se hizo una revisión bibliográfica continua en bases de datos bibliográficas sobre las temáticas relacionadas con las condiciones de estrés que conllevan a la producción de aceites en la microalga *Chlorella sp.* Estos artículos se almacenaron de manera sistemática utilizando el programa Mendeley.

### 5.2 Métodos analíticos

#### 5.2.1 Concentración de biomasa

Se empleó la metodología de peso seco. Se tomaron 2mL del cultivo en crecimiento en eppendorfs previamente secados y pesados, se centrifugó a 15000rpm/10min. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con agua destilada, se llevó nuevamente a centrifugación bajo las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y el pellet con la biomasa se llevó a un horno a 105 °C/12 h. Finalmente se puso en un desecador hasta alcanzar un peso constante (Arredondo & Voltolina, 2007).

#### 5.2.2 Concentración de nitratos.

La concentración de nitratos fue cuantificada mediante el método del ácido salicílico reportado por Palomino *et al.* (1997) para determinar nitratos en el plasma. Las lecturas se realizaron en un lector de microplatos Synergy a 410 nm. La curva de calibración se construye a partir de una solución concentrada de KNO<sub>3</sub> (ver anexo 9.1).

#### 5.2.3 Concentración de fosfatos

La concentración de fosfatos se determinó por el método del ácido ascórbico reportado por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater para muestras de agua dulce modificado en el grupo de bioprocesos (APA, 2005). Las lecturas se llevaron a cabo en un lector de microplatos Synergy a 880 nm. La curva de calibración se construyó a partir de una solución concentrada de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (ver anexo 9.2)

### 5.2.4 Concentración de glucosa

La concentración de Glucosa se cuantificó por el método de la glucosa oxidasa, utilizando el kit Glucose de Biosystem. Las lecturas se llevaron a cabo en un lector de microplatos Synergy a 500 nm.

### 5.2.5 Extracción y contenido de lípidos

El contenido de lípidos (g lípidos/g biomasa seca\*100) se determinó por la metodología gravimétrica, acoplado el método de Bligh y Dyer (1959) y Folch *et al.* (1956) con la ruptura mecánica de las células por sonicación. Este método se realizó en varias etapas: primero se tomaron 4ml de medio de cultivo, se separó la biomasa del medio de cultivo por centrifugación a 15000rpm/10min; la biomasa se resuspendió en 1mL de solución cloroformo:metanol (relación 2:1) y se llevó a un ultrasonido por 2 horas a 30 hz, posteriormente se centrifugó a 15000rpm/10min separándose la biomasa del solvente, se recuperó la fase del solvente con los aceites en un tubo eppendorf previamente pesado, se adicionó 1mL de solución salina (0.9%) para remover material no lipídico que se arrastró con el solvente (González *et al.*, 2009) y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, la fase acuosa se descartó y el eppendorf con los solventes se llevó a una estufa para su evaporación a 80°C hasta tener peso constante.

### 5.3 Microorganismo y medio de cultivo

La microalga *Chlorella* sp. pertenece al cepario del grupo de Bioprocesos de la Facultad de ingeniería, Universidad de Antioquia. La cepa se aisló del lago del parque norte en la ciudad de Medellín y se conservó a 12 °C en medio de cultivo estándar modificado por Quevedo (2012). Para impedir el deterioro de las células, se hicieron repiques de las cajas cada 3 meses. La composición química del medio de cultivo estándar modificado fue: FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 0,0073g/L sobre EDTA 0,00916g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,04g/L; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,05g/L; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,04g/L; KNO<sub>3</sub> 0,1g/L; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,002859mg/L; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,05mg/L; ZnSO<sub>4</sub> 0,1234mg/L; CoCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,05mg/L; MnCl<sub>2</sub> 1,146mg/L; CuCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,054mg/L. Para medio sólido se adiciona agar-agar a 15g/L y NaHCO<sub>3</sub> 1g/L como fuente de carbono.

## 5.4 Preparación del inóculo

Para realizar el inóculo se preparó el medio de cultivo estándar modificado en un erlenmeyer de 250mL con 100mL de volumen efectivo. En otro recipiente se preparó 10ml de una solución de glucosa a 10g/L. Estas soluciones se esterilizaron a 120°C/15min. Después de la esterilización se adicionó la solución de Glucosa al medio de cultivo, se ajustó pH a 6.0 y se sembró la microalga transfiriendo una colonia de un caja de petri con *Chlorella* sp. con un asa de aro al medio líquido. El inóculo se dejó en incubación a 28°C bajo completa oscuridad en un agitador orbital a 120rpm/3días.

## 5.5 Diseño experimental

### 5.5.1 Evaluación de la relación Carbono/Nitrógeno y relación Carbono/Fósforo

Los ensayos se llevaron a cabo en erlenmeyer de 250mL con 120mL de medio de cultivo (volumen de trabajo), cada experimento se realizó por triplicado con muestras destructivas. Los medios de cultivo se llevaron a esterilización a 120°C/15min, y se ajustó pH a 6.0. La microalga se inoculó al 5%v/v con respecto al volumen total del cultivo. Los cultivos se mantuvieron bajo completa oscuridad a 28°C en un agitador orbital a 120rpm/9días. La toma de muestra se realizó bajo condiciones asépticas, retirando 6mL de cultivo para realizar los análisis de concentración de biomasa, nitratos, fosfatos y contenido de lípidos; para calcular los rendimientos y productividades.

Se evaluaron tres relaciones C/N (10/1, 25/1 y 50/1), con 20g/L de glucosa y con la relación C/P (200/1) fija para cada relación C/N, variando la concentración de KNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno. Una vez seleccionada la mejor relación C/N, se procedió a evaluar de la relación C/P (200/1, 300/1 y 400/1) en un medio de cultivo con 20g/L de glucosa, variando la concentración de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> como fuente de Fósforo.

Los resultados se analizaron por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA) y análisis de comparaciones múltiples por el método propuesto por Tukey o método HSD (Honestly Significant Difference) utilizando el software libre estadístico RStudio Versión 0.99.902 – © 2009-2016 RStudio, Inc.

### 5.5.2 Evaluación del pH y la Temperatura de cultivo

La evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento y el contenido de lípidos en la microalga *Chlorella* sp. se realizó mediante el desarrollo de un diseño factorial  $2^3$  (dos factores, cada uno evaluado en 3 niveles). El factor temperatura evaluado a 20, 25 y 30°C y el factor pH inicial evaluado en 5, 7 y 9. En estos ensayos se utilizaron las mejores relaciones carbono nitrógeno y carbono fósforo encontradas en el numeral 5.5.1. Los medios de cultivo se llevaron a esterilización a 120°C/15min, se adicionó a cada uno 20g/L de glucosa estéril y se ajustó el pH inicial del medio de acuerdo al diseño experimental, posteriormente se inoculó al 5% v/v del volumen final de cultivo y se llevó a incubación bajo completa oscuridad por 9 días a la temperatura indicada en el diseño experimental. Este montaje se realizó con muestras destructivas en erlenmeyer de 250mL con 120mL de volumen de cultivo. Se tomaron muestras diarias de 6ml para medir la concentración de biomasa, nitratos, fosfatos y contenido de lípidos; para así calcular los rendimientos, productividades.

Los resultados se analizaron por medio de un Análisis de Varianza multifactorial (ANOVA) y se evaluó interacción entre los dos factores (pH y temperatura), además se realizó el análisis de comparaciones múltiples por el método propuesto por Tukey o método HSD (Honestly Significant Difference) utilizando el software libre estadístico RStudio Versión 0.99.902 – © 2009-2016 RStudio, Inc.

### 5.5.3 Validación de los factores abióticos que inducen la producción de lípidos en reactor de 1Litro.

Con el fin de validar los resultados obtenidos, se realizó un cultivo por lote en un reactor de tanque agitado de 1Litro marca Biostat® A plus, con un volumen efectivo de 800 mL, bajo completa oscuridad. Se emplearon las condiciones de operación obtenidas en el numeral 5.5.2 (temperatura y pH) y las mejores relaciones C/N y C/P encontrada en el numeral 5.5.1. Al cultivo se le hizo seguimiento diario por un tiempo de 12 días.

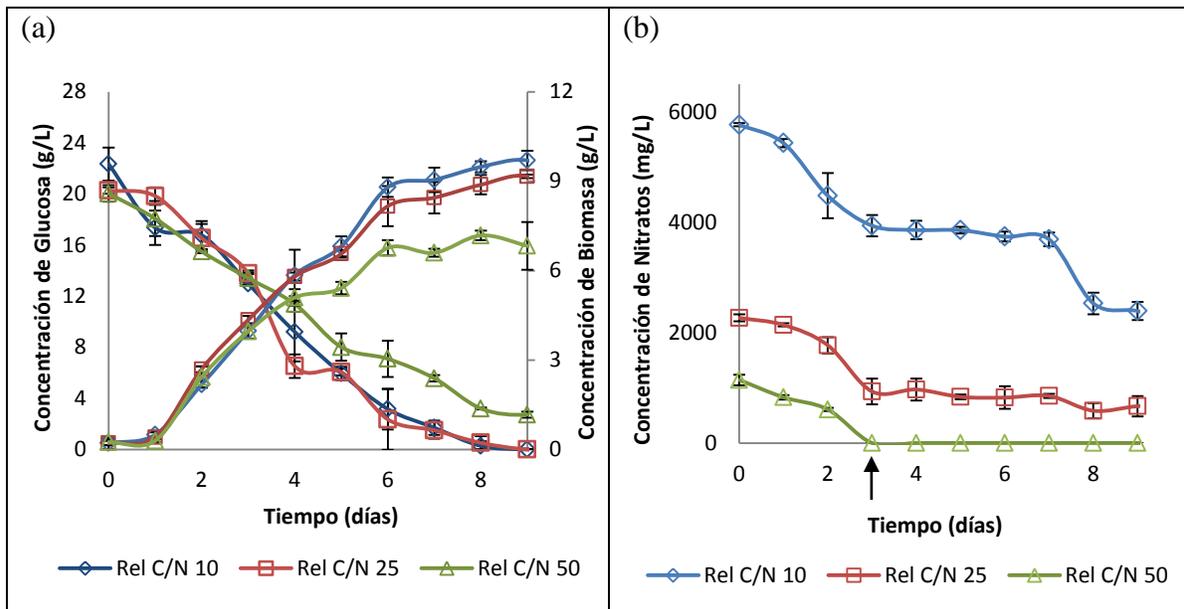
---

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Evaluación de la Relación C/N

Con el fin de aumentar la producción de biomasa y el contenido de lípidos en la microalga nativa *Chlorella* sp. se realizó una evaluación del comportamiento del cultivo heterotrófico de esta microalga con tres relaciones C/N manteniendo la concentración de glucosa inicial fija y la relación C/P constante en todos los ensayos.

La figura 5. a). representa las cinéticas de crecimiento y consumo de Glucosa de las 3 relaciones C/N evaluadas y la figura 5. b), muestra el consumo de nitratos. Las cinéticas con relación C/N 10/1 y 25/1 mostraron tendencias similares de consumo de glucosa, dándose un mayor consumo y posterior agotamiento de esta fuente de carbono a los 8 días de cultivo aproximadamente. Sin embargo, con la relación C/N 50/1 se observó un menor consumo de glucosa, quedando glucosa residual al final de la cinética, en esta relación la microalga alcanza más rápido la fase estacionaria debido a que se agota el nitrógeno en el medio de cultivo en el día 3 (figura 5.b)), posiblemente es esta la razón que sea la cinética con menor concentración de biomasa  $6.83 \pm 0.80 \text{g/L}$ . El nitrógeno, al igual que el carbono, son nutrientes limitantes del crecimiento de las microalgas y deben estar presentes en el cultivo para asegurar la producción de proteínas y ácidos nucleicos importantes para la división celular (Beuckels et al., 2015; Singhasuwan et al., 2015b). Las relaciones C/N 10/1 y 25/1 no parecen tener un efecto limitante del crecimiento, por el contrario se observa que a mayor concentración de nitrógeno hay mayor producción de biomasa.



**Figura 5.** Curvas Cinéticas para el cultivo heterotrófico de *Chlorella* sp., a 28°C, 120rpm y pH inicial 6.0 con las diferentes relaciones C/N 10:1, 25:1 y 50:1. a) Producción de Biomasa y Consumo de Carbono. b). Consumo de Nitratos

El análisis estadístico del diseño unifactorial para la relación C/N. El análisis de varianza (ANOVA), para la variable respuesta concentración final de biomasa (a los 9 días de cultivo) mostró que hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres relaciones C/N evaluadas (valor  $p=0.00027$ ). A pesar de esto, el análisis de comparaciones múltiples realizado por el método de Tukey o método HSD, evidencia que no hay diferencias significativas en la concentración final de biomasa al utilizar las relaciones C/N 25/1 y 10/1 en el día 9 (ver anexo 9.3.1).

