UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación del efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y la composición bioquímica de la microalga *Parachlorella kessleri*

Ing. Cindy Carolina Latorre Hernández

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá D.C., Colombia
2020

Evaluación del efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y la composición bioquímica de la microalga *Parachlorella kessleri*

Ing. Cindy Carolina Latorre Hernández

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Química

Director:

Ph.D. Rubén Darío Godoy Silva

Línea de Investigación:

Bioprocesos – Cultivo de microalgas

Grupo de Investigación:

Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2020

A Héctor José,

el mejor compañero que la vida pudo darme,

por su amor y paciencia.

Yo te pido que seas fuerte y valiente, que no te desanimes ni tengas miedo, porque yo soy tu Dios, y te ayudaré por dondequiera que vayas.

Josué 1:9

Agradecimientos

De la manera más sincera expreso mis agradecimientos:

A Dios, por darme los medios y la fuerza necesaria que me permitió alcanzar esta meta.

A mi esposo, mis padres, hermanas, tíos y primos por siempre mantenerme en sus plegarias, por su amor, el apoyo económico y por sus palabras de aliento en los momentos difíciles.

A la Universidad Nacional y de manera muy especial a todo el personal docente, administrativo y técnico, por su oportuna ayuda en todo momento.

A mi grupo de investigación, de quienes recibí innumerables enseñanzas y con quienes compartí momentos realmente inolvidables; especialmente a la Ing. Valeria Colón por su apoyo durante la fase experimental.

A todos mis amigos del “salón de posgrados” y del laboratorio, por todos los momentos compartidos, porque siempre tuvieron una palabra para animarme, tienen un lugar muy grande en mi corazón.

A mis amigos y compañeros de la Universidad ECCI, por todo el apoyo técnico y emocional que me brindaron para la realización de este proyecto.

A mis amigos de siempre y a los nuevos que esta etapa me regaló y que de alguna manera contribuyeron a la consecución de este objetivo.

Resumen

La microalga *Parachlorella kessleri* fue sometida a regímenes de cultivo autotróficos, fotoheterotróficos, heterotróficos y mixotróficos, con el fin de evaluar su efecto sobre el crecimiento y la composición bioquímica de la microalga. Las fuentes de carbono orgánico utilizadas fueron glucosa y glicerol, adicionadas en concentraciones de 1, 3 y 5 $g \cdot L^{-1}$, comparadas siempre con un ensayo control autotrófico sin fuente de carbono orgánica únicamente suplementado con CO_2 atmosférico. Los resultados indicaron que *P. kessleri* tiene mayor afinidad al uso de glucosa, bajo cualquiera de los regímenes de cultivo, que al glicerol, lo cual se vio traducido en mayor concentración final de células en estos tratamientos.

La composición bioquímica de la microalga fue afectada por el tipo de régimen de cultivo y por la concentración de fuente de carbono, indicando en términos generales que a medida que se incrementa la concentración de fuente de carbono orgánica se incrementa también la producción de lípidos y carbohidratos. Sin embargo, se observó también que en los tratamientos suplementados con glicerol, a pesar de presentar menores concentraciones celulares máximas, fue en ellos donde se observó una mayor acumulación de carbohidratos y lípidos, sugiriendo un metabolismo destinado más a la acumulación de energía que a la reproducción bajo estas condiciones.

Palabras clave: *Parachlorella kessleri*, cultivo fotoheterotrófico, cultivo heterotrófico, cultivo mixotrófico, glucosa, glicerol, composición bioquímica.

Abstract

The microalgae *Parachlorella kessleri* was subjected to autotrophic, photo-heterotrophic, heterotrophic and mixotrophic culture regimes in order to evaluate its growth and biochemical composition. As organic carbon sources, glucose and glycerol were tested in concentrations ranging from 1, 3 and 5 $g \cdot L^{-1}$, while an autotrophic culture was used as a control without organic carbon source added but only atmospheric CO_2. Results suggest *P. kessleri* has a better affinity for glucose than for glycerol under any of the culture regimes, this affinity resulted in higher cell counts for glucose-supplemented cultures.

Biochemical composition of the microalgae was affected by culture regime and concentration of organic carbon source; in general, on increase in organic carbon concentration caused on increase in the concentration of lipids and carbohydrates. However, in treatments with glycerol, besides exhibiting lower cellular concentrations, it was observed higher lipid and carbohydrates accumulation, suggesting a metabolism focused to accumulation of energy rather than reproduction under these conditions.

Keywords: *Parachlorella kessleri*, photoheterotrophic culture, heterotrophic culture, mixotrophic culture, glucose, glycerol, biochemical composition.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **XI**

Abstract ..... **XII**

Contenido ..... **XIII**

Introducción **21**

1. Antecedentes **25**
1.1 Microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles 25
1.2 Utilización de glucosa para el cultivo de microalgas 31
1.3 Utilización de glicerol para el cultivo de microalgas 32

2. Marco teórico **36**
2.1 Género Parachlorella 36
2.1.1 Origen del género *Parachlorella* 36
2.1.2 Historia del género *Parachlorella* 37
2.1.3 Otros rasgos morfológicos 40
2.1.4 Investigaciones en *P. kessleri* 42
2.2 Métodos de cultivo de microalgas 44
2.3 Metabolismo de microalgas 49
2.3.1 Fotosíntesis en microalgas 49
2.3.2 Rutas metabólicas 54
2.3.3 Asimilación del carbono orgánico durante el metabolismo mixotrófico y heterotrófico 63
2.3.4 Composición bioquímica de las microalgas 67

3. Materiales y métodos **70**
3.1 Microorganismo y condiciones de mantenimiento 70
3.1.1 Aislamiento y mantenimiento de la cepa 70
3.2 Adaptación dela cepa al cultivo con fuentes de carbono orgánicas 71
3.2.1 Preparación del preinóculo 71
3.2.2 Escalado del preinóculo 73
3.3 Establecimiento del experimento 75
3.3.1 Toma de muestras del cultivo 78
3.3.2 Control de la contaminación 79
3.3.3 Rendimiento de peso seco 80

3.3.4 Consumo de la fuente de carbono 80
3.4 Determinación de la composición bioquímica 80
3.4.1 Determinación del contenido de humedad de biomasa de microalgas 82
3.4.2 Determinación del contenido de cenizas de biomasa de microalgas 82
3.5 Tratamiento estadístico de datos 83

4. Resultados y discusión 85
4.1 Evaluación del efecto de la glucosa y diferentes regímenes de cultivo sobre el crecimiento de *Parachlorella kessleri* 86
4.1.1 Crecimiento celular de *P. kessleri* en glucosa 86
4.1.2 Velocidad específica de crecimiento en glucosa 91
4.1.3 Consumo de glucosa 94
4.1.4 pH 97
4.2 Evaluación del efecto del glicerol y diferentes regímenes de cultivo sobre el crecimiento de *Parachlorella kessleri* 100
4.2.1 Crecimiento celular de *P. kessleri* en glicerol 100
4.2.2 Velocidad específica de crecimiento en glicerol 104
4.2.3 Consumo de glicerol 105
4.2.4 pH 107
4.3 Composición bioquímica 109
4.3.1 Composición bioquímica de *P. kessleri* en tratamientos con glucosa 110
4.3.2 Composición bioquímica de *P. kessleri* en tratamientos con glicerol 114
4.3.3 Pigmentos 116

5. Conclusiones y recomendaciones 119
5.1 Conclusiones 119
5.2 Recomendaciones 120

BIBLIOGRAFÍA 159

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Biorefinería a partir de microalgas.. 29
Figura 2-1. Tipos de morfología de los cloroplastos presentes en el género *Chlorella*.....38
Figura 2-2: Retos y opciones de mejora en cultivos mixotróficos y heterotróficos de microalgas.....47
Figura 2-3: Resumen esquemático de la fotosíntesis. 49
Figura 2-4: Esquema de la estructura del cloroplasto en Chlorophyta. 50
Figura 2-5: Esquema del arreglo de los fotosistemas I y II, complejo citocromo b6 y ATP sintasa dentro de la membrana del tilacoide.....51
Figura 2-6: Fotorrespiración y Ciclo de Calvin.. 53
Figura 2-7: Esquema de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas y de la ruta de las pentosas.. 56
Figura 2-8: Ciclo de Krebs o ciclo de ácidos tricarboxílicos. 58
Figura 2-9: Biosíntesis del almidón.....61
Figura 3-1: Aislamiento y mantenimiento de la cepa *P. kessleri* 70
Figura 3-2: Preparación del preinóculo.....72
Figura 3-3: Escalado. 74
Figura 3-4: Esquema del experimento según las fuentes de carbono y las condiciones de cultivo.....74
Figura 3-5: Establecimiento del experimento.....76
Figura 3-6: Sistema para tomar muestras de forma estéril. 79
Figura 4-1: Fotografía en SEM de *Parachlorella kessleri.*.....85
Figura 4-2: Curvas decrecimiento de la microalga *P. kessleri* en medio BBM suplementado con glucosa en diferentes concentraciones bajo tres modalidades de cultivo. 87

Figura 4-3: Incremento máximo celular para los tratamientos suplementados con glucosa.. 88
Figura 4-4: Velocidad específica de crecimiento para los tratamientos suplementados con glucosa. 92
Figura 4-5: Concentración de glucosa en cultivos de *P. kessleri* bajo diferentes regímenes de cultivo..... 95
Figura 4-6: Variación del pH para tratamientos suplementados con glucosa. 98
Figura 4-7: Curvas de crecimiento de la microalga *P. kessleri* en medio BBM suplementado con glicerol en diferentes concentraciones bajo tres modalidades de cultivo.. 101
Figura 4-8: Incremento máximo celular para los tratamientos suplementados con glicerol.. 102
Figura 4-9: Velocidad específica de crecimiento para los tratamientos suplementados con glicerol.. 105
Figura 4-10: Concentración de glicerol en cultivos de *P. kessleri* bajo diferentes regímenes de cultivo.. 106
Figura 4-11: Variación del pH para tratamientos suplementados con glicerol..... 108
Figura 4-12: Fotografías de los tratamientos suplementados con glucosa. 117
Figura 4-13: Fotografías de los tratamientos suplementados con glicerol. 117

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2-1: Modos de cultivo de microalgas 44

Tabla 2-2: Ventajas y limitaciones de los cultivos heterotróficos y mixotróficos de microalgas.. 48

Tabla 3-1: Planteamiento del diseño experimental... 77

Tabla 4-1: ANAVA del efecto del régimen de cultivo y la concentración de glucosa sobre el crecimiento celular. 86

Tabla 4-2: Cantidad de biomasa en $g \cdot L^{-1}$ alcanzada por diferentes especies de microalgas bajo cuatro modalidades de cultivo.....91

Tabla 4-3: ANAVA efecto del régimen de cultivo y la concentración de glucosa sobre la velocidad específica de crecimiento. 91

Tabla 4-4: Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) máxima alcanzada por diferentes especies de microalgas bajo cuatro modalidades de cultivo y diferentes concentraciones de glucosa. 94

Tabla 4-5. ANAVA efecto del régimen de cultivo y la concentración de glicerol sobre el incremento celular. 100

Tabla 4-6: ANAVA efecto del régimen de cultivo y la concentración de glicerol sobre la velocidad específica de crecimiento. 104

Tabla 4-7: Composición bioquímica en base seca de *P. kessleri* en tratamientos suplementados con glucosa y expuestos a regímenes de crecimiento fotoheterotrófico, heterotrófico y mixotrófico.. 111

Tabla 4-8: Composición bioquímica en base seca de *P. kessleri* en tratamientos suplementados con glicerol y expuestos a regímenes de crecimiento fotoheterotrófico, heterotrófico y mixotrófico. 115

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
A	Área	m^{-2}	$\iint dxdy$
E	Energía	J	$m \cdot L^{2} \cdot t^{-2}$
m	Masa	Kg	DF
t	Tiempo	s	DF
T	Temperatura	ºC	DF
V	Volumen	m^{3}	$\int dr^{3}$
I	Irradiancia	$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	$E \cdot A^{-1} \cdot t^{-1}$
X	Densidad celular máxima	Nº células·mL^{-1}	
X_0	Densidad celular inicial	Nº células·mL^{-1}	

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
μ	Velocidad específica de crecimiento	h^{-1}	$\frac{\ln X - lnX_0}{t - t_0}$

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
	media		

Abreviaturas

Abreviatura	Término
BBM	Cultivo autotrófico, sin suplemento de fuente de carbono orgánica
Glu1 FT	Cultivo fotoheterotrófico, suplementado con 1 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa
Glu3 FT	Cultivo fotoheterotrófico, suplementado con 3 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa
Glu5 FT	Cultivo fotoheterotrófico, suplementado con 5 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa
Glu1 HT	Cultivo heterotrófico, suplementado con 1 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa
Glu3 HT	Cultivo heterotrófico, suplementado con 3 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa
Glu5 HT	Cultivo heterotrófico, suplementado con 5 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa
Glu1 MX	Cultivo mixotrófico, suplementado con 1 g·L-1 de glucosa
Glu3 MX	Cultivo mixotrófico, suplementado con 3 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa
Glu5 MX	Cultivo mixotrófico, suplementado con 5 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa
Gly1 FT	Cultivo fotoheterotrófico, suplementado con 1 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol
Gly3 FT	Cultivo fotoheterotrófico, suplementado con 3 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol
Gly5 FT	Cultivo fotoheterotrófico, suplementado con 5 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol
Gly1 HT	Cultivo heterotrófico, suplementado con 1 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol
Gly3 HT	Cultivo heterotrófico, suplementado con 3 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol
Gly5 HT	Cultivo heterotrófico, suplementado con 5 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol
Gly1 MX	Cultivo mixotrófico, suplementado con 1 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol
Gly3 MX	Cultivo mixotrófico, suplementado con 3 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol
Gly5 MX	Cultivo mixotrófico, suplementado con 5 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol
USD	Dólares Americanos

Abreviatura	Término
C:N	Relación Carbono:Nitrógeno
BBM	Medio basal Bold
ATP, ADP, AMP	Adenosintri-, di-, monophosfato, respectivamente
vvm	Volumen de gas por volumen de cultivo por minuto

Introducción

Las microalgas son organismos unicelulares, fotosintéticos, ampliamente estudiados y cultivados debido a la versatilidad de usos que pueden tener. Actualmente los usos más importantes están enfocados a alimentación humana y animal, suplementos alimenticios, fertilización, elaboración de productos cosméticos, biocombustibles y bioremediación de aguas contaminadas [1]–[4].

En condiciones de cultivo fotoautótrofas o fotosintéticas, las microalgas incorporan el carbono atmosférico a su metabolismo y utilizan la luz solar como fuente de energía. Esto les permite romper la molécula de agua y obtener los electrones necesarios para iniciar el proceso fotosintético. Sin embargo, esta modalidad de cultivo tiene varias desventajas como la obtención de bajas densidades celulares y largos periodos de cultivo (menos de 1 $g \cdot L^{-1}$ de biomasa en 5 días). Estas desventajas han sido superadas por algunas especies de microalgas que han demostrado tener la habilidad para crecer en condiciones heterotróficas y mixotróficas. Dependiendo de la especie esto se traduce en altos rendimientos de biomasa y altas velocidades específicas de crecimiento en tiempos

de cultivo más cortos (entre 3-4 $g \cdot L^{-1}$ de biomasa en 3-4 días de cultivo en medio suplementado con glucosa entre 1 y 15 $g \cdot L^{-1}$) [5]–[11].

Esas modalidades de cultivo han sido aprovechadas para producir mayores cantidades de biomasa microalgal y obtener mayor rendimiento en la producción de moléculas de alto valor. Entre estas se destacan proteínas, monosacáridos, almidones y otros polisacáridos, lípidos, vitaminas y pigmentos y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) importantes para el desarrollo cerebral y el mantenimiento de una buena salud cardiovascular en humanos [11]–[13].

Las moléculas de alto valor mencionadas son producidas normalmente por las microalgas en condiciones de fotoautotrofía. Sin embargo, se ha encontrado que la variación en el tipo de la fuente de carbono, en las condiciones de iluminación o en la concentración de algún nutriente pueden llevarlas a condiciones de estrés y hacer que la producción de una u otra macromolécula se incremente o disminuya [9], [14], [23], [15]–[22]. Por lo tanto, la composición bioquímica de las microalgas dependerá de las condiciones de cultivo en las cuales se desarrolle su crecimiento y conocerla o incluso tratar de predecirla es un aspecto importante para la obtención de subproductos a partir de ellas.

Como se comentó anteriormente, uno de los subproductos que pueden obtenerse de las microalgas son los biocombustibles o combustibles de tercera generación, y el potencial y desafíos en este campo han sido descritos ampliamente [24]–[28]. Los biocombustibles a partir de microalgas se han desarrollado durante los últimos 40 años, lo cual se intensificó especialmente entre el 2003 y 2014 cuando el precio del petróleo se elevó por encima de los 145 dólares por barril. Igualmente, la presión internacional para tomar acciones urgentes que disminuyeran las emisiones de dióxido de carbono (CO_2) y frenar el calentamiento global se hizo más fuerte [27].

Este impulso al desarrollo de biocombustibles a partir de microalgas dio lugar al estudio de la digestión anaerobia para la producción de metano [11], la disrupción de las células para la extracción de lípidos y su transesterificación para producir biodiesel [25], la

producción de bioetanol mediante la fermentación de los carbohidratos, la producción de hidrógeno [29], [30] o el desarrollo de biocrudo mediante licuefacción hidrotermal [31].

La producción de microalgas enfrenta varios desafíos, entre los que se destacan la reducción en el costo de producción, la maximización de la productividad (específica de la especie), la reducción del costo de capital, la reducción en el consumo de energía, y el aumento en la eficiencia en la utilización de nutrientes (N, P, minerales traza y CO_2). Con las tecnologías actuales, la producción de biocombustibles es probablemente 4 a 5 veces más costosa que la de los combustibles fósiles y los costos finales dependen de los rendimientos esperados, el diseño del sistema de crecimiento y el sistema de cosecha empleado [27]. Otro desafío particular para el uso de microalgas en la producción de biocombustibles es la transición de estudios piloto a operaciones industriales. Para esto es necesario integrar los conocimientos de fisiología de microalgas con los bioprocesos para garantizar la viabilidad económica y minimizar el número de ensayos durante el escalado [24].

Además de estos desafíos se suma el hecho de que biocombustibles (e.g biodiesel) a partir de microalgas requieren pasos adicionales como secado, ruptura celular y extracción de lípidos para su posterior transformación. Estos procesos pueden incrementar hasta en un 70% los costos de producción. Por lo tanto aquellos procesos que impliquen el uso de toda la biomasa sin procesos de secado o extracción se han convertido en los más factibles para la producción de biocombustibles, siendo el más promisorio, la licuefacción hidrotermal (LHT). En este proceso, se usa agua en condiciones supercríticas (374 °C y 22,1 MPa) que permiten que toda la biomasa de las microalgas sea convertida a biocrudo cuyas propiedades, composición y rendimiento son fuertemente dependientes de las condiciones de operación y de la materia prima [31], [32].

A pesar del potencial, el principal inconveniente de la LHT ha sido la dificultad para estandarizar el proceso puesto que las microalgas, presentan una alta variabilidad en su contenido en proteínas, lípidos y carbohidratos, Esto ocurre aun dentro de la misma especie, afectando directamente el rendimiento y composición elemental del biocrudo obtenido. La variación en la composición de la microalga se atribuye tanto a las

condiciones a las cuales se realizó el cultivo como a la especie misma. A esto se suma a esto el hecho que el biocrudo producido por LHT presenta elevados contenidos de Nitrógeno (0,2 – 8,4%) y Oxígeno N (3,8% – 37,4%) [33]–[37]que están por fuera de los estándares aceptables para el petrocrudo [38]. Esto da lugar a la implementación de procesos adicionales de tratamiento para su reducción.

Uno de esos procesos es la manipulación metabólica de las microalgas utilizadas, que consiste en estandarizar el proceso de cultivo donde se obtengan biomasas con menores contenidos de proteínas [32], [39]. Su implementación es fácil, el consumo de energía es mínimo y no requiere de etapas extras comparado con otros métodos de tratamiento de biocrudo.

En este contexto, el objetivo general del presente proyecto es evaluar el efecto en la composición bioquímica de la microalga *Parachlorella kessleri* cuando se utilizan fuentes de carbono orgánicas (glucosa y glicerol) e inorgánicas (CO_2) para su crecimiento. Esto se basa en la hipótesis que las microalgas pueden cambiar su composición bioquímica de acuerdo al tipo de nutrición al que son sometidas.

Para el cumplimiento de dicho objetivos establecieron tres objetivos específicos, cada uno de ellos consiste en evaluar el comportamiento de *P. kessleri* y su composición bioquímica cuando es alimentada con glucosa y glicerol bajo condiciones fotoheterotróficas, heterotróficas y mixotróficas respectivamente. Para esto se estudió el efecto de la fuente de carbono en concentraciones de 1, 3 y 5 $g \cdot L^{-1}$ y comparando con condiciones autotróficas de cultivo.

Este trabajo se enlaza en un proyecto que pretende desarrollar un proceso LHT para la producción de biocombustibles. Con base en los resultados obtenidos se espera identificar las condiciones más adecuadas de obtención de la biomasa para su posterior uso en procesos de LHT o en la producción de otros biocombustibles a partir de microalgas.

1. Antecedentes

1.1 Microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles

Según el reporte de la Agencia Internacional de Energía de 2019, para el año 2017 aproximadamente el 81,3% de la demanda de energía fue suplida por la transformación y el uso de combustibles fósiles. La combustión de dichos materiales libera a la atmósfera óxidos de azufre, óxidos de nitrógeno y principalmente dióxido de carbono (CO_2) a una tasa mayor a la que el planeta es capaz de reciclar en los ciclos biogeoquímicos. Los dos primeros se acumulan en la baja atmosfera e interactúan formando el ozono troposférico y el smog (se forma a partir del monóxido de carbono, los óxidos de nitrógeno y otros compuestos orgánicos volátiles). Por su parte el CO_2 y otros compuestos también generados por la actividad humana (e.g metano, halocarbonos) producen el llamado Efecto Invernadero, estos gases son llamados Gases de Efecto Invernadero (GEI) [40].

El efecto invernadero hace que las temperaturas promedio del planeta aumenten, porque la radiación solar es atrapada por estos gases y en vez de ser liberada fuera de la atmósfera es devuelta a la superficie terrestre. Para el caso del CO_2 atmosférico, la Agencia Internacional de Energía reporta una acumulación en la atmosfera de 32,8 Gigatoneladas [40]. La acumulación de GEI en la atmósfera evita el escape de la radiación solar, lo cual ha producido un aumento en la temperatura de la superficie terrestre de alrededor de 1 °C en los últimos 100 años [41]. Este tema empezó a ser una preocupación para los científicos en la década de los setenta, y es así como desde el año 1979, con el fin de establecer acciones encaminadas a reducir las emisiones de GEI, la ONU organiza reuniones llamadas cumbres climáticas. En estas reuniones multilaterales, los países participantes han intentado llegar a acuerdos globales para la disminución de emisiones [42].

Con la intención de alinearse con esas políticas ambientales, en el año 2001 Colombia publicó su primera comunicación nacional sobre el cambio climático ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático [43]. Aunque es cierto que Colombia no es un gran generador de GEI (aporta sólo el 0,2% del total global de emisiones), al igual que todos, es un país vulnerable a los efectos del cambio climático en las esferas social, económica y ambiental. Aproximadamente un 4% de la población nacional habita las zonas costeras, vulnerables a los efectos del clima, igualmente, el 75% del sector manufacturero, 50% de los recursos hídricos, 95% de los nevados y el 49% de los cultivos se verían afectados por los efectos de un cambio climático global [43].

En dicho informe se describieron las acciones que Colombia implementó desde el año 1994 en los sectores energético, transporte, industrial, agrícola, silvicultura y de residuos con miras a reducir las emisiones de GEI. Entre los sectores que aportan mayores emisiones de CO_2 son el energético (33,3%) y el de transporte (31,4%) [44]. Para mitigar en cierta medida la generación de emisiones contaminantes por el sector transporte, se impulsaron diferentes políticas públicas de carácter regional o nacional. Entre estas se destacan los programas adelantados en Bogotá como el Pico y Placa (año 1998),el día sin carro (año 2000) y la implementación del uso de Gas Natural Vehicular (año 2000). Muchas de estas políticas se extendieron posteriormente a otras ciudades de Colombia

y Latinoamérica [43]. Otra de las políticas implementadas fue la promoción de energías limpias en el transporte urbano que busca incentivar el uso de combustibles alternativos: el gas licuado de petróleo, bioetanol, biodiesel, conversión del parque automotor para el uso de biocombustibles y a largo plazo, la utilización de combustibles con cero emisiones como hidrógeno, electricidad, celdas de combustible y energía solar [43].

En esta dirección, y con la Ley 788 de 2002 [45] se eximió el pago de impuestos para las actividades destinadas a la generación de energías renovables con base en recursos eólicos, biomasa o residuos agrícolas. Esto dio el impulso necesario a la producción de biocombustibles, específicamente biodiesel y bioetanol a partir de cultivos energéticos como aceite de palma y caña de azúcar respectivamente.

En concordancia con el programa de biocombustibles que Colombia posee formalmente desde el 2001, el Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos desarrolla una línea de investigación en este campo. En particular, uno de los temas de estudio consiste precisamente en el uso de biomasa de microalgas (organismos microscópicos fotosintéticos) como materia prima para la producción de biocombustibles.

Algunos de los logros científicos en este campo han sido la estandarización de métodos para la extracción y cuantificación de lípidos, el estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel, y el estudio del efecto del contenido de CO_2, la irradiancia, el fotoperiodo y la aireación sobre la producción y acumulación de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* [46]. Igualmente se ha estudiado la evaluación de los exopolisacáridos producidos por una cepa nativa de cianobacteria *Nostoc sp*. como sustrato en la producción de bioetanol [47].

El uso de microalgas para esta aplicación es promisorio por presentar varias ventajas:

i) No requieren grandes cantidades de terreno para su producción, incluso una hectárea de terreno ocupada con un cultivo de microalga puede producir 100 veces más aceite que una hectárea de cultivo de palma aceitera [25]

ii) No compite por tierra cultivable,

iii) En cuanto al uso de agua, el proceso puede ser autosostenible si se utilizan aguas residuales como sustrato de crecimiento,

iv) Pueden reciclar CO_2 de emisiones industriales y

v) Es posible obtener de ellas una amplia variedad de productos y subproductos de valor agregado, siendo éste el principal objetivo de las biorefinerías.

El término biorefinería hace referencia a instalaciones industriales en las que se realiza la transformación de biomasa en materiales, productos químicos, combustibles, energía y otros productos como los biocombustibles. Entre estos últimos se incluyen los de tercera generación como bioetanol, biocrudo, y biodiesel que puedan ser obtenidos de microalgas. La Figura 1-1 esquematiza los procesos en una biorefinería que usa como materia prima microalgas. Los procesos o usos que permiten el aprovechamiento de las microalgas en las biorefinerías incluyen:

i) Fermentación alcohólica o digestión anaerobia para producir bioetanol o metano respectivamente [48]–[52].

ii) Fuente de proteína para alimentación humana o animal [53].

iii) Extracción de productos de alto valor a nivel farmacéutico, nutricional o cosmético (e.g. clorofila, carotenoides PUFA [54]–[57],

iv) Fuente de ácidos grasos que pueden ser extraídos y destinados a la producción de biodiesel, y

v) Licuefacción hidrotermal (LHT) para producir biocrudo (un líquido con características similares a las del petróleo).

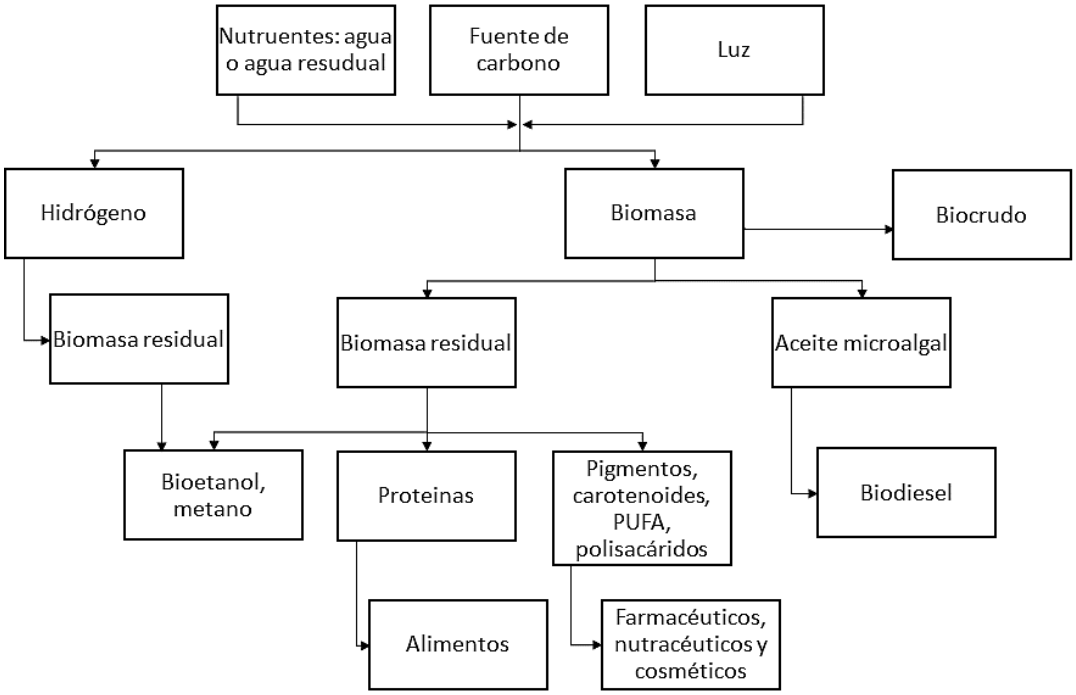

Figura 1-1: Biorefinería a partir de microalgas. Adaptado de Naik *et al*. (2010) [26].

