

# INFLUENCIA DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN CHLORELLA VULGARIS UTEX 1803.

INFLUENCE OF THE CARBON / NITROGEN RATIO IN THE PRODUCTION OF TOTAL PROTEINS IN CHLORELLA VULGARIS UTEX 1803.



**Durán Serrano Linda Estephany<sup>1</sup>, Barajas Solano Andrés Fernando<sup>2</sup>,  
González Delgado Ángel Darío<sup>3</sup>, Barajas Ferreira Crisóstomo<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, linda.duran@correo.uis.edu.co

<sup>2</sup> Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, andresfdobarajas@gmail.com

<sup>3</sup> Universidad Nacional Abierta y a Distancia- UNAD, Bucaramanga, Colombia, cisyc@uis.edu.co

<sup>4</sup> Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, cbarajas@uis.edu.co.

Recibido: 03/11/2011 • Aprobado: 15/12/2011

## RESUMEN

Las microalgas representan una fuente de proteína con posibles aplicaciones en la nutrición humana y animal ya que poseen un buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos, en comparación con otras fuentes de proteína; sin embargo, la baja productividad de estos cultivos ha impedido implementar una producción a gran escala. En este trabajo se estudió la influencia de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de proteínas totales presentes en *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio. Se efectuaron cultivos mixotróficos durante 5 días con diferentes concentraciones de acetato (5mM, 10mM, 20mM), y nitrato de sodio (0,97mM, 1,94mM, 2,94mM). Todos los tratamientos se realizaron a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , con ciclos luz-oscuridad 12h: 12h. El valor más alto de concentración de proteínas se obtuvo en el medio de cultivo R9 con una productividad de  $0,78 \pm 0,18$  g/L, superando 1,7 veces más en producción, al cultivo control (0,46 g/L). De igual manera, fue el cultivo que consumió mayor cantidad de nitrógeno (91%). Con base en los datos obtenidos y el análisis de los mismos, se encontró que el contenido de proteínas totales en *C. vulgaris* es directamente proporcional a la cantidad de acetato y nitrato presentes en el medio, mientras que la respuesta de la cepa algal en cultivos con limitación de estos nutrientes, registró los valores más bajos en relación con la concentración de proteínas.

**Palabras clave:** acetato, cultivos mixotróficos, microalgas, nitrato de sodio, productividad

## ABSTRACT

*Microalgae represent a source of protein with potential applications in human and animal nutrition, since they possess a good balance of amino-acids and low content of nucleic acids in comparison with other sources of protein. However, the low productivity of cultures has prevented production at a large scale. In this work, we studied the total production of protein in *Chlorella vulgaris* at a laboratory scale, analyzing different pre-established parameters under the carbon/nitrogen ratio. For this, we performed mixotrophic cultures during 5 days at different concentrations of acetate (5Mm, 10Mm, 20Mm) and sodium nitrate (0,97Mm, 1,94Mm, 2,94Mm). All treatments were kept at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , with light/dark cycles of 12h: 12h for 5 days. The highest value of protein concentration was obtained from the culture R9 with a production of  $0,78 \pm 0,18$  g/L, 1.7 times higher than the production of the control culture treatment. (0,46 g/L). R9 was also the culture that consumed the most nitrogen (91%). Based on these results and their analysis, we found that the total content of protein in *C. vulgaris* is directly proportional to the amount of acetate and nitrate present in the culture media, since the algae grown in cultures where these nutrients were limited exhibited the lowest values in terms of protein concentration.*

**Keywords:** acetate, microalgae, mixotrophic culture, sodium nitrate, productivity



## I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son consideradas la principal fuente de alimento de muchas especies de peces, moluscos y crustáceos [1]. Su cultivo constituye potencialmente la forma más interesante de acuicultura, ya que puede sintetizar su propio alimento de manera similar a las plantas de origen terrestre, por lo que se convierte en la fuente primaria de alimento para la mayoría de los organismos marinos [2], [3]. La biotecnología microalgal ha ganado importancia en los últimos años debido al desarrollo de nuevas tecnologías ambientales [4], dado que su crecimiento requiere sustratos de bajo costo y pueden ser eficaces para la obtención de compuestos de alto valor agregado [5]. Actualmente, las microalgas representan una fuente de proteína con posibles aplicaciones en la nutrición humana y como complemento alimenticio para los animales, debido a que poseen un buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos en comparación con otras fuentes de proteína unicelular [6].

El contenido protéico en las microalgas comprende hasta el 50% o más de la biomasa total [7]. Aunque las investigaciones sobre la utilización de las

microalgas en la alimentación parece ser un tema relativamente reciente, en realidad su consumo por parte de los habitantes de determinadas zonas, data de tiempos inmemoriales; no obstante, los primeros ensayos fueron realizados en la década de los 60, unidos a la ejecución de estudios al respecto [5].