En la tabla 1 se resumen los parámetros de los cultivos evaluados al día 9. Las relaciones C/N 10/1 y 25/1 alcanzaron las mayores concentraciones de biomasa ( $9.70 \pm 0.33$  g/L y  $9.17 \pm 0.06$  g/L, respectivamente) y mayores productividades de biomasa ( $1.08 \pm 0.04$  y  $1.02 \pm 0.01$  g/Ld, respectivamente) en comparación a la relación C/N 50/1 ( $6.83 \pm 0.80$  g/L de biomasa y  $0.76 \pm 0.09$  g/Ld).

**Tabla 1.** Parámetros de cultivo: cultivos heterotróficos de *Chlorella* sp. para las diferentes relaciones C/N evaluadas al día 9.

Parámetros Cinéticos	relación	relación	relación
	C/N 10/1	C/N 25/1	C/N 50/1
<b>Concentración final de biomasa (g/L)</b>	9.70±0.33	9.17±0.06	6.83±0.80
<b>Rendimiento de biomasa en sustrato <math>Y_{xs}</math> (g/g)</b>	0.43±0.03	0.44±0.01	0.38±0.03
<b>Productividad de biomasa (g/Ld)</b>	1.08±0.04	1.02±0.01	0.76±0.09
<b>Contenido de lípidos (%) (g lípidos/g biomasa seca)</b>	15.65±0.85	18.82±1.63	24.27±0.33
<b>Productividad de lípidos (mg/Ld)</b>	17.39±0.94	20.92±1.82	26.97±0.36
<b>Rendimiento de lípidos en biomasa <math>Y_{px}</math>(g/g)</b>	0.13±0.01	0.15±0.03	0.20±0.01

Los resultados obtenidos en este trabajo con una relación 10/1 coinciden con los reportados por Wei *et al.* (2009), el cual evaluó una concentración de glucosa inicial de 40g/L de los cuales la microalga *Chlorella protothecoides* consumió 20g/L de glucosa aproximadamente, obteniendo una concentración de biomasa de 10.7g/L, productividad de biomasa 1.07g/Ld y rendimiento de biomasa en sustrato de 0.5g/g aproximadamente en 10 días de cultivo, se observa que son resultados muy parecidos a los alcanzados por esta investigación a pesar de trabajar con especies de *Chlorella* diferente. En este mismo estudio, se observó un efecto similar cuando se sometieron las microalgas a relaciones de C/N altas (50/1), el crecimiento de biomasa se ve afectado de forma negativa. El factor limitante del crecimiento de la biomasa microalgal de los cultivos con altas concentraciones de glucosa es el nitrógeno, si el nitrógeno se agota en muy poco tiempo la microalga no es capaz de seguir sintetizando proteínas, DNA y RNA, y entra en una etapa de estrés nutricional conduciendo su metabolismo a la producción de lípidos neutro y triglicéridos como almacenamiento de energía (Sakarika & Kornaros, 2017b; Xin *et al.*, 2010).

Singhasuwan *et al.* (2015) evaluaron 3 relaciones C/N 29/1, 63/1 y 95/1 para la microalga *Chlorella* sp., TISR8990, encontraron que con la relación menor 29/1 se obtienen mayores concentraciones de biomasa 2,7g/L, y con la más alta relación C/N 95/1 encontraron la menor producción de biomasa 1.3g/L la cual es un 48% menor a la relación C/N 29/1, lo

---

mismo ocurre con nuestro estudio en el cual con la más alta relación C/N se obtiene un 74% menos de biomasa, todo esto indica que altas relaciones C/N disminuyen la concentración de biomasa debido al rápido agotamiento de nitrógeno en el medio de cultivo.

El contenido de lípidos en la microalga *Chlorella* sp. (tabla 1), alcanzó un mayor porcentaje con la relación C/N 50/1 ( $24.27 \pm 0.33\%$ ) que con las relaciones C/N 10/1 y 25/1 ( $15.65 \pm 0.85$  y  $18.82 \pm 1.63\%$  respectivamente). El análisis estadístico para la relación C/N se realizó con el software libre RStudio Versión 0.99.902. El ANOVA realizado para la variable respuesta contenido de lípidos (a los 9 días de cultivo) mostró en que hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres relaciones carbono nitrógeno evaluadas (valor  $p=1.392e-05$ ), esto se confirma con el análisis de comparaciones múltiples realizado el método de Tukey en el cual se evidencia diferencias significativas en las tres relaciones C/N en el día 9 (ver anexo 9.3.1).

Este resultado confirma que la deficiencia de nitrógeno induce la producción de lípidos en la microalga *Chlorella* sp., como se observa en la curva cinética de consumo de Nitratos (Figura 5 b), en la cual, para la relación C/N 50/1 se agota este nutriente el día 3, por lo tanto la microalga comienza a almacenar lípidos de reserva, aumentando la productividad de lípidos intracelulares ( $26.97 \pm 0.36 \text{ mg/gd}$ ), esta productividad es mayor que la obtenida con las relaciones C/N 10/1 y 25/1 ( $17.39 \pm 0.94$  y  $20.92 \pm 1.82 \text{ mg/gd}$  respectivamente) (ver tabla 1).

El estudio realizado por Wei *et al.* (2009), en el cual se obtuvo un contenido de lípidos de 28% con 20g/L de glucosa en 10 días de cultivo, utilizando urea como fuente de nitrógeno, es similar a lo encontrado en nuestro estudio con la microalga nativa *Chlorella* sp. donde se obtuvo un contenido de lípidos de  $24.27 \pm 0.33\%$  con 20g/L de Glucosa en 9 días de cultivo utilizando nitrato de potasio como fuente de nitrógeno. Otros autores como Wang *et al.* (2016) también han trabajado con limitación de nitrógeno en el medio de cultivo para evaluar el efecto de este nutriente en la acumulación de lípidos intracelulares en un cultivo en batch con glucosa a 38g/L y  $\text{NaNO}_3$ , la fuente de nitrógeno es agotada aproximadamente

a los 3 días de cultivo, obteniendo una mayor concentración de biomasa 18.38g/L y mayor contenido de lípidos de 27.2% al igual que en nuestro estudio.

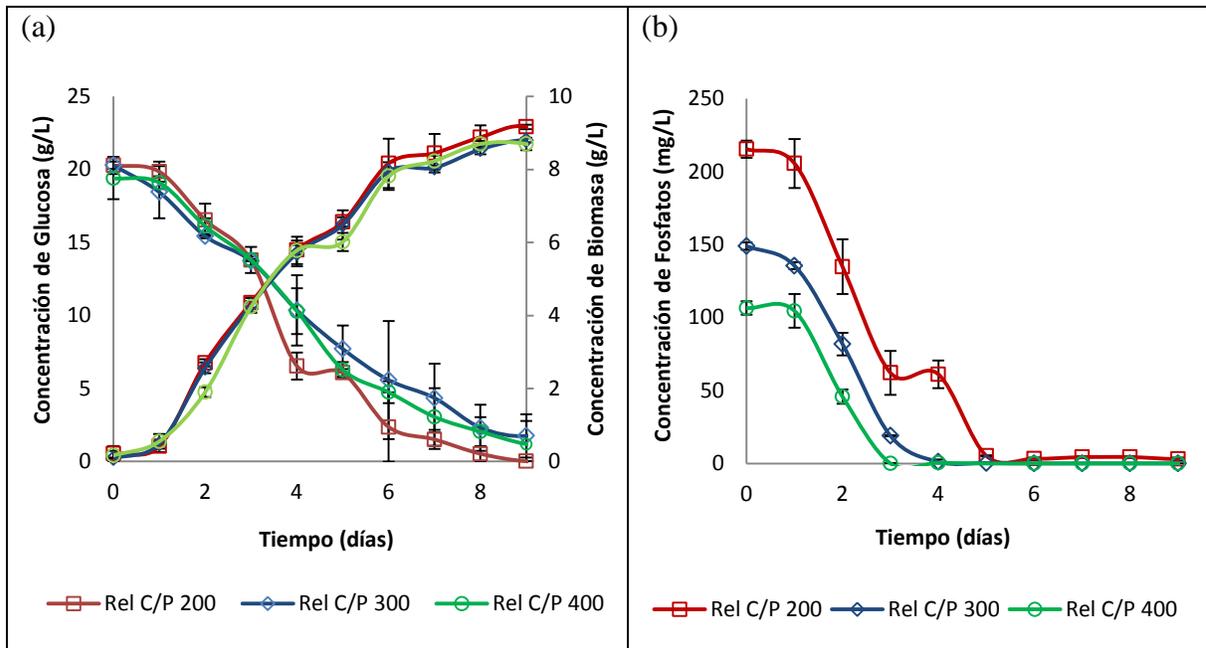
Singhasuwan *et al.* (2015) encontraron que la relación C/N 63/1 es la mejor para la producción de ácidos grasos totales en la microalga *Chlorella sp* TISR8990, obtuvieron un contenido de lípidos de 394 mg/g y una productividad de lípidos de 186mg/Ld. Este resultado es parecido a lo encontrado en nuestro trabajo con la relación C/N 50/1 (242.7mg/g y 26.97±0.36mg/gd respectivamente) y nos confirma que esta relación C/N es la mejor para inducir la producción de ácidos grasos totales en la microalga nativa *Chlorella sp*.

## 6.2 Evaluación de la Relación C/P

Se realizó la evaluación del comportamiento del cultivo heterotrófico de la microalga nativa *Chlorella sp*. con tres relaciones C/P 200/1, 300/1 y 400/1 manteniendo la concentración de glucosa inicial fija y la relación C/N constante en todos los ensayos.. En este ensayo se aseguró que la concentración de nitrógeno no limitara el crecimiento de la microalga, por esta razón se trabajó con la relación C/N 25/1, la cual provee suficiente nitrógeno al medio de cultivo.

Los comportamientos cinéticos para todas las relaciones C/P evaluadas son similares en el crecimiento y consumo de glucosa (figura 6. a), la cinética de consumo de fosfatos (figura 6. b) es más lenta para la relación C/P 200/1 agotándose los fosfatos a los 5 días de cultivo, mientras que para las relaciones C/P 400/1 y 300/1 se agotan los fosfatos a los 3 y 4 días de cultivo respectivamente. Sin embargo, a pesar de la diferencia en el consumo de fósforo, la tendencia de crecimiento de la biomasa en las tres cinéticas es el mismo, esto se debe a que algunas microalgas pueden reducir su demanda de fósforo fisiológico en hasta un 50% en respuesta a la limitación de fósforo, por lo tanto se disminuye la tasa de síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos (Belotti 2013). Otras microalgas también poseen la capacidad de almacenar fósforo en forma de polifosfatos como reserva de energía, que puede ser

utilizada posteriormente por la célula debido a la limitación nutriente en el medio de cultivo (Fu *et al.*, 2017). Es por esto que cuando encontramos una limitación de fósforo como la observada en nuestro trabajo, no se observa una marcada diferencia en la concentración final de biomasa.



**Figura 6.** Curvas Cinéticas para el cultivo heterotrófico de *Chlorella* sp, a 28°C, 120rpm y pH inicial 6.0, con las relaciones C/P 200/1, 300/1 y 400/1. a) Producción de Biomasa y Consumo de Carbono. b) Consumo de Fosfatos

La tabla 2 resume los parámetros de los cultivos evaluados al día 9. La relación C/P 200/1 alcanzó la mayor concentración de biomasa ( $9.17 \pm 0.06$ g/L) en comparación a las relaciones C/P 300/1 y 400/1 ( $8.80 \pm 0.05$ g/L y  $8.70 \pm 0.17$ g/L respectivamente). El análisis de varianza (ANOVA), para la variable respuesta concentración final de biomasa (a los 9 días de cultivo) mostró que hay diferencias estadísticamente significativas entre las 3 relaciones C/P evaluadas (valor  $p = 0.002432$ ). A pesar de esto el análisis de comparaciones múltiples realizado por el método de tukey evidenció que no hay diferencias significativas entre las

relaciones C/P 300/1 y 400/1 para la concentración final de biomasa en el día 9 (ver anexo 9.3.2).