El biocrudo es un biocombustible cuya producción presenta varias ventajas:

i) Todos los componentes de la biomasa como carbohidratos, proteínas y lípidos pueden ser convertidos en biocrudo,

ii) No requiere una etapa de secado de dicha biomasa como sí lo requieren otros procesos de producción de biocombustibles como la pirólisis, sino que puede trabajar con una concentración de sólidos totales iniciales de la materia prima está entre un 10 y 30% p/p (90 – 70 % de agua);[58], [59].

iii) No requiere procesos de extracción y transesterificación de lípidos como en el caso del biodiesel que suelen ser complejos y aumentar los costos de producción,

iv) La LHT de microalgas logra reducir hasta en un 50% las emisiones de gases de efecto invernadero comparada con otros combustibles derivados del petróleo [60].

Respecto a la producción de biocrudo el grupo de Procesos Químicos y Bioquímicos de la Universidad Nacional de Colombia ha realizado investigaciones en la optimización del

proceso de LHT con el propósito de obtener composiciones químicas de biocrudo uniformes. Sin embargo, para lograr esto se requiere que la composición de las materias primas utilizadas (microalgas) en los diferentes lotes de producción tenga también una composición química uniforme. El desafío del proceso radica en que las microalgas desarrollan diferentes composiciones bioquímicas (i.e. contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y pigmentos principalmente) aún si se trata de la misma especie, que se atribuye tanto a las condiciones a las cuales se realizó el cultivo como a la especie misma.

Para homogeneizar las condiciones del proceso y la composición del biocrudo es viable que la biomasa que se destine al proceso de LHT se produzca siempre en condiciones de cultivo similares. La composición de la microalga puede ser modulada controlando las diferentes variables que afectan las rutas metabólicas de las células [28], Estas variables incluyen la irradiación, tipo y concentración de fuente de carbono, modalidad de cultivo y especie de microalga utilizada.

En particular, la modalidad de cultivo es un factor determinante ya que la microalga debe ser capaz de desarrollar una composición bioquímica adecuada para el tipo de biocombustible que se desea obtener. Por ejemplo, para producir biodiesel o biocrudo la característica más deseable es que la microalga sea capaz de acumular cantidades significativas de lípidos. Según reportes recientes, es necesario llegar a contenidos de lípidos entre el 45 y 64 % del peso seco celular y las especies capaces de alcanzar dichos niveles son *Botryococcus braunii, Desmodesmus, sp., Nannochloropsis sp., Scenedesmus* SDEC-8*, Chlorella protothecoides, Nannochloropsis sp*. y *Sorokiniana* FCG IITG [28], [61].

En el caso de la producción de biogás mediante digestión anaerobia, se eliminan las etapas de secado, extracción y concentración de lípidos. En este caso se utiliza toda la biomasa obtenida, lo que representa en sí un ahorro energético. Sin embargo, el principal desafío de este proceso es obtener la relación C:N adecuada para que se favorezca la producción de metano en vez de amonio, dado que éste último es tóxico para las comunidades bacterianas metanogénicas. En este campo de estudio se han realizado avances interesantes mediante la aplicación de pretratamientos físicos y biológicos que

contribuyan al aumento de la cantidad de metano producido. En cuanto a la producción de bioetanol a partir de microalgas, es importante la bioprospección de especies que se caractericen por acumular altas cantidades de carbohidratos fermentables. Un ejemplo de dichos organismos es la microalga *Chlorella vulgaris*, que ha demostrado capacidad para generar 35 L de etanol por tonelada de biomasa [62]. A parte de los procesos mencionados anteriormente, las microalgas pueden ser sometidas a otros procesos con el fin de aprovechar su contenido energético como combustión directa, pirolisis o gasificación.

En los siguientes apartados se amplía información acerca de la importancia de una adecuada selección de la cepa y de la fuente de carbono al momento de establecer una configuración de cultivo. Aunque el método tradicional de cultivo de microalgas es el fotosintético o autotrófico basado en la adquisición de carbono inorgánico en forma de dióxido de carbono (CO_2), la adición de fuentes de carbono orgánicas han demostrado tener productividades de biomasa, lípidos y carbohidratos superiores [5], [7], [10], [63]–[67].Una vez el cultivo es suplementado con alguna de ellas se dice que es mixo, hetero o fotoheterotrófico, dependiendo si se desarrolla o no bajo condiciones de iluminación y de suministro externo de CO_2. La fuente de carbono orgánico más empleada hasta el momento ha sido la glucosa por su alta disponibilidad, aunque también ha tomado fuerza el uso del glicerol, las razones para el uso de una u otra se explicarán a continuación.

1.2 Utilización de glucosa para el cultivo de microalgas

Antes del desarrollo de técnicas moleculares, la correcta clasificación taxonómica de las microalgas constituía uno de los mayores desafíos para los biólogos. En un intento por organizar la información conocida hasta el año 1965, los investigadores Shihira y Krauss [68] realizaron una clasificación taxonómica de las especies de *Chlorella* conocidas hasta entonces basada en caracteres bioquímicos, entre los cuales se evaluaba la asimilación de diferentes azúcares (arabinosa, glucosa, fructosa, manosa, sacarosa, lactosa, entre otras). Desde ese momento se conoció la alta afinidad que tienen las especies del género *Chlorella* por este azúcar. Con el transcurso de los años, se han realizado

estudios que permiten dilucidar los principales rasgos del comportamiento de *Chlorella* y de otras especies de agua dulce, cuando se les es suministrada esta fuente de carbono. Se ha caracterizado la producción de biomasa, clorofila, el efecto del pH, la evolución del CO_2 como producto de respiración y la generación de productos metabólicos de desecho [69], [70].Estudios subsiguientes empezaron a enfocarse en los cultivos heterotróficos en vista de la ventaja que implica la no utilización de la luz que se traduce en reducción de costos de los sistemas de cultivo [71], [72]. Dichos estudios exploraron el crecimiento y la composición bioquímica de diferentes especies de microalgas cuando están sometidas a condiciones mixo y heterotróficas, evaluando los efectos de la variación dela intensidad lumínica [73], [74]. Cuando se dispuso de un conocimiento más amplio de la bioquímica de las microalgas, surgieron entonces los primeros estudios sobre sistemas de cultivo optimizados para la producción de lípidos y las primeras caracterizaciones de los lípidos microalgales en busca de las mejores respuestas de ácidos grasos poliinsaturados [6], [21], [75].Con este conocimiento las fermentaciones cambiaron su objetivo a producción enfocada en biodiesel y su optimización [76]–[78].

Las investigaciones más recientes no solo enfocan sus objetivos a la producción de lípidos para producir biocombustibles sino además a la obtención de otros productos de valor agregado como pigmentos, proteínas [5] y ácidos grasos poliinsaturados como suplemento dietario [55].

1.3 Utilización de glicerol para el cultivo de microalgas

El Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos de la Universidad Nacional de Colombia, realiza actualmente un proyecto de investigación denominado “Alternativas energéticas renovables a partir de efluentes de la industria colombiana de biodiesel” cuyo objetivo general es desarrollar una estrategia de producción de un biocombustible (biocrudo), a partir de microalgas alimentadas con glicerol crudo. El glicerol crudo es el principal subproducto de la transesterificación de los triglicéridos en producción de biodiesel. La composición de este subproducto varía de acuerdo al tipo de

catálisis usada en el proceso, la eficiencia de la transesterificación y recuperación del biodiesel, el tipo de alcohol utilizado y las impurezas de la materia prima [79].

En la producción de biodiesel, por cada 100 Kg de biocombustible, se generan aproximadamente 10 Kg de glicerol crudo. En el caso de Colombia para el año 2017 se generaron aproximadamente 46000 toneladas [80]. Además de los altos costos para su refinación, la demanda de la glicerina en el mercado se ha mantenido estable, impidiendo absorber el volumen de glicerina cruda proveniente de la industria de biodiesel [81]. [81]. En 2015, solamente el sector biodiesel aportó el 65% de la producción total de glicerol a nivel mundial, la cual se estimó en 2 millones de toneladas [82]. La alta y constante oferta de dicho producto desencadenó una baja notable en los precios. Todo este panorama ha hecho que compañías como Dow Chemical, Procter & Gambley Solvay hayan cerrado algunas plantas químicas de producción de glicerol en Texas, Londres y Tavaux (Francia), respectivamente[83], [84]. Todo lo anterior se traduce en la necesidad urgente de buscar usos alternativos para su aprovechamiento.

Algunos de los usos que se están implementando para este subproducto son:

i) Refinación para transformarlo en glicerina técnica, grado alimentario o farmacéutico,

ii) Transformación en biocombustibles como etanol [85], hidrógeno [85], [86], ácido cítrico [87], polihidroxibutirato [88], butanol [89], biogás [90] y 1,3-propanodiol [91], [92]

iii) Componente de alimentos para animales [93], en particular en Colombia la compañía BioD S.A. ha logrado aprovechar el valor calórico de glicerol (i.e. 3800 Kcal/Kg) y utilizarlo como suplemento energético para ganado bovino en mezclas con maíz molido, granos de destilería, torta de palmiste por solvente o presión, papa, entre otros. En este uso se ha demostrado que se da un aumento en la producción de leche, los parámetros reproductivos de los animales, junto con una reducción en los costos de producción [94]

En cuanto a la refinación, la glicerina cruda tiene una composición aproximada del entre 40% y 88% de glicerol puro en peso además de una gran cantidad de metanol, agua, jabones y sales provenientes del proceso de transesterificación [95]. El problema radica

en que debido a la alta cantidad de impurezas su costo de refinación para usos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios no es viable para los pequeños productores de biodiesel (alrededor de 0,15 USD por kilogramo) [25], [81], [95]. Así que mientras la producción de biodiesel continúe, el tema de buscar un uso a la corriente residual de glicerol continuará siendo sumamente urgente.

Teniendo esto en contexto, varios trabajos han aprovechado la alta disponibilidad y bajo costo del glicerol para utilizarlo como una fuente de carbono en diversos bioprocesos. Algunas de sus investigaciones lo utilizan en fermentaciones con la bacteria *Clostridium sp.*, un microorganismo capaz de transformar esa glicerina en 1,3 propanodiol, este diol es un producto de mayor valor agregado y con una variedad de usos, entre los que se pueden mencionar: la producción del polímero PTT (politrimetilentereftalato) para la fabricación de fibras e hilos, la obtención de poliuretano solvente en la industria cosmética para preparación de champús y el uso directo en el tratamiento de algunas enfermedades nerviosas [96]. Igualmente se puede usar como excipiente de humidificante, estabilizador, anticongelante, o vehículo solvente en diferentes formulaciones [81].

El glicerol ha sido utilizado con éxito en fermentaciones con las microalgas *Phaeodactylum tricornutum, Rhodomonas reticulata, Chlorella protothecoides, Schizochytrium limacinum, Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis* mejorando la producción de biomasa y ácidos grasos respecto a su control autotrófico [6], [8], [10], [15], [19], [21], [97]–[100]. El uso glicerol crudo en algunos de estos estudios se tradujo en altos rendimientos de biomasa probablemente debido al efecto de las impurezas de dicha materia prima. También se han estudiado diferentes configuraciones de cultivo con el fin de manipular la composición bioquímica de las microalgas [97], [101]. En el año 2013, Cerón *et al*. [102] reportaron el desarrollo de un sistema heterotrófico de *Chlorella protothecoides* acoplado a un proceso de producción de biodiesel, este trabajo coincide con los estudios de Cabanelas *et al*., 2013 [62]. Otros estudios por el contrario han encontrado cepas específicas que no pueden metabolizarlo por falta de las enzimas necesarias, este hallazgo infiere que posiblemente el aprovechamiento del glicerol sea un rasgo que dependa de la cepa [103].

2. Marco teórico

2.1 Género Parachlorella

Parachlorella kessleri, la microalga utilizada en la presente investigación fue durante varias décadas clasificada erróneamente como perteneciente al género *Chlorella*, el género de microalgas más ampliamente estudiado hasta ahora debido a su gran parecido morfológico. Fue en la década de los ochenta, gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular, que se estableció la existencia del género *Parachlorella* y con éste descubrimiento la necesidad de investigar su potencial de bioprospección [104]–[107].

2.1.1 Origen del género *Parachlorella*

P. kessleri , fue reportada por primera vez en Holanda en 1881 [108] y descrita inicialmente en 1893 por Artari recibiendo para entonces el basionimio (nombre científico con el cual fue bautizada originalmente) de *Pleurococcus regularis* [109]. Durante algunos años y debido a la falta de herramientas para una adecuada clasificación y divulgación, otros autores la nombraron como *Chlorella regularis* [68], *Chlorella vulgaris* [110]–[112] o *Chlorella II* [113]. Esta ambigüedad en la clasificación se debe a que los primeros investigadores agruparon a varias especies dentro de este género basándose solamente en caracteres morfológicos, utilización de diversas fuentes de carbono o nitrógeno para el crecimiento, o teniendo en cuenta detalles como el color del cultivo y la apariencia de las colonias en agar. Estas técnicas dieron origen a clasificaciones erróneas y claves taxonómicas incompletas y engañosas [114]. A pesar de esas confusiones se estableció tempranamente que *Parachlorella kessleri* pertenecía al filo *Chlorophyta* que agrupa las llamadas algas verdes, las cuales están estrechamente relacionadas a las plantas superiores porque poseen los mismos tipos de clorofila: a y b.

2.1.2 Historia del género *Parachlorella*

Esta especie se clasificó inicialmente bajo el género *Chlorella* porque sus individuos se caracterizan por ser eucariotas, con forma esférica o elipsoides, la forma del pirenoide, y el organelo asociado al almacenamiento de la enzima RuBisCO (fijadora de dióxido de carbono) es en “forma de manto”. La reproducción de la microalga es asexual por liberación de autosporas, y el almidón se forma como uno de los principales productos de reserva dentro del cloroplasto y no en el citoplasma, característica que las diferencia del resto de algas eucariotas [115].

Chlorella es hasta hoy el género de algas verdes mejor estudiado [107], [116]. En 1881, Brandt encontró las primeras especies de *Chlorella* creciendo asociadas a esponjas o hidras y las llamó *Zoochlorella.* Fue en 1890 que el biólogo Beijerinck logró aislar y comprobar que esas microalgas no eran parásitos obligados y dio por primera vez una descripción del género. Esa clasificación inicial dada por Beijerinck cambió mucho a través de los años y fue bastante controversial; hasta 1965 el nombre del género no era aún aceptado por el comité de nomenclatura del Congreso Botánico Internacional [68].

Durante los años 80, Kessler presentó una clasificación convincente sustentando sus descubrimientos en propiedades bioquímicas y así diferenció inicialmente alrededor de 16 taxa [117]–[119]. Tras varios estudios [120]–[123], esos taxa fueron desmantelados a al menos unos seis [124]. Sin el desarrollo aún de las técnicas moleculares actuales, esas investigaciones se dedicaron a estudiarla composición y estructura de la pared celular [68], [123], las características fisiológicas y bioquímicas [120] como actividad de enzimas hidrogenasas [113], [117], amilolíticas [68], características de los carotenoides [113], acidotolerancia [68], halotolerancia [68], tolerancia a metales pesados [118], [125], termofilia [126], [127], utilización de componentes orgánicos de nitrógeno [128], y composición de las azúcares, entre otros.

El nombre de *Chlorella kessleri* fue asignado en 1969, cuando Fott & Nováková [114]estudiaron las cepas 211-11g y 211-11h de la colección de la Universidad de Cambridge que se encontraban clasificadas como *Chlorella II* y encontraron que la cepa

211-11g tenía presencia de la enzima hidrogenasa (importante para reacciones de óxido-reducción, foto-protección y metabolismo fermentativo en las células). Además, la estructura del cloroplasto que era bastante específica, (i.e. "*mantel-shaped*") hasta esa época no había sido reportada para cualquier otra alga verde. En la Figura 2-1 (**e**) se ilustra la forma particular del cloroplasto.

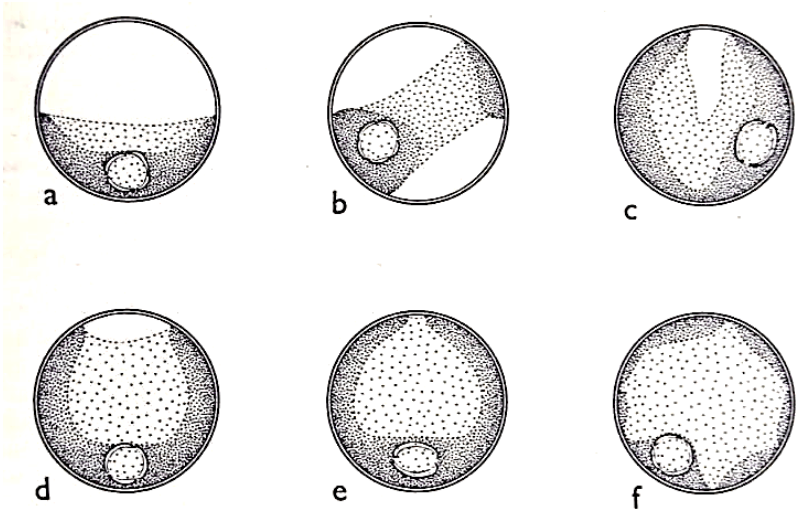

Figura 2-1. Tipos de morfología de los cloroplastos presentes en el género *Chlorella*. a: forma de platillo, b: forma de banda, c: forma de faja, d: forma de copa, e: forma de manto, f: parietal (cubre la cavidad celular completamente). Las estructuras redondas dentro de cada representación celular corresponden a los pirenoides [114].

Debido a la presencia de esta particular forma de los cloroplastos, Fott & Nováková consideraron reubicar esta cepa como una nueva especie dentro del género *Chlorella*, llamándola *Chlorella kessleri* en honor a Kessler quien fue el primero en designar estas especies como *Chlorella II*. Los autores describen en su trabajo de manera detallada la morfología de *C. kessleri*: células esféricas, el cloroplasto cubre casi la totalidad de las células, excepto porque en la base del mismo se ubica el pirenoide. Estos autores diferenciaron 16 taxa del género *Chlorella* solamente basados en rasgos morfológicos y fisiológicos.

El pirenoide fue una pieza clave para la clasificación de las especies del orden *Chlorellales* antes del desarrollo de técnicas moleculares. Ikeda [129] encontró una relación evolucionaria entre la estructura del pirenoide y la química de la pared celular: algunas especies de microalgas del género *Chlorella* tienen paredes celulares compuestas por glucano y en otros casos están compuestas por glucosamina. En las primeras, los pirenoides presentan estructuras diversas, mientras que para el segundo caso (*P. kessleri, C. sorokiniana* y *C. vulgaris*) las morfologías de los pirenoides son idénticas. Esto último indica una relación evolucionaria más cercana y además afirma que este rasgo puede ser usado como marcador evolutivo, puesto que la morfología entre una especie y otra es diferente.

Hoy en día, esa clasificación basada en caracteres morfológicos ha quedado relegada gracias al desarrollo de técnicas en biología molecular específicamente, de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la amplificación de regiones del ADN y 18S del ARNr, siendo hasta el momento los métodos más acertados para realizar una apropiada clasificación de las algas verdes [124], [130].

En 1974 Hellmann y Kessler utilizaron las primeras técnicas de biología molecular para hacer un análisis comparativo de la composición básica del ADN, evaluando el contenido de Guanina - Citocina (CG) y solamente lograron observar una diferencia intraespecífica entre cepas de *Chlorella vulgaris*. Wolgfan & Kessler (1978) [132] y Huss *et al*. (1989) [130] usaron el método de hibridación de ADN pero encontraron que los taxa eran bastante heterogéneos y que esta técnica no brinda información concluyente acerca de las especies dentro de este género, su evolución y su relación con otras algas verdes.

Huss y Sogin (1990) [124] fueron pioneros en utilizar las técnicas de análisis de ácidos nucleicos para la identificación de algas verdes. En este trabajo mencionan que realizar el análisis molecular a nivel de ADN del género *Chlorella* no arroja resultados concluyentes acerca de las relaciones interespecíficas dentro del mismo. Por el contrario, el análisis de las subunidades del ARN ribosomal (ARNr), sí parece ser útil para éste propósito, siendo las secuencias de ARNr de la subunidad pequeña (16S) una de las más estudiadas en organismos eucariotas y procariotas.

Estos mismos autores iniciaron en 1999 un estudio de la subunidad 18S del ARNr dentro de diferentes especies del género *Chlorella* para establecer su relación con otros miembros pertenecientes también a la división Chlorophyta y de allí concluyeron que el género se reduce a cuatro especies: *C. vulgaris, P. kessleri , C. lobophora* y *C. sorokiniana*. Más adelante, en 2004, Krienitz *et al*. [107] harían un valioso aporte al investigar la subunidad 18S del ARN ribosomal (ARNr) de *Chlorella* y otros taxa relacionados y la región ITS2 de 17 cepas de *Chlorellaceae* [107]. En este trabajo se encontró que esta familia está dividida en dos ramas o clados, es decir, grupos que proceden de un ancestro común: el clado *Parachlorella* que agrupa las especies *Chlorella beijerinckii*, *Parachlorella kessleri*, *Discloster acuatus* y *Closteriopsis acicularis*, y el clado *Chlorella* que incluye las especies *C. vulgaris*, *C. lobophora* y *C. sorokiniana*. En este punto se creó el género *Parachlorella* y la llamada hasta ese momento *Chlorella kessleri* se ubicó aquí con su correspondiente cambio de nomenclatura. La investigación más reciente acerca de la filogenia de *Chlorella* hizo una clasificación completa de *Chlorophyta, Trebouxiophyceae* y *Chlorellaceae* analizando esas mismas secuencias del ARNr [133].

En 2009, Turmel *et al.* [134], secuenció el genoma del cloroplasto de *P. kessleri* y de *C. vulgaris* encontrando que entre ellas se conservan todos los 105 genes que se codifican a excepción del gen trnR (ccg) en *P. kessleri.*

Basándose en estos hallazgos puede afirmarse que *P. kessleri* en efecto estaría estrechamente emparentada con el género *Chlorella*, en este estudio se asumirá que al menos en cuanto a procesos bioquímicos estas especies tienen los mismos comportamientos.

2.1.3 Otros rasgos morfológicos

A pesar de que la clasificación por caracteres morfológicos dio ideas erradas acerca de la verdadera clasificación de las especies del género *Chlorella*, sí fue útil para recolectar

información acerca del comportamiento y morfología de cada especie, entre las cuales se mencionan:

- En el caso de *P. kessleri* además de la presencia de hidrogenasa y el pirenoide en forma de manto, se encontró también que la glucosa, la galactosa y la fructosa estimulan el crecimiento en luz y en oscuridad. La manosa y el acetato pueden soportar ligeramente el crecimiento de la microalga en cultivos bajo iluminación, pero la mayoría de las veces es inefectiva. El nitrógeno puede ser asimilado desde amonio o desde nitratos de manera equivalente [68]. *P. kessleri* no tolera altas concentraciones salinas, Kessler (1974) [135] estableció que este límite en tan solo 2%. Esta algo no tiene la capacidad de producir enzimas extracelulares que le permitan hidrolizar almidón y proteínas [136].

- En Latinoamérica fue reportada la presencia de *P. kessleri* en una laguna ácida volcánica en la región de la Patagonia (Argentina) y la importancia de este descubrimiento radica en que se comprobó que dicha especie es capaz de tolerar ambientes ácidos (pH entre 3 y 4) y temperaturas aproximadas de 35 ºC[137], [138], resultados que además confirmaron los obtenidos previamente por Kessler (1965, 1972, 1985) [126], [127], [139].

- Las fibras de la pared celular están compuestas exclusivamente de glucosamina, y la matriz de hemicelulosa contiene azucares como glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y en menores cantidades arabinosa, manosa y fructosa; su espesor es de aproximadamente 60 a 80 nm [137].

- *P. kessleri* no produce carotenoides secundarios (astaxantina, cantaxantina y xantofila) [138].

- La reproducción se realiza por autosporas, una célula madre produce 2, 4, 6, 8 y raramente 16 autosporas de forma elipsoidal o poliédrica [137].

2.1.4 Investigaciones en *P. kessleri*

Una vez superada la controversia acerca de la taxonomía, las investigaciones se enfocaron en la bioprospección de la cepa, es así como una de las primeras investigaciones al respecto fue la de Řezanka y Podojil [140], [141]. Entre 1983 y 1984, estos autores describieron y separaron los ácidos grasos de cadena larga obtenidos de *P. kessleri* cultivada auto y heterotróficamente, mediante cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS). Allí se encontró que la composición de ácidos grasos varía de acuerdo al tipo de crecimiento de las microalgas y que algunos de ellos se expresaron exclusivamente bajo una de las dos modalidades de crecimiento, pudiendo usarse como marcador taxonómico. En este sentido varios estudios se han hecho con el fin de inducir la sobreproducción de lípidos mediante la depleción de algún nutriente [142]–[146]. En *P. kessleri* la depleción de fósforo llevó al incremento de ácidos grasos insaturados [147] y Přibyl *et al*. (2012) [148] limitaron la concentración de nitratos y fosfatos lo cual resultó en el cese de la división celular y el incremento de lípidos en la célula.

Otra aproximación al comportamiento de *P. kessleri* fue reportada recientemente [149]–[152], quienes investigaron acerca de las características fotosintéticas de *P. kessleri* , la afinidad por el CO_2, y los mecanismos de concentración del carbono. Sato y colaboradores [153] también profundizaron sus estudios en el proceso de síntesis de glicerolípidos que se forman en los cloroplastos y el efecto de la luz roja y azul fue investigado por Grotjohann *et al*., (1992) [154].

Una preocupación sobre la creciente contaminación de ecosistemas acuáticos por metales pesados y compuestos orgánicos persistentes (pesticidas e hidrocarburos) llevó a Juárez *et al*., (2008) [155] a evaluar no solo la tolerancia de *P. kessleri* a altas temperaturas sino también el efecto *in vivo* del cromo hexavalente (Cr^{+6}) sobre el mecanismo fotosintético al mismo tiempo que se evaluó sobre *Eudorina unicocca,* otra microalga de agua dulce. La diferencia entre ellas es que *P. kessleri* presenta pared celular mientras las células de E*. unicocca* se encuentran cubiertas por un mucílago que constituyen diferentes mecanismos de exclusión para los metales pesados. Como

resultados encontraron que *E. unicocca* es mucho más sensible al $Cr^{+}6$, tolerando concentraciones solo de 40 µM. En el caso de *P. kessleri* probablemente la presencia de pared celular le confiere mayor tolerancia al Cr^{+6} sin efectos significativos en su aparato fotosintético por concentraciones por debajo de 4000 µM. Estos efectos fueron observados gracias a la degradación de los pigmentos fotosintéticos inducida por la presencia del cromo. En cuanto a la tolerancia a herbicidas, Romero *et al.* (2011) [156] evaluaron el efecto que tiene el glifosato sobre *P. kessleri*. Éste herbicida actúa inhibiendo enzimas clave ya sea de la biosíntesis de aminoácidos o de porfirinas. La biosíntesis de proteínas en *P. kessleri* no se vio afectada y su crecimiento se detuvo después de 96 horas de ser expuesta a 70 $mg \cdot L^{-1}$ de glifosato, el estrés por la presencia de este compuesto en el medio desarrolló un incremento en la vacuolización, es decir, en el tamaño y número las vacuolas dentro de las células y en el número de esporangios, las estructuras reproductivas que forman la autosporas.

En 2015, Kasiri *et al*., [157] utilizó la metodología de superficie de respuesta para optimizar variando la intensidad de luz, las concentraciones de fosfato y las concentraciones de CO_2, obteniendo como valores óptimos 70 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 29 mM y 35% respectivamente, un estudio similar también fue presentado por De Morais *et al.* (2007) [158].