Para obtener una producción considerable de biomasa, es importante utilizar un medio que contenga todos los nutrientes básicos y un sistema de cultivo eficiente [8]; los sistemas de cultivo autotróficos, por lo general, presentan dificultades para alcanzar altas tasas de crecimiento y productividad [9], principalmente, debido a la restricción de luz en muchas de las configuraciones de los fotobiorreactores utilizados [10]. Por lo anterior, una posible alternativa es el uso de cultivos heterotróficos, dado que muchas algas no sólo pueden crecer fotosintéticamente mediante la fijación de  $\text{CO}_2$ , sino que también pueden aprovechar fuentes de carbono orgánico para la biosíntesis y el mantenimiento celular [11]. La mixotrofia es, entonces, el crecimiento en el cual el  $\text{CO}_2$  y el carbono orgánico se asimilan al mismo tiempo y, por ende, los metabolismos celulares

(fotosintético y fosforilación oxidativa) funcionan simultáneamente [12], [13]. La mayoría de estudios sobre crecimiento mixotrófico se han enfocado en las algas verdes como *Chlorella vulgaris* [14], conocida como una de las microalgas con más rápido crecimiento, que incluye por lo general 14% -22% de lípidos, 51% -58% de proteínas, 12% -17% de hidratos de carbono y 4% -5% de ácidos nucleicos [15]; además, ha demostrado que puede oxidar y utilizar el acetato como fuente de carbono para su crecimiento en la oscuridad [16], lo cual provoca cambios en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, debido a que el Acetil-CoA no se obtiene a partir del piruvato, sino del ión acetato. El mecanismo bioquímico que le permite a *C. vulgaris* crecer mediante la conversión de acetato, se conoce como ciclo de glioxilato [17], [18], [19]; de esta manera se confirma que *C. vulgaris* tiene la capacidad de crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas [20], encontrándose que su metabolismo se incrementa debido a una alta incorporación de carbono orgánico a partir del acetato dentro de las células, generando así, la formación de lípidos, polisacáridos y proteínas [21]. Se ha considerado que la relación entre el carbono y el nitrógeno influye en la producción de la biomasa total [22], [23] y en el contenido lipídico [24], [25], [26]. La asimilación de nitrógeno (tanto  $\text{NO}_3^-$  como  $\text{NH}_4^+$ ) en microalgas es un proceso costoso que está cercanamente relacionado con el metabolismo del carbono en cultivos autotróficos y heterotróficos, ya que hasta el 55% del carbono asimilado está comprometido para la asimilación y metabolismo del nitrógeno [23]. En general, modificaciones en el medio de cultivo cambian la composición bioquímica de la biomasa, fundamentalmente lo que corresponde a proteínas, lípidos, hidratos de carbono y pigmentos [27]. Según Huppe & Turpin [23], la variación en la concentración de carbono y nitrógeno puede hacer más productiva el alga en ciertos componentes. Es por ello, que en este trabajo se evaluó el efecto de la variación del acetato de sodio y nitrato como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente, en la producción de proteínas totales en la microalga *C. vulgaris*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Microalga y condiciones de crecimiento

La microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, se adquirió de la colección de cepas provenientes de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA); se cultivó en medio Bold Basal, cuya composición en mg/l es:  $\text{NaNO}_3$  (2,94),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $3,04 \times 10^{-1}$ )  $\text{NaCl}$  ( $4,28 \times 10^{-1}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $4,31 \times 10^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,29),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $1,70 \times 10^{-1}$ ) y micronutrientes (mg/l)  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $3,07 \times 10^{-2}$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $7,28 \times 10^{-3}$ ),  $\text{MoO}_3$  ( $4,93 \times 10^{-3}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $6,29 \times 10^{-3}$ ),  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $1,68 \times 10^{-3}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $1,85 \times 10^{-1}$ ), EDTA ( $1,71 \times 10^{-1}$ ), KOH ( $5,53 \times 10^{-1}$ ),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1,79 \times 10^{-2}$ ). El alga se mantuvo a  $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , pH entre 7 y 8, sin ningún suministro complementario de  $\text{CO}_2$ ; lámparas fluorescentes a ambos lados de los reactores proporcionaron la iluminación del cultivo.

Teniendo en cuenta el trabajo de Hernández-Benítez & Rosas-Oviedo [28], se realizaron cultivos mixotróficos con acetato de sodio y nitrato de sodio a tres concentraciones diferentes Tabla 1.

TABLA I  
DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS CULTIVOS  
MIXOTRÓFICOS PARA *C. VULGARIS*

	Acetato de Sodio (mM)		
Nitrato de Sodio (mM)	5	10	20
0,97	R1	R2	R3
1,94	R4	R5	R6
2,94	R7	R8	R9

### B. Biorreactores

Se usaron botellas de plástico transparentes con una capacidad de 2,5 litros, y un volumen de trabajo de 2 litros. Se utilizaron, también, un total de 30 reactores (original y 2 réplicas). En el extremo superior de cada uno de ellos se insertó un sistema de continuo suministro de aireación por burbujeo (tubo-difusor), con el fin de proveer de aire a los cultivos.