**Tabla 2.** Parámetros de cultivo heterotrófico para *Chlorella* sp. a diferentes relaciones C/P evaluadas al día 9.

Parámetro	relación	relación	relación
	C/P 200	C/P 300	C/P 400
<b>Concentración final de biomasa (g/L)</b>	9.17±0.06	8.80±0.05	8.70±0.17
<b>Rendimiento de biomasa en sustrato <math>Y_{xs}</math> (g/g)</b>	0.44±0.01	0.44±0.06	0.43±0.03
<b>Productividad de biomasa (g/Ld)</b>	1.02±0.01	0.98±0.01	0.97±0.02
<b>Contenido de lípidos (%) (g lípidos/g biomasa seca)</b>	18.82±1.63	21.31±1.72	20.48±1.27
<b>Productividad de lípidos (mg/Ld)</b>	20.92±1.82	23.67±1.91	22.76±1.41
<b>Rendimiento de lípidos en biomasa <math>Y_{px}</math>(g/g)</b>	0.15±0.03	0.17±0.02	0.16±0.02

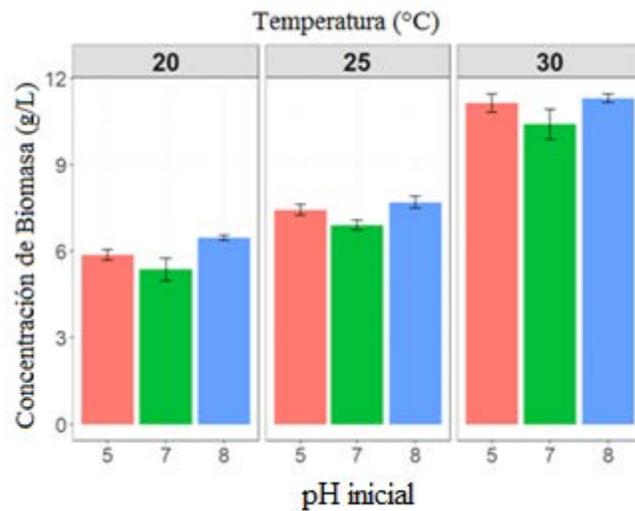
La tabla 2 muestra que el que contenido de lípidos en las relaciones C/P 200/1, 300/1 y 400/1 fue 18.82±1.63%, 21.31±1.72% y 20.48±1.27% respectivamente, este contenido de lípidos es prácticamente el mismo para las tres relaciones evaluadas, esto se confirma con el ANOVA, para la variable respuesta contenido de lípidos, mostró que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las relaciones C/P evaluadas (valor  $p=0.2686$ ) (ver anexo 9.3.2), por lo tanto la acumulación de lípidos en la microalgas nativa *Chlorella* sp. bajo deficiencia de fósforo no es tan evidente como la acumulación de lípidos cuando hay deficiencia de nitrógeno, además, el contenido de lípidos de las tres relaciones C/P evaluadas están alrededor del 20% como se observa para la relación C/N 25/1 (20.92±1.82%).

En el estudio realizado por Rodolfi *et al.*, (2009), la disminución de la concentración de fósforo en el medio de cultivo de la microalga *Nannochloropsis* sp., provocó un aumento en el contenido lipídico de 13,2 % a 50,1%, sin embargo no se presentó un efecto benéfico en la productividad de lípidos debido al bajo crecimiento celular, pues a medida que

aumento el tiempo de deficiencia de fósforo disminuyó la productividad de biomasa hasta 0.1g/Ld, en nuestro estudio la evaluación de la relación C/P para *Chlorella* sp. no mostro un notable aumento en el contenido de lípidos a pesar de haber deficiencia de fósforo en el medio de cultivo, sin embargo si hay un aumento en la productividad de biomasa de hasta  $1.02 \pm 0.01$ g/Ld para la relación C/P 200/1 y aumento en la productividad de lípidos, las cuales oscilan entre  $20.92 \pm 1.82$ mg/Ld y  $23.67 \pm 1.91$ mg/Ld.

### 6.3 Evaluación de la Temperatura y el pH en medio de cultivo.

Las condiciones para evaluar el efecto de la temperatura y el pH inicial en la producción de biomasa y lípidos, se llevaron a cabo utilizando relaciones C/N 25/1 y C/P 300/1 seleccionadas en los experimentos anteriores.



**Figura 7.** Producción de Biomasa en cultivo heterotrófico de *Chlorella* sp, con relación C/N 25/1 y C/P 300/1 a diferentes temperaturas 20°C, 25°C y 30°C, 120rpm y pH inicial 5.0, 7.0 y 8.0.

La figura 7, muestra los valores de concentración final de biomasa de la microalga *Chlorella* sp. a 20°C, 25°C y 30°C, se puede apreciar que se obtiene mayor cantidad de biomasa a la mayor temperatura evaluada (30°C). En los tres casos para las 3 temperaturas

---

evaluadas, la glucosa y el nitrógeno no se agota en los 9 días de cultivo, por lo tanto no se observa deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo, por el contrario, el fósforo se agota el día 9 para 20°C, el día 6 para 25°C y el día 4 para 30°C, pero como vimos en el numeral 6.2 este nutriente no tiene un efecto significativo en la producción de biomasa.

El análisis estadístico para el diseño multifactorial  $2^3$  para la variable respuesta concentración de biomasa mostro que no hay interacción entre el pH y la temperatura (valor-p= 0.937947) por lo tanto se debe analizar cada factor por separado (ver anexo 9.3.3). El ANOVA para las variables evaluadas temperatura y pH mostraron valores  $p=0.002384$  y  $p=5.127e^{-14}$  respectivamente, los cuales indican que si hay diferencias significativas entre algún par de medias. Para confirmar esto, se realizó un análisis de comparaciones múltiples por el método de Tukey, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las 3 temperaturas, siendo óptima la temperatura de 30°C para la producción de biomasa; por el contrario con la variable pH inicial del medio, no se observa diferencias estadísticamente significativas entre trabajar a pH 5 y 8, siendo óptima la producción de biomasa con pH 8.

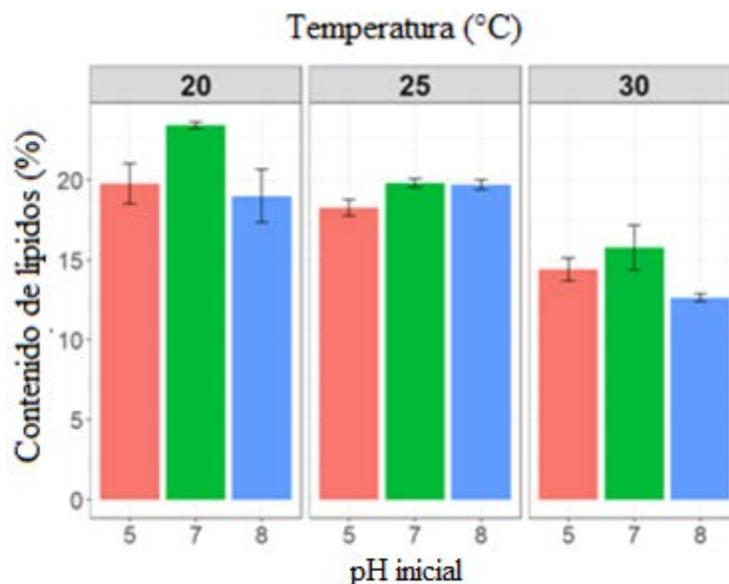
En la tabla 3, se resumen los parámetros de los cultivos para cada uno de los factores. Es posible ver como el aumento de la temperatura incide en la obtención de mayores concentraciones de biomasa y productividades de biomasa ( $11.27\pm 0.24\text{g/L}$  y  $1.25\pm 0.03\text{g/Ld}$  respectivamente). Por otro lado, un pH de 8 fue la condición que, independiente de la temperatura, obtuvo la mayor concentración de biomasa. Por lo tanto las condiciones que llevan a obtener mayores concentraciones de biomasa y productividades de biomasa fueron 30°C y pH 8.

**Tabla 3.** Parámetros de cultivo heterotrófico para *Chlorella* sp. a diferentes temperaturas y pH evaluados al día 9.

Parámetro	TEMPERATURA 20°C		
	pH 5	pH 7	pH 8
Concentración final de biomasa (g/L)	5,88±0,29	5,35±0,66	6,45±0,13
Rendimiento de biomasa en sustrato Y <sub>xs</sub> (g/g)	0,30±0,02	0,28±0,09	0,35±0,07
Productividad de biomasa (g/Ld)	0,65±0,03	0,59±0,07	0,72±0,01
Contenido de lípidos (%) (g lípidos/g biomasa seca)	19,77±2,22	23,45±0,36	18,99±2,86
Productividad de lípidos (mg/Ld)	21,96±2,47	26,06±0,40	21,10±3,17
Rendimiento de lípidos en biomasa Y <sub>px</sub> (g/g)	0.14±0.03	0.20±0.01	0.15±0.05
Parámetro	TEMPERATURA 25°C		
	pH 5	pH 7	pH 8
Concentración final de biomasa (g/L)	7,43±0,32	6,90±0,30	7,70±0,40
Rendimiento de biomasa en sustrato Y <sub>xs</sub> (g/g)	0,45±0,01	0,44±0,05	0,46±0,03
Productividad de biomasa (g/Ld)	0,83±0,04	0,77±0,03	0,86±0,04
Contenido de lípidos (%) (g lípidos/g biomasa seca)	18,25±0,90	19,81±0,43	19,71±0,50
Productividad de lípidos (mg/Ld)	20,28±1,00	22,01±0,48	21,90±0,55
Rendimiento de lípidos en biomasa Y <sub>px</sub> (g/g)	0.13±0.02	0.16±0.01	0.14±0.01
Parámetro	TEMPERATURA 30°C		
	pH 5	pH 7	pH 8
Concentración final de biomasa (g/L)	11,12±0,58	10,38±0,90	11,27±0,24
Rendimiento de biomasa en sustrato Y <sub>xs</sub> (g/g)	0,55±0,04	0,54±0,03	0,58±0,03
Productividad de biomasa (g/Ld)	1,24±0,06	1,15±0,10	1,25±0,03
Contenido de lípidos (%) (g lípidos/g biomasa seca)	14,41±1,29	15,79±2,40	12,65±0,40
Productividad de lípidos (mg/Ld)	16,84±1,24	17,62±3,74	14,56±0,83

La figura 8, muestra los valores de contenido de lípidos alcanzado por la microalga *Chlorella* sp. a 20°C, 25°C y 30°C. En esta figura se observa que los lípidos presenta un mayor contenido a 20°C y 25°C en comparación con 30°C.

El ANOVA para la variable respuesta contenido de lípidos, no mostró interacción entre los dos factores (valor  $p=0.15716$ ), por lo tanto, al analizar ambos factores por separado se encontró que si hay diferencias estadísticamente significativas (valor  $p=1.662e-07$  para la temperatura y valor  $p=0.00569$  para el pH), sin embargo, el análisis de comparaciones múltiples HSD muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre 20°C y 25°C y entre un pH inicial de 5 y 8, por lo tanto el mejor pH inicial para aumentar la producción de lípidos es pH7 obteniéndose un contenido de lípidos de 23,45% a una temperatura entre 20°C.



**Figura 8.** Contenido de lípidos en el cultivo heterotrófico de *Chlorella* sp, con relación C/N 25/1 y C/P 300/1 a diferentes temperaturas 20°C, 25°C y 30°C, 120rpm y pH inicial 5.0, 7.0 y 8.0.

Al comparar los resultados obtenidos en la tabla 3, encontramos que a medida que disminuye la temperatura aumenta el contenido de lípidos y la productividad de lípidos. Estos resultado confirma lo reportado por autores como Wang *et al.* (2016), los cuales

---

evaluaron el efecto de dos temperaturas para el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* donde la microalga crece mucho más rápido a 26°C obteniendo una concentración de biomasa, productividad de lípidos y contenido de lípidos de 2.486g/L, 327.9mg/Ld y 131mg/g en 10 días de cultivo respectivamente, y crece más lento a 18°C alcanzando una concentración de biomasa, productividad de lípidos y contenido de lípidos de 2.536g/L, 376,2 mg/Ld y 148.8 mg/gen 15 días de cultivo, lo que confirma un mayor tiempo de cultivo para alcanzar la misma densidad celular cuando se disminuye la temperatura. Para la microalga de nuestro trabajo *Chlorella* sp. bajo condiciones de cultivo heterotrófico se obtuvieron concentraciones de biomasa, contenido de lípidos y productividades de lípidos superiores a lo reportado por estos autores cuando se trabaja con una temperatura de 20° y 30°C, además se obtienen menores concentraciones de biomasa a bajas temperaturas.

Otro estudio realizado por Wu *et al* (2013) donde se alcanzó la mayor concentración de biomasa y productividad de biomasa 650mg/Ly 93mg/Ld a 30°C y obtuvieron un contenido de lípidos y productividad de lípidos 32.9% y 27mg/Ld a 25°C, es similar a lo alcanzado con nuestra microalga nativa *Chlorella* sp. a 30°C lográndose mayor concentración de biomasa 11,27±0,24 g/L y productividad de biomasa 1,25±0,03 g/Ld, y a 25 ° un menor contenido de lípidos 23,45±0,36% pero con una productividad de lípidos similar 26,06±0,40mg/Ld a pesar de ser dos especies de microalgas diferentes.