En cuanto a la producción de biocombustibles *P. kessleri* también has sido usada en biorefinería para la producción de biogás [159] aunque solo alcanzó un rendimiento de metano del 62%. Este es un porcentaje medio teniendo en cuenta que microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii* alcanzaron rendimientos hasta del 111%. Otra aplicación fue la realizada por Dandipet (2013) [160] destinada a la producción de *P. kessleri* enfocada al rendimiento en biodiesel, y para ello utilizó como materias primas hidrolizados de sorgo y maíz utilizados para la producción de bioetanol y un sistema heterotrófico. Wang *et al*. (2013) [161] investigaron el crecimiento mixotrófico de *P. kessleri* sobre agua residual suplementada con glucosa, glicerol y etanol, y el perfil de ácidos grasos obtenido. Bajo estas condiciones la microalga acumuló hasta el 54% de masa seca en lípidos (7,11 $g \cdot L^{-1}$) para glucosa y para glicerol se obtuvo el 21,19%. Aunque en este último, aproximadamente la mitad de esos lípidos son saturados, lo cual convierte a esa

condición de cultivo en una de las más prometedoras para la obtención de biodiesel. Con esta misma finalidad incluso se han desarrollado nuevas metodologías de cultivo, como la propuesta por Shiratake *et al*. (2013) [162]. Esta busca incrementar el contenido de triglicéridos disminuyendo sustancialmente la cantidad de agua utilizada en los cultivos, puesto que solo requiere de una superficie húmeda constantemente para incrementar la biomasa. Otros esfuerzos también se han realizado para producir hidrógeno a partir de la transformación de biomasa de esta microalga [163].

Estudios similares al presentado en este trabajo, donde se evalúa el efecto modalidades de cultivo y diferentes fuentes de carbono a diferentes concentraciones sobre la composición bioquímica de *P. kessleri* son los realizados por Deng *et al*. (2019 a, b), Hamza *et al.* (2013) [5], [164], [165], sus resultados serán comparados y discutidos en el capítulo 4.

2.2 Métodos de cultivo de microalgas

Las microalgas son en la actualidad una de las materias primas más prometedoras por la versatilidad de productos que pueden ser obtenidos a partir de ellas como se observó en la Figura 1-1. Cualquiera que sea el producto de interés que se desee obtener, un cultivo de microalgas ideal es aquel que permita obtener los mayores rendimientos en los menores tiempos y a bajos costos. Para alcanzar la mayor productividad de biomasa en relación a los costos, es importante seleccionar cuidadosamente el método de cultivo adecuado en el cual se establezcan cuáles serán las fuentes de carbono y energía que soportarán el crecimiento de las microalgas. Estos métodos aparecen resumidos en la Tabla 2-1.

Modo de crecimiento	Fuente de energía	Fuente de carbono	Requerimientos de la disponibilidad de luz
Fotoautotrófico o autotrófico	Luz	Inorgánica	Obligatoria
Heterotrófico	Orgánica	Orgánica	No obligatoria
Fotoheterotrófico	Luz	Orgánica	Obligatoria
Mixotrófico	Luz y orgánica	Inorgánica y orgánica	No obligatoria

Tabla 2-1: Modos de cultivo de microalgas [166].

- En los cultivos autotróficos la fuente de carbono a partir de la cual se realizará la construcción de los componentes celulares es el dióxido de carbono (CO_2) y la fuente de energía que permitirá romper los enlaces químicos es la luz.
- En cultivos heterotróficos, la fuente de energía y de carbono es la misma: un compuesto orgánico que puede ser por ejemplo glucosa, acetato o glicerol, este tipo de cultivos no requiere de iluminación.
- En los cultivos fotoheterotróficos las células usan luz para obtener energía y constituyen biomoléculas a partir del catabolismo de fuentes de carbono orgánicas. En esta modalidad, la luz y las fuentes de carbono orgánicas deben ser suministradas de manera obligatoria, esta alternativa ha sido poco estudiada,
- y en la modalidad mixotrófica, ambas fuentes de carbono orgánica e inorgánica e iluminación son asimiladas al mismo tiempo, el CO_2 es fijado mediante la fotosíntesis la cual requiere condiciones de iluminación, mientras que los compuestos orgánicos son asimilados a través de la fosforilación oxidativa y consumo de oxigeno (heterotrofía).

Recientemente la modalidad mixotrófica ha sido más ampliamente estudiada debido a que muchas cepas de microalgas han demostrado tener tasas de crecimiento más altas comparadas con aquellas obtenidas bajo modalidades heterotróficas o autotróficas [9], [10], [167]–[169]. Algunos científicos sugieren que la tasa de crecimiento bajo la modalidad mixotrófica corresponde aproximadamente a la suma de tasas de crecimiento máximas obtenidas bajo cultivos autotróficos y heterotróficos [170]. Sin embargo, otros investigadores consideran que esta tasa de crecimiento no puede ser simplemente la combinación de ellas sino que más bien ambos procesos metabólicos pueden ser afectados sinérgicamente el uno al otro, lo que resulta en una mejora de la productividad de biomasa [166]. La modalidad heterotrófica también es bastante atractiva para los investigadores puesto que al no requerir luz disminuye los costos de producción, aunque pueden presentarse problemas de contaminación.

Además de tener claridad sobre la modalidad de cultivo más conveniente, también es importante hacer una adecuada selección de la cepa de microalga que alcance los

mejores rendimientos en la configuración de cultivo que sea seleccionada: lote, lote alimentado, continuo, o semicontinuo a escala laboratorio, piloto o comercial, o el modo metabólico de crecimiento (Tabla 2-1). En este punto es importante tener en cuenta que aunque existen varias especies capaces de intercambiar sus vías metabólicas y adaptarse a los diferentes modos de crecimiento, su éxito no puede generalizarse puesto que incluso con la misma especie pueden presentarse resultados diferentes. Esto dependerá en parte de la especie de microalga utilizada puesto que muchas de ellas pueden ser autótrofas obligadas o heterótrofos facultativos [170]. En algunos casos pueden desarrollarse mixotróficamente pero sólo bajo ciertas condiciones específicas de intensidad lumínica [7] y en otros simplemente son incapaces de metabolizar ciertas fuentes de carbono [68]. Además de la fuente de carbono suplementada también deben brindarse concentraciones óptimas de macro y micronutrientes, ya que deficiencias en cualquiera de ellos causa cambios metabólicos y fisiológicos y decrecimiento en la productividad [54]. Una vez alcanzada la cantidad de biomasa óptima, los procesos siguientes tienen que ver con la cosecha de la biomasa, la disrupción celular para la extracción de los productos químicos de alto valor y su separación o purificación si es el caso [170].

En la Tabla 2-2 se enumeran las ventajas y limitaciones de las modalidades de cultivo más utilizadas para microalgas, y la selección del método más adecuado dependerá de los productos y subproductos que se deseen obtener. Para cada una de las limitaciones descritas en la Tabla 2-2 existen oportunidades de mejora, y algunas de ellas se resumen en la Figura 2-2. Entre ellas se puede resaltar la que tiene que ver con la manipulación metabólica de las cepas por medio del modo de cultivo, y por lo tanto en la producción de metabolitos primarios. Por esta razón las microalgas exhiben una variada composición bioquímica (contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos) que depende no solo de la especie, sino de las condiciones bajo las que se hacen los cultivos. Esto incluye el tipo de fuente de carbono, regímenes de luz o la disponibilidad de otros macro y micronutrientes.

Esta variabilidad hace difícil la estandarización de procesos de transformación de esa materia prima, en la producción de biodiesel (en la cual se espera un alto contenido de lípidos en la microalga) o de biocrudo (que contenga bajos contenidos de nitrógeno y

azufre) [33]–[37]. Este es un inconveniente fundamental debido a que la uniformidad del proceso de producción, la calidad y composición del producto dependerá de la composición de la materia prima utilizada.

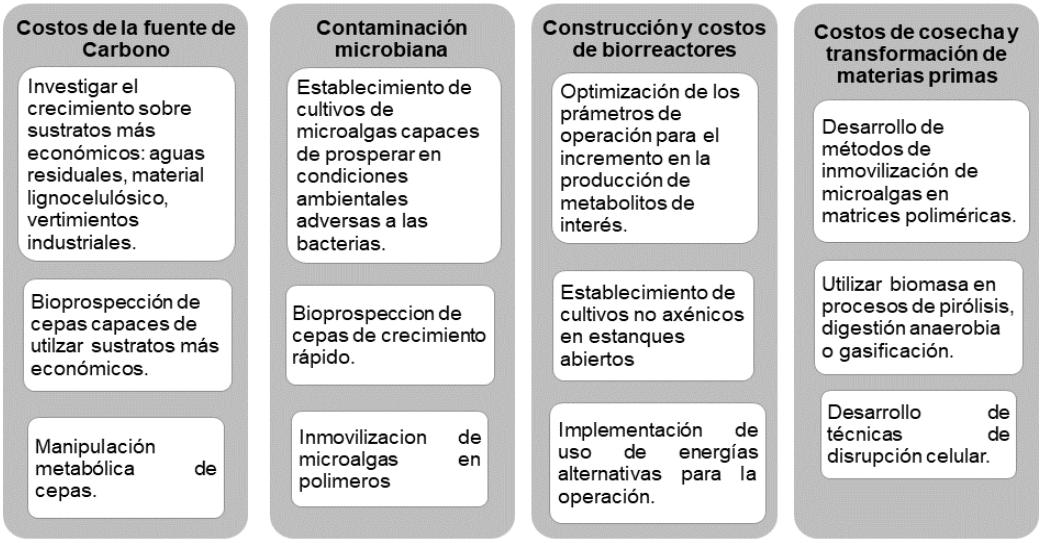

Figura 2-2: Retos y opciones de mejora en cultivos mixotróficos y heterotróficos de microalgas [170]

Cultivos heterotróficos	Cultivos mixotróficos
Ventajas	
Altas tasas de crecimiento y productividades de biomasa comparados con los cultivos fotoautotróficos (pueden ser superiores hasta 3 y 4 veces)	Permite altas tasas de crecimiento en menores tiempos de cultivo y rendimientos de biomasa más altos comprados con modos de crecimiento autotrófico y heterotrófico debido a que la célula asimila simultáneamente dióxido de carbono y una fuente de carbono orgánica
Posibilidad de manipular la composición de biomasa mediante el cambio de sustratos orgánicos que estimulan vías metabólicas y biosintéticas específicas	Fase exponencial más prolongada
Reducción en los costos de construcción de los bioreactores	Se reduce la perdida de biomasa causada por la respiración en las condiciones de oscuridad (heterotrofía)
Se elimina la limitación que presenta el crecimiento autotrófico que tiene que ver con la distribución eficiente de la luz cuando el cultivo alcanza altas densidades celulares.	Reducción del efecto fotoinhibitorio que puede darse
	Flexibilidad para intercambiar el metabolismo entre el modo autotrófico y heterotrófico dependiendo de la disponibilidad de luz y de carbono orgánico
	Protección contra el daño foto-oxidativo debido a la acumulación de oxigeno que sucede generalmente en sistemas de cultivo cerrado.
Posibilidad de usar aguas residuales para remover materia orgánica por la eficiencia en la remoción de nutrientes (N y P). Mayor acumulación de lípidos en comparación con cultivos fotoautotróficos.	
Limitaciones	
- Requerimiento de inyección de oxígeno para llevar a cabo la respiración. - Incapacidad para producir metabolitos que requieren ser inducidos por luz. - La adición de un sustrato orgánico aumenta los gastos de energía y los costos generales puede presentarse contaminación y competencia con otros microorganismos que crecen más rápido que las microalgas. - La cantidad de microalgas que pueden crecer heterótrofo y mixotróficamente es limitada. - Necesidad de construcción de bioreactores complejos que mantengan condiciones de oxigenación, temperatura y agitación que puedan mantener la esterilidad del cultivo que implican el gasto	

Tabla 2-2: Ventajas y limitaciones de los cultivos heterotróficos y mixotróficos de microalgas. Adaptado de [77], [170]–[176][170][170][170][170][170].

2.3 Metabolismo de microalgas

2.3.1 Fotosíntesis en microalgas

Las microalgas toman el carbono atmosférico en forma de CO_2 o ácido carbónico (H_2CO_3) y lo fijan, es decir, lo trasforman en biomasa mediante la fotosíntesis. En este proceso se forman hexosas con las cuales se construirán los componentes celulares liberando oxígeno atmosférico como subproducto. Los ecosistemas marinos absorben aproximadamente la misma cantidad de CO_2 desde el atmósfera como ecosistemas terrestres [177], específicamente, los productores primarios marinos absorben alrededor de 50 Gt de carbono por año [178].

Para llevar a cabo la asimilación del carbono inorgánico, la fotosíntesis involucra algunas reacciones que se deben realizar en presencia de luz y otras que no dependen directamente de ella. Este proceso se expone en la Figura 2-3.

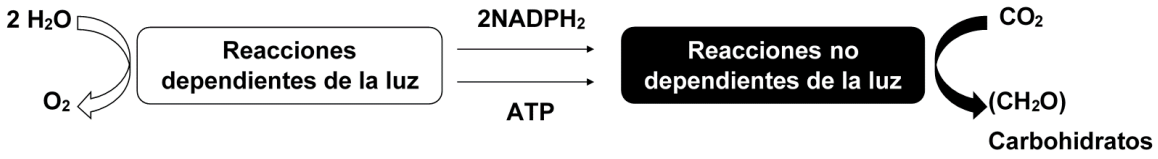

Figura 2-3: Resumen esquemático de la fotosíntesis. Adaptado de Masojídek *et al*. (2013) [179].

La fotosíntesis requiere dos etapas: reacciones dependientes de la luz en las que se producen además del oxígeno, moléculas de alta energía de adenosín trifosfato (ATP) y dinucleótido fosfato de nicotinamida adenina reducido (NADPH). Estas son posteriormente utilizadas en el ciclo de Calvin-Benson en el cual se fija el carbono; a estas reacciones posteriores también se les llama reacciones no dependientes de la luz [179].

En un proceso complementario, durante las horas de oscuridad, ocurre el proceso contrario a la fotosíntesis en el cual se consume oxígeno para realizar la catálisis de los carbohidratos. Este proceso es llamado respiración, por lo tanto la fotosíntesis se considera como la suma de la fotosíntesis neta (producción de O_2) y la respiración (consumo de O_2) [179]. Sin embargo, es de especial atención la cantidad de radiación lumínica que puedan llegar a recibir los organismos fotoautotróficos, pues intensidades muy altas de luz pueden causar destrucción de clorofilas y la fotoinhibición Esto trae como consecuencia que la mayoría de la luz solar es desperdiciada como calor y solo una pequeña parte de ella es aprovechada y convertida por la fotosíntesis [180]. Esta radiación también es llamada radiación fotosintéticamente útil (en inglés: PAR) y corresponde aproximadamente al 45-50% del total de la radiación recibida [181].

- **Reacciones dependientes de la luz**

Para dar inicio a la fotosíntesis se requiere que las partículas que los fotones, sean atrapados por la clorofila presente en los cloroplastos. La Figura 2-4 describe la estructura característica de estos organelos en el filo Chlorophyta. Dentro de los cloroplastos, la estructura básica del aparato fotosintético consta de una serie de vesículas membranosas aplanadas llamadas tilacoides o discos, y una matriz o estroma circundante.

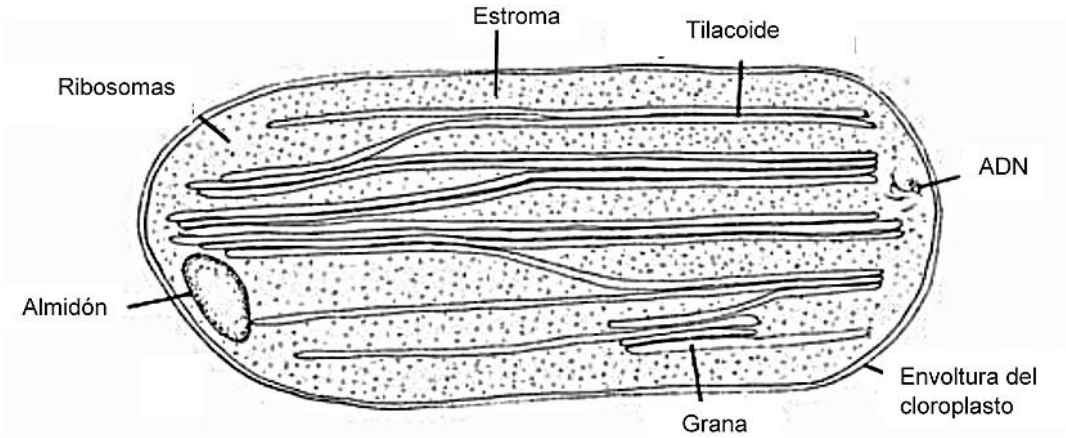

Figura 2-4: Esquema de la estructura del cloroplasto en Chlorophyta. Tomado de Lee (2008) [115].

El cloroplasto se caracteriza por poseer doble membrana y en su interior los tilacoides se agrupan de dos a seis por banda, en una agrupación llamada grana. La fotosíntesis ocurre en la membrana tilacoidal, que contiene las moléculas de clorofila y la fijación de dióxido de carbono ocurre en el estroma [115]. En la membrana tilacoidal se encuentran los siguientes complejos: i) complejos captadores de luz, que captan los fotones y se encargan de transferirlos al centro de reacción, ii) fotosistemas I y II (el fotosistema I absorbe luz de longitudes de onda largas-infrarrojo- y el fotosistema II absorbe luz de longitudes de onda más cortas-rojo-[182]) iii) citocromo b6 y iv) ATP sintasa [115], [179], [183] en la Figura 2-5 se ilustra la membrana tilacoidal y la transferencia de electrones dentro de ella.

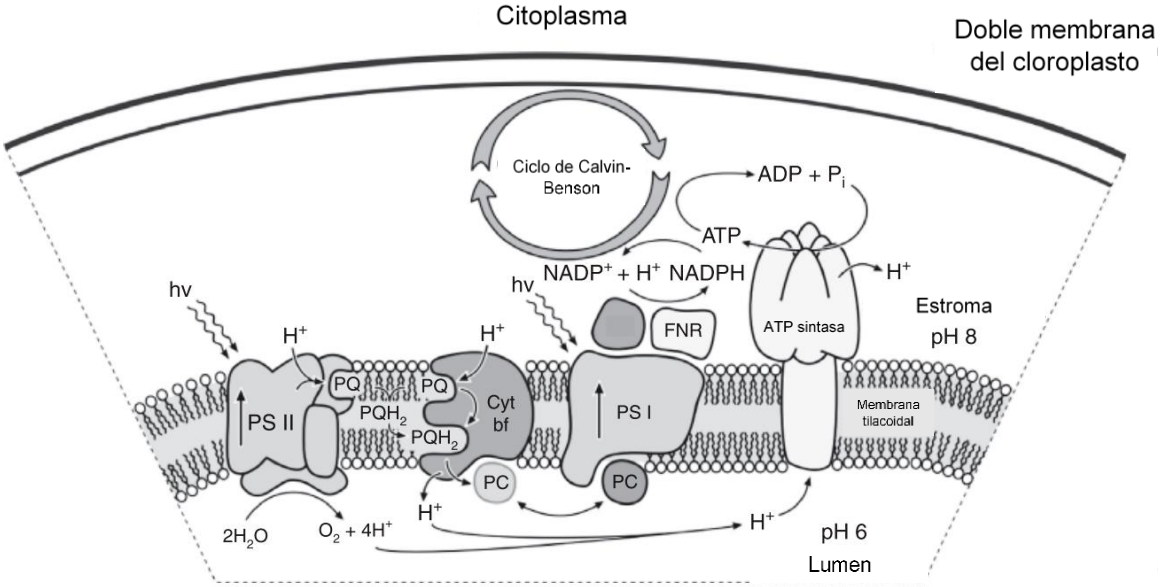

Figura 2-5: Esquema del arreglo de los fotosistemas I y II, complejo citocromo b6 y ATP sintasa dentro de la membrana del tilacoide. hv: energía de la luz, PS I: fotosistema I, PS II: fotosistema II, PQ: plastoquinona, PQH2: plastoquinona reducida, Cyt bf: Complejo citocromo b6/f, PC: plastocianina, FNR: ferredoxina, ADP: adenosín difosfato [179].

El sistema de la Figura 2-5 actúa como una cadena transportadora de electrones y su objetivo es transferir electrones desde compuestos que tienen alta tendencia a ganarlos hasta compuestos que tienen alta tendencia a cederlos. Dado que los electrones necesarios para iniciar el proceso deben ser extraídos de la molécula de agua y ésta a su vez es una molécula con un potencial de reducción (E_0) bastante bajo, (i.e. baja

tendencia a transferir electrones), se requiere de la energía de la luz (hv) para realizar la fotólisis y romper la molécula de H_2O. De allí se liberan electrones que son atrapados en el fotosistema II (PSII) y luego son transferidos a través de la membrana tilacoidal por una serie de transportadores que incluye plastoquinonas, citocromo b6/f, plastocianina y finalmente al fotosistema I (PSI). En la membrana tilacoidal se inician los pasos que llevan a la reducción de $NADP^+$ a NADPH que actúa como el transportador de electrones desde la fotosíntesis al ciclo de Calvin-Benson donde serán requeridos más adelante. Durante el paso de los electrones a través de esta cadena también se liberan protones (H^+), que generan una fuerza protón motriz que inicia la producción de ATP catalizado por la enzima ATP sintasa que también será requerida en el ciclo de Calvin [182].

- **Reacciones no dependientes de la luz**

El ATP y NADPH producidos en la fotosíntesis ahora deberán ser utilizados en el siguiente proceso que consiste en el anabolismo de carbohidratos a partir del dióxido de carbono atmosférico. La enzima clave del proceso es la ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO). La enzima RuBisCO recibe su nombre debido a que presenta actividad carboxilasa y oxigenasa que son competitivas entre sí y dependen de la concentración de CO_2 u O_2 cerca del sitio activo de la enzima. Cuando existe exceso de O_2 en el medio, éste puede ser captado por RuBisCO y conducido por una ruta metabólica diferente llamada **fotorrespiración** [184]. Mientras la fotorrespiración tenga lugar, la célula no puede llevar a cabo reacciones fotosintéticas, consumiendo ATP y NADPH obtenidos de la fotosíntesis (Ver Figura 2-6a). Por otro lado, una alta concentración de CO_2 en el medio conducirá a la biosíntesis de macromoléculas, proceso llamado también como el **ciclo de Calvin-Benson** el cual tiene lugar en el estroma de los cloroplastos (Figura 2-4) y se lleva a cabo en cuatro fases consecutivas, la Figura 2-6(b) ilustra los pasos que se explican a continuación

i) ***Fase de carboxilación:*** esta primera fase consiste en adicionar una molécula de CO_2 a la ribulosa bifosfato, la reacción es catalizada por la enzima RuBisCO. De esta reacción se generan dos moléculas de 3-fosfoglicerato [179].

ii) ***Fase de reducción:*** el 3-fosfoglicerato es fosforilado con una molécula de ATP para producir 1,3-bifosfoglicerato, después una molécula de NADPH generada desde la fotosíntesis transfiere un electrón a la molécula, lo cual produce que la molécula sea reducida a gliceraldehído-3-fosfato. esta molécula es clave porque es intermediaria en la glucólisis [179], [182].

iii) ***Fase de síntesis:*** los carbohidratos son sintetizados a partir de gliceraldehído-3-fosfato, pero también a partir de esta molécula se generan ácidos grasos, aminoácidos y ácidos orgánicos [179].

iv) ***Fase de regeneración:*** la ribulosa bifosfato es regenerada para volver a comenzar el ciclo [179].

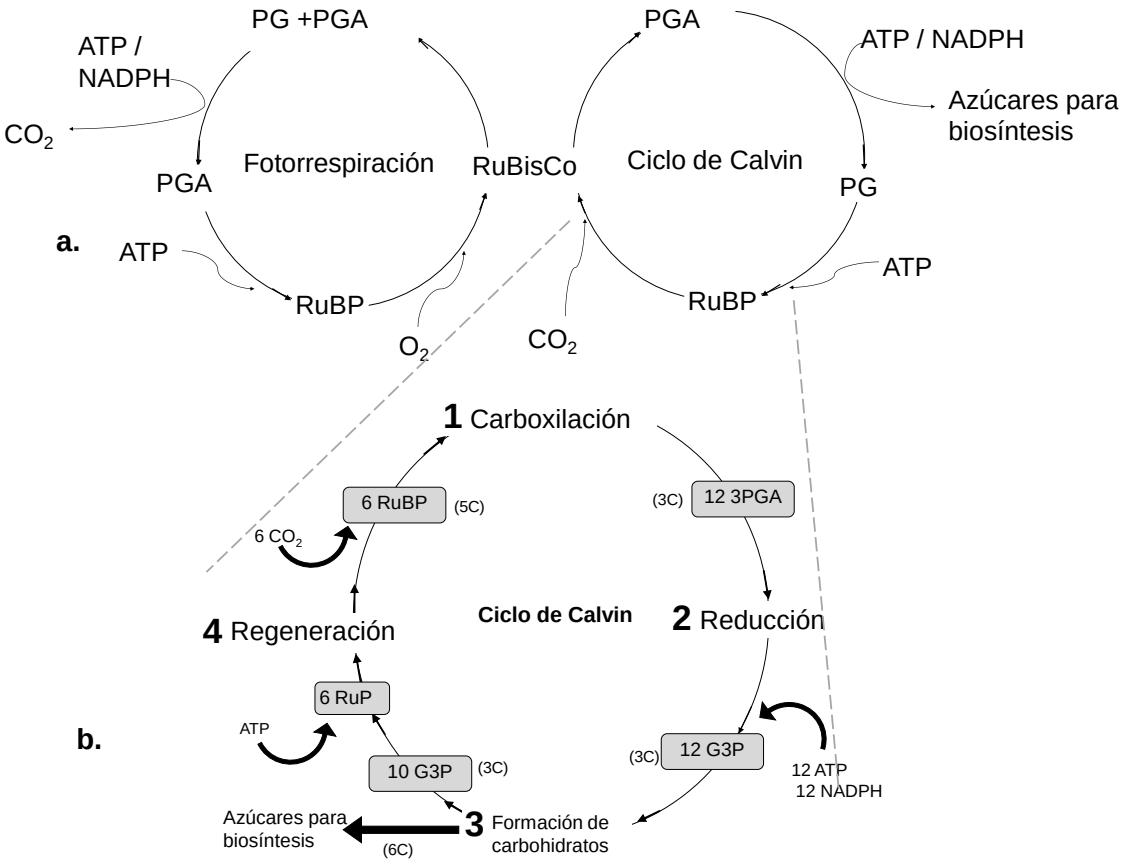

Figura 2-6: Fotorrespiración y Ciclo de Calvin. a. Comparación entre las actividades oxigenasa y carboxilasa de RuBisCO. b. Esquema del ciclo de Calvin [179], [182],[184].

Durante la fotorrespiración el oxígeno es acoplado al azúcar ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP) por la enzima RuBisCO de este proceso se obtiene como producto CO_2, además de serina y amonio. Ambos procesos consumen ATP y NADPH con la diferencia que en la fotorrespiración esta energía es consumida sin que se dé la biosíntesis de carbohidratos lo cual representa una ineficiencia potencialmente significante en términos energéticos. En el Ciclo de Calvin el dióxido de carbono (CO_2) es adicionado a una molécula de 1,5 ribulosa bifosfato (RuBP) catalizado por la enzima RuBisCO y tiene como finalidad la asimilación de carbono inorgánico para su transformación en materia orgánica.

El gliceraldehído 3-fosfato obtenido en el ciclo de Calvin es transportado fuera del cloroplasto hacia el citosol de la célula y en este punto puede ser desviado hacia dos rutas metabólicas diferentes según las necesidades de la célula: la síntesis de carbohidratos (*gluconeogénesis*) o la ruta oxidativa a través de la *glicólisis* para obtener piruvato.

2.3.2 Rutas metabólicas

El gliceraldehído 3-fosfato que proviene del ciclo de Calvin es el precursor clave de varios procesos biosintéticos relacionados a continuación:

- **Ruta Embden-Meyerhof-Parnas**

Esta ruta llamada así en honor a sus descubridores implica la oxidación de glucosa hasta piruvato, proceso conocido también como glucólisis y su proceso reverso que implica la síntesis de glucosa (gluconeogénesis) desde algún intermediario del proceso. La mayoría de sus reacciones son reversibles excepto algunas que son altamente reguladas (son favorecidas energéticamente en la dirección de síntesis de glucosa) y requieren enzimas diferentes en cada dirección (Figura 2-7).

El gliceraldehído-3-fosfato, producto del ciclo de Calvin, ingresa en la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y funciona como un intermediario clave en la síntesis de biomoléculas, este proceso ocurre en el citosol.