### C. Determinación de proteínas totales

Para la determinación de proteínas totales se implementó el método de solubilización de proteínas [24], el cual consiste en tomar 5 mL de medio con células y centrifugar a 3400 rpm durante 20 minutos; después de los 20 minutos se descartó el sobrenadante y se re-suspendió en 1 mL de NaOH 1M. La muestra se llevó a 100°C en un baño maría durante 5 minutos. Después del calentamiento se le agregaron 5 mL del reactivo de Biuret [29]. Previamente, se había obtenido la curva de calibración usando ovoalbúmina como estándar para proteínas a una concentración máxima de 2 g/L.

### D. Determinación de la tasa de consumo de nitrógeno

El nitrógeno consumido se midió utilizando el método espectrofotométrico propuesto por Clesceri *et al* [30]. De cada uno de los tratamientos se tomó una muestra diaria de 50mL, se centrifugó durante 20 minutos a 3400 rpm y se filtró utilizando papel filtro de 1µm con el fin de asegurar que el medio estuviera libre de células. La muestra se filtró al vacío utilizando papel filtro (2 µm); luego, al filtrado se le agregó 1 ml de solución de HCl 1 N, y se agitó vigorosamente durante 10 minutos. Finalmente, la muestra se leyó en el espectrofotómetro a 220 y 275 nm, cuyos valores, posteriormente, se reemplazaron en la ecuación (1).

$$\text{Valor corregido} = (2 * \lambda_{275}) - \lambda_{220} \quad (1)$$

### E. Análisis estadístico

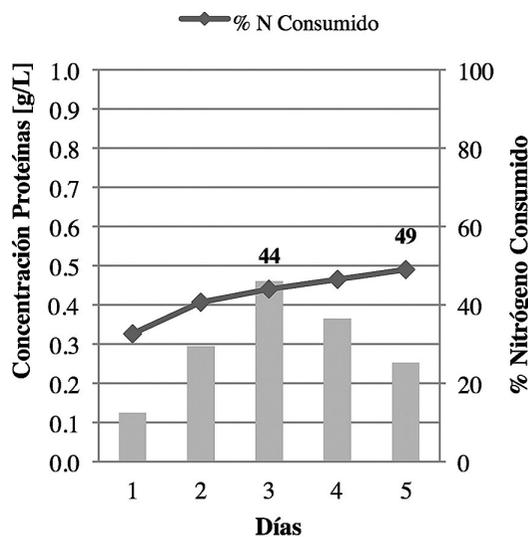
Los valores medios de los resultados se utilizaron en todos los experimentos. El error estándar de la media (SE) y los valores medios fueron representados con un límite de confianza del 95% [31]. Se realizaron pruebas *a priori* de normalidad y homogeneidad de varianzas, según las pruebas de Kolmogorov Smirnof y Levene, respectivamente [32] en el programa PAST 2.15 [33]. A continuación, en el programa Statistica 10 [34], se determinó si existían diferencias significativas en la producción de proteínas totales y consumo de nitrógeno con respecto a cada medio de cultivo,

empleando el método de varianza (Anova Factorial) y, finalmente, a las variables que reportaron significancia, se les realizó una prueba de Tukey.

## II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Relación entre el contenido de proteínas totales y el consumo de nitrógeno por *C. vulgaris*.

La variación en la concentración de proteínas totales en el medio de cultivo Bold Basal se muestra en la Fig. 1. El contenido de proteínas totales se incrementa al inicio del cultivo, obteniéndose la máxima concentración de proteínas al tercer día con un valor de 0,46±0,12 g/L y un consumo de nitrógeno del 44%. Al final del experimento, el valor decrece a 0,25±0,12 g/L con un consumo de nitrógeno del 49%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ördög *et al* [35], en los cuales la concentración de proteínas totales se incrementa al inicio del experimento en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno; pero cuando el nitrógeno se convierte en un limitante, sus concentraciones disminuyen. Otros autores sustentan que no solo se debe a la limitación de nutrientes como el nitrógeno, sino depende también de la edad del cultivo [36].

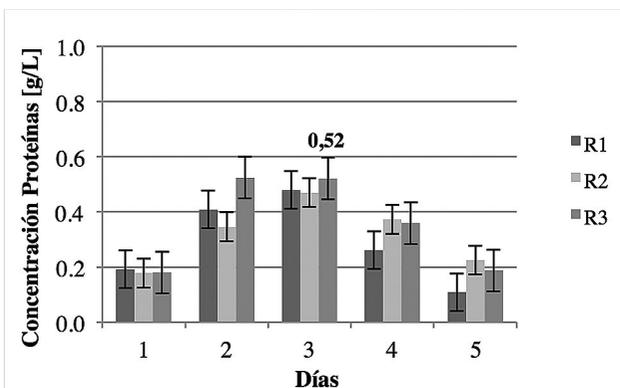


Fuente: Los autores

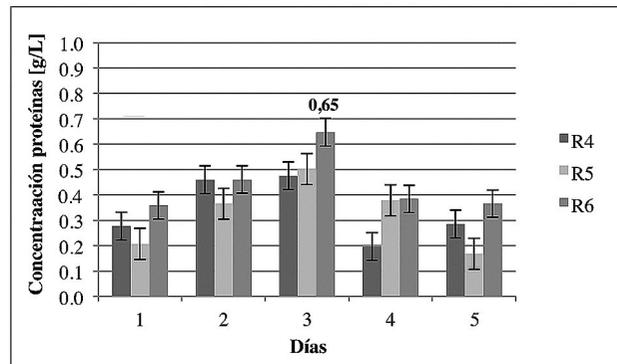
**Fig. 1** Consumo de nitrógeno (%) en relación con la concentración de proteínas totales presentes en *Chlorella vulgaris* en el medio de cultivo Bold Basal durante los 5 días del experimento.