Se puede observar que cuando se aumenta la temperatura de 20°C a 30°C en nuestro estudio realizado con la microalga *Chlorella* sp. se disminuyó el contenido de lípidos de 23.45% a 15.79% , al igual que ocurrió con el trabajo investigativo realizado por Converti *et al* (2009) con la microalga *Chlorella vulgaris* en el cual al aumentar la temperatura de 25 a 30°C disminuyó el contenido de lípidos de 14.7% a 5.9%.

La mayoría de las microalgas crecen bajo condiciones de temperatura entre 20 y 30°C en la naturaleza y el efecto de la temperatura en el rendimiento de lípidos depende de las diferentes especies de microalgas, es importante resaltar que a mayores temperaturas se da mejor el crecimiento de la biomasa y a bajas temperaturas se aumenta la producción de lípidos totales y la productividad de lípidos en las células microalgales, como se confirma

---

en este estudio. Se ha reportado que a bajas temperaturas se induce la producción de genes que codifican las enzimas ácido graso desaturasas y se aumenta el % de ácidos grasos poliinsaturados que ayudan a mantener la fluidez de la membrana (Wang, He, Sun, & Chen, 2016). Además, el estrés causado por las bajas temperaturas cambia el metabolismo del carbono, disminuyendo la producción de proteínas y carbohidratos debido a una inhibición en la biosíntesis de aminoácidos, lo que conduce a un aumento de intermediarios de la glucólisis que pueden ser precursores del Acetil CoA llevando a la síntesis de ácidos grasos (Wang, He, Sun, & Chen, 2016).

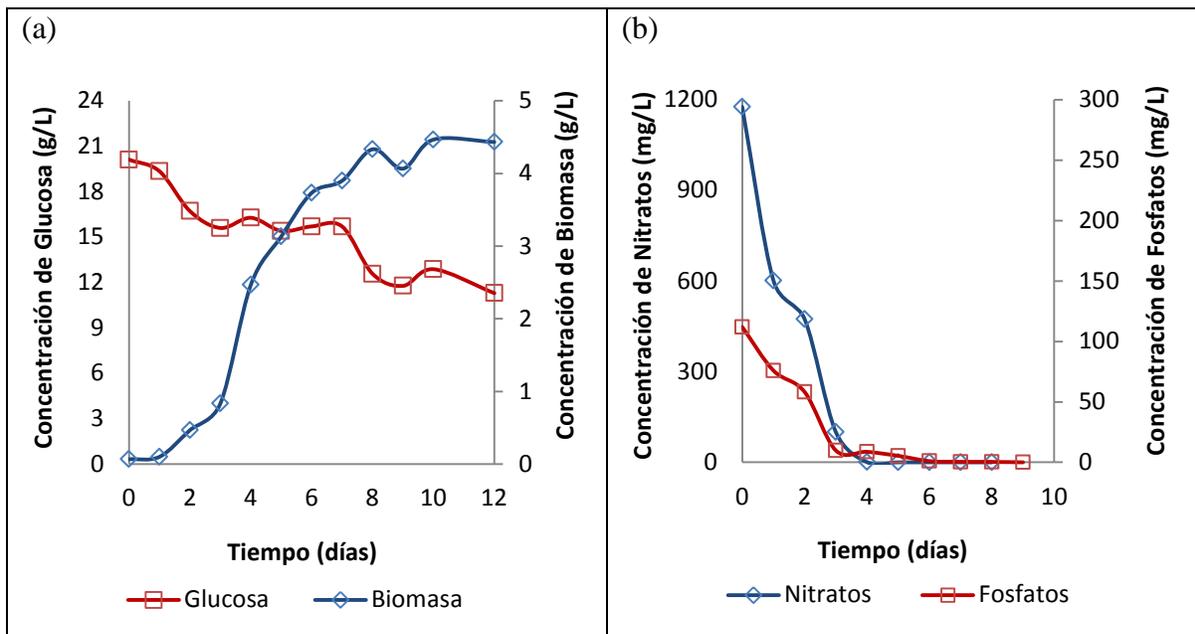
En este estudio no se controló el pH en el tiempo de cultivo, solo se ajustó su pH inicial para los tres pH evaluados (5, 7 y 8) por lo cual el pH es muy variable en el tiempo (ver anexo 9.3.4). A 20 y 25 °C se observa una tendencia a bajar el pH hasta 5 en los medios de cultivo con pH inicial 7 y 8, el medio con pH inicial 5 aumenta su pH hasta 7 en los primeros 5 días de cultivo y luego disminuye el pH hasta 5 al final del cultivo. A 30°C los medios de cultivo con pH inicial 7 y 8 disminuyen su pH hasta 5 los primeros 7 días de cultivo y aumenta el pH hasta 8 al final de la cinética, el cultivo con pH inicial de 5 aumenta su pH hasta 7 en los 3 primeros días de cultivo, luego hasta el día 8 el pH disminuye hasta 5 y finalmente aumenta el pH hasta 8 al final de la cinética.

Las fluctuaciones del pH pueden afectar la disponibilidad de los nutrientes y su asimilación por la microalga, por esta razón el análisis de varianza no muestra diferencias significativas entre trabajar a pH 5 y 8 para la producción de biomasa y el contenido de lípidos. Esto nos lleva a pensar que el pH del medio de cultivo puede afectar enormemente la eficiencia del uso de las fuentes de N, P y C, por lo tanto un control del pH puede lograr una mejor producción de biomasa y un mayor contenido de lípidos.

#### **6.4 Validación de las condiciones de cultivo para la producción de lípidos en un Biorreactor de tanque agitado de 1litro.**

La validación de los factores abióticos que aumentan el contenido de lípidos intracelulares en la microalga nativa *Chlorella* sp. se realizaron en un biorreactor de 1L operado en lote con una temperatura de 25°C, pH inicial 7 y una relación C/N y C/P 50/1 y 400/1 en el medio de cultivo.

Las cinéticas de producción de biomasa y consumo de nutrientes por la microalga nativa *Chlorella* sp. (figura 9. a y b) muestra la tendencia característica de los cultivos bajo deficiencia de nutrientes observada anteriormente, en este ensayo se puede observar que el día 4 de cultivo se agota tanto el nitrógeno como el fósforo en el medio de cultivo, de tal forma que la cinética de crecimiento comienza su fase de desaceleración y posterior fase estacionaria a partir de este día, además hay que destacar que la temperatura también afecta la velocidad de crecimiento de la microalga.



**Figura 9.** Curvas Cinéticas para el cultivo heterotrófico de *Chlorella* sp., a 25°C, 120rpm y pH inicial 7.0, con las relaciones C/N 50/1 y C/P 400/1. a) Producción de Biomasa y Consumo de Carbono. b) Consumo de Nitratos y Fosfatos

La tabla 4, muestra los parámetros calculados para este cultivo, en este se puede observar que la concentración máxima de biomasa se alcanzó a los 10 días de cultivo (4.47g/L), la cual es menor a la alcanzada en los ensayos de deficiencia de nitrógeno (6.83g/L) y a los ensayos realizados a temperatura de 20°C/pH7 (5.35g/L). Además, el contenido de lípidos y la productividad de lípidos en el biorreactor (24.38% y 24.38mg/Ld) es superior a lo obtenido bajo deficiencia de nitrógeno (24.27% y 26.97mg/Ld) y con la temperatura de 20°C/pH7 (23.45% y 26.06mg/Ld), sin embargo, la productividad de lípidos en biorreactor de es inferior debido a la baja concentración de biomasa alcanzada.

**Tabla 4.** Parámetros de cultivo heterotrófico de *Chlorella* sp. para las diferentes temperaturas y pH evaluados al día 10 en un biorreactor de tanque agitado de 1L, con una temperatura de 25°C/pH 7 y relación C/N y C/P 50/1 y 400/1

Parámetro	Biorreactor 1L
<b>Concentración final de biomasa (g/L)</b>	4.47
<b>Rendimiento de biomasa en sustrato <math>Y_{xs}</math> (g/g)</b>	0.61
<b>Productividad de biomasa (g/Ld)</b>	0.45
<b>Contenido de lípidos (%) (g lípidos/g biomasa seca)</b>	24.38
<b>Productividad de lípidos (mg/Ld)</b>	24.38
<b>Rendimiento de lípidos en biomasa <math>Y_{px}</math>(g/g)</b>	0.20

Comparando los resultados de nuestro trabajo con lo reportado por Wang *et al.* (2016), donde trabajaron un cultivo en batch con N limitado, y concentración de glucosa de 50 g/L, obtuvieron 18.38g/L de biomasa con un contenido de lípidos de 27.2%, nuestro sistema de cultivo para la inducción de lípidos produce menor cantidad de biomasa debido a la limitación tanto de nitrógeno como de fósforo en el medio de cultivo, además la baja temperatura disminuye la velocidad de crecimiento de la célula, sin embargo el contenido de lípidos no es tan bajo 24.38%.

La validación de nuestro sistema de cultivo en lote, muestra que a pesar de obtenerse bajas concentraciones de biomasa, hay un evidente efecto positivo en la producción de lípidos en la microalga nativa *Chlorella* sp.,

Para mejorar la productividad de lípidos es recomendable aumentar la concentración de biomasa en el cultivo y de esta manera se obtendrán mejores productividades de lípidos intracelulares en la microalga, esto se puede lograr haciendo un cultivo en dos etapas, en el cual en la primera etapa se obtenga una alta productividad de biomasa, utilizando las mejores condiciones encontradas para asegurar el adecuado crecimiento de la microalga (30°C, pH8, relación C/N 10/1 y C/P 200/1), y en la segunda etapa de cultivo, inducir la producción de lípidos bajo las condiciones de estrés Abiótico evaluadas en esta validación (25°C, pH inicial 7, relación C/N 50/1 y C/P 400/1).

## 7 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo investigativo muestran que al tener una menor relación C/N y C/P aumenta la concentración de biomasa hasta 9.7g/L debido a que hay suficientes nutrientes para el apropiado crecimiento celular, y al tener altas relaciones C/N y C/P se obtienen mayores contenidos de lípidos 24.27% y productividades de los mismos de hasta 26.97mg/gd. Se observó además, que a pesar que el fósforo no haya mostrado una diferencia estadísticamente significativa para la producción de lípidos intracelulares, el Nitrógeno muestra ser un nutriente limitante tanto en la producción de biomasa como en la acumulación de lípidos en la microalga nativa *Chlorella* sp.

La temperatura es un parámetro importante para la producción de biomasa y lípidos, debido a que a altas temperaturas aumenta la producción de biomasa y a bajas temperaturas hay un aumento considerable del contenido de lípidos. A pesar de obtenerse bajas concentraciones de biomasa, el pH es un parámetro importante si se tiene control en el cultivo, en este estudio se obtuvieron mejores concentraciones de biomasa a pH 8 y mejor contenido de lípidos a pH 7.

Validando las condiciones de cultivo obtenidas en los dos primeros objetivos, con las condiciones de pH 7, T 20°C, relación C/N y C/P (50/1 y 400/1), establecidas como ideales para la producción de lípidos intracelulares en la microalga nativa *Chlorella* sp. en un biorreactor de 1L, se observa que es un buen sistema para inducir el contenido de lípidos hasta en un 24.38%, el cual es comparable con lo obtenido en la evaluación de los parámetros individuales, y este resultado es muy bueno a pesar de la baja productividad de lípidos en la biomasa debida a la baja concentración de biomasa alcanzada.

Lo anterior nos lleva a sugerir que realizar una estrategia de cultivo en dos etapas puede ser una opción para aumentar la productividad de lípidos totales en la microalga nativa *Chlorella* sp. Es evidente que al optimizar las condiciones de cultivo de la microalga *Chlorella* sp. con suficientes nutrientes para su crecimiento se puede asegurar una alta producción de biomasa en poco tiempo, y en la segunda etapa donde habrá deficiencia de nutrientes como nitrógeno y fósforo y operando a bajas temperaturas, se puede alcanzar una alta productividad de lípidos totales como respuesta al estrés abiótico, pero se debe asegurar

la presencia de fuente de carbono en el medio de cultivo para asegurar la elongación de los ácidos grasos.

---

## 8 BIBLIOGRAFÍA.

- Adams, M. (2005). Superfoods for optimum health: Chlorella and spirulina. *Truth Publishing International, Ltd.* Retrieved from [www.TruthPublishing.com](http://www.TruthPublishing.com)
- Amsler, C. D. (2008). *Algal chemical ecology*. *Algal Chemical Ecology*.  
<http://doi.org/10.1007/978-3-540-74181-7>
- Andersen, R. . (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. Retrieved from [www.books.elsevier.com](http://www.books.elsevier.com)
- APA. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (23 st). Washington, DC.
- Arias, M. trinidad, Martínez, A. de Jesus, & Cañizares, V. (2013). PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS: PARÁMETROS DEL CULTIVO QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1900–1649 (en línea)), 43–68. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/32832/40207>
- Arora, N., Patel, A., Pruthi, P. A., & Pruthi, V. (2016). Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 285530, 79–87.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.112>
- Arredondo, B. oliva, & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. *Métodos Y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal*, 1–11.
- Arts, Michael. Brett, Michael. Kainz, M. (2009). *Lipids in Aquatic Ecosystems*. New York: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-89366-2>
- Belarbi, E. H., Molina, E., & Chisti, Y. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(7), 516–529. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00191-X](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00191-X)
- Beuckels, A., Smolders, E., & Muyllaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*, 77,

98–106. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>

Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A., & Cohen, Z. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, *60*(5), 497–503.