- **Gluconeogénesis:**

Cuando las microalgas son cultivadas en condiciones autotróficas se requiere sintetizar glucosa a partir del gliceraldehído-3-fosfato proveniente del ciclo de Calvin. El gliceraldehído-3-fosfato es convertido a fructosa-6-fosfato y posteriormente a glucosa-6-fosfato que seguirá la ruta de las pentosas (Figura 2-7) [182], [185]. Este ciclo es clave para obtener glucosa, que es precursora de polisacáridos (principalmente almidón) y de pentosas que formarán más adelante los ácidos nucleicos.

- **Glucólisis:**

En organismos heterotróficos, la glucosa es transportada al interior de la célula y mediante este proceso es oxidada a piruvato (Figura 2-7) [186]. Este proceso es importante porque de él se obtiene energía y especies reductoras que corresponden a dos moléculas de ATP y NADH por cada molécula de glucosa que son necesarios en otros procesos celulares [182]. La glucólisis además convierte los carbohidratos en compuestos que sufren oxidación terminal (acetil-CoA) o que se usan para la biosíntesis.

- **Ruta de las pentosas:**

Una vez que la glucosa es obtenida por la célula, sea a través de gluconeogénesis o mediante transporte activo desde el exterior, puede seguir esta ruta alterna. El principal objetivo de la ruta de las pentosas es utilizar la glucosa para generar NADPH, pentosas (ribosa y desoxirribosa) y treosas que se usan en reacciones biosintéticas de nucleótidos y aminoácidos (Figura 2-7) [182].

En esta ruta, por cada tres moléculas de glucosa-6-fosfato se generan tres moléculas de CO_2 y tres azúcares de cinco carbonos. La ribulosa-5-fosfato entra a una serie de reacciones en las cuales los azúcares de entre tres y siete carbonos son interconvertidas a glucosa-6-fosfato. Este puede ingresar nuevamente en la ruta y ser oxidado, lo que la convierte en alternativa de la glucólisis. La mayoría de enzimas encontradas en esta ruta participan también en el ciclo de Calvin, es decir, el metabolismo del carbono en el citoplasma y el mecanismo fotosintético son regulados por controles celulares comunes.

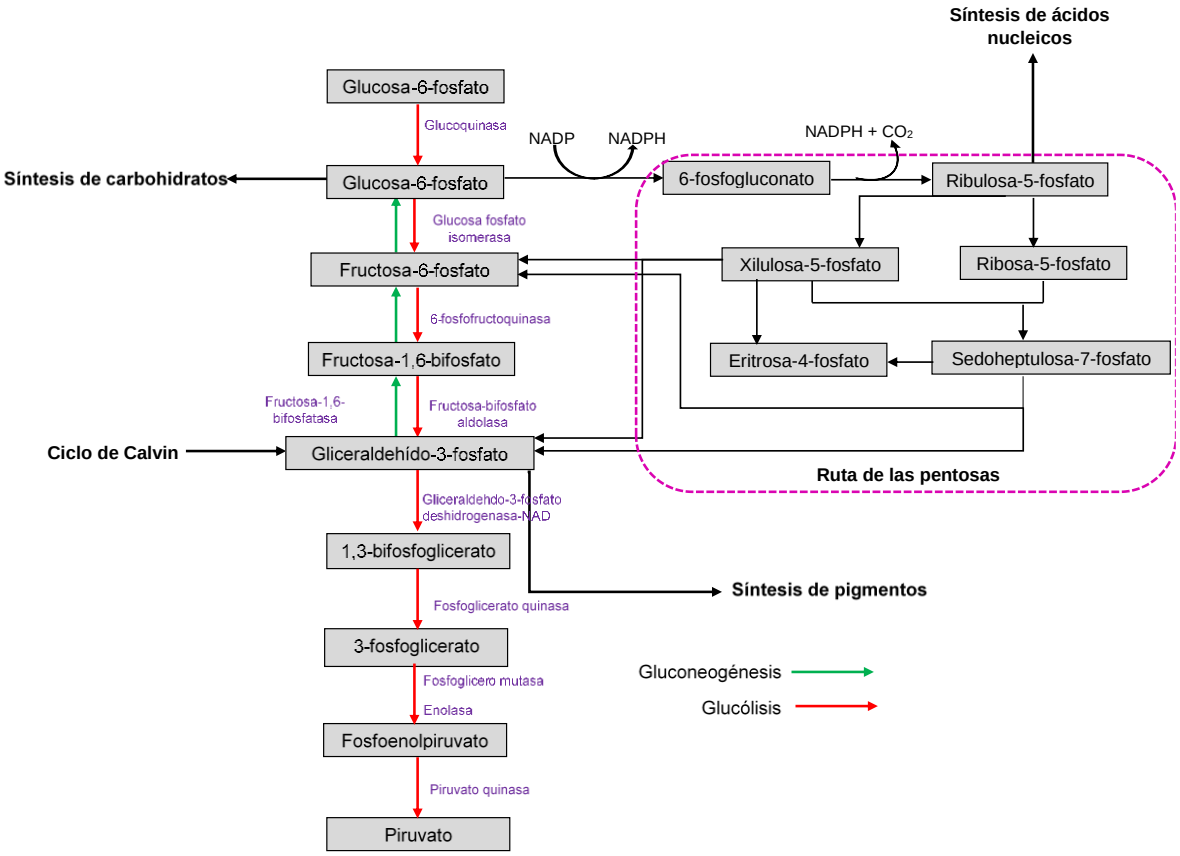

Figura 2-7: Esquema de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas y de la ruta de las pentosas. La flecha roja indica la catálisis de glucosa hasta piruvato, este proceso es llamado glucólisis. Por otra parte, cuando la célula realiza fotosíntesis, la célula sintetiza glucosa a partir del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) en el proceso indicado con la flecha color verde el cual es llamado gluconeogénesis. Adaptado de Chen & Jiang (2017), Madigan *et al*. (2015), Pérez-García *et al.* (2000) y Chen *et al*. (2000) [182], [184], [187], [188].

La ruta EMP comparte muchos intermediarios con el ciclo de las pentosas fosfato y es por eso que ambas pueden ser interactivas.

- **Ciclo del ácido cítrico:**

La Figura 2-8 describe el ciclo del ácido cítrico, ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Esta es la principal ruta de oxidación de los carbohidratos y ácidos grasos. Es importante porque la suma de la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico producen en total

38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa y algunos de sus intermediarios como ácido glutárico y el oxaloacetato son precursores de varios aminoácidos.

El ciclo inicia cuando el piruvato (una molécula de tres carbonos) obtenido en la glicólisis, es transportado hasta las mitocondrias y es oxidado a acetil (molécula de dos carbonos), el carbono restante es liberado como CO_2. El acetil se une a una molécula de coenzima A y forman el acetil coenzima A (Acetil-CoA), el cual se condensa con oxaloacetato para generar citrato. El ciclo resulta en la oxidación del piruvato a 3 moléculas CO_2, y en la obtención de intermediarios como el ácido glutárico que es enviado a la ruta de biosíntesis de aminoácidos y de malato que es clave para la síntesis de ácidos grasos [182]. Además se obtienen NADH y $FADH_2$ que son moléculas de alta energía capaces de donar electrones [182]. El oxaloacetato regenerado puede ir también en una reacción reversible para convertirse en piruvato y retornar a la gluconeogénesis [189].

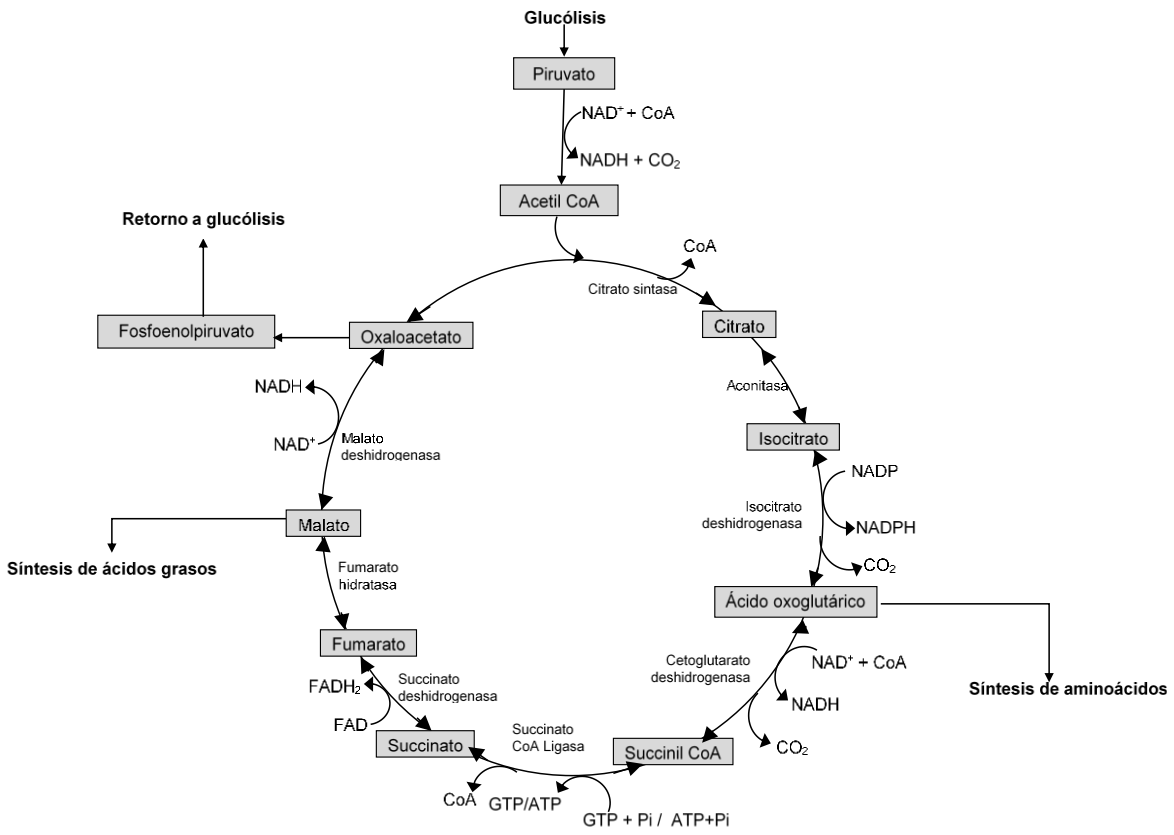

Figura 2-8: Ciclo de Krebs o ciclo de ácidos tricarboxílicos. Tiene lugar en la mitocondria. [187], [190]

- **Biosíntesis de polisacáridos:**

Los polisacáridos son sintetizados adicionando una forma de glucosa activada a un polímero preexistente. En microalgas, el principal polímero de reserva es el almidón y se sintetiza en el cloroplasto, en el cual cada una de las unidades de glucosa está unida por enlaces 1-4 α-glucosídicos formando una cadena llamada glucosan o glucano. El ciclo comienza en el proceso de gluconeogénesis cuando la fructosa-6-fosfato se convierte a glucosa-6-fosfato, más adelante a glucosa-1-fosfato y finalmente a ADP-glucosa. El almidón consta de dos fracciones, la amilosa que no es soluble en agua fría y la amilopectina que sí lo es. La amilosa comprende casi 20% en masa del almidón y consiste de varios cientos de moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces 1→4-α-glucosídicos. La amilopectina comprende 80% restante del almidón y es más compleja en estructura que la Amilosa puesto que contiene ramificaciones 1→6-α-glucosídicas, aproximadamente cada 25 unidades de glucosa [189], [191] (Figura 2-9).

- **Biosíntesis de lípidos:**

Los lípidos son un grupo heterogéneo de componentes que incluyen grasas, aceites, esteroides y ceras que se relacionan más por sus propiedades físicas que químicas, son relativamente insolubles en agua y solubles en solventes no polares. Los lípidos más simples son ésteres de ácidos grasos (largas cadenas carbonadas) con alcohol. Los ácidos grasos pueden ser saturados (solo presentan enlaces sencillos en la porción larga hidrófoba de la molécula) o instaurados (presentan uno más enlaces dobles en su cadena), también pueden ser ramificados o tener un número impar de átomos de carbono. El número y la posición de estos dobles enlaces a menudo es específico de la especie o del grupo, y los dobles enlaces generalmente se forman por de-saturación de un ácido graso saturado. Los ácidos grasos son de alta importancia fisiológica puesto que son los principales componentes de las membranas(glicoglicerolípidos y fosfoglicerolípidos) y porque son reservas de energía de la célula (triacilglicerol) [192], [193].

Su biosíntesis requiere carbono en forma de acetil-CoA, ATP, NADPH y un conjunto de proteínas codificadas en el núcleo celular y se lleva a cabo en los cloroplastos. Se cree que la molécula de acetil-CoA es demasiado grande como para ingresar al cloroplasto debido a su limitada permeabilidad y la falta de transportadores. Por esto comúnmente, se acepta que el acetil-CoA se produce en cada compartimento celular que lo requiere como un iniciador importante en diversas reacciones bioquímicas [194].Existen varias rutas bioquímicas que suceden dentro del cloroplasto que podrían conducir a la producción de acetil-CoA, pero la que se considera la mayor fuente, es la mediada por la enzima piruvato deshidrogenasa. El fosfoenolpiruvato proveniente de la glucólisis (Figura 2-7) ingresa al cloroplasto y allí su grupo fosfato es removido gracias a la acción de la enzima piruvato quinasa plastídica obteniendo piruvato. Luego la piruvato deshidrogenasa actúa sobre el piruvato retirando un grupo carboxilo para obtener el radical acetil. El proceso requiere coenzima A (CoA), NAD^+ como receptor de electrones y ácido lipóico como cofactor, y es regulada por luz, Mg^+, y se inhibe por la retroalimentación de acetil-CoA y NADH [193].

Posteriormente, al acetil-CoA es agregado un CO_2 para obtener malonil Co-A por la enzima acetil-CoA carboxilasa. Posteriormente el grupo malonil es transferido a una proteína transportadora de grupo acilo (ACP por sus siglas en inglés) y de esta manera se obtiene malonil-ACP [193].

Los ácidos grasos son sintetizados por la condensación de acetil-CoA y malonil-ACP, este proceso involucra la adición de dos carbonos cada vez a la proteína ACP. Esa proteína retiene el ácido graso en crecimiento a medida que se construye y lo libera una vez que ha alcanzado su longitud final. Cada alargamiento de dos carbonos implica cuatro pasos enzimáticos: condensación, reducción, deshidratación y una segunda reducción que consume dos moléculas de NADPH y libera una molécula de CO_2 del malonil-ACP [182], [193].

La síntesis de ácidos grasos termina por la acción de las tioesterasas acil-ACP que generan ACP y cadenas de ácidos grasos libres de los complejos acil-ACP. Estos corresponden a: 16:0-ACP (16 carbonos, sin insaturaciones unidos a la proteína ACP),

18:0-ACP (18 carbonos, sin insaturaciones unidos a la proteína ACP, 18: 1Δ9-ACP (18 carbonos, 1 insaturación en el carbono 9 de la cadena unidos a la proteína ACP) y a veces 14 0-ACP ACP (14 carbonos, sin insaturaciones unidos a la proteína ACP). Los ácido grasos acil-ACP tioesterasas son las responsables de remover la proteína ACP para que pueda volver a ser usada como acetil-CoA [193].

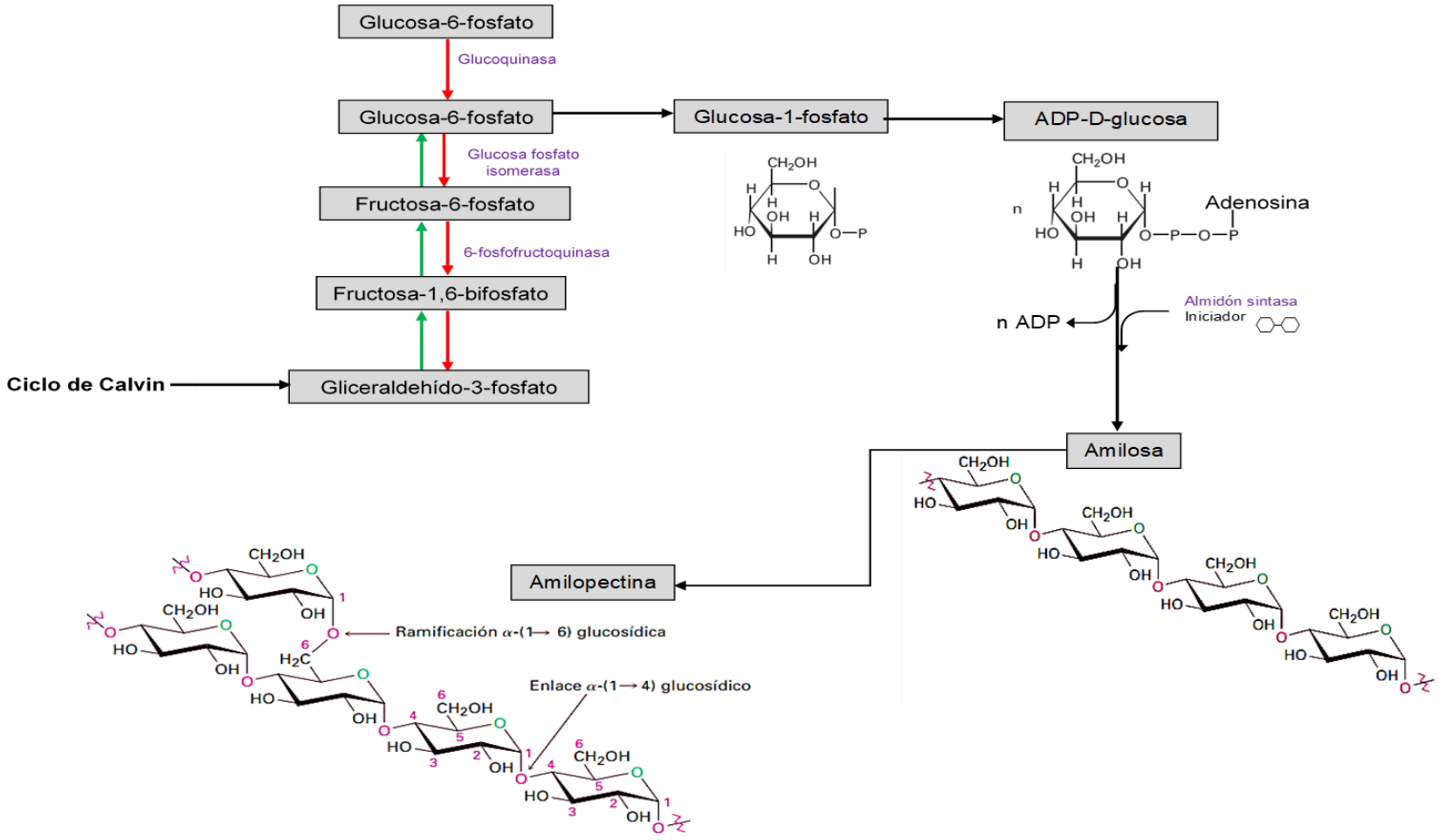

Figura 2-9: Biosíntesis del almidón. Se ilustran también las estructuras de la amilosa y la amilopectina. Adaptado de McMurry (2008)y Wünschiers (2013) [189], [191].

Las cadenas de ácidos grasos son llevadas al retículo endoplasmático donde serán transformados en triglicéridos mediante la llamada ruta *Kennedy*. En esta ruta los ácidos grasos sufren una transesterificación de la siguiente manera: el gliceraldehído-3-fosfato proveniente del ciclo de Calvin es reducido a glicerol-3-fosfato. Esta es una molécula de 3 carbonos, suceden dos transferencias de acilo consecutivas desde acil-CoA a las posiciones 1 y 2 del glicerol-3-fosfato para generar ácido lisofosfatídico y ácido fosfatídico (PA) es decir, un difosfoglicérido. Finalmente la enzima 1,2-diacilglicerol aciltransferasa cataliza el último paso que es la transesterificación terminal por un acil-CoA de la posición 3 del difosfoglicérido [188].

La acumulación de lípidos depende de las condiciones ambientales en las cuales se encuentre la microalga, por ejemplo, la depleción de algún nutriente conlleva a la producción de altas cantidades de lípidos. La composición de ácidos grasos de las células varía de una especie a otra y varía también de acuerdo a las condiciones de crecimiento [193]. El hecho de que algunas microalgas sean mayores productoras de lípidos parece estar relacionado con el número de genes que codifican enzimas relacionadas con la síntesis de lípidos tal es el caso de *C. reinhardtii*, *P. tricornutum* y *Ectocarpus siliculosus*.

- **Biosíntesis de proteínas:**

  Esta tiene lugar en los ribosomas, donde la secuencia de nucleótidos del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) es traducida a la secuencia de aminoácidos de una proteína, por lo cual el ARNm se acopla al ribosoma. En el primer paso, el ARN de transferencia (ARNt) identifica la secuencia iniciadora de la traducción en el ARNm que es una secuencia específica de nucleótidos que marcan siempre la iniciación de la síntesis de una proteína. El segundo paso es la elongación donde sucesivos ARNt se acoplan a la cadena de ARNm, el ARNt trae consigo aminoácidos que van siendo unidos entre ellos por enlaces peptídicos. La traducción termina cuando es leída una secuencia de terminación en el ARNm.

2.3.3 Asimilación del carbono orgánico durante el metabolismo mixotrófico y heterotrófico

Como se explicó en el apartado 2.2, una de las formas de alcanzar mejores rendimientos en los cultivos manteniendo una adecuada relación costo-beneficio es mediante la adición de fuentes de carbono orgánicas.

Los análisis económicos muestran que en general, del total de costos de producción, la fuente de carbono orgánica representa un 45,4%, los micronutrientes el 3,3%, la electricidad 30,6%, la esterilización por vapor el 14,2% y la aplicación de aire estéril el 6,6% [61], [173], [195].

Para tener certeza sobre cuáles son las fuentes de carbono que la microalga puede asimilar es importante desarrollar pruebas a nivel laboratorio antes de iniciar un proceso a gran escala. En la biomasa microalgal, el carbono representa casi el 50% del peso seco y por lo tanto uno de los mayores costos de inversión en los sistemas de producción. Esto crea la necesidad de encontrar sustratos cada vez más económicos y asequibles. Entre los sustratos que están siendo explorados han tomado fuerza aquellos que se generan como subproducto de otros procesos de transformación. Este es el caso de la glicerina proveniente del proceso de elaboración de biodiesel o el uso de aguas residuales domésticas y/o de procesos agroindustriales [15], [51], [101], [196]–[200].

A nivel metabólico, la asimilación de las fuentes de carbono orgánicas tiene como finalidad la obtención de energía en forma de ATP. Esto permite el mantenimiento celular, biosíntesis y la obtención de esqueletos de carbono para la formación de biomoléculas, implicando que se transfieran electrones desde estas moléculas hasta un aceptor final: el oxígeno. Tales fuentes de carbono orgánicas pueden ser metabolizadas bajo heterotrofía, mixotrofía, fotoheterotrofía para producir biomasa o metabolitos de alto valor [170].

Bajo heterotrofía, el carbono tomado por la célula debe ser transformado en intermediarios de las principales vías metabólicas, reemplazando las moléculas producidas fotosintéticamente, las células deben tener la facultad para dividirse y activar los metabolitos

en ausencia de luz. Bajo este proceso la energía se genera a través de la fosforilación oxidativa acompañada por consumo de O_2 como aceptor final de electrones.

En mixotrofía la fijación del carbono inorgánico se hace mediante la fotosíntesis y el carbono orgánico es asimilado a través de la respiración aerobia, influida por la disponibilidad de O_2. Se ha observado que cuando se presenta esta modalidad de crecimiento, la célula de cierta manera se "acostumbra" a utilizar el carbono orgánico y disminuye su afinidad por el CO_2, pero el poco CO_2 que logra asimilar es procesado hasta siete veces más eficientemente comparado con regímenes autotróficos [201]. La fuente de carbono orgánica mejora la respiración en luz y en oscuridad y aunque se esperaría que como producto de esta respiración exista una cantidad de CO_2 considerable en el medio, de hecho es todo lo contrario. En este caso se encuentra en bajas concentraciones, probablemente debido a la asimilación más eficiente del mismo y a que pueda estar siendo reciclado por la parte fotosintética de la modalidad mixotrófica.

- **Glucosa**

La glucosa es la fuente de carbono más comúnmente utilizada porque se alcanzan mejores rendimientos celulares comparados con otras fuentes de carbono (azúcares, alcoholes o ácidos orgánicos) y esto se explica en el hecho que la molécula de glucosa libera más energía (i.e. 2872 $kJ \cdot mol^{-1}$)durante su catálisis en comparación con otros sustratos (glicerol 1643 $kJ \cdot mol^{-1}$, ácido acético 894 $kJ \cdot mol^{-1}$, etanol 1319 $kJ \cdot mol^{-1}$) [187].

Cuando la glucosa está presente en el medio, la glucosa ingresa al citoplasma de las microalgas por medio de un transporte activo de hexosas ligado a simporte de protones, este mecanismo transporta azúcares y protones con una estequiometria de 1:1 [202] y la célula debe invertir una molécula de ATP por cada molécula de glucosa transportada. Este sistema transportador es codificado por el gen *hup1*, la síntesis del transportador inicia aproximadamente a los 15-18 minutos después de agregar el azúcar al medio [188]. La expresión de este gen en *Chlorella* es inducido solamente por la presencia de D-glucosa, D-fructosa, y D-galactosa pero no por pentosas, sacarosa, D-manosa o disacáridos [187]. Esta es la razón por la que Shihira & Krauss [68] encontraron diversidad en la respuesta de crecimiento cuando evaluaron el crecimiento de los aislados de *Chlorella* en medios

suplementados con diferentes tipos de azúcares. *Chlorella* además posee dos genes más relacionados con el transporte de hexosas: *hup2* y *hup3* conducidos también por la presencia de glucosa. En *P. kessleri* se activaron los genes *hup1*, *aat* (translocador de nucleótidos de adenina que intercambia ATP mitocondrial por ADP citosólico) [203] y *gap1* que cataliza la transformación de gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-bifosfoglicerato cuando la microalga se transfirió a un medio con glucosa y se sometió a un crecimiento heterotrófico [187].

El factor presencia o ausencia de luz interactúa también con la glucosa en el medio, afectando varias de las rutas metabólicas de las microalgas: cuando se tienen en un régimen de crecimiento **mixotrófico**, la luz "regula a la baja" la expresión del gen *hup1* y por lo tanto la eficacia de la toma de glucosa. La glucosa que logra ser ingresada al interior de la célula es metabolizada principalmente por la ruta glucolítica. Por el contrario, bajo condiciones de **heterotrofia** la glucosa es metabolizada principalmente por la ruta de las pentosas (Figura 2-7) [73], [170], [184], esto significa que para obtener el gliceraldehído-3-fosfato la célula recurre a la transformación de la glucosa a sedoheptulosa-7-fosfato, como se ilustra en el recuadro de la Figura 2-7. Por ejemplo Boyle& Morgan (2009) [182] y Chen Yang *et al.* (2000) [202], reportan que en *Chlorella sorokiniana,* bajo crecimiento heterotrófico la glucosa es metabolizada en un 90% mediante la ruta de las pentosas. En este caso, a pesar de presentar una concentración similar a la presentada bajo el crecimiento autotrófico, la concentración de enzima necesaria para transformar glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato disminuye en su actividad. Las demás enzimas necesarias para transformar el gliceraldehído-3-fosfato aguas abajo del proceso glicolítico no se ven afectadas ni en concentración ni en actividad. En el metabolismo heterotrófico también es obvia una esperada reducción en la concentración de las enzimas del ciclo de Calvin encargadas de la fijación de carbono inorgánico [170]. En cuanto al ciclo de Krebs, éste parece no estar influido por el efecto de la luz tal como reportan los estudios de Hong & Lee (2007) [182], Yang *et al*. (2002) [203], Chen *et al.*, (2000) [204]. En este caso pues las concentraciones y actividades de las enzimas no presentan variación en el crecimiento auto, hetero o mixotrófico [170]. Otro efecto de la iluminación reportado en la literatura fue el reportado por Cho *et al.* (1981) [207], en el que describe que en ausencia de luz, la glucosa presente en el medio induce la expresión de dos genes transportadores de aminoácidos a

través de la membrana celular. La glucosa no inhibe la ruta EMP, el ciclo de las pentosas ni el ciclo de Krebs, por lo cual se reportan tasas de crecimiento en cualquiera de las modalidades de cultivo superiores a las autotróficas [170].

La presencia de glucosa también tiene un efecto sobre el pH del medio. Al inicio del cultivo el medio se torna ácido debido a los productos ácidos de su metabolización excretados por la microalga (ácido fórmico y acético). Aproximadamente, al segundo día del cultivo, se contrarresta acidez porque cuando se toma la glucosa los protones también son transportados al interior de la célula. Esto provoca una alcalinización del medio por aumento en la concentración en iones OH^-.