### B. Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la deposición de proteínas totales en *C. vulgaris*.

Al comienzo del experimento, todos los cultivos producen aproximadamente la misma concentración de proteínas, debido a que el nitrógeno es abundante. En los cultivos con una concentración inicial de nitrato de 0,97mM, el que presentó la mayor cantidad de proteínas totales fue R3 con un valor de  $0,52 \pm 0,19$  g/L, Fig. 2, mientras que con una concentración inicial de 1,94mM de nitrato, el cultivo que registró la máxima concentración de proteínas totales fue R6, con un valor de  $0,65 \pm 0,12$  g/L, Fig. 3. Para los cultivos con la mayor concentración inicial de nitrato (2,94mM), R9 fue el que presentó el mayor contenido de proteínas con un valor de  $0,78 \pm 0,18$  g/L, Fig. 4. Los cultivos que registraron el mayor contenido de proteínas son los que presentan el nivel superior de acetato (20mM). El análisis estadístico determinó que existen diferencias significativas con respecto a la concentración de proteínas, puesto que el p-valor fue menor a 0,05, por lo que se puede concluir que la relación carbono/nitrógeno afecta de manera importante el contenido de proteínas, lo que se evidencia en el cultivo R9, el cual difiere significativamente de los otros cultivos.

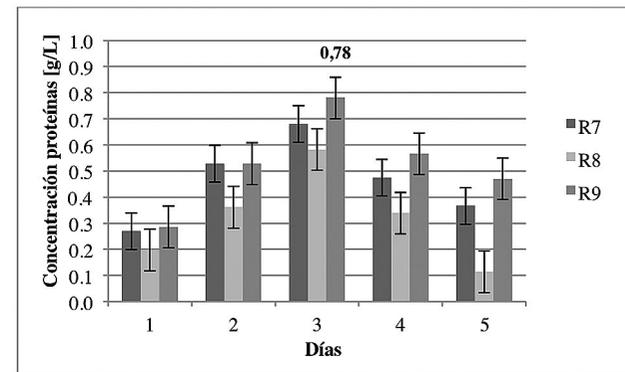


**Fig. 2** Producción de proteínas totales para los cultivos R1 (5mM: 0,97Mm), R2 (10mM: 0,97Mm) y R3 (20mM: 0,97Mm) durante los 5 días del experimento.



Fuente: Los autores

**Fig. 3** Producción de proteínas totales para los cultivos R4 (5mM: 1,94Mm), R5 (10mM: 1,94Mm) y R6 (20mM: 1,94Mm) durante los 5 días del experimento

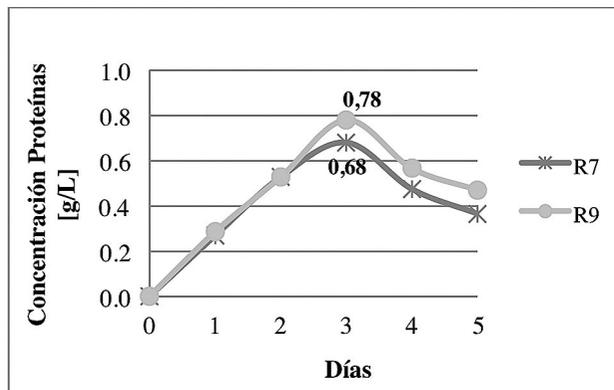


Fuente: Los autores.

**Fig. 4** Producción de proteínas totales para los cultivos R7 (5mM: 2,94Mm), R8 (10mM: 2,94Mm) y R9 (20mM: 2,94Mm) durante los 5 días del experimento.

Los resultados anteriores muestran que se produce mayor contenido de proteínas en cultivos con grandes cantidades de nitrógeno y acetato, mientras que la respuesta de la cepa algal en cultivos con limitación de nitrógeno es diferente, encontrándose los valores más bajos; esto implicaría que la variación de nutrientes en el medio de cultivo afecta la producción de proteínas totales. Los resultados de este trabajo coinciden con los reportados por [24], en los cuales el contenido de proteínas para *C. vulgaris* es menor en medios de cultivo con baja fuente de nitrógeno.

Los valores más altos en concentración de proteínas totales, se encontraron en los medios de cultivo R7 y R9 con valores de productividad de  $0,68 \pm 0,16$  g/L y  $0,78 \pm 0,18$  g/L, respectivamente, Fig. 5. Los resultados indican que altas concentraciones de nitrógeno generan aumento en la producción de proteínas totales para *C. vulgaris*, lo que está acorde con lo reportado por [37], quienes plantean que un incremento en la concentración de este nutriente en el medio de cultivo, genera un aumento en el contenido de proteínas totales. Además, se ha encontrado que la deficiencia de nitrógeno también afecta otros aspectos de la fisiología celular, incluyendo una disminución en la cantidad de clorofila, afectando así la habilidad de las células para realizar fotosíntesis, lo que se refleja en la disminución del crecimiento microalgal [35].