[http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00100-0](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00100-0)

Brennan, L., & Owende, P. (2010a). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 557–577.

<http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

Brennan, L., & Owende, P. (2010b). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 557–577.

<http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, *102*(1), 71–81.

<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>

Chu, F. F., Chu, P. N., Cai, P. J., Li, W. W., Lam, P. K. S., & Zeng, R. J. (2013).

Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. *Bioresource Technology*, *134*, 341–346.

<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.131>

Conchillo, a., Valencia, I., Puente, a., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2006). Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. *Nutricion Hospitalaria*, *21*(3), 369–373.

Converti, A., Casazza, A. a., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (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*(6), 1146–1151.

<http://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>

Cooney, M. J., Young, G., & Pate, R. (2011). Bio-oil from photosynthetic microalgae: Case study. *Bioresource Technology*, *102*(1), 166–177.

<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.134>

- Fraeye, I., Bruneel, C., Lemahieu, C., Buyse, J., Muylaert, K., & Foubert, I. (2012). Dietary enrichment of eggs with omega-3 fatty acids: A review. *Food Research International*, 48(2), 961–969. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.014>
- Fu, L., Cui, X., Li, Y., Xu, L., Zhang, C., Xiong, R., ... Crittenden, J. C. (2017). Excessive phosphorus enhances *Chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation. *Chemical Engineering Journal*, 330(August), 566–572. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.182>
- Gladyshev, M. I., Sushchik, N. N., & Makhutova, O. N. (2013). Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 107, 117–26. <http://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.03.002>
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Barbosa, C. R., Pereira, R. D., & Malcata, F. X. (2011). Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and  $\alpha$ -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International*, 44(9), 2721–2729. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.020>
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45(2), 160–186. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>
- Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., & Danquah, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 1037–1047. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004>
- Hernández Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina Y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <http://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*, 54(4), 621–639. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Huang, G. H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. W., & Chen, G. (2010). Biodiesel production

- by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87(1), 38–46.  
<http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.06.016>
- Kozłowska-Szerenos, B., Bialuk, I., & Maleszewski, S. (2004). Enhancement of photosynthetic O<sub>2</sub> evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO<sub>2</sub> concentration as a sign of acclimation to phosphate deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 42(5), 403–9.  
<http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.02.010>
- Krienitz, L., Huss, V. a. R., & Bock, C. (2015). *Chlorella*: 125 years of the green survivalist. *Trends in Plant Science*, 20(2), 67–69.  
<http://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.005>
- Krzemińska, I., Piasecka, A., Nosalewicz, A., Simionato, D., & Wawrzykowski, J. (2015). Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities. *Bioresource Technology*, 196, 72–77.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.043>
- Lacerda, L. D. (1997). Global Mercury Emissions from Gold and Silver Mining2.pdf. *Water, Air and Soil Pollution 97:*, 209–221. <http://doi.org/10.1007/BF02407459>
- Lee, R. E. (2008). *Phycology*. *Phycology*. Retrieved from  
<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=gfoIAFHgusgC&oi=fnd&pg=PA31&q=Phycology&ots=UEpslAr5zJ&sig=Krt8cMzc8XFJTXaXkhHdmoTe6Yc>
- Lemahieu, C., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Muylaert, K., Buyse, J., & Foubert, I. (2013). Impact of feed supplementation with different omega-3 rich microalgae species on enrichment of eggs of laying hens. *Food Chemistry*, 141(4), 4051–9.  
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.078>
- Leyva soto, luis alosnso. (2014). *Estudio de la acumulación de lípidos y ácidos grasos en la microalga Chlorella vulgaris inmovilizada junto a Azospirillum brasilense en esferas de alginato, en relación a las condiciones de crecimiento*. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008a). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 629–636. <http://doi.org/10.1007/s00253-008->

---

1681-1

- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008b). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(4), 629–636. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1681-1>
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, *31*(7), 1043–1049. <http://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>
- Liu, J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y., & Chen, F. (2011). Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis* : Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology*, *102*(2011), 106–110. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.017>
- Loera-Quezada, M., & Olguín, E. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Y Algal RELBA*, *1*(1), 91–116.
- Lv, J.-M., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., Zhang, L., & Chen, H.-L. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, *101*(17), 6797–804. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.120>
- Miao, X., & Wu, Q. (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, *110*(1), 85–93. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.013>
- Molina E, F.-S. J. (2011). Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO<sub>2</sub>. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, *2*(2), 93–106.
- Ohse, S., Derner, R. B., Ozório, R. Á., Corrêa, R. G., Furlong, E. B., Cesar, P., & Cunha, R. (2014). Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. *IDESIA (Chile)*, *33*(1), 93–102.
- Olivero, J., & Solano, B. (1998). Mercury in environmental samples from a waterbody contaminated by gold mining in Colombia, South America. *Science of the Total Environment*, *217*(1–2), 83–89. [http://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00175-2](http://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00175-2)

- 
- Quevedo, C. (2011). *Estudio de las condiciones de cultivo de la microalga Chlorella sp para la producción de hidrocarburos y su caracterización con aplicaciones en combustibles*. Universidad de Antioquia.
- Ra, C. H., Kang, C.-H., Kim, N. K., Lee, C.-G., & Kim, S.-K. (2015). Cultivation of four microalgae for biomass and oil production using a two-stage culture strategy with salt stress. *Renewable Energy*, 80(2015), 117–122.  
<http://doi.org/10.1016/j.renene.2015.02.002>
- Raghavan, G., Haridevi, C. K., & Gopinathan, C. P. (2008). Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. *Aquaculture Research*, 39(10), 1053–1058.  
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01964.x>
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, 103(2013), 444–467. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>
- Renaud, S. M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, G., & Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211(1–4), 195–214.  
[http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00875-4](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00875-4)
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100–112. <http://doi.org/10.1002/bit.22033>
- Ruiz, M. C., Diana, J., Rodríguez, P., & Castro Gómez, J. C. (2016). INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN MICROALGAS SOMETIDAS A ESTRÉS NUTRITIVO Induction of Total Lipids Production in Microalgae Under Nutritional Stress. *Acta Biol. Colomb*, 2121(11), 17–2617.  
<http://doi.org/10.15446/abc.v21n1.47439>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278.

<http://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

Saha, S. K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D., & Murray, P. (2013). Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, *128*(2013), 118–124.

<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.049>

Sakarika, M., & Kornaros, M. (2017). Kinetics of growth and lipids accumulation in *Chlorella vulgaris* during batch heterotrophic cultivation: Effect of different nutrient limitation strategies. *Bioresource Technology*, *243*, 356–365.

<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.110>

Sansawa, H., & Endo, H. (2004). Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *98*(6), 437–44. [http://doi.org/10.1016/S1389-1723\(05\)00309-9](http://doi.org/10.1016/S1389-1723(05)00309-9)

Serrano Bermúdez, L. M. (2012). *Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel*. Universidad nacional de colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/7825/1/299883.2012.pdf>

Serrano Bermúdez, L. M., Ramírez Landínez, D. M., Sierra Sáenz, E. R., Scott Carvajal, Ó. M., Álvarez Sierra, C. A., Torrea Parra, J. M., ... Godoy Silva, R. D. (2011). Efecto del hierro en el crecimiento y acumulación de lípidos en la microalga colombiana *Chlorella Vulgaris* LAUN 0019. *ITECKNE*, *8*(2339–3483 (Web–Online)), 15–22. Retrieved from

<http://revistas.ustabuca.edu.co/index.php/ITECKNE/article/download/257/241>

Shekh, A. Y., Shrivastava, P., Krishnamurthi, K., Mudliar, S. N., Devi, S. S., Kanade, G. S., & Chakrabarti, T. (2016). Stress enhances poly-unsaturation rich lipid accumulation in *Chlorella sp.* and *Chlamydomonas sp.* *Biomass and Bioenergy*, *84*, 59–66. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.11.013>

Shen, X. F., Liu, J. J., Chu, F. F., Lam, P. K. S., & Zeng, R. J. (2015). Enhancement of FAME productivity of *Scenedesmus obliquus* by combining nitrogen deficiency with sufficient phosphorus supply in heterotrophic cultivation. *Applied Energy*, *158*, 348–354. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.08.057>

Singh, P., Guldhe, A., Kumari, S., Rawat, I., & Bux, F. (2015). Investigation of combined

- effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 94(2015), 22–29. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.019>
- Singh, R. N., & Sharma, S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2347–2353. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>
- Singhasuwan, S., Choorit, W., Sirisansaneeyakul, S., Kokkaew, N., & Chisti, Y. (2015a). Carbon-to-nitrogen ratio affects the biomass composition and the fatty acid profile of heterotrophically grown *Chlorella* sp. TISTR 8990 for biodiesel production. *Journal of Biotechnology*, 216, 169–177. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.003>
- Singhasuwan, S., Choorit, W., Sirisansaneeyakul, S., Kokkaew, N., & Chisti, Y. (2015b). Carbon-to-nitrogen ratio affects the biomass composition and the fatty acid profile of heterotrophically grown *Chlorella* sp. TISTR 8990 for biodiesel production. *Journal of Biotechnology*, 216(2015), 169–177. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.003>
- Tabernero, A., Martín del Valle, E. M., & Galán, M. a. (2012). Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics. *Biochemical Engineering Journal*, 63(2012), 104–115. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2011.11.006>
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T. R., & Graham, I. a. (2002). Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, 61(1), 15–24. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00201-7](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00201-7)
- Trinidad, M., Pe, A., Jes, A. D. E., Rold, N. E. Z., Ca, R. O., Villanueva, I., & Avanzados, E. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: Biodiesel Production from Microalgae : *Acta Biológica Colombiana*, 18, 43–68. Retrieved from <http://www.revista.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/viewFile/32832/39953>
- Valladares Peñaherrera, F. V. (2014). *DISEÑO DE UNA PLANTA DE EXTRACCIÓN DE ACEITE A PARTIR DE MICROALGAS (Chlorella sp)*. Escuela Politecnica Nacional.
- Wang, Y., He, B., Sun, Z., & Chen, Y. F. (2016). Chemically enhanced lipid production from microalgae under low sub-optimal temperature. *Algal Research*, 16, 20–27. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.022>

- 
- Wen, Z.-Y., & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 21(4), 273–294. [http://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00051-X](http://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00051-X)
- Wu, L. F., Chen, P. C., & Lee, C. M. (2013). The effects of nitrogen sources and temperature on cell growth and lipid accumulation of microalgae. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85(2013), 506–510. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.016>
- Xie, T., Sun, Y., Du, K., Liang, B., Cheng, R., & Zhang, Y. (2012). Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp. for oil production. *Bioresource Technology*, 118, 235–242. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.004>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>
- Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126(4), 499–507. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.002>
- Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105(2012), 120–127. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.103>
- Yen, H.-W., Hu, I.-C., Chen, C.-Y., Ho, S.-H., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2013a). Microalgae-based biorefinery--from biofuels to natural products. *Bioresource Technology*, 135, 166–74. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.099>
- Yen, H.-W., Hu, I.-C., Chen, C.-Y., Ho, S.-H., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2013b). Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. *Bioresource Technology*, 135(2013), 166–174. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.099>
- Yoo, C., Jun, S.-Y., Lee, J.-Y., Ahn, C.-Y., & Oh, H.-M. (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*, 101 Suppl(1), S71-4. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.030>

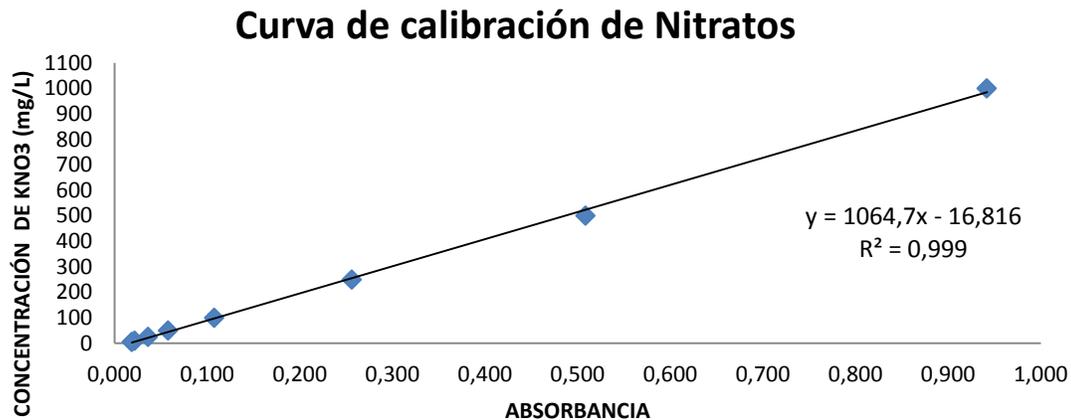
## 9 ANEXOS

### 9.1. Curva de calibración de Nitratos por el método del ácido salicílico

La curva de calibración para el método del ácido salicílico se realiza a partir de una solución concentrada de  $\text{KNO}_3$  a 1000mg/L, a partir de esta se realizan diluciones de concentración conocida por triplicado y se lee en un lector de microplatos Synergy a 410 nm. Los resultados se observan en la tabla 5.