En cuanto a las tasas de crecimiento, la mayoría de estudios reportan mejores resultados para cultivos heterotróficos alimentados con glucosa. Sin embargo, en otras investigaciones [208] se reportan mejores resultados bajo el crecimiento fotoautotrófico. Es importante aclarar que los efectos de la glucosa sobre el metabolismo de las microalgas pueden variar de una especie de microalga a otra y si la iluminación es o no suministrada. En cultivos mixotróficos, Martinez & Orus (1991) y Valiente et al. (1992) [209], [210], reportaron que la célula disminuía su afinidad por la toma de CO_2 en cultivos de *Chlorella,* pero a pesar de este hecho, la fotosíntesis se realiza de manera más eficiente, y el CO_2 producido de la respiración de la glucosa es reutilizado para el proceso fotosintético. Esto explicaría que la mayoría de estudios obtienen tasa de crecimiento más altas comparadas con otras modalidades de cultivo.

- **Glicerol**

El uso del glicerol como fuente de carbono para el cultivo de microalgas tiene como ventaja principal su bajo costo puesto que es obtenido como subproducto de la producción de biodiesel. Es un sustrato compatible con las enzimas y membranas celulares sin efectos tóxicos, y es metabolizado fácilmente por muchas microalgas cuando es suministrado en bajas concentraciones. En este caso se reportan rendimientos de biomasa comparables con los obtenidos de cultivos suplementados con glucosa [170], [211], [212].

La molécula de glicerol ingresa a la célula mediante difusión simple y es fosforilado en el citoplasma usando ATP. Luego mediante reacciones sucesivas es transformada a glicerato y gliceraldehído-3-fosfato.

Durante este proceso, en algún punto se forma *sn*-glicerol-3-fosfato; se cree que este intermediario inhibe la glucólisis, y favorece la gluconeogénesis. Sin embargo, se inhibe la ruta de las pentosas por lo cual la mayoría de sustrato termina siendo desviado hacia la síntesis de carbohidratos [170]. También se infiere que cuando se suministra como única fuente de carbono se reduce el flujo enzimático del ciclo de Calvin, lo cual implicaría que no pueda ser aprovechado de manera eficiente fotoheterotrófica o mixotróficamente [14]. Sin embargo, el factor genético de la microalga juega un papel importante. Algunas especies como *Agmenellum quadruplicatum, Goniotrichium elegans, Navicula pelliculosa, Nostoc sp.* y otras como *Chlorella vulgaris, Nannochloropsis spp.* y *Schizochytrium limacinum* han demostrado su utilización de forma heterotrófica [9], [66].También, la composición bioquímica de las microalgas cultivadas depende de la concentración de glicerol en el medio [170]. El glicerol induce una serie de cambios estructurales y bioquímicos en la célula como la acumulación de pigmentos, la reducción el número de tilacoides por célula y el tamaño de las partículas del fotosistema II [213].

2.3.4 Composición bioquímica de las microalgas

La composición de la biomasa se ve afectada por varios factores: i) régimen de crecimiento (autotrófico, mixotrófico, heterotrófico o fotoheterotrófico), ii) la genética de la cepa y iii) la fuente de carbono suministrada. Se reporta usualmente como porcentaje de biomasa por peso seco de proteínas, lípidos, carbohidratos o cualquier otra molécula específica.

La mayoría de estudios en los últimos años han estado enfocados a promover en las microalgas una sobreproducción de lípidos, que puedan ser luego extraídos y transformados en biodiesel. Las principales estrategias para lograrlo son la depleción de algún nutriente en el medio, generalmente nitrógeno. Sin embargo, en microalgas como *Cryptheconidium conhii* y *C. sorokiniana* se observó que dicha acumulación fue promovida no tanto por agotamiento de nitrógeno sino por exceso de carbono en el medio de cultivo [214]–[216].

De manera general se reporta que los lípidos y carbohidratos tienden a ser acumulados por las microalgas en una mayor cantidad cuando crecen bajo condiciones mixo o heterotróficas comparados con las condiciones autotróficas. Esto sucede porque las células consumen la fuente de carbono a una velocidad más alta que la de reproducción celular, promoviendo la conversión del exceso de azúcar en lípidos [170].

Sin embargo, esta afirmación no puede ser generalizada, sino que se debe tener en cuenta una vez más la genética de la cepa. Esto, puesto que existen algunas especies genéticamente más predispuestas a acumular carbohidratos en situaciones de estrés y es así como soportan la síntesis de proteínas [214], [215], [217], [218]. Ésta probablemente es una de las razones por las que Xiuling Li *et al*.(2013) [142] incluso afirma que las cepas apropiadas para sobreproducción de lípidos no son apropiadas para la producción de almidón y viceversa.

La microalga utilizada en este estudio, *P. kessleri,* se caracteriza por el almacenamiento preferente de energía en forma de almidón en lugar de lípidos cuando crece en condiciones de abundancia de nutrientes. Sin embargo, cuando es sometida a depleción de nutrientes, el contenido de almidón decrece y el de lípidos tiene a incrementar [146]. El estudio de Kong *et al*. (2013) [100] obtuvo un incremento de lípidos con el aumento en la concentración de glicerol obteniendo 7,48% para el modo autotrófico y 10,64% para el modo mixotrófico suplementado con 10 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol. En este mismo estudio, el contenido de carbohidratos se mantuvo casi invariable respecto al control (alrededor del 6%) y el contenido de proteínas disminuyó sustancialmente presentando valores de 18,13%, 8%, 3% y 2,5% respectivamente en medios con concentraciones de 0, 1, 5 y 10 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol. Este autor concuerda con Orús *et al.* (1991) [219] afirmando que la disminución de proteínas va acompañada por el incremento de lípidos y carbohidratos. De esto se concluye que las condiciones mixotróficas y la suplementación de fuentes de carbono orgánico promovieron la producción de biomasa, lípidos y carbohidratos, al tiempo que redujeron la biosíntesis de pigmentos y proteínas. Esto indica que las condiciones mixotróficas cambiaron las vías metabólicas del nitrógeno y el carbono. En el estudio de Deng *et al*. (2019) [164], el contenido de proteínas en un cultivo heterotrófico de *P. kessleri* suplementado con 2 $g \cdot L^{-1}$ de

glucosa no fue muy diferente del control autotrófico (51.6 y 51.9 % respectivamente). La principal diferencia entre las dos modalidades es quizá el contenido de carbohidratos y lípidos, puesto que el contenido de carbohidratos aumentó 6% y el de lípidos se redujo un 5% respecto al control.

El contenido de pigmentos también se ve afectado por el modo de cultivo, Kong *et al*. (2013) [100] suplementaron *C. vulgaris* con glicerol en concentraciones de 0, 1, 5 y 10 $g \cdot L^{-1}$, encontrando una disminución en el contenido de clorofila los cuales fueron 36,00; 25,05; 8,00 y 7,55 $mg \cdot g^{-1}$, respectivamente. Esto apoya los resultados obtenidos por Lewitus *et al.* (1991) [213] quienes describen que la presencia de glicerol afecta negativamente la acumulación de pigmentos y las estructuras plastídicas. En este trabajo se encontró también un incremento en la concentración de almidón con la adición de glicerol al medio. En cultivos mixotróficos con glucosa, el contenido de proteínas también disminuye, pero el contenido de carbohidratos y lípidos aumenta mientras más glucosa es agregada al medio.

Se sugiere que el almacenamiento de carbohidratos es la forma más eficiente de acumulación de energía porque se requiere menos ATP y NADPH para la síntesis de carbohidratos comparado con el requerimiento de la síntesis de lípidos. Aunque estos últimos tienen una mayor densidad de energía que los carbohidratos de almacenamiento, no es suficiente para compensar la energía invertida en su síntesis. Yang *et al.* (2002) compararon los niveles de ARNm durante mixotrofía (suplementada con glucosa) y autotrofía, encontrando un nivel similar de expresion de proteínas bajo ambas condiciones, lo cual significa que la presencia de glucosa y luz no altera los niveles de expresión de proteínas.

3. Materiales y métodos

3.1 Microorganismo y condiciones de mantenimiento

Para la realización de este trabajo se utilizó la microalga *Parachlorella kessleri* (LAUN 002) cepa suministrada por el Laboratorio de Cultivo de Algas del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia.

3.1.1 Aislamiento y mantenimiento de la cepa

En la Figura 3-1 se esquematiza el manejo de la cepa desde el momento de su recepción, hasta su aislamiento y a continuación se da una explicación del proceso.

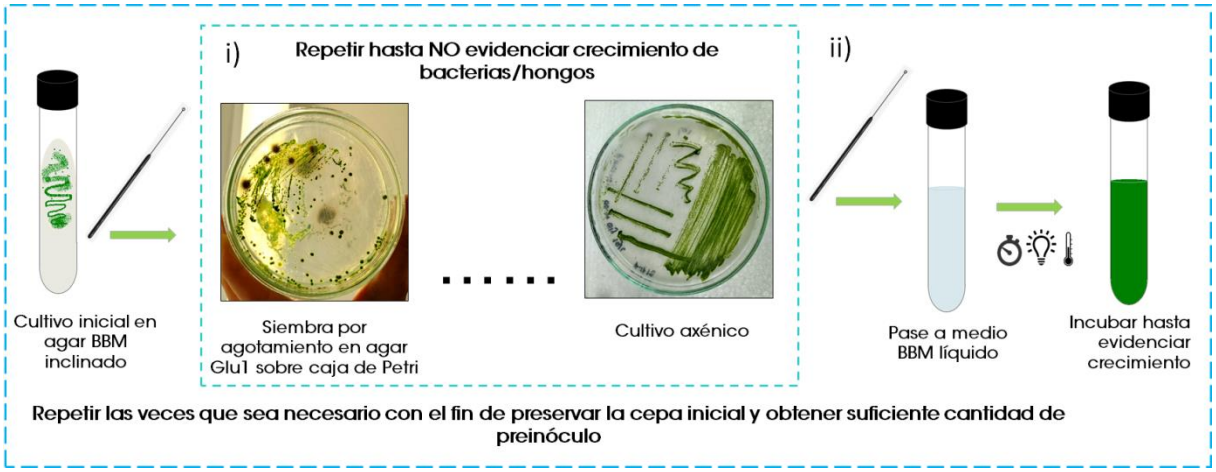

Figura 3-1: Aislamiento y mantenimiento de la cepa *P. kessleri*

Con el fin de asegurar que durante todo el experimento se utilizara un ejemplar axénico, la cepa suministrada se resembró varias veces por agotamiento en cajas de Petri. Esto se realizó usando agar medio basal Bold (BBM) estéril preparado según los reactivos y cantidades presentados en el Anexo A y adicionando 1 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa. En adelante, este medio de cultivo será designado como Glu1. Las cajas fueron incubadas a una temperatura de 25 ± 2 °C y una irradiancia de 36 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (12:12 L: O) hasta observar el crecimiento de colonias verdes características de *P. kessleri* (aproximadamente 7 días). Esas condiciones de irradiancia, temperatura y fotoperiodo se mantuvieron constantes durante todo el experimento.

i) Una vez se evidenció el crecimiento de *P. kessleri*, en condiciones estériles, se tomaron colonias aisladas y se transfirieron a nuevas cajas con medio Glu1. Este procedimiento fue repetido cuantas veces fue necesario hasta que no se observó más crecimiento fúngico o bacteriano ni mediante tinción de Gram ni mediante observación a simple vista.

ii) A partir de estas cajas de Petri con cultivos axénicos, se inocularon 10 mL de medio BBM líquido estéril en tubos con tapa rosca, en las condiciones de temperatura y fotoperiodo descritas anteriormente. La agitación a 100 rpm se realizó en una incubadora Heidolph PROMAX 1020 a la cual se le adaptaron luces LED para suministrar las condiciones de irradiancia antes descritas. Esto se evidenció hasta que se evidenció crecimiento caracterizado por un típico cambio de color del medio de incoloro a verde oscuro, y un aumento en la turbidez del mismo.

3.2 Adaptación dela cepa al cultivo con fuentes de carbono orgánicas

3.2.1 Preparación del preinóculo

La Figura 3-2 ilustra el proceso de preparación del preinóculo de los experimentos que se hizo con el fin de adaptar la microalga al consumo de glucosa y glicerol.

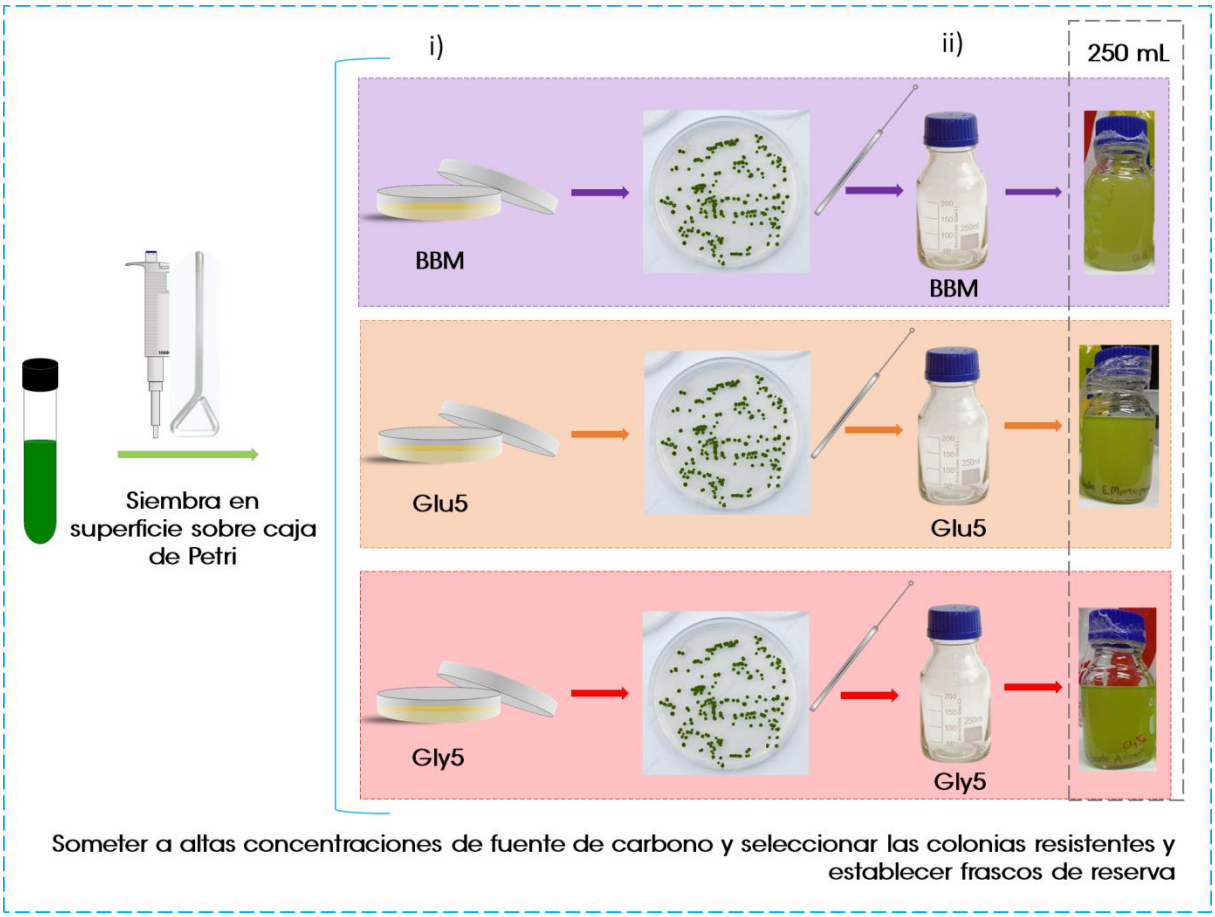

Figura 3-2: Preparación del preinóculo.

La Figura 3-2 se explica de la siguiente manera:

i) A partir de los tubos obtenidos en la sección 3.1.1 se inocularon por siembra superficial cajas de Petri que contenían los siguientes medios de cultivo: agar BBM suplementado con 5 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa, agar BBM suplementado con 5 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol (medios que en adelante serán designados como Glu5 y Gly5 respectivamente) y agar BBM. Las cajas de Petri fueron incubadas hasta evidenciar el crecimiento en su superficie caracterizado por la formación de colonias color verde (aproximadamente 15 días).

Las colonias que crecieron en estas cajas fueron transferidas en su totalidad con asa microbiológica a botellas tipo SCHOTT de 250 mL que contenían 200 mL de medio líquido Glu5, Gly5 o BBM según el caso. Las botellas se mantuvieron cerradas en la incubadora

con agitación de 100 rpm, temperatura, irradiancia y fotoperiodo hasta evidenciar el crecimiento del microorganismo. Este se caracteriza por el cambio de color del medio de incoloro a verde oscuro y el incremento de la turbidez del mismo. Finalmente se almacenaron a 4°C.

ii) Estos frascos constituyeron la reserva del experimento y se mantuvieron a lo largo de todo el proyecto, siendo renovados cada dos meses. Este proceso se realizó mediante la adición de medio fresco, y monitoreando al mismo tiempo la ausencia de microorganismos contaminantes mediante siembra en superficie en cajas con agar Glu1.

3.2.2 Escalado del preinóculo

El escalado del cultivo se hizo en varias etapas según se observa en la Figura 3-3, guardando una proporción de 20% de inóculo y 80% de medio fresco estéril como se describe a continuación.

i) A partir de los frascos de reserva se transfirieron 50 mL del cultivo a botellas que contenían 200 mL de medio BBM líquido, 200 mL de medio BBM líquido suplementado con 1 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa, y 200 mL de medio BBM líquido suplementado con 1 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol según su procedencia (medios que en adelante serán designados como Glu1 y Gly1 respectivamente). A partir de este momento se diferenciaron los cultivos según su finalidad en el experimento así como se esquematiza en la Figura 3-4:

a. Fotoheterótrofos; expuestos a irradiancia, fotoperiodo, fuente de carbono orgánica y agitación por aireación **con eliminación** del CO_2 atmosférico.
b. Mixotróficos: expuestos a iluminación, fotoperiodo, fuente de carbono orgánica y agitación por aireación **sin retiro** del CO_2 atmosférico.
c. Heterótrofos; en oscuridad, suplementados con fuente de carbono orgánica y agitación por aireación **con eliminación** del CO_2 atmosférico.
d. Fotoautótrofos o autótrofos; expuestos a iluminación, fotoperiodo y agitación por aireación sin retiro del CO_2 atmosférico, sin ninguna adición de fuente de carbono orgánica. Estos

últimos constituían el control del experimento y de ellos se hicieron cuantas repeticiones fueron necesarias.

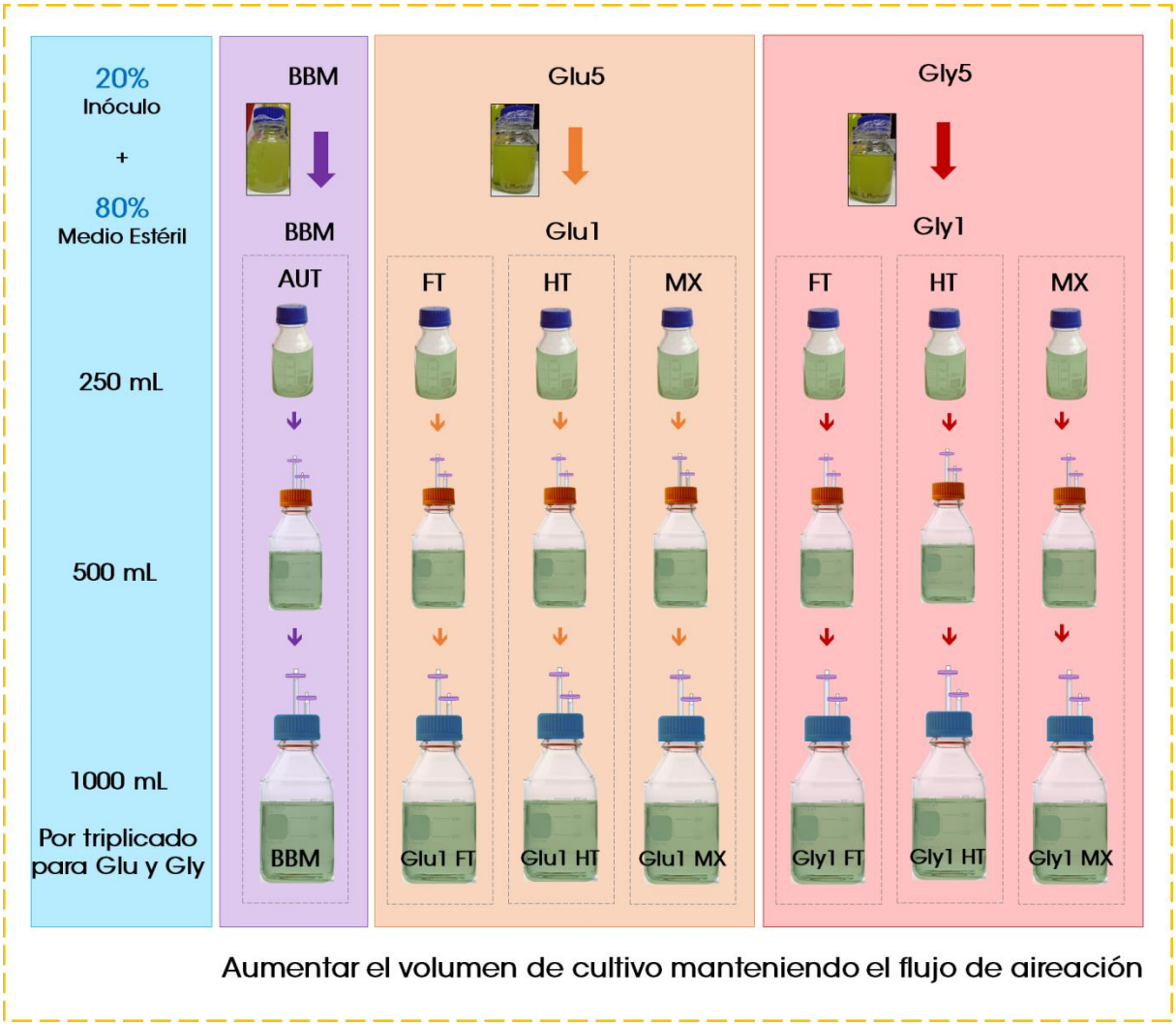

Figura 3-3: Escalado.

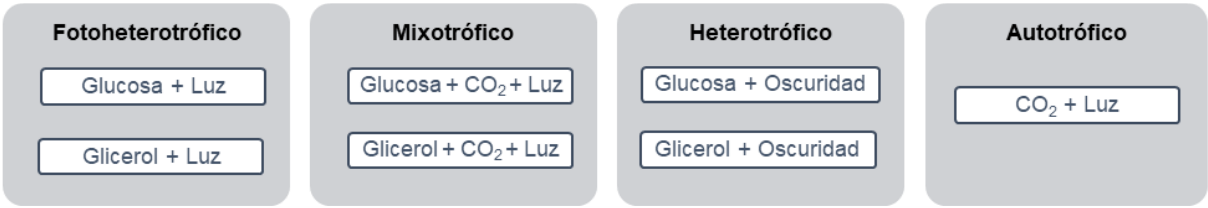

Figura 3-4: Esquema del experimento según las fuentes de carbono y las condiciones de cultivo.

A todos los cultivos les fue suministrado aire atmosférico a un flujo aproximado de 0,7 vvm, filtrado a través de filtros hidrofóbicos con tamaño de poro de 0,22 µm. Para los cultivos autotróficos y mixotróficos, la cantidad de CO_2 atmosférico fue medida con un equipo Sparlink PS 2110 - marca PASCO, encontrando que la concentración promedio fue de 345 ppm. Para el caso de los cultivos fotoheterotróficos y heterotróficos el CO_2 del aire se eliminó por burbujeo a través de una solución 2 M de NaOH antes de ingresar al cultivo. Igualmente se usó una trampa de agua para evitar que gotas de la solución de NaOH fueran arrastradas al cultivo. La solución fue reemplazada cada semana para evitar la saturación con bicarbonato de sodio.

El crecimiento de los cultivos fue monitoreado cada 24 horas mediante la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Cytation 3 (BioTek®) a 680 nm hasta que alcanzaron la fase estacionaria.

ii) Cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, se transfirieron 100 mL a nuevas botellas tipo SCHOTT que contenían 400 mL de medios frescos. Se mantuvieron los criterios de aireación y de condiciones de la Figura 3-4. Se evaluó la absorbancia del cultivo cada 24 horas y cuando alcanzaron la fase exponencial se procedió a inocular botellas que de 1 L.

3.3 Establecimiento del experimento

A partir de las botellas de 500 mL de la sección ii) del numeral 3.2.2 se inocularon botellas tipo SCHOTT de capacidad 1 L, que contenían medios estériles BBM, Glu1 y Gly1 de manera que contuvieran una concentración de células inicial de aproximadamente $1 \cdot 10^6$ células·mL^{-1} (Figura 3-5).

Los cultivos fueron monitoreados hasta alcanzar la fase estacionaria tomando una alícuota aproximada de 5 mL cada 24 horas gracias al dispositivo descrito en el numeral 3.3.1. A

partir de esta alícuota se determinó el número de células por mililitro de cultivo mediante conteo directo, empleando una cámara de Neubauer (Anexo B), un microscopio con cámara incorporada (OMAX A35140U), la metodología estandarizada por el grupo de investigación y el software Image J. Se determinó también el pH usando un equipo HANNA HI2020-01 y el consumo de la fuente de carbono de acuerdo a la metodología descrita en numeral 3.3.4. También fue monitoreado el peso seco al inicio y al final del experimento con el fin de determinar los rendimientos del cultivo (numeral 3.3.3).

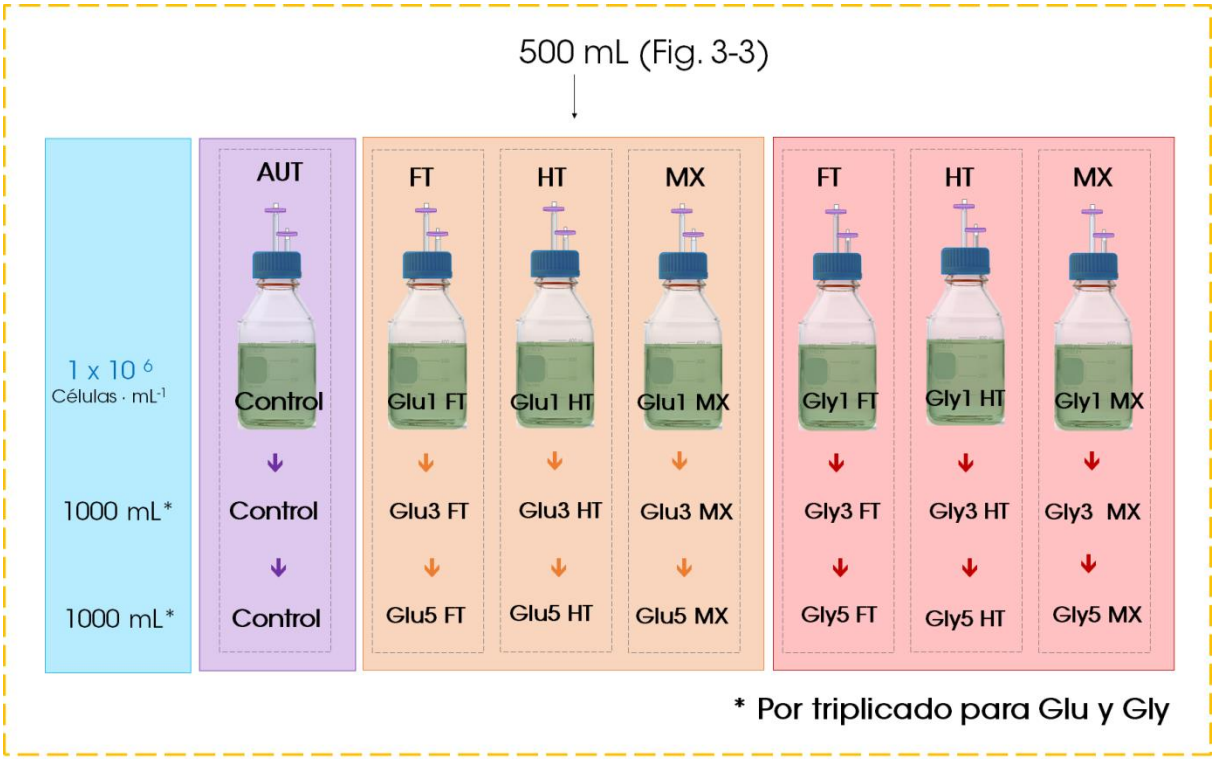

Figura 3-5: Establecimiento del experimento.

Cuando la diferencia en la concentración celular entre tres medidas consecutivas fue menor que 5% se define que el cultivo alcanza la fase estacionaria.

Cuando los tratamientos de 1 $g \cdot L^{-1}$ alcanzaban la fase estacionaria, a partir de cada botella se inocularon otras botellas de manera pero en esta ocasión, se incrementó la concentración de la fuente de carbono a 3 $g \cdot L^{-1}$, como cultivos de control se inocularon con medio BBM como se esquematiza en la Figura 3-5 guardando también que la concentración inicial de

células fuera $1 \cdot 10^6$ células·mL^{-1}. Para estos tratamientos de 3 $g \cdot L^{-1}$, se monitorearon también los parámetros antes mencionados y al alcanzar la fase estacionaria se inocularon a partir de ellos otras botellas con concentraciones de glucosa o glicerol de 5 $g \cdot L^{-1}$ y los controles que fueron monitoreadas de igual manera.