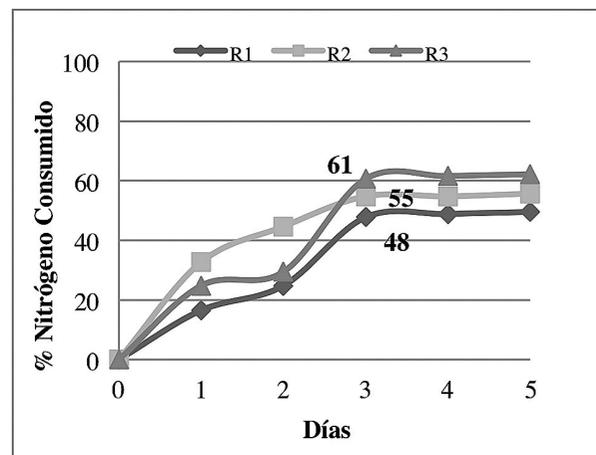
Fuente: Los autores

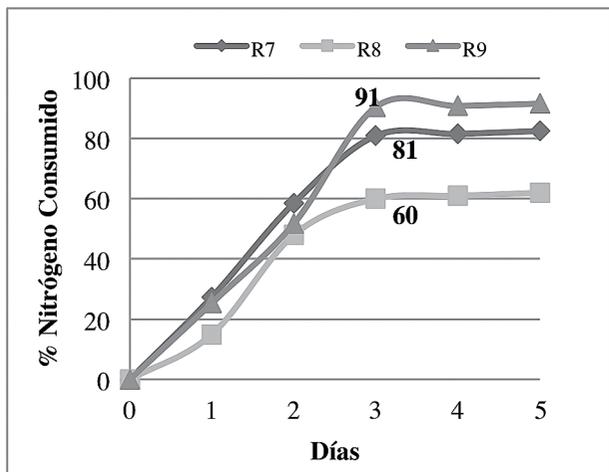
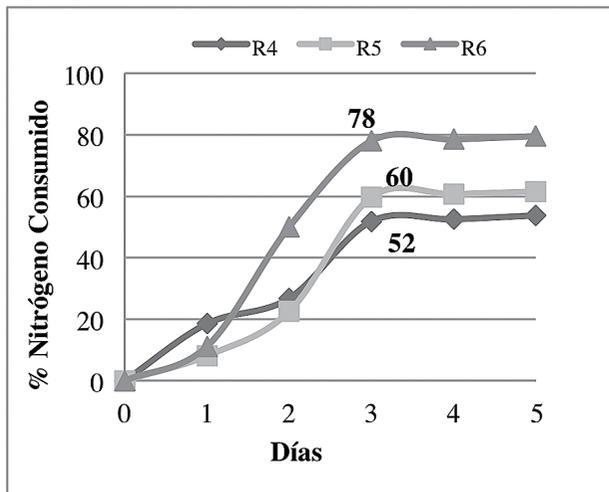
**Fig. 5** Cultivos con la mayor producción de proteínas totales presentes en *Chlorella vulgaris* durante los 5 días del experimento.

En los experimentos de [36] se encontró que incubando células en un medio libre de nitrógeno durante seis días, el contenido de proteínas totales y solubles se reducía sustancialmente. Los ensayos también indicaron una marcada reducción provocada por la escasez de nitrógeno en proteínas específicas (tales como rubisco) que se encuentran en el cloroplasto y que están implicadas en la fijación de  $\text{CO}_2$ , y en otros casos, una pequeña reducción de otras proteínas como las histonas.

### C. Consumo de nitrógeno por parte de *C. vulgaris* bajo la relación carbono/nitrógeno.

En todos los tratamientos se encontró que el consumo de nitrógeno aumenta durante los primeros tres días del experimento, y se mantiene constante hasta el último día de cultivo Fig. 6. Además, se observó un consumo significativo de nitrógeno para los cultivos con mayor concentración de nitrógeno y acetato Tabla 2. Con base en estos resultados se puede decir que las células con respecto a la concentración de nitrógeno, después de cinco días de cultivo, dejan de consumir nitrógeno como una medida para regular la concentración interna y externa. Aunque también puede deberse a que por la presencia del acetato, el nitrógeno no se consume en su totalidad, ya que este se incorpora rápidamente y se utiliza en la producción de polisacáridos y proteínas. Probablemente, la adaptación al crecimiento en acetato implica no sólo un aumento en la actividad de las enzimas del ciclo glioxilato, sino un aumento también en la actividad de las enzimas que catalizan reacciones que conducen a la producción de otros compuestos [38], [39], encontraron que en algún punto en el tiempo, después del agotamiento del nitrógeno en el medio, todo el nitrógeno es aparentemente utilizado en enzimas y estructuras celulares esenciales. Sin embargo, en los experimentos de [40] se encontró que las burbujas de aire en el cultivo de *C. vulgaris* ejercen un efecto positivo sobre el crecimiento celular, mientras que la presencia o ausencia de nitrato no provoca una diferencia significativa.