Tabla 5. Medición de la Absorbancia del  $\text{KNO}_3$  a diferentes concentraciones.

Muestra	Concentración $\text{KNO}_3$ (mg/L)	Absorbancia 410nm			Promedio Absorbancia	Error
1	1000	0.953	0.915	0.957	0.942	0.023
2	500	0.519	0.505	0.502	0.509	0.009
3	250	0.248	0.256	0.265	0.256	0.008
4	100	0.099	0.106	0.117	0.108	0.009
5	50	0.061	0.055	0.058	0.058	0.003
6	25	0.037	0.037	0.034	0.036	0.002
7	10	0.025	0.020	0.020	0.022	0.003
8	5	0.015	0.028	0.012	0.019	0.008
9	2.5	0.007	0.015	0.008	0.010	0.005
10	1.25	0.011	0.010	0.010	0.010	0.001



**Figura 10.** Curva de calibración para nitratos.

## 9.2. Curva de calibración de Fosfatos por el método del ácido Ascórbico

La curva de calibración para el método del ácido ascórbico reportado por el Standard Methods para muestra de agua dulce modificado en el grupo de bioprocesos, se realiza a partir de una solución concentrada de  $K_2HPO_4$  a 1000mg/L, a partir de esta se realizan diluciones de concentración conocida por triplicado y se lee en un lector de microplatos Synergy a 880 nm. Los resultados se observan en la tabla 6.

Tabla 6. Medición de la absorbancia del  $KNO_3$  a diferentes concentraciones.

Muestra	Concentración de $K_2HPO_4$ (mg/L)	Absorbancia 410nm			Promedio Absorbancia	Error
1	1000	1.745	2.102	2.035	1.961	0.190
2	500	1.605	2.152	2.208	1.988	0.333
3	250	1.902	1.501	1.585	1.663	0.211
4	100	1.760	1.827	1.679	1.755	0.074
5	50	1.371	1.335	1.313	1.371	0.029
6	25	1.117	1.104	1.196	1.139	0.050
7	10	0.873	0.896	0.883	0.884	0.012
8	5	0.642	0.629	0.610	0.627	0.016

<b>9</b>	2.5	0.319	0.321	0.306	0.315	0.008
<b>10</b>	1.25	0.160	0.152	0.157	0.156	0.004
<b>11</b>	0.625	0.080	0.078	0.075	0.078	0.003
<b>12</b>	0.3125	0.041	0.038	0.035	0.038	0.003
<b>13</b>	0.15625	0.027	0.016	0.015	0.019	0.007
<b>14</b>	0.078125	0.005	0.013	0.004	0.007	0.005

### Curva de calibración para Fosfatos

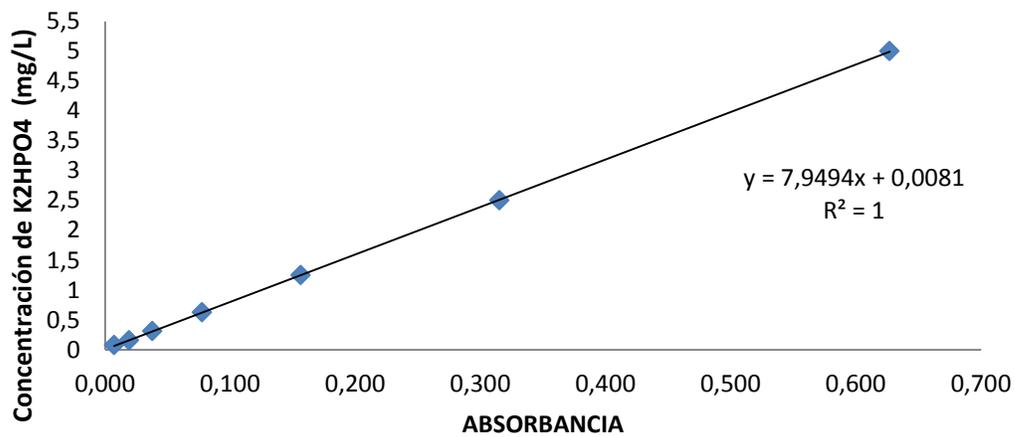


Figura 11. Curva de calibración para fosfatos.

### 9.3. Análisis estadístico:

#### 9.3.1. Análisis univariado: evaluación de la Relación C/N para la producción de Biomasa y el contenido de lípidos

##### Biomasa:

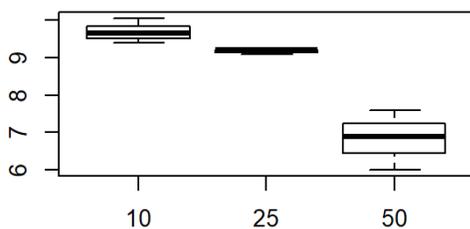


Figura 12. Gráfico de cajas y bigotes para la producción de biomasa a las diferentes relaciones C/N evaluadas.

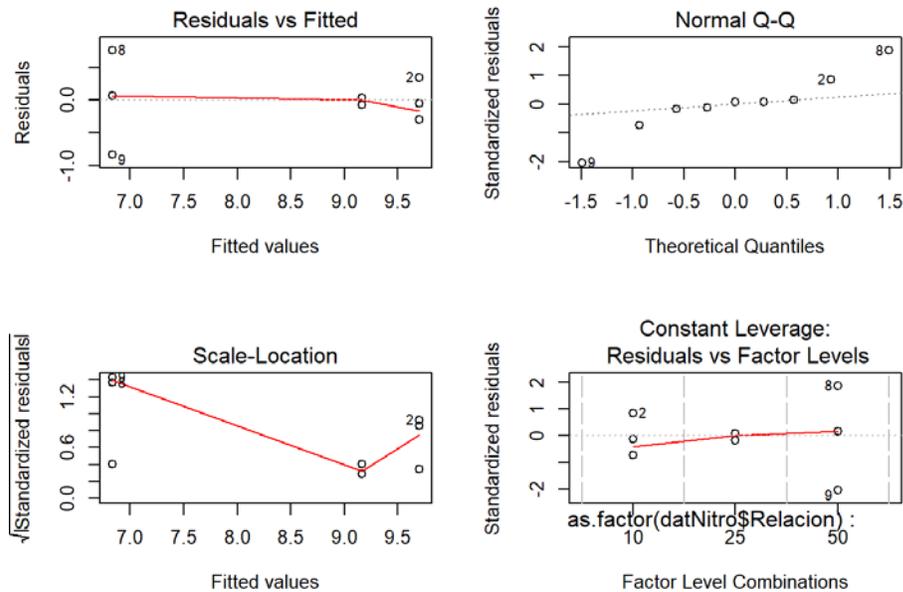


Figura 13. Supuestos: Normalidad, homocedasticidad e Independencia

**ANOVA (Analysis of Variance Table)** para la variable respuesta concentración de Biomasa a las diferentes relaciones C/N evaluadas

Response: datNitro\$Biomasa

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
as.factor(datNitro\$Rel)	2	13.9467	6.9733	27.739	0.0009296 ***
Residuals	6	1.5083	0.2514		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

**Análisis de Comparaciones múltiples (HSD Test for datNitro\$Biomasa)**

Mean Square Error: 0.2513889

as.factor(datNitro\$Relacion), means

	datNitro.Biomasa	std	r	Min	Max
10	9.700000	0.32787193	3	9.4	10.05
25	9.166667	0.05773503	3	9.1	9.20
50	6.833333	0.80208063	3	6.0	7.60

Alpha: 0.05 ; DF Error: 6

Critical Value of Studentized Range: 4.339195

Minimum Significant Difference: 1.256092

Treatments with the same letter are not significantly different.

datNitro\$Biomasa	groups
10	a
25	a
50	b

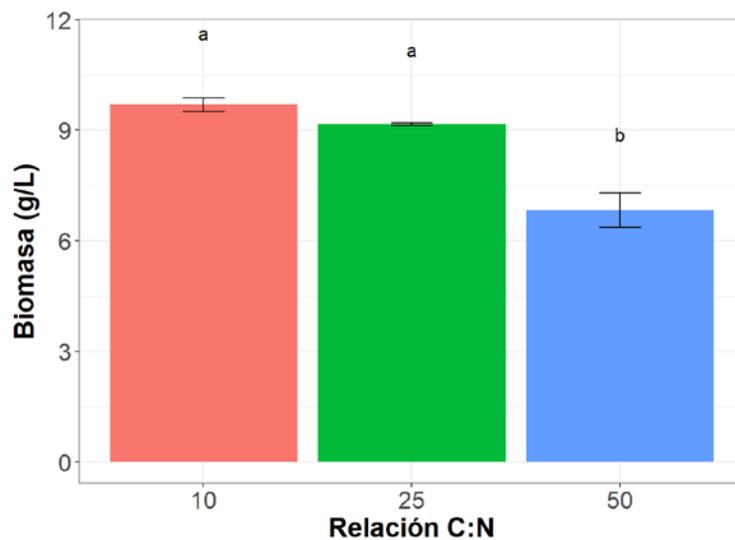


Figura 14. Comparaciones múltiples para la relación C/N.

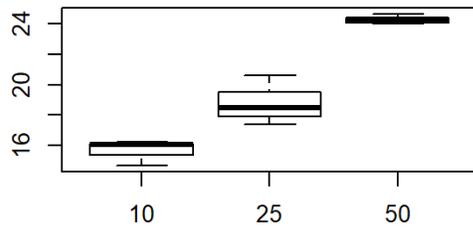
**Lípidos:**

Figura 15. Grafico de cajas y bigotes para la variable respuesta contenido de lípidos a las diferentes relaciones C/N evaluadas.

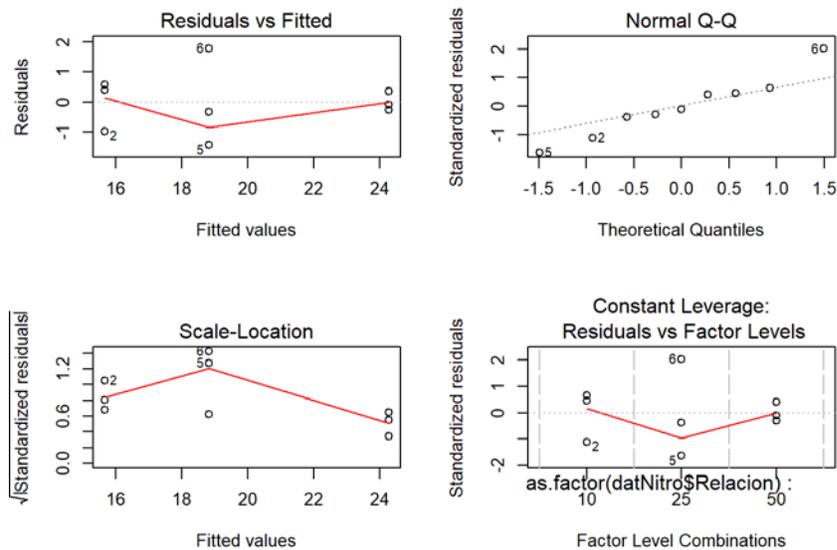


Figura 16. Supuestos: Normalidad, homocedasticidad e Independencia

**ANOVA (Analysis of Variance Table)** para el contenido de lípidos a las diferentes relaciones C/N evaluadas

Response: datNitro\$Lipidos

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
as.factor(datNitro\$Relacion)	2	114.056	57.028	49.041	0.0001916 ***
Residuals	6	6.977	1.163		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

### Comparaciones Múltiples HSD Test for datNitro\$Lipidos)

Mean Square Error: 1.162867

as.factor(datNitro\$Relacion), means

	datNitro.Lipidos	std	r	Min	Max	
10	15.65333	0.8467192	3	14.68	16.22	
25	18.82333	1.6323092	3	17.39	20.60	
50	24.27333	0.3274650	3	24.01	24.64	

Alpha: 0.05 ; DF Error: 6

Critical Value of Studentized Range: 4.339195

Minimum Significant Difference: 2.701553

Treatments with the same letter are not significantly different.

datNitro\$Lipidos	groups
50 24.27333	a
25 18.82333	b
10 15.65333	c

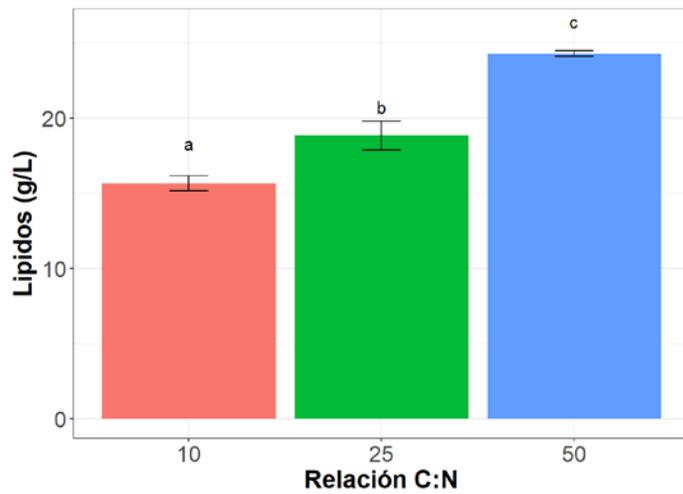


Figura 17. comparaciones multiples para la relación C/N.