Con el fin de hacer una fácil identificación de las unidades experimentales, en cuanto al tipo de fuente de carbono, concentración y modo de cultivo utilizado, la nomenclatura establecida en la Tabla 3-1 se utilizará en adelante en el presente documento utilizando las abreviaturas correspondientes. La Figura 3-4 y la Tabla 3-1 presentan el diseño experimental realizado para evaluar el crecimiento y la composición bioquímica como respuesta al efecto de varios factores: cuatro tipos de régimen de crecimiento (fotohetero, mixo, hetero y autotrófico) que debido a su naturaleza cualitativa se consideraron estos como variables discretas y dos diferentes fuentes de carbono (glucosa/glicerol) a concentraciones de 1, 3 y 5 $g \cdot L^{-1}$. Cada una de las casillas de la Tabla 3-1 corresponde a un tratamiento, cada uno de los cuales tenía tres réplicas.

	$g \cdot L^{-1}$	FT	HT	MX
Glucosa	1	Glu1 FT	Glu1 HT	Glu1 MX
	3	Glu3 FT	Glu3 HT	Glu3 MX
	5	Glu5 FT	Glu5 HT	Glu5 MX
Control	0	**AUT**		

	$g \cdot L^{-1}$	FT	HT	MX
Glicerol	1	Gly1 FT	Gly1 HT	Gly1 MX
	3	Gly3 FT	Gly3 HT	Gly3 MX
	5	Gly5 FT	Gly5 HT	Gly5 MX
Control	0	**AUT**		

Tabla 3-1: Planteamiento del diseño experimental. Las unidades experimentales identificadas con Glu corresponden a medios de cultivo BBM suplementados con glucosa y aquellos designados con Gly son suplementados con Glicerol. Los números 1, 3 y 5 indican la concentración de la fuente de carbono en $g \cdot L^{-1}$. FT: régimen fotoheterotrófico, HT: régimen heterotrófico, MX: régimen mixotrófico. Las letras *a*: corresponden a cultivos fotoheterotróficos; *b*: corresponde a cultivos heterotróficos y *c*: corresponde a cultivos mixotróficos. Los cultivos correspondientes a la modalidad autotrófica en el esquema se asocian como cultivos mixotróficos sin fuente de carbono orgánica. Los controles del experimento correspondían a cultivos sin carbono orgánico (0 $g \cdot L^{-1}$).

En resumen, cuando cada uno de los tratamientos alcanzaba la fase estacionaria, una parte de la población celular se utilizaba para inocular el tratamiento posterior con mayor concentración de carbono orgánico. El cultivo líquido sobrante de cada uno de los tratamientos se recolectó en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugó usando una centrífuga Rotofix 32 (Hettich) a 4000 rpm (2469×*g*) durante 10 minutos usando un rotor de 8 tubos tipo *Swing-out* a 45° (Cat. No. 1617). El precipitado se lavó y se centrifugó nuevamente; el sobrenadante fue descartado y el precipitado que contenía las células de microalgas se colectó y se congeló a -20 °C hasta su posterior proceso. Posteriormente se liofilizó la biomasa usando un equipo Labconco FreeZone 4.5 operado a temperatura de -140 ºC y presión de 1,18 mBar durante 48 horas. La biomasa liofilizada sobrante se almacenó a temperatura ambiente hasta su procesamiento para determinación de composición bioquímica.

3.3.1 Toma de muestras del cultivo

Para tomar muestras de los cultivos, cada botella SCHOTT cuenta con un sistema de conexiones en la tapa para tomar muestras de forma estéril (Figura 3-6). El sistema cuenta con una válvula anti-retorno que permite extraer líquido del sistema sin que parte de él pueda devolverse o pueda ingresar aire por el mismo conducto. El líquido que queda en el conducto de extracción es empujado nuevamente hacia el bioreactores mediante aire filtrado que se inyecta por otro conducto.

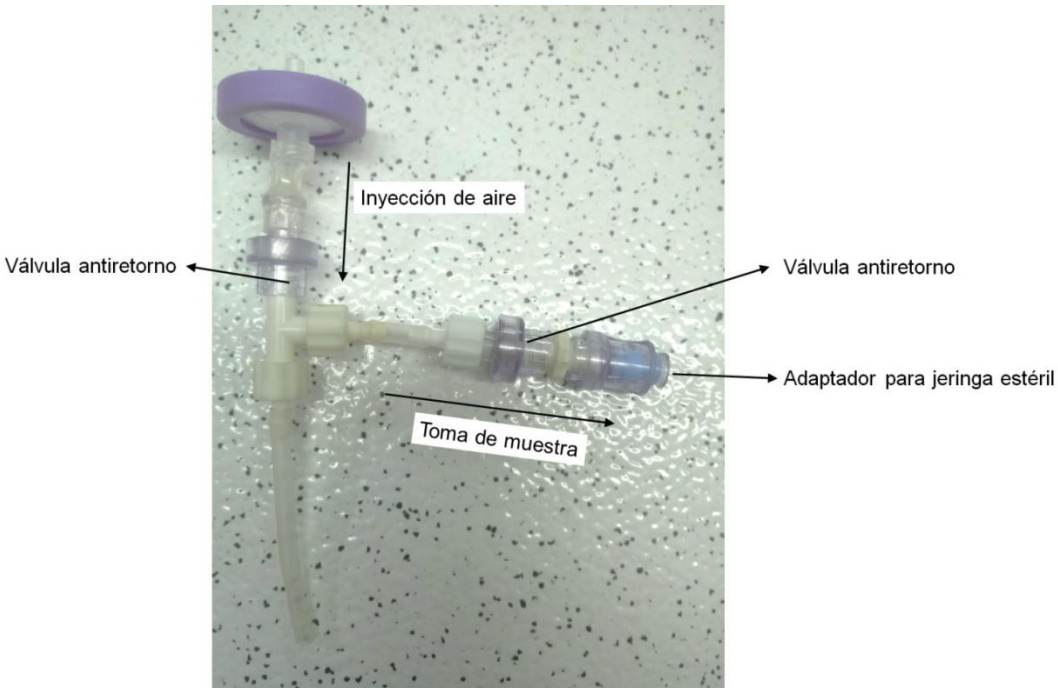

Figura 3-6: Sistema para tomar muestras de forma estéril.

3.3.2 Control de la contaminación

Debido a que los cultivos son susceptibles a una fácil contaminación debida a la presencia de fuente de carbono orgánica, el control periódico de los mismos ayudó a descartar a tiempo aquellos en los que fue posible evidenciar contaminación a simple vista y mediante tinción de Gram.

Para todos los preinóculos y tratamientos se realizaron pases a agar BBM suplementado con glucosa y se realizaron tinciones de Gram hacia el segundo día de cultivo. Si en algún momento se encontraba contaminación en un tratamiento, era descartado y debía ser renovado a partir de un preinóculo estéril o a partir de los preinóculos de reserva.

La preparación del material juega un papel clave, estrategias como desinfectar el material de vidrio toda la noche en solución de hipoclorito, esterilizar el material antes y después de su uso o esterilizar las soluciones de preparación de los medios pueden ayudar a reducir la

contaminación. Durante la etapa de cultivo y crecimiento de la microalga se debe verificar continuamente el estado de los filtros hidrofóbicos que permiten el paso de aire hacia el cultivo y filtran las impurezas. El filtro debe ser renovado con el inicio de cada tratamiento o cuando se observe que el filtro cambia de color, no debe presentar humedad para garantizar su correcto funcionamiento.

3.3.3 Rendimiento de peso seco

El incremento en el peso de la biomasa por cada litro de cultivo en cada unidad experimental, se determinó por gravimetría. Del primer y último día del cultivo se tomó una alícuota de 5 mL y se filtró en un sistema de vacío a través de una membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,45 µm pre-secada y pre-pesada. El filtrado retenido por la membrana fue secado a 80 °C durante 24 horas; cumplido el tiempo, fue retirado del horno, se dejó enfriar en un desecador y se pesó. El rendimiento en peso seco fue determinado como la diferencia de pesos entre la membrana seca que contiene la muestra y de la membrana seca vacía. El incremento de peso fue reportado en unidades $g \cdot L^{-1}$. La productividad de biomasa fue calculada dividiendo el peso seco entre los días del cultivo $g \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$.

3.3.4 Consumo de la fuente de carbono

El consumo de la fuente de carbono orgánica fue monitoreado diariamente mediante la toma de una alícuota del cultivo para lo cual se separó la biomasa del sobrenadante por centrifugación a 4000 rpm (2469×*g*) durante 10 minutos. Para este objetivo se desarrollaron y estandarizaron los protocolos descritos en los anexos C y D.

3.4 Determinación de la composición bioquímica

Para determinar el contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos, cenizas y humedad, la biomasa liofilizada se maceró y homogeneizó. Se pesaron 50 miligramos de cada tratamiento y se re-suspendieron en 50 mL de la solución buffer correspondiente. Para lípidos, proteínas y carbohidratos, se desarrolló el mismo procedimiento de disrupción, variando únicamente la solución en la cual las microalgas fueron resuspendidas:

metanol:cloroformo, buffer *Phosphate Bovine Serum* (PBS) y agua destilada respectivamente. El recipiente que contenía la muestra resuspendida fue cargado en un cubo con hielo para evitar sobrecalentamiento y evaporación del solvente. Se hizo disrupción celular según la metodología estandarizada por el grupo de investigación, en la cual se utilizó ultrasonido proporcionado por un sonicador Branson Sonifier 450 Digital y cuerno de ½" disponible en el Laboratorio de Ingeniería Química, cuya frecuencia de sonicación es 20 kHz, la amplitud de sonicación fue configurada al 70% durante un tiempo de 60 minutos a intervalos intermitentes intercalando pulsos de encendido de 59 segundos y de apagados de 20 segundos. Se tomó una muestra de aproximadamente 2 mL antes y después de la disrupción y se conservaron en hielo hasta el momento del análisis de composición bioquímica, esas muestras permitieron verificar la efectividad de la disrupción celular.

Las muestras extraídas del rompimiento fueron centrifugadas durante 5 minutos a 2400 x g en una microcentrífuga Z-233 M-2 (Hermle®). Con ayuda de una micropipeta, los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos debidamente identificados con el fin de separar los restos celulares.

Las alícuotas tomadas del proceso de disrupción fueron centrifugadas y los sobrenadantes extraídos para separarlos de los residuos celulares. Los sobrenadantes fueron sometidos a cuantificación de proteínas, lípidos o carbohidratos. Para cuantificar la proteína algal se siguió la metodología de Bradford [220]; la cuantificación el contenido de carbohidratos de las microalgas se hizo por método fenol–ácido sulfúrico siguiendo la metodología propuesta por DuBois [221] y la cuantificación de lípidos se realizó mediante el método sulfo-fosfo-vainillina (ver Anexos E, F y G) [220], [222], [223].

Para calcular el porcentaje de proteínas, lípidos y carbohidratos en la biomasa fue necesario realizar metodologías que permitieran hallar el porcentaje de cenizas y humedad de cada uno de los tratamientos.

3.4.1 Determinación del contenido de humedad de biomasa de microalgas

En una balanza de humedad (AMB 50, Adam Equipment) se pesaron aproximadamente 0,2 g de microalga liofilizada y se registró el peso exacto. Se programó la temperatura de la balanza a 105°C y calentar la muestra hasta peso constante. Se registró el peso final de la muestra.

Para el cálculo del contenido de humedad se siguió la siguiente fórmula:

$$\%\, humedad = \frac{W_1 - W_2}{W_1} x\, 100 \qquad \text{Ec. 3-1}$$

Donde:
W_2: peso de la muestra de microalga después de calentar a 105°C hasta peso constante
W_1: peso de la muestra de microalga antes de calentar a 105°C

Este procedimiento se realizó por duplicado para cada uno de los tratamientos y se calculó el promedio.

3.4.2 Determinación del contenido de cenizas de biomasa de microalgas

Para la determinación de cenizas se tomó una cápsula de porcelana vacía y se llevó a calentamiento gradual en una mufla marca Terrígeno a una velocidad de 5 °C·min^{-1} hasta alcanzar los 575 °C, esa temperatura se mantuvo durante 4 horas. Una vez terminado el tiempo de calentamiento, se dejó enfriar aproximadamente 20 horas, se retiró de la mufla con ayuda de unas pinzas y se llevó aun desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, se pesó y se registró el peso de la cápsula (W_c).

El siguiente paso fue agregar a la cápsula aproximadamente 0,5 g de microalga liofilizada y registrar el peso exacto (cápsula + microalga) (W_m). El sistema fue calentado a 575°C por 4 horas, a una velocidad de calentamiento de 5 °C·min^{-1}; terminado el tiempo de

calentamiento y enfriamiento (aproximadamente 20 horas), se retiró la cápsula de la mufla con ayuda de las pinzas se llevó a un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, se pesó y se registró el peso exacto (W_f).

Para el cálculo del contenido de cenizas se siguió la siguiente formula:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{W_2}{W_1 * (100 - H)} * 100 \qquad \text{Ec. 3-2.}$$

Donde:

$$W_1 = W_m - W_c$$
$$W_2 = W_f - W_c$$

W_1: peso de la muestra de microalga antes de calentar a 575°C por 4 horas, en gramos.
W_2: peso de la muestra de microalga a de calentar a 575°C por 4 horas, en gramos.
H: porcentaje de humedad de la microalga en gramos de agua/gramos de biomasa.

Para este procedimiento no se realizaron repeticiones debido a la alta cantidad de biomasa requerida.

3.5 Tratamiento estadístico de datos

Las respuestas obtenidas para cada réplica para crecimiento celular, consumo de fuente de carbono y pH fueron analizados mediante un diseño de bloques con parcelas divididas en el tiempo, debido a que en algunos tratamientos la aleatorización no pudo ser completa.

En cuanto a composición bioquímica, se realizó el análisis estadístico para cada una de las respuestas de cada réplica, basado en un diseño de bloques completamente aleatorizado.

Las barras de error en los gráficos corresponden a la desviación estándar. Se realizó análisis de varianza (ANAVA) con un nivel de significancia del 5% a las respuestas

obtenidas. Se establecieron las diferencias estadísticas entre tratamientos mediante la prueba de Tukey.

Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico *Statistix 9*.

4. Resultados y discusión

Debido a la novedad del género *Parachlorella*, muchas de las características metabólicas y bioquímicas del género aún se encuentran en estudio o fueron confundidas durante mucho tiempo con aquellas exhibidas por *C. vulgaris*. Por lo tanto, los resultados de la presente investigación se compararon con otras investigaciones hechas con *C. vulgaris* y otras especies del género *Chlorella*, asumiendo que debido a su parentesco genético el metabolismo debería ser muy similar entre dichos géneros. La Figura 4-1 corresponde a una microfotografía tomada en el microscopio electrónico de barrido (SEM) de la microalga utilizada.

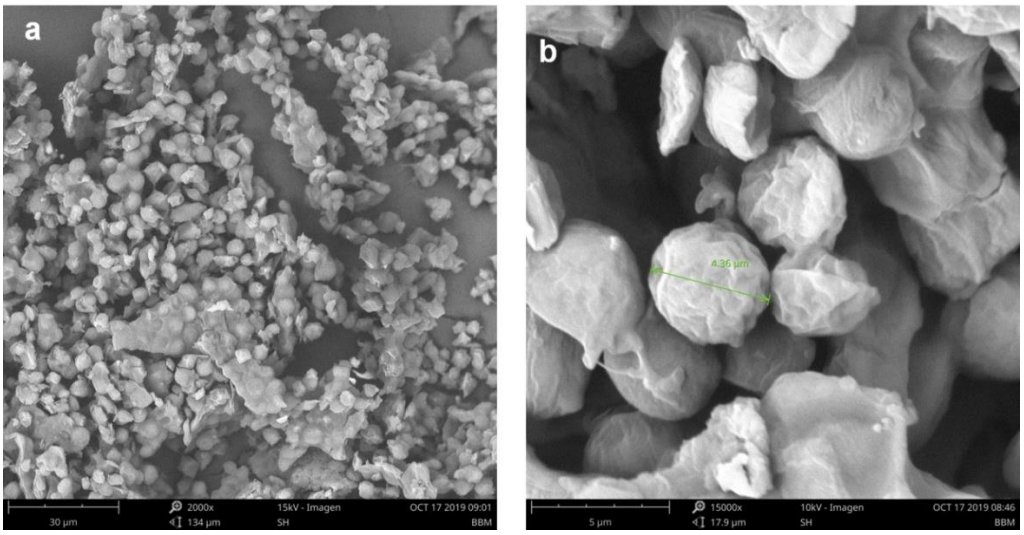

Figura 4-1: Fotografía en SEM de *Parachlorella kessleri.* a. Células de *P. kessleri,* magnificación: 2000X, 15kV. b. Magnificación: 15000X, 10kV, 5 µm. La figura b indica el diámetro de una célula desarrollada en condiciones autotróficas correspondiente a 4,36 µm. Microfotografía tomada por la autora.

4.1 Evaluación del efecto de la glucosa y diferentes regímenes de cultivo sobre el crecimiento de *Parachlorella kessleri*

El desempeño de *P. kessleri* en las fuentes de carbono y las diferentes modalidades, fue analizado mediante las respuestas de número de células, consumo de fuente de carbono, velocidad específica de crecimiento.

4.1.1 Crecimiento celular de *P. kessleri* en glucosa

El crecimiento celular se determinó mediante conteo celular en cámara de Neubauer cada 24 horas hasta observar que el cultivo alcanzó la fase estacionaria.

Los datos fueron analizados estadísticamente tomando como bloques los regímenes de crecimiento y como tratamientos las concentraciones de glucosa. El análisis de varianza de la Tabla 4-1 permitió determinar que las varianzas de los tratamientos no son iguales.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Tiempo	0,3281	5	0,0657		
Concentración	0,3029	3	0,1009	19,71	0,0000
Error Tiempo*Concent	0,0768	15	0,0051		
Régimen	0,0082	2	0,0041	11,56	0,0001
Concentración*Régimen	0,0279	6	0,0046	13,14	0,0000
ErrorTiempo*Conc*Régim	0,0142	40	0,0003		
Total	0,7589	71			

Tabla 4-1: ANAVA del efecto del régimen de cultivo y la concentración de glucosa sobre el crecimiento celular.

El crecimiento celular para los tratamientos en glucosa en regímenes de cultivo fotoheterotrófico, heterotrófico y mixotrófico se exhibe en la Figura 4-2.

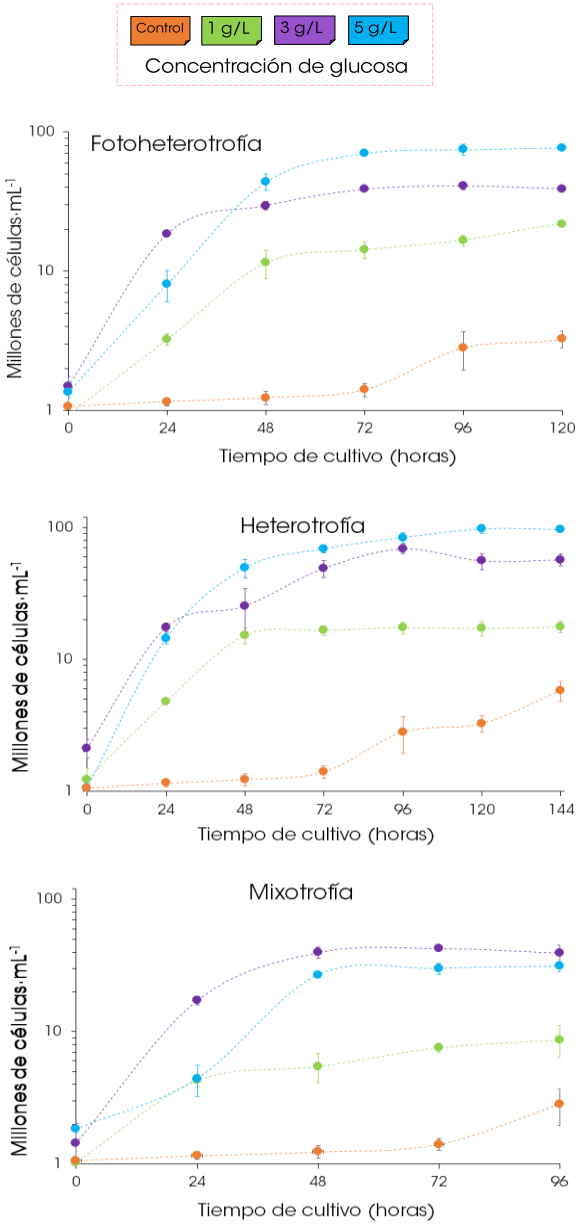

Figura 4-2: Curvas decrecimiento de la microalga *P. kessleri* en medio BBM suplementado con glucosa en diferentes concentraciones bajo tres modalidades de cultivo. Para cada tratamiento en glucosa, cada punto representa el promedio de tres medidas. Las barras sobre los puntos representan la desviación estándar, en aquellos puntos donde no se ve la barra, la desviación estándar es menor al tamaño del punto en la gráfica.

Para identificar si existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en cuanto al crecimiento celular, se tomó el número máximo de células alcanzado en cada

uno de ellos y este valor se dividió entre el número inicial de células. De esta manera se calculó el incremento celular. Los incrementos celulares se compararon entre sí mediante la prueba de Tukey y los resultados se exponen en la Figura 4-3.

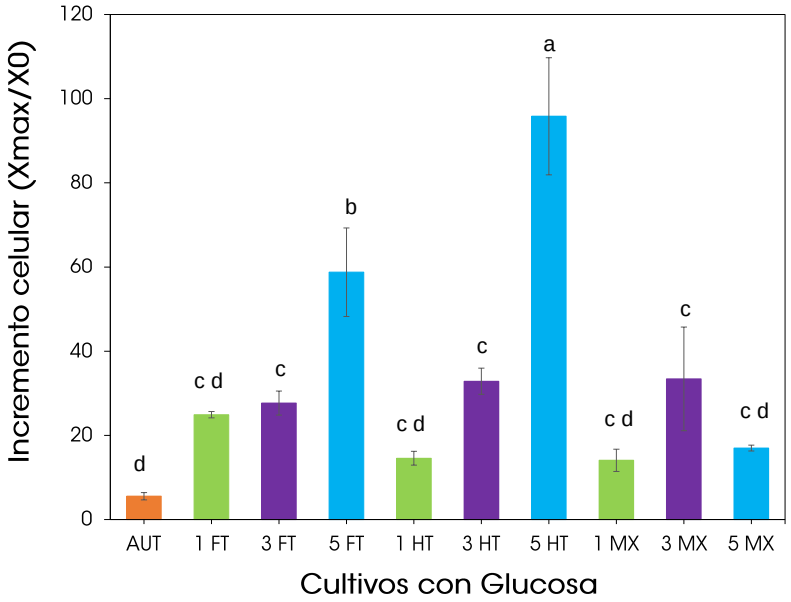

Figura 4-3: Incremento máximo celular para los tratamientos suplementados con glucosa. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.

En los cultivos control, el incremento celular fue de 5,45 veces en 5 días; este valor es muy variado entre la bibliografía consultada. Para la misma especie se encontraron incrementos de 1.75-3.5 veces en 4 días [199], 3,36 veces en 7 días [164], 11 veces en 30 días [152], 10 veces en 20 días [143]. En otras investigaciones realizadas por el grupo de investigación reportan para este mismo tratamiento en *Chlorella vulgaris* un aumento aproximado de la densidad celular de 37 veces en 6 días [3] y 105 veces en 8 días [46]. Otros trabajos con *Chlorella vulgaris* reportan incrementos de 3 veces en 4 días [224] o 50 veces en 14 días [225]. En cada uno de esos estudios se reportan condiciones diferentes de crecimiento en las cuales varían condiciones como la irradiancia, el fotoperiodo, la temperatura o el flujo de aireación, por lo tanto podrían atribuirse a estos factores las diferencias en los números celulares.

Los tratamientos fotoheterotróficos incrementaron su número de células al incrementar la concentración de glucosa en el medio. Obteniendo de esta manera incrementos celulares de 24, 27 y 58 veces en 48, 24 y 72 horas, para los tratamientos Glu1, Glu3 y Glu5 FT, respectivamente. Bajo esta modalidad de cultivo son muy pocos los antecedentes con los cuales pueden compararse los resultados obtenidos debido a que el suministro de fuente de carbono orgánica y de irradiancia incrementa los costos de producción. Estos resultados para fotoheterotrofía fueron mayores que los obtenidos por Patel *et. al* (2019) [7] quienes utilizaron este régimen de cultivo para el crecimiento de *Chlorella protothecoides* obteniendo incrementos celulares de apenas 6 veces en un medio Glu5 FT y con una irradiancia 4,16 veces más alta (150 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$).

Los cultivos heterotróficos se comportaron de manera similar, obteniendo incrementos celulares de 14, 32 y 95 veces en 48, 96 y 120 horas, para los tratamientos Glu1, Glu3 y Glu5 HT, respectivamente. Siendo éste último la respuesta más alta en cuanto a incremento celular para todos los tratamientos suplementados con glucosa, fue 17 veces más alto que el resultado obtenido para el cultivo control. Los resultados obtenidos fueron superiores a los obtenidos por Deng *et. al* (2019) quienes obtuvieron bajo esta modalidad un incremento celular de 6.66 veces en 48 horas en un medio suplementado con 2 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa [164]. También fueron superiores al resultado obtenido por Patel *et. al* (2019) [7], quienes obtuvieron bajo un tratamiento Glu5 HT un incremento celular máximo de 11 veces. Esta respuesta puede hacer de esta modalidad de cultivo muy prometedora si se desean altos incrementos celulares en lapsos cortos de tiempo, porque se eliminan los requerimientos de luz, implicando por consiguiente un ahorro energético y de costos de diseño del bioreactor.

Según la Figura 4-3, los tratamientos Glu5 FT y Glu5 HT obtuvieron los mayores incrementos celulares. Los demás tratamientos no obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para el incremento celular y fueron ubicados en un mismo grupo, lo cual indica que en fotoheterotrofía y heterotrofia agregar 1 o 3 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa no marca diferencia para esta respuesta; en este mismo grupo también se ubicaron las respuestas de los tratamientos mixotróficos.

La modalidad mixotrófica, tampoco promovió el crecimiento celular y se obtuvieron incrementos celulares de 15 y 22 veces en 96, y 48 horas para los tratamientos Glu1 y Glu3 MX, respectivamente. El tratamiento Glu5 MX obtuvo una respuesta menor, de sólo 18 veces en 2 días. Bajo mixotrofía se espera una complementariedad entre los mecanismos autotrófico y heterotrófico, pero un menor crecimiento obtenido en este estudio, puede explicarse según Wan *et al.* (2011) porque mediante la realización de una PCR en tiempo real, pudieron observar una disminución en la expresión del gen *rbcL* (ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad grande), que interviene en la síntesis de RuBisCO (Figura 2-6), la enzima que fija el CO_2 y de esta manera, una menor cantidad de carbono del medio podría estar siendo aprovechada como sustrato para construcción de componentes celulares [226].

En resumen, la modalidad que favorece el incremento celular para la cepa de *Parachlorella kessleri* utilizada en este estudio es la heterotrofía y es posible utilizar cantidades de glucosa de hasta 5 $g \cdot L^{-1}$. A partir de los datos obtenidos en este estudio y de aquellos reportados en la literatura, no se puede concluir que exista una modalidad de cultivo preferida por las diferentes especies de los géneros *Chlorella* y *Parachlorella* para promover el crecimiento celular, de hecho los resultados obtenidos pueden ser muy variables como se aprecia en la Tabla 4-2 donde se compara el peso seco de la biomasa obtenida en estudios similares bajo diferentes modalidades de cultivo.

De acuerdo a la Tabla 4-2, en los resultados obtenidos por Cheirsilp & Torpee (2012) [7] y Lin & Wu (2015) [227], la modalidad mixotrófica obtuvo mayores pesos secos celulares que las modalidades autotrófica y heterotrófica. Por otro lado, Deng *et al*. (2019) [164]; Patel *et al.* (2019) [7] y Heredia-Arroyo *et al*. (2010) [6] no encontraron diferencias significativas en cuanto al peso seco obtenido bajo heterotrofía y mixotrofía para dos especies de microalgas diferentes,. El trabajo de Yeh & Chang (2012) [228] utilizó *Chlorella vulgaris* y encontró los mayores pesos secos en crecimiento autotrófico comparado con las otras tres modalidades de cultivo. Y finalmente, Perez-Garcia *et al*. (2010) [176], quienes realizaron el conteo directo para determinar el incremento celular, encontraron que el crecimiento de *C. vulgaris* en heterotrofía es superior que en mixotrofía, comportamiento similar al de *P. kessleri* reportado en esta investigación.