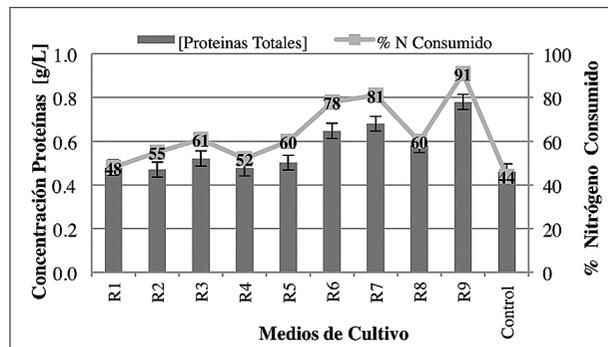
**Fig. 6** Consumo de nitrógeno (expresado en %) a lo largo del experimento (a) Cultivos R1; R2 ;R3 con relación C:N 5mM;10 mM;20 mM:0,97mM, respectivamente (b) Cultivos R4;R5;R6 con relación C:N 5mM;10 mM;20 mM:1,94Mm, respectivamente (c) Cultivos R7;R8;R9 con relación C:N 5mM;10 mM;20 mM:2,94mM, respectivamente.

**TABLA II**  
CULTIVOS QUE PRESENTARON MAYOR  
CONSUMO DE NITRÓGENO

Cultivos	[Nitrógeno Inicial]	Consumo Nitrógeno (%)
R7	2,94 mM	81
R9	2,94 mM	91

**D. Relación entre el contenido de proteínas y el consumo de nitrógeno en el medio modificado bajo la relación carbono/ nitrógeno en *C. vulgaris*.**

En la Fig. 7 se muestra la concentración de proteínas totales y el porcentaje de nitrógeno consumido en todos los experimentos después de tres días de cultivo, ordenados por sus concentraciones iniciales de acetato/nitrógeno. Según los resultados, los cultivos R7 y R9 que contienen alta concentración de nitrógeno y acetato inicial, registraron los valores más altos en cuanto a contenido de proteínas; de igual manera, estos cultivos corresponden a los que consumieron mayor cantidad de nitrógeno con valores de 81 y 91%, respectivamente. Fue evidente que el consumo de nitrógeno aumenta con el incremento en la concentración de nitrato; este mismo comportamiento se encontró en el trabajo de [41]. El cultivo que registró la menor concentración de proteínas totales fue el de control (0 mM Acetato: 2,94mM Nitrato) con una producción de 0,46 g/L y un consumo de nitrógeno del 44%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por [24], en los que se encontraron, para *C. vulgaris*, diferencias significativas en el contenido de proteínas, entre los diversos medios de cultivo, con respecto al cultivo control.



Fuente: Los autores

**Fig. 7** Contentación de proteínas y consumo de nitrógeno (%) en todos los medios de cultivo, incluyendo el cultivo control.

La gran diferencia entre las células cultivadas autotróficamente (cultivo control) y en presencia de acetato, radica en que este último incorpora carbono desde el acetato en compuestos como proteínas e hidratos de carbono, sugiriendo que las enzimas que catalizan estas reacciones que se llevan a cabo fuera del ciclo del ácido tricarbóxico pueden aumentar el contenido de proteínas y carbohidratos en presencia de acetato [ 21].

Los datos experimentales demuestran que la respuesta de la microalga a las diferentes concentraciones de nitrógeno y acetato es variable en términos de contenido de proteínas. Por tanto, un medio de cultivo con una baja fuente de nitrógeno y acetato, producirá poco contenido protéico. [35] reportaron que el nitrógeno se necesita para la biosíntesis de proteínas y, por ende, su limitación afecta la concentración de estas, las cuales se requieren en otros procesos, entre ellos, la división celular. [42] hicieron crecer *C. vulgaris* en cultivos a diferentes concentraciones de nitrógeno y encontraron que cuando eran mayores dichas concentraciones, aumentaba la biomasa, el contenido de proteínas (de 8% a 54%) y la clorofila; pero a bajas concentraciones, era mayor la acumulación de lípidos y menor el contenido de proteínas. La explicación que dieron [39] acerca de esta conducta de las microalgas, radica en que el montaje y mantenimiento de un fotosistema requiere grandes cantidades de pigmentos y proteínas que se producen desde la fuente de nitrógeno, mientras que la acumulación de lípidos neutros tiende a ocurrir en entornos limitados de nitrógeno. Sin embargo, [43] reportaron para *Scenedesmus sp.*, concentraciones de 0,01% y 0,1% de nitrógeno en el medio de cultivo que producía 34% y 32% de proteínas, respectivamente. Por tanto, no es posible generalizar una relación C/N que mejore la productividad de proteínas, dado que existe un potencial para perturbar los organismos simplemente alterando el nivel de iluminación durante el muestreo, la manipulación de la muestra e incubaciones experimentales [44]. También hay, sin duda, diferencias entre las especies y grupos de microalgas, tanto en la rapidez y magnitud de las respuestas, como en el umbral que hace significativas estas