### 9.3.2. Análisis univariado: evaluación de la Relación C/P para la producción de Biomasa y el contenido de lípidos

#### Biomasa

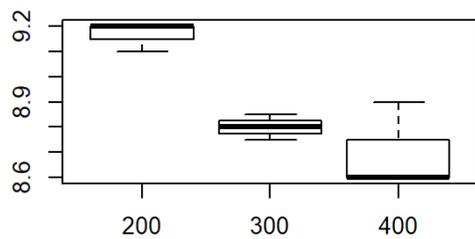


Figura 18. Grafico de cajas y bigotes para la producción de biomasa a las diferentes relaciones C/P evaluadas.

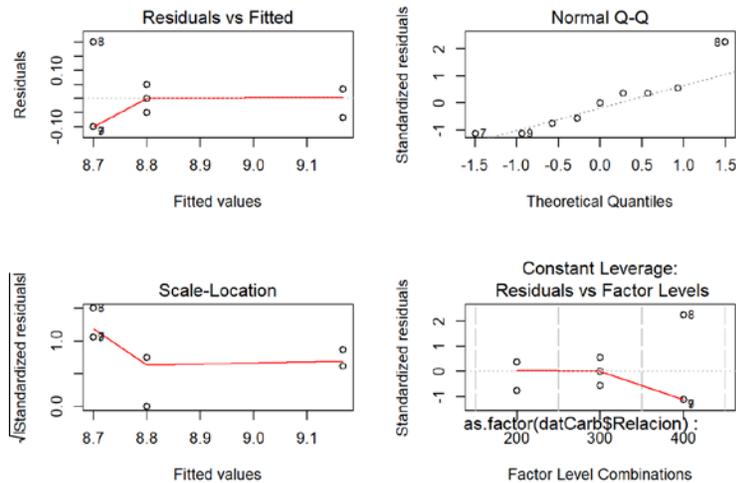


Figura 19. Supuestos: Normalidad, homocedasticidad e Independencia

**Análisis de varianza** para la concentración de Biomasa a las diferentes relaciones C/P evaluadas

Response: datCarb\$Biomasa

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
as.factor(datCarb\$Relacion)	2	0.36222	0.181111	15.163	0.004506 **
Residuals	6	0.07167	0.011944		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

**Análisis de comparaciones múltiples HSD Test**

Mean Square Error: 0.01194444

as.factor(datCarb\$Relacion), means

datCarb.Biomasa	std	r	Min	Max
200	9.166667	0.05773503	3	9.10 9.20
300	8.800000	0.05000000	3	8.75 8.85
400	8.700000	0.17320508	3	8.60 8.90

Alpha: 0.05 ; DF Error: 6

Critical Value of Studentized Range: 4.339195

Minimum Significant Difference: 0.2737988

Treatments with the same letter are not significantly different.

datCarb\$Biomasa	groups
200 9.166667	a
300 8.800000	b
400 8.700000	b

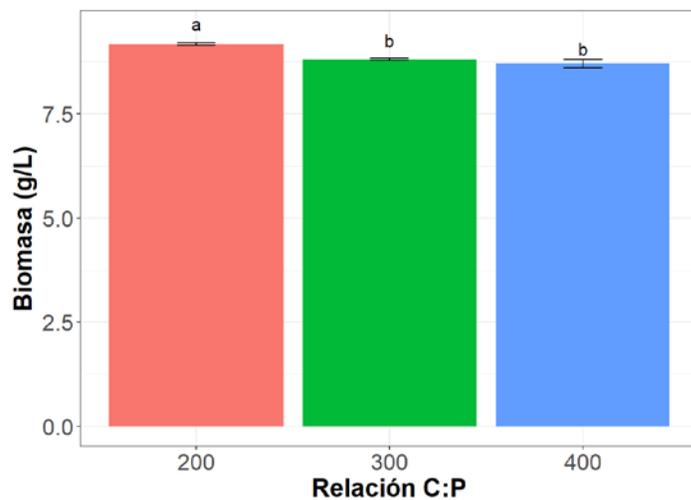


Figura 20. comparaciones multiples para la relación C/P.

### Lípidos:

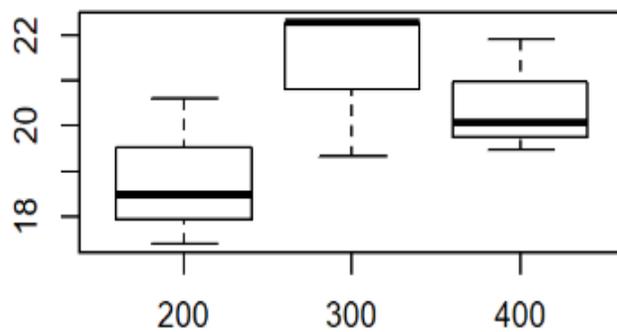


Figura 21. Grafico de cajas y bigotes para el contenido de lipidos a las diferentes relaciones C/P evaluadas.

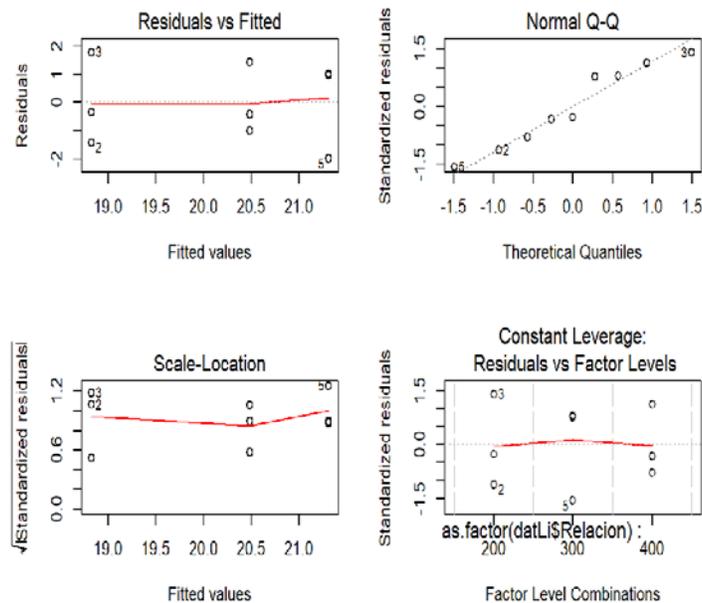


Figura 22. Supuestos: Normalidad, homocedasticidad e Independencia

**Análisis de varianza** para el contenido de lípidos a las diferentes relaciones C/P evaluadas

Analysis of Variance Table

Response: datLi\$Lipidos

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
as.factor(datLi\$Relacion)	2	9.6225	4.8112	1.9921	0.217	
Residuals	6	14.4907	2.4151			

**Análisis de comparaciones múltiples**HSD.test

Study: modLi ~ "as.factor(datLi\$Relacion)"

HSD Test for datLi\$Lipidos

Mean Square Error: 2.415122

as.factor(datLi\$Relacion), means

datLi.Lipidos	std	r	Min	Max
200	18.82333	1.632309	3	17.39 20.60
300	21.31000	1.723456	3	19.32 22.32
400	20.48333	1.269107	3	19.48 21.91

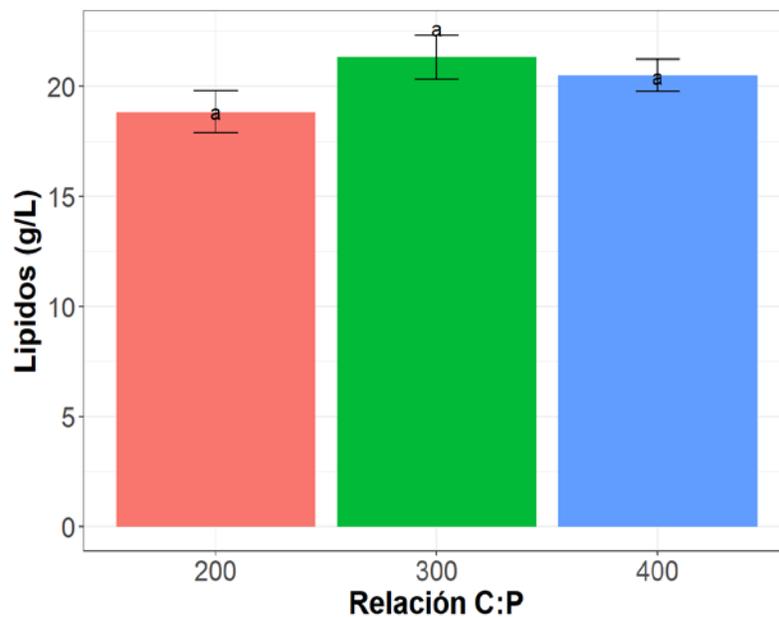
Alpha: 0.05 ; DF Error: 6

Critical Value of Studentized Range: 4.339195

Minimum Significant Difference: 3.893302

Treatments with the same letter are not significantly different.

datLi\$Lipidos	groups
300 21.31000	a
400 20.48333	a
200 18.82333	a



**Figura 23.** comparaciones multiples para la relación C/P.

### 9.3.3. Diseño factorial 2<sup>3</sup>: evaluación de la Temperatura y el pH para la concentración de Biomasa y contenido de lípidos

```
boxplot(Biomasa~pH*Temp)
```

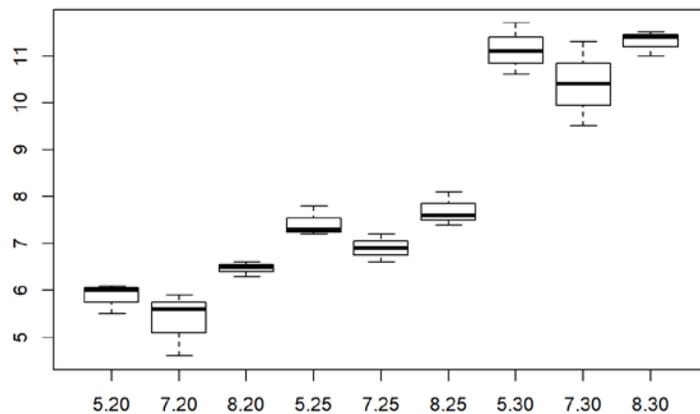


Figura 24. Grafico de cajas y bigotes para la producción de biomasa a los diferentes pH y Temperatura evaluadas.

Supuestos: Normalidad, homocedasticidad e Independencia.