	Peso seco de biomasa por modalidad de cultivo				
Microalga	**Autotrófico**	**Heterotrófico**	**Mixotrófico**	**Fotoheterotrófico**	**Referencia**
Chlorella sp.	0,6	0,7	1,4		[78]
Chlorella sp. Y8-1	0,22	0,17	0,45		[227]
Parachlorella kessleri	0,49	1,03	1,03		[164]
Chlorella protothecoides	1	4	4,07		[6]
Chlorella protothecoides	0,72	3,33	3,02	1,50	[7]
Chlorella vulgaris	4,8	0,5	1,8	3,5	[228]

Tabla 4-2: Cantidad de biomasa en $g \cdot L^{-1}$ alcanzada por diferentes especies de microalgas bajo cuatro modalidades de cultivo.

El motivo por el cual se obtienen incrementos celulares tan diversos, puede estar en que cada uno de estos estudios utiliza configuraciones diferentes de cultivo. Estas variaciones implican desde la elección de la cepa adecuada, la variación del medio de cultivo, la utilización de diferentes irradiancias, variaciones en flujos de aireación, el enriquecimiento del aire suministrado con CO_2 hasta la evaluación de diferentes fotoperiodos.

4.1.2 Velocidad específica de crecimiento (μ) en glucosa

El análisis de varianza presentado en la Tabla 4-3 permitió determinar el efecto de la modalidad de cultivo y de la dosis de glucosa suministrada sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) de la microalga. Se encontró que la velocidad de crecimiento es indiferente del tratamiento bajo el cual sea expuesta la microalga y que sí varía dependiendo de la concentración de glucosa agregada.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Régimen	0.00012	2	0.00006		
Concentración	0.01229	3	0.00410	19,16	0,0018
Error	0.00128	6	0.00021		
Total	0.01369	11			

Tabla 4-3: ANAVA efecto del régimen de cultivo y la concentración de glucosa sobre la velocidad específica de crecimiento.

La Figura 4-4 muestra las velocidades específicas de crecimiento de los tratamientos en glucosa. Se realizó una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 5% para hallar diferencias significativas entre las velocidades de crecimiento de los tratamientos suplementados con glucosa. Esta prueba estadística ubicó la μ de los tratamientos autotróficos como la más baja en un grupo estadísticamente diferente de los tratamientos suplementados con glucosa.

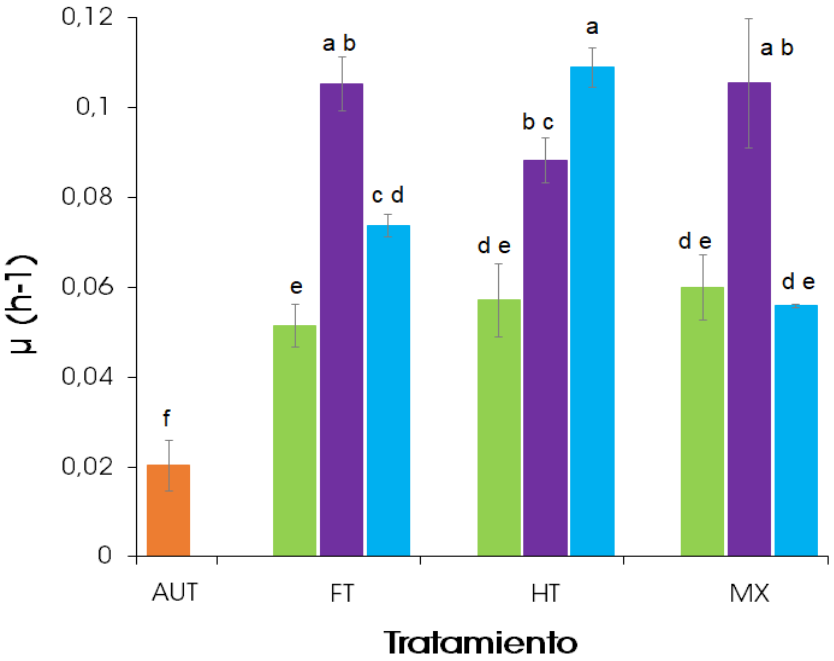

Figura 4-4: Velocidad específica de crecimiento para los tratamientos suplementados con glucosa. n=3. Barra error: 1 Error Estándar de regresión. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.

La prueba de Tukey ubicó las respuestas de las velocidades de crecimiento en 6 grupos diferentes, agrupando bajo la letra **a** aquellos tratamientos con las respuestas más altas para μ, y bajo la letra **f** los tratamientos con las menores respuestas.

Entre los tratamientos con glucosa, el tratamiento Glu5 HT es ubicado en un primer grupo (grupo a) por presentar el mayor valor de μ. En un segundo grupo se ubicaron los tratamientos suplementados con 3 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa (grupo b). El tratamiento Glu5 FT a

pesar de presentar un alto incremento celular (Figura 4-3), no presenta una velocidad acelerada de crecimiento y es ubicado en un mismo grupo con el tratamiento Glu5 MX. Y finalmente, los tratamientos suplementados con 1 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa se ubicaron por tener las medias más bajas en un mismo grupo estadístico (grupo e).

La modalidad autotrófica, presentó una µ promedio de 0,02 h^{-1}. Este valor fue similar a la calculada por Serrano (2012) calculó este valor en 0,03 $h^{-}1$, Ardila (2012) [3] obtuvo un valor de 0,021 h^{-1} para *Chlorella vulgaris*. En otros estudios recientes con *P. kessleri* este valor para cultivos autotróficos fue de 0,017 h^{-1} [5], 0,008 h^{-1} [229], 0.019 h^{-1} [199] y 0,013 h^{-1} [230]. Otras investigaciones en *C. vulgaris* reportan 0,02 h^{-1} [100] y 0,03 h^{-1} [176]. Es decir que para los tratamientos autotróficos, el parámetro µ estuvo dentro de los intervalos descritos en estudios previos.

Las velocidades específicas de crecimiento para los cultivos heterotróficos tienen comportamientos esperados: aumentan cuando se aumenta la glucosa suministrada. De esta manera se obtuvieron valores para µ de 0,06; 0,09 y 0,11 para Glu1 HT, Glu3 HT y Glu5 HT, respectivamente.

Para los tratamientos en luz, esta afirmación se cumple para los tratamientos suplementados con 1 y 3 $g \cdot L^{-1}$. Los tratamientos con 5 $g \cdot L^{-1}$ presentan menor velocidades. De esta manera se tienen valores de µ de 0,05; 0,10 y 0,07 h^{-1} para Glu1 FT, Glu3 FT y Glu5 FT, respectivamente. En mixotrofía se obtuvieron los siguientes valores: 0,06; 0,11 y 0,05 h^{-1} para Glu1 MX, Glu3 MX y Glu5 MX, respectivamente. El comportamiento de la velocidad específica de crecimiento en los cultivos mixotróficos coincide con el observado en el estudio de Deng *et al.* (2019) [5] quienes reportan valores de 0,031; 0,036 y 0,034 h^{-1} en Glu2 MX, Glu4 MX y Glu6 MX.

Analizando estos resultados se tiene que el tratamiento Glu5 HT no solo es el tratamiento que alcanza un mayor número de células al final del cultivo, sino que además es el tratamiento en el cual las células a una mayor velocidad.

Las velocidades específicas de crecimiento de *P. kessleri* obtenidas bajo heterotrofía en este trabajo, fueron mayores que las reportadas en bibliografía disponible. Debido a la escasez de estudios con los cuales pueda hacerse una comparación, en la mayoría de casos esto fue posible sólo comparando con estudios que utilizaron mayores concentraciones de glucosa (6, 15 y 30 $g \cdot L^{-1}$). Sin embargo, incluso de esta manera, los resultados fueron satisfactorios porque las µ obtenidas en este estudio fueron mayores que las reportadas, incluso cuando utilizaron esas cantidades mayores de glucosa, lo cual indica que la cepa en estudio es capaz de crecer tan rápido como otras especies utilizando menores cantidades de glucosa. En la Tabla 4-4 se realiza una comparación entre las tasas máximas obtenidas en cada tratamiento con las reportadas en trabajos similares.

Tasa máxima de crecimiento por modalidad de cultivo(h^{-1})						
Microalga	**AUT**	**Concentración de glucosa ($g \cdot L^{-1}$)**	**FT**	**HT**	**MX**	**Referencia**
Parachlorella kessleri	**0,02**	**3**	**0,10**		**0,036**	**Este estudio**
Parachlorella kessleri		**5**		**0,11**		**Este estudio**
Parachlorella kessleri	0,017	6			0,034	[5]
Chlorella protothecoides	0,005	15		0,04	0,04	[6]
Chlorella vulgaris	0,03	10		0,04	0,02	[176]

Tabla 4-4: Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) máxima alcanzada por diferentes especies de microalgas bajo cuatro modalidades de cultivo y diferentes concentraciones de glucosa.

4.1.3 Consumo de glucosa

La Figura 4-5 expone la cinética de consumo de glucosa para las diferentes modalidades de cultivo.

La variación en la concentración inicial de glucosa puede deberse a que en algunos casos el preinóculo tenía glucosa residual y en otros, la cantidad de preinóculo era lo suficientemente alta para alcanzar a diluir la glucosa del medio receptor.

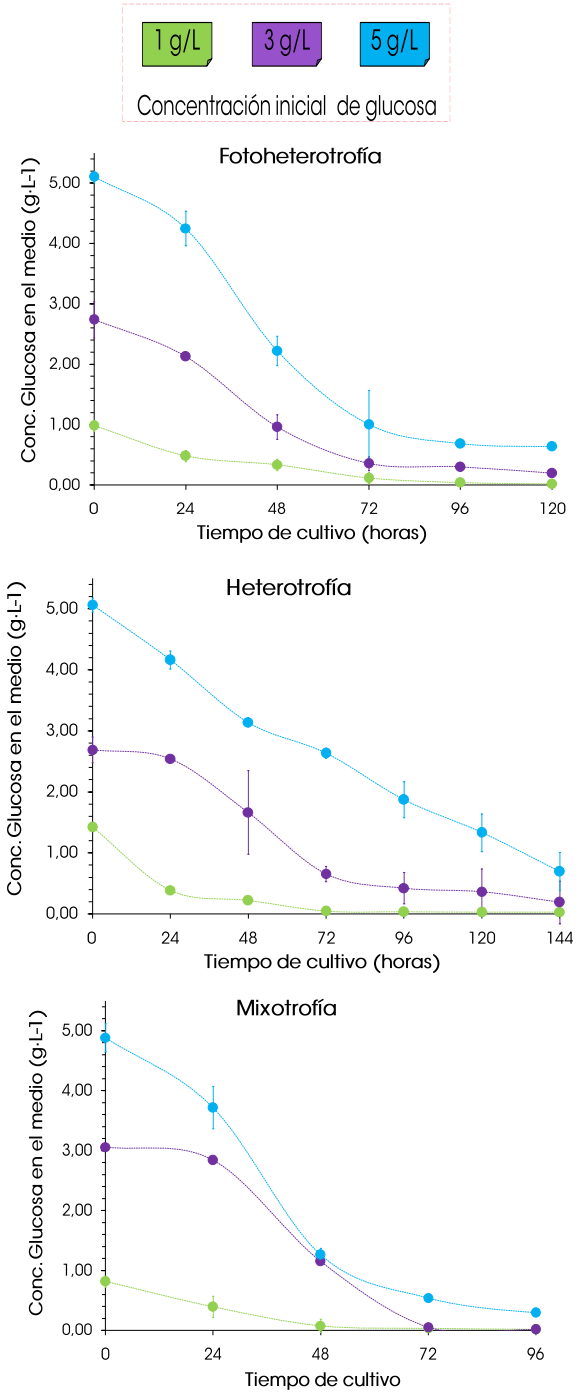

Figura 4-5: Concentración de glucosa en cultivos de *P. kessleri* bajo diferentes regímenes de cultivo. Cada punto representa el promedio de tres medidas. Las barras sobre los puntos representan la desviación estándar, en aquellos puntos donde no se ve, la desviación estándar es menor al tamaño del punto en la gráfica.

En la Figura 4-5, se aprecia que en los tratamientos suplementados con 1 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa, ésta es consumida casi en su totalidad entre el segundo y tercer día de cultivo. Para los tratamientos en 3 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa, después de 5 días aún puede encontrarse un remanente glucosa en el medio de alrededor de 0,1 $g \cdot L^{-1}$ para fotoheterotrofía y heterotrofía; para esta misma dosis, en mixotrofía, en el tercer día de cultivo no se encontró glucosa en el medio. En los cultivos suplementados con 5 $g \cdot L^{-1}$, incluso hasta el sexto día aún se encontró glucosa en el medio.

Es probable que este resultado podría ser el resultado de un agotamiento de los macro y micronutrientes debido a que la disminución del consumo de glucosa coincide con el alcance de la fase estacionaria del crecimiento, en este estudio los macro y micro nutrientes no fueron cuantificados y en un futuro trabajo podrían ser complementados.

El comportamiento de esta cinética es similar a la observado por Deng *et al.* (2019 a, b) y Heredia-Arroyo *et al.* (2011) [5], [10], [164] quienes también determinaron que la glucosa agregada en concentraciones de 2; 4 y 5 $g \cdot L^{-1}$ respectivamente fue consumida casi completamente hacia el segundo día de cultivo. Deng *et al.* (2019) [5] también observó que en concentraciones mayores a 6 $g \cdot L^{-1}$ la cinética de consumo se extiende, encontrando hasta 2 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa residual en el sexto día en el ensayo que contenía 15 $g \cdot L^{-1}$ inicialmente. Lo mismo sucedió cuando Lee & Lee (2001) [231] cultivaron *P. kessleri* en agua residual artificial suplementada con 1,125 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa, en condiciones de iluminación continua y ciclos de luz y oscuridad de 2000 lux, quienes registraron que el 80% de la glucosa fue consumida durante el primer día de cultivo, permaneciendo el restante como remanente en el medio de cultivo.

Debido a que los pesos secos de los tratamientos presentaron una alta variación y los cálculos derivados de estos datos como rendimientos, coeficientes de mantenimiento, velocidad específica de consumo de glucosa y productividad de biomasa presentaron inconsistencias; en este trabajo nos abstuvimos de presentar las cifras correspondientes, por lo tanto, se recomienda complementar la investigación presentada con resultados experimentales en un futuro trabajo.

4.1.4 pH

El monitoreo y control del pH es un factor importante en los cultivos de microalgas porque de él depende la solubilidad, disponibilidad de los nutrientes y de los iones H^+ [164], [232]. El pH fue ajustado al inicio de todos los cultivos para tener un valor inicial entre 6 y 7. Diariamente, hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria, fue tomada una alícuota a partir de la cual se tomaron varios parámetros: conteo celular, concentración de la fuente de carbono y pH. Durante el transcurso de los experimentos, el pH no fue controlado y a partir de los datos obtenidos se construyeron los gráficos presentados en la Figura 4-6.

La Figura 4-6 representa las medidas de pH para los cultivos fotoheterotróficos, mixotróficos y heterotróficos de *P. kessleri* suplementados con 1, 3 y 5 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa. Estos parámetros fueron comparados con el pH del cultivo control. En el ensayo control el pH es mantenido casi cercano a la neutralidad gracias a la adición de sales como K_2HPO_4 o KH_2PO_4 que actúan como soluciones tampón. En este tratamiento se evidencia un ligero incremento del pH desde 6,59 a 7, 31 que puede ser atribuido al proceso de fijación de CO_2, debido a que durante la fotosíntesis el medio libera iones OH^- dentro de las células y para neutralizar su efecto, deben ser ingresados al interior iones H^+ desde el exterior, resultando en un incremento del pH extracelular según se ha reportado por otros autores [164].

La principal característica que presenta el pH en los tratamientos fotoheterotróficos y heterotróficos suplementados con glucosa es que en las primeras horas del cultivo tiende a disminuir; coincidiendo también con el consumo de glucosa que como producto de esta respiración la célula libera ácidos al medio. Entre esos productos estarían los ácidos ácido acético, láctico y fórmico que se han encontrado en otras investigaciones [69], [70]. En algunos casos, después de unas horas el pH aumenta, lo cual sucede porque al ingresar glucosa a través de la membrana celular, ésta es acompañada por iones H^+ lo cual hace que en el espacio extracelular poco a poco se presente un déficit de ellos y que queden solamente iones OH^- los cuales alcalinizan el medio.

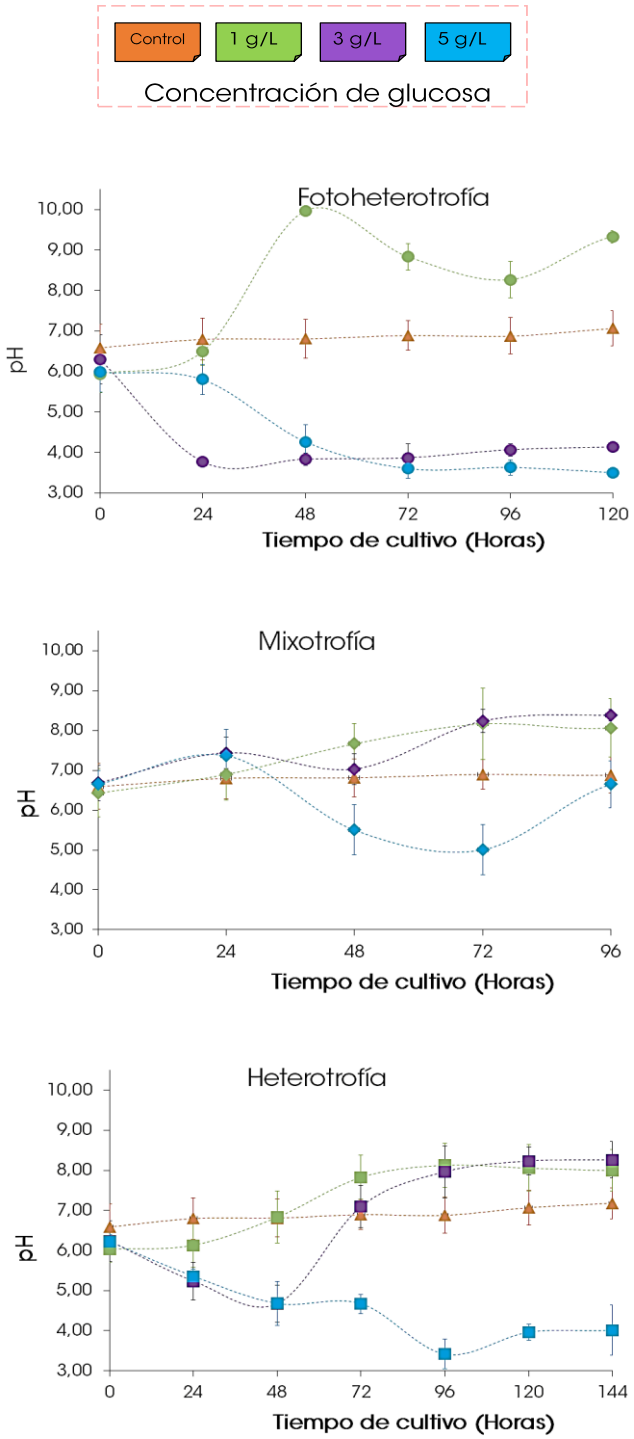

Figura 4-6: Variación del pH para tratamientos suplementados con glucosa. Barra error: 1 Desv. Estándar. Cada punto representa el promedio de tres medidas. Las barras sobre los puntos representan la desviación estándar, en aquellos puntos donde no se ve, la desviación estándar es menor al tamaño del punto en la gráfica.

En los cultivos mixotróficos el pH se comportó de manera diferente, a bajas concentraciones de glucosa, probablemente el metabolismo de la glucosa existente aporte ácidos al medio extracelular, pero ese aporte se ve compensado por dos efectos: por un lado el proceso fotosintético donde al realizar la fijación de carbono dentro de las células se liberan OH^- que deben ser neutralizados por los iones H + que se toman del entorno extracelular y por otro lado la toma de glucosa que también requiere el ingreso de protones a la célula.

Por lo cual, en vez de presentar una caída drástica al inicio del cultivo aportada por los productos ácidos de la respiración de la glucosa, el pH se mantuvo incrementando ligeramente a lo largo del cultivo coincidiendo con la cinética de crecimiento de la Figura 4-2.

Los resultados encontrados difieren de los obtenidos por Yu *et al*. (2017) [233] que propone que el pH óptimo para el desarrollo de *P. kessleri* es de 6 a 10 ya que como se puede observar, en este trabajo el pH en algunos casos fue tan bajo como 3,6 en los primeros días de cultivo sin efectos adversos en el crecimiento.

4.2 Evaluación del efecto del glicerol y diferentes regímenes de cultivo sobre el crecimiento de *Parachlorella kessleri*

4.2.1 Crecimiento celular de *P. kessleri* en glicerol

Los datos en cuanto a crecimiento celular fueron analizados tomando como bloques los regímenes de crecimiento y como tratamientos las concentraciones de glicerol. El análisis de varianza de la Tabla 4-5 permitió determinar que las diferencias entre algunas de las medias son estadísticamente significativas.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Tiempo	0,2755	6	0,0459		
Concentración	0,1077	3	0,0359	13,95	0,0001
Error Tiempo*Conc	0,0463	18	0,0025		
Régimen	0,0044	2	0,0022	5,49	0,0071
Régimen*Conc	0,0114	6	0,0019	4,69	0,0008
Error Tiempo*Régimen*Conc	0,01954	48	0,0004		
Total	0,4651	83			

Tabla 4-5. ANAVA efecto del régimen de cultivo y la concentración de glicerol sobre el incremento celular.

Las curvas de crecimiento celular de *P. kessleri* en glicerol en regímenes de cultivo fotoheterotrófico, heterotrófico y mixotrófico, son mostradas en la Figura 4-7.

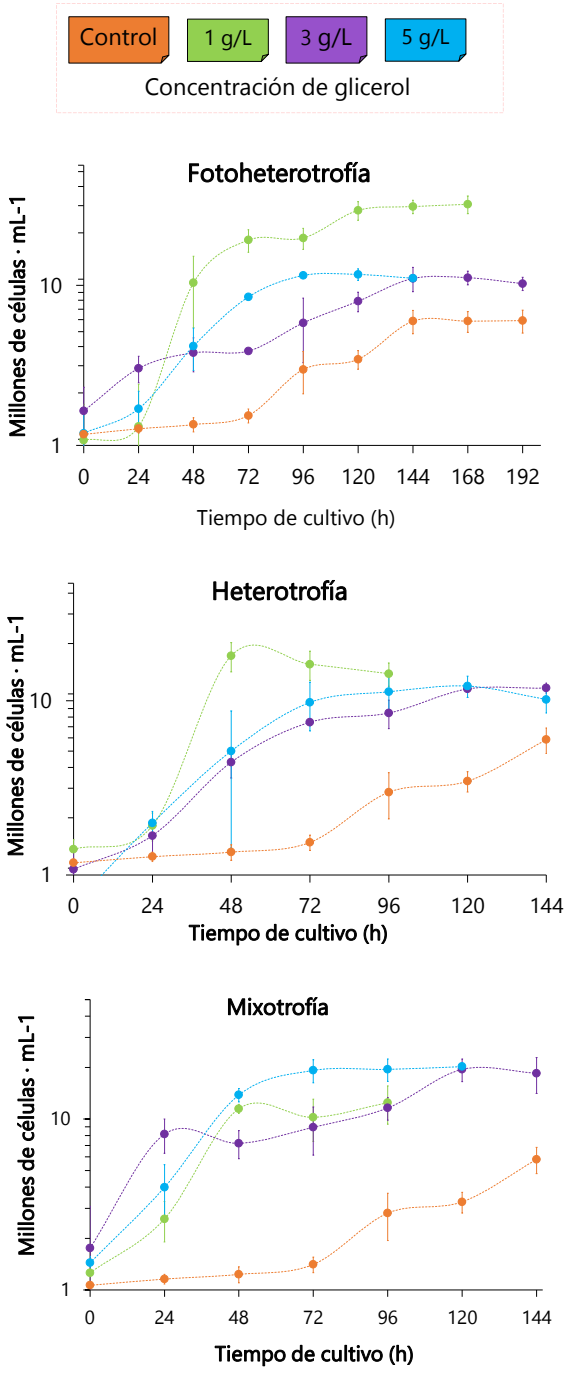

Figura 4-7: Curvas de crecimiento de la microalga *P. kessleri* en medio BBM suplementado con glicerol en diferentes concentraciones bajo tres modalidades de cultivo. Para cada tratamiento en glicerol, cada punto representa el promedio de tres medidas. Las barras sobre los puntos representan la desviación estándar, en aquellos puntos donde no se ve la barra, la desviación estándar es menor al tamaño del punto en la gráfica.

Al igual que en los tratamientos suplementados con glucosa, se calculó el incremento celular para determinar el incremento real en el número de células desde el primer al último día del cultivo. Los resultados entre tratamientos fueron comparados mediante pruebas de Tukey, indicando que el único tratamiento en el cual el incremento celular es más alto y significativamente diferente es el suplementado con glicerol a 1 $g \cdot L^{-1}$ bajo fotoheterotrofía; el resto de tratamientos no fueron estadísticamente diferentes. Estas comparaciones pueden observarse en la Figura 4-8.

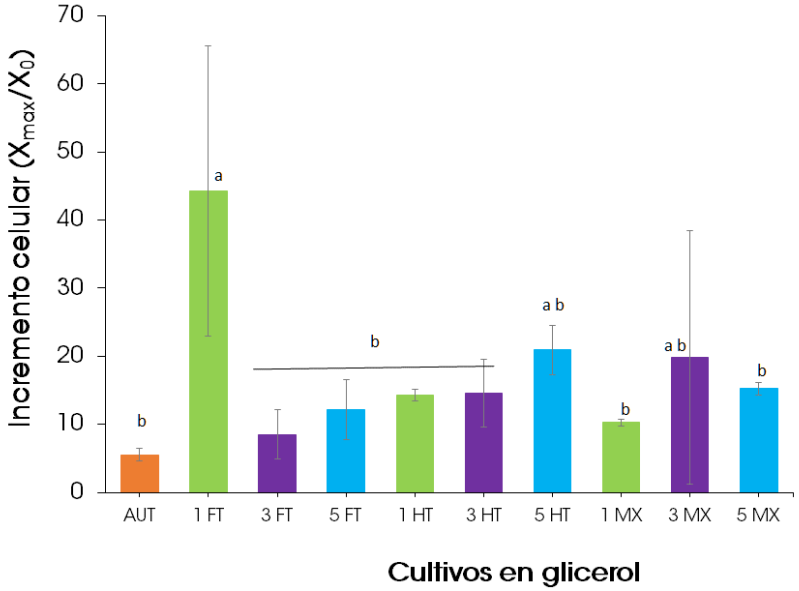

Figura 4-8: Incremento máximo celular para los tratamientos suplementados con glicerol. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.

Aquí se observa que los incrementos celulares alcanzados por los cultivos en glicerol son mucho menores que aquellas alcanzadas en glucosa. Por ejemplo, en glucosa las mayores concentraciones celulares rondaron los 80 a 100 millones de $células \cdot mL^{-1}$. Comparativamente, entre los tratamientos con glicerol el mayor número de células fue de 33 millones de $células \cdot ml^{-1}$ (Gly1 FT). Este es un claro indicio de la baja afinidad de la cepa utilizada por esta fuente de carbono, y que el crecimiento fue ligeramente inhibido por glicerol a altas concentraciones.

Los cultivos fotoheterotróficos alcanzaron incrementos de 44,25; 8,52 y 12,17 veces para las concentraciones de 1, 3 y 5 $g \cdot L^{-1}$ en 7, 6 y 4 días, respectivamente. Lo cual indica que bajo esta modalidad la célula no puede tolerar el glicerol a altas concentraciones. Este tipo de régimen de cultivo presentan pocos antecedentes para microalgas, se tiene por ejemplo el trabajo realizado por Patel *et al*. (2019) quienes adicionaron glicerol a medios de cultivo para el crecimiento de *Chlorella protothecoides* bajo los mismos regímenes de cultivo estudiados en este trabajo. La forma como inhibieron la fotosíntesis y se garantizó la fotoheterotrofía fue mediante la adición de 3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU), bajo este régimen de cultivo las células no presentaron crecimiento al cabo de 4 días.

Para los cultivos heterotróficos, el glicerol fue asimilado de mejor manera, obteniendo mayores incrementos a medida que aumenta la concentración e glicerol. El número celular se incrementó en 14,3; 14,6 y 20,9 veces a medida que la concentración de glicerol aumentó a 1, 3 y 5 $g \cdot L^{-1}$. Con esta especie, bajo este régimen de cultivo no se han encontrado estudios similares; la mayoría se han realizado con *Chlorella protothecoides* como lo hicieron Chen & Walker (2011) [67] y O'Grady & Morgan (2011) [15] quienes obtuvieron incrementos celulares de 19 veces en 6 días y 13 veces en 5 dias, al suplementar el medio con mayores cantidades de glicerol (30 $g \cdot L^{-1}$). Por lo tanto, sería conveniente evaluar en estudios futuros si es posible obtener mayores incrementos celulares usando este régimen de cultivo y concentraciones más altas de glicerol, con el fin de eliminar los requerimientos lumínicos y poder aprovechar este compuesto como fuente de carbono.