respuestas [22]. Finalmente, la intersección de todos estos resultados es lo que permite viabilizar la producción de biomasa de microalgas con miras a la obtención de biocombustibles, ya que el concepto de biorrefinería debe extenderse más allá del solo hecho de la obtención de una mayor cantidad de metabolitos y empezar por abarcar un medio de cultivo específico que tenga en cuenta la minimización en cuanto al tiempo empleado y el consumo de nutrientes. Sin embargo, para los resultados obtenidos en este estudio, la elección del método de cultivo que permita el máximo aprovechamiento, debe estar ligada fuertemente a la productividad de los diferentes metabolitos de alto valor agregado (proteínas, carbohidratos, pigmentos, lípidos, entre otros). En este caso, aunque se produce una cantidad considerable de proteínas totales en tan solo tres días de experimento con el tratamiento R9, el consumo de nitrógeno es muy elevado (91%) del total presente en el medio. Por tanto, la producción de proteínas depende de los requerimientos de la especie en particular y se ve afectado conforme aumenta o disminuye la cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo [37].

## IV. CONCLUSIONES

Con base en los datos obtenidos y el análisis de los mismos, se comprobó experimental y estadísticamente que el contenido de proteínas es directamente proporcional a la cantidad de acetato y nitrato presentes en el medio, mientras que la respuesta de la cepa algal en cultivos con limitación de estos nutrientes es diferente, por lo que se encontraron los valores más bajos en relación con la concentración de proteínas.

*Chlorella vulgaris* UTEX 1803 puede ser cultivada en el medio de cultivo con una concentración de 20Mm de acetato de sodio y 0.97nM de nitrato de sodio (R9) debido a que es allí donde presenta los valores más altos en cuanto al contenido de proteínas totales que va desde 0.29 g/L hasta 0.78g/L, en comparación con el cultivo control, el cual registró una productividad máxima de 0,46 g/L en tres días de cultivo.

## REFERENCIAS

- [1] J. H. Wilson. "The food value of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin to the larvae of *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* Thunberg." *Aquaculture*, vol. 13, pp. 313-323, 1978.
- [2] C.J. Dawes. *Botánica marina*. Ed. Limusa, México, D. F.p. 673, 1986.
- [3] D. W. Marshall. *Biología de las Algas. Enfoque fisiológico*. Ed. Limusa. México. D. F. pp. 12-13, 1987.
- [4] O. Pulz. "Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms" *Appl. Microbiol. Biotechnol*, vol. 5, pp. 287-293, 2001.
- [5] H. J. Morris,; M. M Quintana, A Almarales y , L. Hernández. "Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*." *Rev Cubana Aliment Nutr*.vol. 13, pp. 123-128, 1999.
- [6] M. R Brown. *Nutritional value of microalgae for aquaculture. Avances en Nutrición Acuícola VI*. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México. 282-292, 2002.
- [7] E. W. Becker, "Micro-algae as a source of protein." *Biotechnology*.vol. 25, pp. 207-210, 2007.
- [8] A. Edberg, "Growth of *Chlorella vulgaris* at High Carbon Dioxide Levels in Swedish Light Conditions." Master of Science Thesis in Energy Engineering. Umeå Institute of Technology, 2010.
- [9] W. Xiong, C. Gao, D. Yan, C. Wu, Q. Wu. "Double CO<sub>2</sub> fixation in photosynthesis-fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production." *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 2287-2293, 2010.
- [10] F. Fernández, J. Pérez, J. Sevilla, F. Camacho, E. Grima. "Modeling of eicosapentaenoic acid (EPA) production from *Phaeodactylum tricornutum* cultures in tubular photobioreactors. Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance." *Biotechnology and Bioengineering*.vol. 68, pp.173-183, 2000.
- [11] Ma. E Martínez, A.F. Camacho, J.M. Jimenez, , J. B. Espinola. "Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of *Chlorella pyrenoidosa* mixotrophic growth." *Process Biochemistry*.vol 32,pp. 93-98, 1997.
- [12] T. Ogawa, S. Aiba, "Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*." *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 23, pp. 1121-1132, 1981.
- [13] F. J. Márquez, K. Saski, T. Kakizono, N. Nishio, S. Nagai, "Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions." *Ferment Bioeng*. Vol. 76, pp. 408-410, 1993.
- [14] X. Liu, S. Duan, A. Li, N. Xu, Z. Cay, Z. Hu, « Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*." *Journal of Applied Phycology*. Vol. 21, pp. 239-246, 2009.
- [15] J. Kim, B:P: Lingaraju, R. Rheume, J. Lee, K:F: Siddiqui. "Removal of Ammonia from Wastewater Effluent by *Chlorella Vulgaris*." *Tsinghua Science and Technology*. vol. 15, pp. 391-396, 2010.
- [16] M:J: Merrett and P:J: Syrett. "The relationship between glucose oxidation and acetate oxidation in *Chlorella vulgaris*." *Physiologia*. vol. 13, pp. 237-49, 1960.
- [17] H. Kornberg, and H. Krebs. "Synthesis of cell constituents from C<sub>2</sub>-units by a modified tricarboxylic acid cycle." *Nature*, vol. 179, pp. 988-991, 1957.
- [18] H. Kornberg and S. Elsdén. "The Metabolism of 2-Carbon Compounds by Microorganisms." *Adv Enzymol Related Areas Molecular Biology*, vol. 23, pp. 401-470, 1961.
- [19] K. Goulding, and M. Merrett,. "The Photometabolism of Acetate by *Chlorella pyrenoidosa*." *J Experiment Bot*. vol. 17, pp. 678-689, 1966.
- [20] M. Borowitzka. "Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters." *Journal of Biotechnology*. Vol. 70, pp. 313-321, 1999.
- [21] P:J: Syrett, S:M: Bocks, M:J. Merrett. *The assimilation of acetate by Chlorella vulgaris*. Ibid. 15: 35-47, 1964.
- [22] K. Flynn. "Algal carbon-nitrogen metabolism: a biochemical basis for modelling the interactions between nitrate and ammonium uptake." *Journal of Plankton Research*. vol. 13, pp. 373-387, 1991.
- [23] H. C.Huppe and D.H. Turpin. "Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells." *Plant Physiol. Plant Mol. Bioi*, vol. 45, pp. 507- 577, 1994.
- [24] A.M. Illman, A.H. Scragg and S.W. Shales, "Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium." *Enzyme and Microbial Technology*. vol. 27, pp. 631-635, 2000.
- [25] A.H. Scragg, , A.M. Illman, A. Carden, S.W. Shales. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, vol. 23, pp. 67 - 73, 2002.
- [26] C.Y. Lin and C.H. Lay. "Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora." *International Journal of Hydrogen Energy*. vol. 29, pp. 41 - 45, 2004.
- [27] S. Sánchez, S., M.A. Martínez and F. Espinola. "Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium." *Biochemical Engineering Journal*. vol. 6, pp. 13-18, 2000.
- [28] P. Hernández-Benítez and C. Rosas-Oviedo. "Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobioreactores a escala de laboratorio" *Fac. Ingeniería Físicoquímica Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia*, 62, 2011.