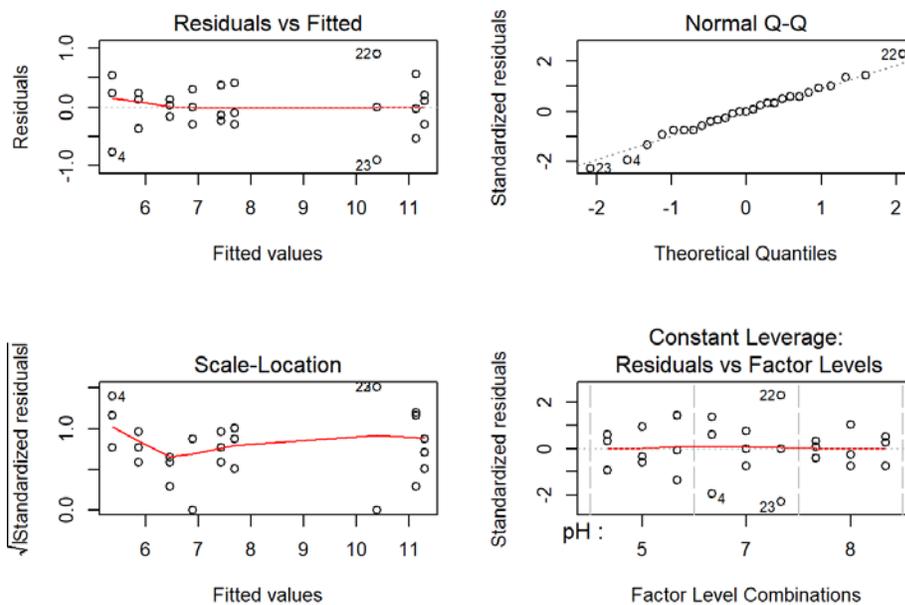


Figura 25. Supuestos: Normalidad, homocedasticidad e Independencia

### Analisis de varianza para la concentración de Biomasa a las diferentes relaciones pH y temperatura

Response: Biomasa

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pH	2	4.010	2.005	8.6057	0.002384 **
Temp	2	121.479	60.739 26	0.7250	5.127e-14 ***
pH:Temp	4	0.181	0.045	0.1948	0.937947

---

Residuals      18      4.193      0.233

---

Signif.codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

### **Análisis de comparaciones múltiples para pH y Temperatura**

#### **Biomasa: pH**

HSD Test for **Biomasa**

Mean Square Error: 0.232963

pH, means	Biomasa std	r	Min	Max
5 8.144444	2.369130	9	5.5	11.7
7 7.555556	2.309281	9	4.6	11.3
8 8.488889	2.187718	9	6.3	11.5

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Value of Studentized Range: 3.609304

Minimum Significant Difference: 0.5806917

Treatments with the same letter are not significantly different.

Biomasa groups

8 8.488889	a
5 8.144444	a
7 7.555556	b

#### **Biomasa: Temperatura**

HSD Test for Biomasa "Temp"

Mean Square Error: 0.232963

Temp, means	Biomasa std	r	Min	Max
20 5.900000	0.6123724	9	4.6	6.6
25 7.344444	0.4530759	9	6.6	8.1
30 10.944444	0.6839428	9	9.5	11.7

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Value of Studentized Range: 3.609304

Minimum Significant Difference: 0.5806917

Treatments with the same letter are not significantly different.

Biomasa groups		
30	10.944444	a
25	7.344444	b
20	5.900000	c

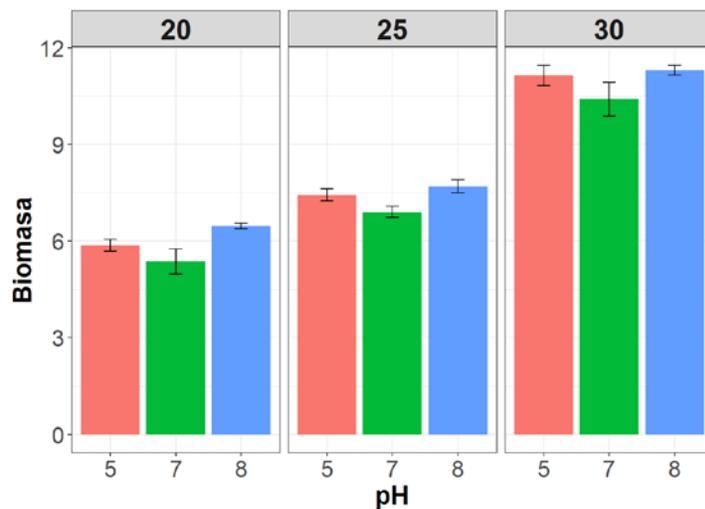


Figura 26.comparaciones multiples para Temperatura y pH.

### Diseño factorial 2<sup>3</sup> : Temperatura y pH para lipidos

boxplot(Lipidos~pH\*Temp)

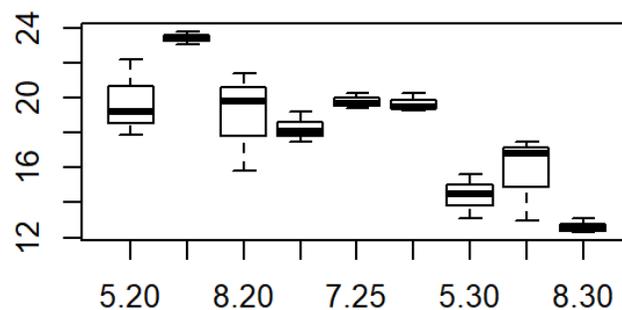


Figura 27. Grafico de cajas y bigotes para la producción de biomasa a las diferentes

temperaturas y pH.

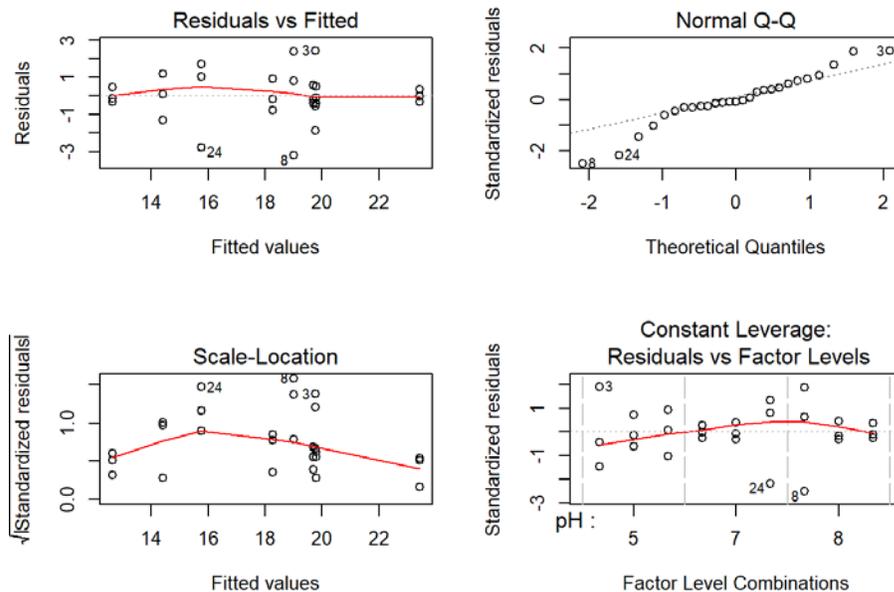


Figura 28. Supuestos: Normalidad, homocedasticidad e Independencia

### Análisis de varianza para el contenido de lípidos a los diferentes pH y temperatura

Response: Lipidos

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pH	2	34.370	17.185	6.9836	0.00569 **
Temp	2	206.672	103.336 4	1.9938	1.662e-07 ***
pH:Temp	4	18.539	4.635	1.8835	0.15716
Residuals	18	44.293	2.461		

---

Signif.codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

### Análisis de comparaciones múltiples para pH y Temperatura

#### Lipidos: pH

HSD Test for Lipidos

Mean Square Error: 2.460741

---

pH, means	Lipidos std	r	Min	Max
5 17.47778	2.746715	9	13.1	22.2
7 19.66667	3.546830	9	13.0	23.8
8 17.11111	3.682881	9	12.3	21.4

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Value of Studentized Range: 3.609304

Minimum Significant Difference: 1.887275

Treatments with the same letter are not significantly different.

	Lipidos	groups
7	19.66667	a
5	17.47778	b
8	17.11111	b

### **Lipidos: Temperatura**

HSD.test(modLipidos, 'Temp', console = T)

Study: modLipidos ~ "Temp"

HSD Test for Lipidos

Mean Square Error: 2.460741

Temp, means	Lipidos std	r	Min	Max
20 20.73333	2.7454508	9	15.8	23.8
25 19.25556	0.9275116	9	17.5	20.3
30 14.26667	1.9371371	9	12.3	17.5

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Value of Studentized Range: 3.609304

Minimum Significant Difference: 1.887275

Treatments with the same letter are not significantly different.

	Lipidos	groups
20	20.73333	a
25	19.25556	a
30	14.26667	b

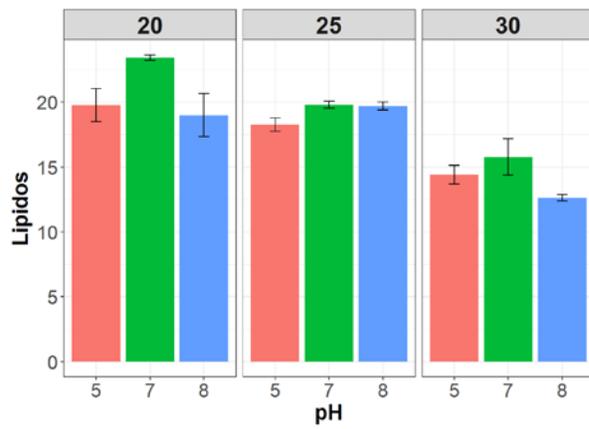


Figura 29. comparaciones multiples para la temperatura y pH.

#### 9.3.4 cinéticas de pH

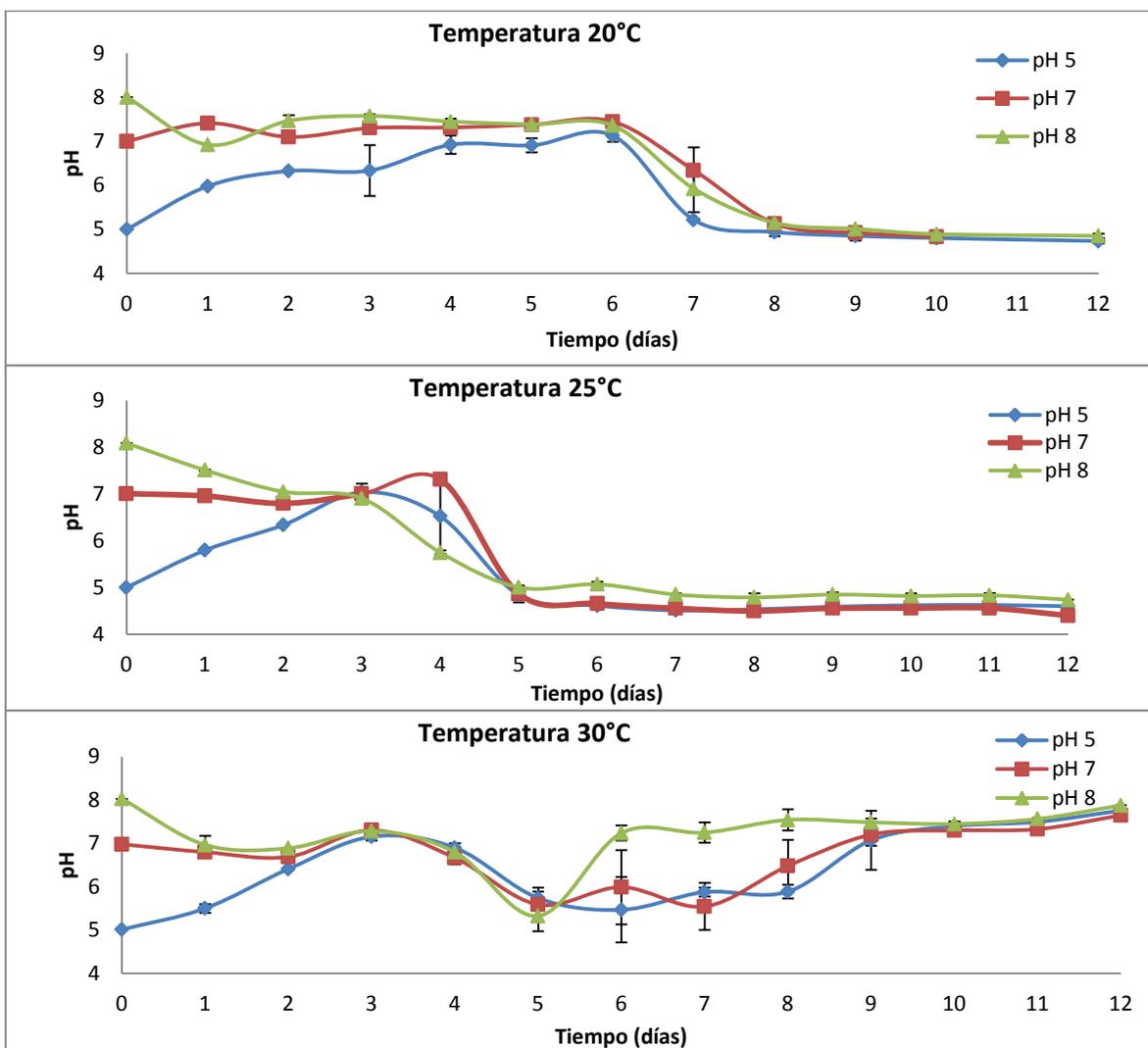


Figura 30. Cinéticas de pH en el tiempo para las tres temperaturas evaluadas.