- [29] F. Dorey and G. Draves. *Quantitative Analysis Laboratory: A New Approach Funded by the National Science Foundation*. University of Central Arkansas. 1-3, 1998.
- [30] L.S. Clesceri, A.E. Greenberg and A.D. Eaton. "Standard Methods for the examination of water and wastewater" *American Public Health Association*, vol. 20, pp. 708-710, 1999.
- [31] R.E. Parker. "Introductory Statistics for Biology". *Cambridge University Press. Cambridge*, vol. 2, pp. 60-73, 1980.
- [32] J. Zar. *Biostatistical analysis*. 4<sup>a</sup>. Ed.. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 663 pp, 1999.
- [33] Ø Hammer,, D. Harper and P. Ryan. *PAST*. "Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis". *Palaeontologia Electrónica*, vol. 4, pp. 1-9, 2001.
- [34] Statsoft Inc (2011). *STATISTICA 10*. [Programa informático]. Disponible en: <http://www.statsoft.com/>.
- [35] V. Ördög, W.A. Stirk, P. Bálint, J.V. Staden and C. Lovász. "Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures" *J Appl Phycol*, vol. 97, pp. 11-19, 2011.
- [36] N.E. Farrill, L. Travieso, F. Benítez, E. Bécares, S. Romo, R. Borja, P. Weiland and E. Sánchez. "Population Dynamic of Algae and Bacteria in an Oxidation Channel". *Journal of Environmental Science and Health*., vol. 38, pp. 697-709, 2003.
- [37] J. Fábregas, J. Abalde and C. Herrero. "Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentration as chloride, sulphate, nitrate and carbonate" *Aguaculture*.vol. 83, pp. 289-304, 1989.
- [38] D.A. Walker. "Pyruvate carboxylation and plant metabolism" *Biol. Rev*, vol. 37, pp. 215-56, 1962.
- [39] B. Richardson, D.M. Orcutt, H.A. Schwertner, C.L. Martinez and H.E. Wickline. "Effects of Nitrogen Limitation on the Growth and Composition of Unicellular Algae in Continuous Culture." *Applied Microbiology*, vol. 18, pp. 245-250, 1969.
- [40] Y. Liang, Y., N. Sarkany, Y. Cui. "Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions" *Biotechnol Lett*, vol. 31, pp. 1043-1049, 2009.
- [41] W.M. Rowley. "Nitrogen and phosphorus biomass-kinetic model for *Chlorella vulgaris* in a biofuel production scheme" Thesis. Air Force Institute of Technology. Air University, 2010.
- [42] L. Uslu, O. Isik, K. Koç and T. Göksan, "The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*". *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, pp. 386-389, 2011.
- [43] O.C. Quevedo, V.S. Morales and C.A. Acosta. "Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal" *Vitae*.vol. 15, pp. 25-31, 2008.
- [44] G. Hitchcock, C. Goldman and M. Dennett. "Photosynthate partitioning in cultured marine phytoplankton metabolic patterns in a marine diatom under constant and variable light intensities" *Marine Ecology Progress*. Vol. 30, pp. 77-84, 1986.