En los tratamientos mixotróficos Gly1 MX; Gly3 MX y Gly5 MX se observó un incremento de 10,3; 19,8 y 15,2, respectivamente. Lo cual quiere decir que bajo mixotrofía, *P.* kessleri no pudo tolerar una concentración de 5 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol en el medio. El comportamiento de los resultados obtenidos se asemeja a los encontrados por Liang *et al.* (2009), donde *C. vulgaris* se incrementó 7,22 cuando se agregaron $g \cdot L^{-1}$ de glicerol al medio y su incremento fue menor (6,56 veces) cuando se agregaron 20 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol. Por el contrario, Kong *et al.* (2013) [100] obtuvieron mayores incrementos de *C. vulgaris* mientras incrementaron la concentración de fuente de carbono: 1,5; 5,5 y 6,5 veces en 4 días cuando suplementaron el medio con 1, 5 y 10 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol, respectivamente. Es decir, que para *Parachlorella*

kessleri aún no puede definirse una hipótesis sobre cuál será su comportamiento en mixotrofía, puesto que se han realizado muy pocos estudios al respecto. En este sentido, este trabajo indica que para alcanzar altos crecimientos celulares con la cepa de *P. kessleri* utilizando glicerol, éste debe ser agregado en una concentración de 1 $g \cdot L^{-1}$ y el cultivo debe ser sometido a condiciones fotoheterotróficas.

4.2.2 Velocidad específica de crecimiento en glicerol

El análisis de varianza presentado en la Tabla 4-6 permitió determinar el efecto de la modalidad de cultivo y de la dosis de glicerol suministrada sobre la velocidad específica de crecimiento de la microalga. Se encontró que no existen diferencias en las varianzas de los tratamientos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Régimen	0,0032	2	0,0016	2,28	0,2287
Concentración	0,0004	2	0,0002	0,32	0,7443
Error	0,0029	4	0,0007		
Total	0,0066	8			

Tabla 4-6: ANAVA efecto del régimen de cultivo y la concentración de glicerol sobre la velocidad específica de crecimiento.

La Figura 4-9 muestra las velocidades específicas de crecimiento (μ) de los tratamientos en glicerol y de acuerdo a los resultados de la Tabla 4-6, realizar a estos parámetros una prueba de Tukey ubica a todos los tratamientos en un mismo grupo estadístico.

A pesar de que estadísticamente no existen diferencias significativas entre las velocidades específicas de los tratamientos, en la Figura 4-9 se observan ligeras diferencias. Puede afirmarse que las células crecen más rápido en concentraciones de 1 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol bajo cualquier modalidad de cultivo. Bajo condiciones mixotróficas, incluso, pueden utilizarse concentraciones de 5 $g \cdot L^{-1}$ que se traducen en rápidos crecimientos celulares, pero se alcanza rápidamente una fase estacionaria y su crecimiento cesa , aunque solo en el tratamiento Gly1 FT, la alta velocidad específica de crecimiento se traduce en mayor

incremento celular (Figura 4-7). Este es el primer estudio que reporta velocidades específicas de crecimiento de *P. kessleri* bajo la modalidad fotoheterotrófica y en general se observa que *P. kessleri* no toleró concentraciones de glicerol mayores a 1 $g \cdot L^{-1}$ bajo ninguna modalidad de cultivo.

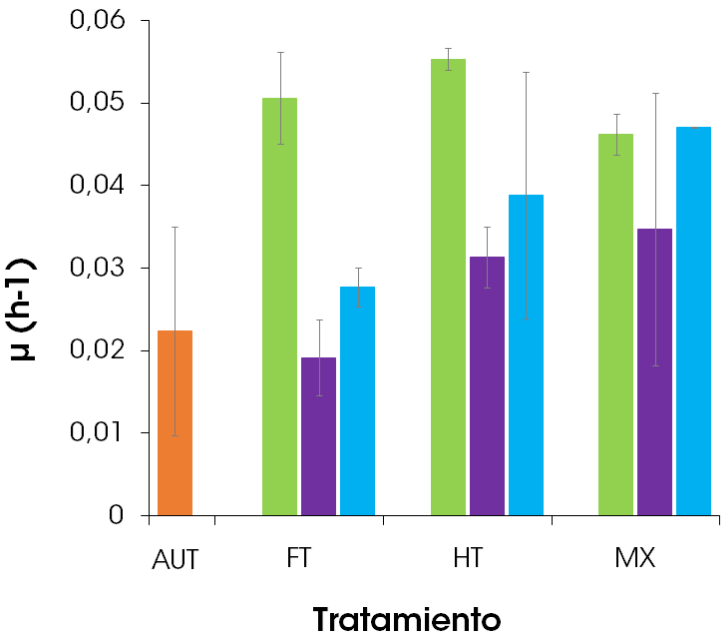

Figura 4-9: Velocidad específica de crecimiento para los tratamientos suplementados con glicerol. n=3. Barra error: 1 Error Estándar de regresión.

Las velocidades específicas de crecimiento para los tratamientos mixotróficos en este estudio son mayores que las reportadas por Kong *et al.* (2013) [100] para *Chlorella vulgaris* bajo mixotrofía quienes obtuvieron valores de μ de 0,039 para tratamientos con 5 y 10 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol.

4.2.3 Consumo de glicerol

La Figura 4-10 expone la cinética de consumo de glicerol para las diferentes modalidades de cultivo.

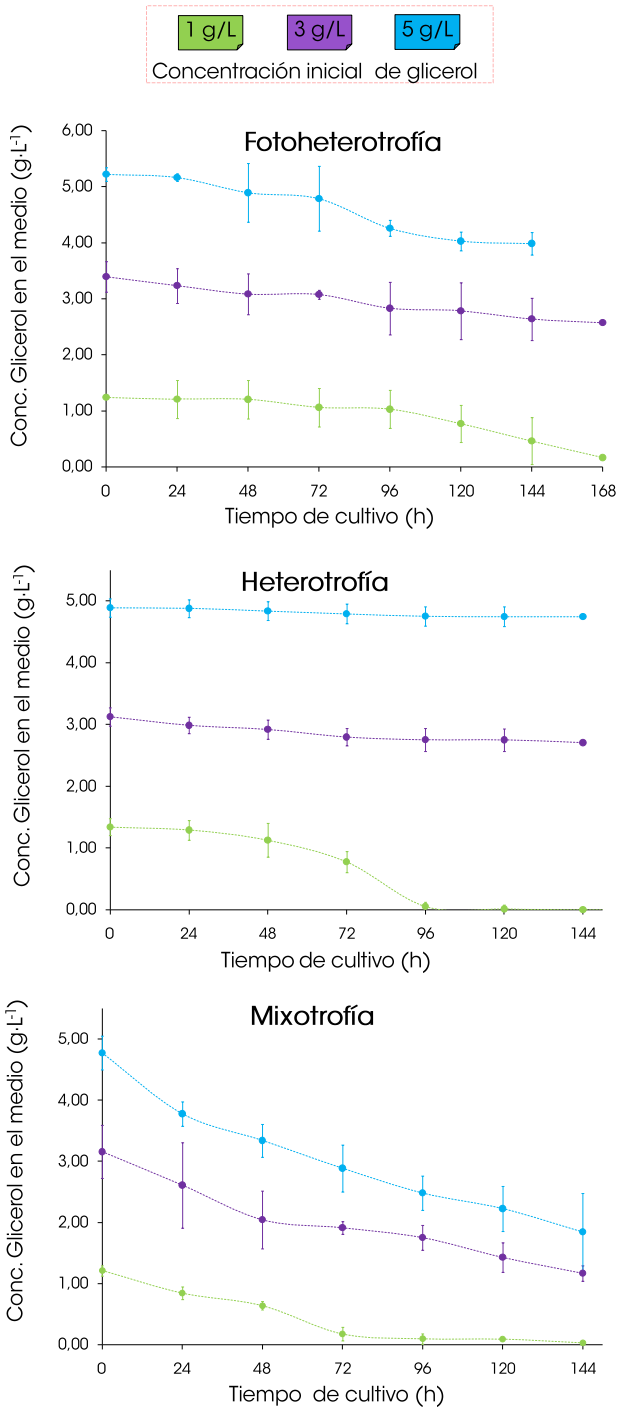

Figura 4-10: Concentración de glicerol en cultivos de *P. kessleri* bajo diferentes regímenes de cultivo. Cada punto representa el promedio de tres medidas. Las barras sobre los puntos representan la desviación estándar, en aquellos puntos donde no se ve, la desviación estándar es menor al tamaño del punto en la gráfica.

La variación en la concentración inicial de glicerol puede deberse a que en algunos casos el preinóculo tenía glicerol residual y en otros, la cantidad de preinóculo era lo suficientemente alta para alcanzar a diluir el glicerol del medio receptor.

La primera observación que puede hacerse es que el glicerol no fue consumido de manera tan eficiente si se compara con el consumo de glucosa (Figura 4-5), demostrando la baja afinidad de la cepa utilizada por este sustrato. Esto se deduce a partir del hecho de que los tratamientos que presentaban concentraciones iniciales de 3 y 5 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol, aun después de 6 días de cultivo presentaron una reducción de glicerol en el medio entre el 25 a 60%. En efecto las eficiencias de consumo de glicerol fueron: 78,1; 27,2; 97,6; 25,5; 35,97; 67,6; 23,6; 2,9 y 64,1 % para los tratamientos Gly1 FT, Gly1 HT, Gly1 MX, Gly3 FT, Gly3 HT, Gly3 MX, Gly5 FT, Gly5 HT, Gly5 MX, respectivamente.

Se observa que en general, las mejores eficiencias de toma de glicerol se presentan en los tratamientos mixotróficos, sin que se obtengan altas concentraciones celulares. Posiblemente, el glicerol tomado del medio esté siendo utilizado por la célula para labores de mantenimiento y no para el crecimiento celular. El estudio de Patel *et al.* (2019) demostró que el régimen de cultivo tiene efectos significativos sobre la toma de los sustratos utilizados y su finalidad. En ese estudio ellos atribuyen el no crecimiento bajo heterotrofia y mixotrofía de *C. protothecoides* a que no es suministrada la cantidad suficiente de oxígeno para realizar su respiración y a la falta de enzima requeridas para su metabolismo. Sería viable entonces optimizar otros parámetros de cultivo como la aireación, la intensidad lumínica, la variación de la duración del fotoperiodo o la cantidad de CO_2 suministrada con el fin de encontrar una condición que favorezca en mayor medida el crecimiento de la microalga y la utilización de glicerol.

4.2.4 pH

El pH en los tratamientos suplementados con glicerol se tomó diariamente y a partir de los datos se construyó la Figura 4-11 se mantuvo cercano a condiciones neutras aunque ligeramente más alto que el del cultivo control.

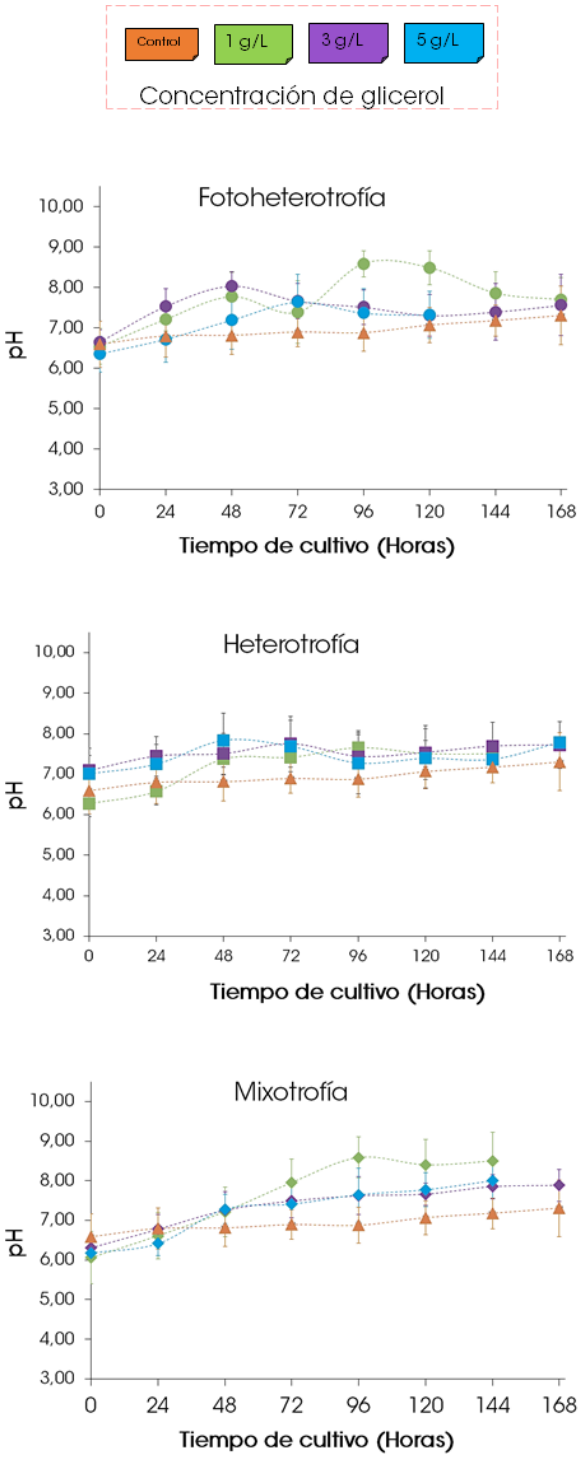

Figura 4-11: Variación del pH para tratamientos suplementados con glicerol. a. Ensayos fotoheterotróficos, b. Ensayos heterotróficos, c. Ensayos mixotróficos. n=3. Barra error: 1 Desv. Estándar

Es probable que debido a que el medio BBM utilizado funciona como un tampón, su pH tienda con dificultad a sufrir variaciones, por otro lado, el glicerol actúa como osmorregulador en la célula, lo cual puede contribuir a mantener balanceados los iones a uno y otro lado de la membrana [67]. El comportamiento en fotoheterotrofía y mixotrofía se puede comparar al encontrado por Grama *et al*. 2016 [8] quienes reportan resultados similares al evaluar el crecimiento de *Dactylococcus dissociatus* MT1 en glicerol. Sustenta sus resultados explicando que la respiración produce CO_2 que acidifica el medio con ácido carbónico, luego, la fotosíntesis consume CO_2 y desplaza el equilibrio hacia un valor de pH más alto.

4.3 Composición bioquímica

Se evaluó la composición bioquímica de las microalgas obtenidas en cada uno de los tratamientos. Para realizar esto, cuando los cultivos alcanzaron su fase estacionaria, el siguiente lote de cultivos fue inoculado con una parte de ellos y la otra parte se centrifugó; la biomasa precipitada fue recolectada y liofilizada. Posteriormente se tomaron 0,5 gramos de biomasa liofilizada, se realizó disrupción celular mediante ultrasonido para liberar el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos existente dentro de las células; estas biomoléculas son determinadas por reacciones colorimétricas y espectrofotometría de luz visible y comparado con curvas de calibración para cada biomolécula.

La finalidad de la presente investigación es encontrar aquella condición de cultivo que permita una biomasa de *P. kessleri* rica en carbohidratos o lípidos y con bajo contenido de proteínas, que pueda ser utilizada en posteriores procesos de producción de biocombustibles y específicamente, como interés del grupo de investigación, en licuefacción hidrotermal; esperando obtener biocrudo con bajo porcentaje de nitrógeno y azufre.

Los contenidos de cada una de estas biomoléculas son expresados en porcentaje, el total está dado por la sumatoria de proteínas, lípidos y carbohidratos. Para el momento de la publicación de la presente investigación, pocos son los reportes detallados acerca de la composición bioquímica cuando *P. kessleri* se suplementa con glucosa como fuente de carbono [5], [164], incluso, hasta el momento no se han reportado este tipo de resultados

cuando su crecimiento se realiza en tratamientos con glicerol. La presente investigación sería una primera aproximación a su conocimiento.

La información obtenida se comparó con algunos estudios similares hechos en *C. vulgaris* y *C. protothecoides* [102] por ser las especies más cercanas genéticamente y además porque son las más estudiadas hasta ahora; *S. platensis* por ser una microalga también de agua dulce y *Schizochytrium limacinum* una microalga conocida por acumular altas cantidades de lípidos de la cual se encontró un trabajo que reporta su composición bioquímica completa [18]. Todo ello asumiendo que entre esas especies existe semejanza entre las vías metabólicas de biosíntesis de biomoléculas. Además se procuró tener en cuenta solamente aquellos tratamientos en los que las concentraciones y orígenes de las fuentes de carbono eran similares a las utilizadas en este trabajo, puesto que en algunos de ellos las dosis suplementadas son muy superiores (40-100 $g \cdot L^{-1}$) o en el caso del glicerol, algunos trabajos utilizan glicerol crudo proveniente de procesos de obtención de biodiesel y estos conjuntos de condiciones conllevan a inhibiciones del crecimiento de los microorganismos esperando así una composición bioquímica dada más por el estrés al que la microalga está sometida que al efecto de la asimilación de la fuente de carbono en sí. Por lo tanto, dichas situaciones no pueden ser comparables con las reportadas en esta investigación.

4.3.1 Composición bioquímica de *P. kessleri* en tratamientos con glucosa

Los análisis de varianza de Anexo H muestran la variabilidad de los contenidos de proteínas, y carbohidratos entre regímenes de cultivo y concentraciones de glucosa agregadas, obteniendo que en todos los casos es éste último factor el que influye sobre la expresión de estas respuestas.

La Tabla 4-7 recopila los valores de contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos reportados para cultivos de *P. kessleri* en los tratamientos suplementados con glucosa.

Tratamiento	Contenido de Proteínas (%)	Contenido de Carbohidratos (%)	Contenido de Lípidos (%)
AUT	59,71 ± 7,43 [a]	21,93 ± 2,64 [b]	14,19 ± 0,96 [c d e]
Glu1 FT	62,81 ± 9,52 [a]	23,53 ± 1,64 [ab]	12,92 ± 0,35 [c d e]
Glu3 FT	58,79 ± 10,58 [a]	26,24 ± 3,33 [ab]	13,71 ± 1,93 [c d e]
Glu5 FT	51,19 ± 3,86 [a]	26,65 ± 3,29 [ab]	20,93 ± 2,56 [a]
Glu1 HT	62,55 ± 9,21 [a]	21,52 ± 1,87 [b]	14,79 ± 1,40 [c d]
Glu3 HT	58,24 ± 3,78 [a]	26,30 ± 3,24 [ab]	11,30 ± 1,26 [d e]
Glu5 HT	52,61 ± 10,25 [a]	29,54 ±2,6 [ab]	10,31 ± 0,89 [e]
Glu1 MX	58,58 ± 7,56 [a]	22,95±3,26 [ab]	16,19 ± 1,83 [b c]
Glu3 MX	51,47 ± 6,76 [a]	27,46±1,19 [ab]	16,79 ± 1,45 [a b c]
Glu5 MX	48,70 ± 5,07 [a]	30,68 ±4,83 [a]	20,39 ±1,56 [a b]

Tabla 4-7: Composición bioquímica en base seca de *P. kessleri* en tratamientos suplementados con glucosa y expuestos a regímenes de crecimiento fotoheterotrófico, heterotrófico y mixotrófico. Cada valor es el promedio de tres medidas ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.

De esta manera se tiene que el metabolismo de expresión de proteínas de todos los tratamientos no es estadísticamente diferente de la de los cultivos control, es decir utilizar estas concentraciones bajo cualquier modalidad de cultivo no conlleva a la reducción de las proteínas. Sin embargo, cuando se incrementó la concentración de glucosa en el medio a 5 $g \cdot L^{-1}$, sí se observó una ligera disminución del contenido de proteínas para todos los tratamientos. Una posible explicación para los altos contenidos de proteína de los tratamientos en glucosa pueden deberse a que este sustrato es metabolizado principalmente por la vía de las pentosas fosfato (Figura 2-7) que es la principal ruta de producción de aminoácidos.

Este comportamiento similar al encontrado por Deng *et al*. (2019) [5] quien encontró que el contenido de proteínas disminuyó desde 54.3% hasta 34.9% con un incremento de glucosa desde 2 a 15 $g \cdot L^{-1}$ en mixotrofía en *P. kessleri*; el trabajo de Liang et al.(2009) [9] evaluó incluso concentraciones de 10 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa obteniendo solamente 32% de proteínas en *C. vulgaris.*

El contenido de carbohidratos aumentó cuando la cantidad de glucosa incrementó en cada medio. Para este estudio, el contenido de carbohidratos en el tratamiento control fue de 21,93 %, y aumentó hasta 26,65; 29,54 y 30,68 % en los tratamientos Glu5 fotoheterotróficos, heterotróficos y mixotróficos, respectivamente. Unos comportamientos similares obtuvieron Deng *et al.* (2019): en el tratamiento control encontró un 17,2% de carbohidratos que incrementó desde 12.6% hasta 28.2% cuando incrementaron la glucosa desde 2 a 15 $g \cdot L^{-1}$ en el medio. Estos resultados están de acuerdo con lo afirmado por Yang *et al.* (2000) [184] quienes sugieren que la glucosa puede estar siendo convertida directamente en almidón sin la conversión previa en gliceraldehído-3-fosfato y luego ser absorbida por el cloroplasto. Por lo tanto, una parte de la glucosa exógena se convierte directamente en almidón y el resto se oxida a través de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas o glicólisis (Figura 2-7) glicólisis a partir de la cual se inicia el ciclo de Krebs (Figura 2-8) donde se genera una mayor cantidad de precursores que inician la síntesis de carbohidratos y lípidos.

El contenido de lípidos para estos tratamientos tiene la misma explicación bioquímica. Para este estudio, según el análisis de varianza de Anexo H , éste parámetro, sí se ve afectado tanto por el régimen de cultivo como por la concentración de glucosa que es agregada; por lo cual en esta respuesta se observa una mayor variedad en los resultados. La más alta acumulación de lípidos se logró en los tratamientos Glu5 FT y Glu5 MX de glucosa, gracias a una mayor disponibilidad de energía bajo estas condiciones; por lo tanto, ésta sería una estrategia potencial para incrementar su producción. En los tratamientos autotróficos y aquellos suplementados con 1 y 3 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa, la cantidad de lípidos acumulada no fue significativamente diferente. Los tratamientos control obtuvieron 14,19% de lípidos, un poco más bajo que el obtenido por Serrano (2012) quien obtuvo el 18,9% para *C. vulgaris* al optimizar condiciones de irradiancia, CO_2 y aireación para lograr mayor acumulación de lípidos.

En las microalgas el almacenamiento de energía en forma de lípidos es un proceso que compite con el almacenamiento en forma de carbohidratos, y se ha sugerido que ésta última puede ser la forma más eficiente; debido a que se necesita menos ATP y NADPH por cada

molécula de carbohidrato producida, a diferencia de la síntesis de lípidos que requiere más del doble. Aunque los lípidos pueden almacenar más energía, la cantidad de energía invertida en su síntesis no es compensada por la energía obtenida de su oxidación [234].

A partir de estos resultados se puede afirmar que la microalga *P. kessleri* tiene la capacidad de alterar sus vías metabólicas y cambiar su composición bioquímica cuando se cultiva en glucosa bajo diferentes concentraciones y regímenes de cultivo. De manera general se puede decir que la energía obtenida de la glucosa fue utilizada principalmente para la reproducción celular y solo en aquellos casos donde la glucosa fue suministrada en concentraciones de 5 $g \cdot L^{-1}$ se observó un metabolismo enfocado a la biosíntesis de moléculas energéticas, es decir, ese aporte de energía “extra” dado por la glucosa también promueve que la cantidad de carbohidratos aumente; la cantidad de lípidos también incrementa, pero lo hace de manera más sutil. Se observa que en los tratamientos suplementados con 5 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa, la cantidad de lípidos y carbohidratos tiende a incrementar, razón por la cual el contenido de proteínas tiende a disminuir.

Los hallazgos de esta investigación, coinciden con lo afirmado por Perez-Garcia & Bashan, (2015): la fuente de carbono es consumida a una velocidad más alta que la de reproducción celular, promoviendo la conversión del exceso de azúcar en lípidos. Sin embargo, en este caso, probablemente debido a la genética de la cepa, *P. kessleri* estuvo más predispuesta a acumular carbohidratos, afirmación que había sido hecha también por Fernandes *et al.* (2013).

Por lo tanto se concluye que si se desean biomasas que puedan ser usadas en futuros proceso de licuefacción hidrotermal y que sean capaces de metabolizar la glucosa presente en el medio, *P. kessleri* debería ser cultivada bajo una modalidad fotoheterotrófica o mixotrofía agregando 5 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa.

4.3.2 Composición bioquímica de *P. kessleri* en tratamientos con glicerol

La Tabla 4-8 recopila las respuestas en cuanto a contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos reportados para cultivos de *P. kessleri* en los tratamientos suplementados con glicerol.

Los ANAVA para estos tratamientos se encuentran consignados en el Anexo H y la prueba de Tukey muestra la variabilidad de los contenidos de proteínas y carbohidratos entre regímenes de cultivo y concentraciones de glicerol agregadas, obteniendo que estos parámetros son influidos por el régimen de crecimiento.

De acuerdo a la Tabla 4-8 los mayores contenidos de proteínas se obtuvieron en los tratamientos expuestos a la luz y estadísticamente no fueron significativamente diferentes del tratamiento control. Por otro lado, en todos los tratamientos heterotróficos se observó una disminución en el contenido de proteínas desde 40,77% hasta 20, 37%, es decir que la disminución es más marcada mientras se incrementa la concentración de glucosa. Komor &Tanner (1974) [202] y Aubert *et al.* (1994) [235] sugirieron que el glicerol cuando se suministra como única fuente de carbono, inhibe la ruta de las pentosas fosfato, lo cual provocaría una disminución de la producción de aminoácidos y explicaría que los contenidos de proteína en oscuridad sean tan bajos. Los cultivos fotoheterotróficos podrían estar reciclando parte del CO_2 que se produce de la respiración del glicerol y los mixotróficos toman el CO_2 del aire suministrado por lo tanto tendrían un aporte extra de carbono. Sin embargo, al observar el consumo de esta fuente de carbono (Figura 4-10), se observa que a 3 y 5 $g \cdot L^{-1}$ no fue consumido. Por lo tanto una disminución en las proteínas podría deberse también a una situación de estrés que provoque el consumo de proteínas por parte de la misma célula para su posterior transformación y almacenamiento en forma de carbohidratos y lípidos y por lo tanto un cese de la reproducción celular como se discutió en el numeral 4.2.1.

Tratamiento	Contenido de Proteínas (%)	Contenido de Carbohidratos (%)	Contenido de Lípidos (%)
AUT	59,53 ± 7,43 [a]	21,93 ± 2,64 [c]	14,19 ± 0,96 [bc]
Gly1 FT	61,26 ± 8,31 [a]	25,64 ± 1,36 [c]	11,94 ± 1,71 [c]
Gly3 FT	66,89 ± 1,08 [a]	21,94 ± 3,50 [c]	11,56 ± 0,92 [c]
Gly5 FT	62,39 ± 6,28 [a]	22,6 ± 1,71 [c]	14,11 ± 1,98 [bc]
Gly1 HT	40,77 ± 5,76 [b]	38,91 ± 6,3 [b]	16,82 ± 6,3 [b]
Gly3 HT	35,64 ± 1,8 [bc]	46,03 ± 5,49 [ab]	14,81 ± 1,43 [bc]
Gly5 HT	20,37 ± 3,7 [c]	52,32 ±1,38 [a]	27,29 ± 2,19 [a]
Gly1 MX	68,11 ± 8,84 [a]	19,9,± 1,47 [c]	11,63 ± 1,26 [c]
Gly3 MX	63,92 ± 8,46 [a]	24,45 ± 3,2 [c]	11,32 ± 1,51 [c]
Gly5 MX	68,15 ± 2,2 [a]	22,89 ± 1,01 [c]	11,77± 1,24 [c]

Tabla 4-8: Composición bioquímica en base seca de *P. kessleri* en tratamientos suplementados con glicerol y expuestos a regímenes de crecimiento fotoheterotrófico, heterotrófico y mixotrófico. Cada valor es el promedio de tres medidas ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.

En cuanto a la acumulación de carbohidratos y lípidos, el ANAVA consignado en el Anexo H y la Tabla 4-8, indican que los cultivos heterotróficos obtuvieron las mayores acumulaciones que se incrementan cuando se incrementa la concentración de glicerol. Es decir, que bajo este régimen de cultivo, el contenido de proteínas disminuye para dar paso a una acumulación de éstas biomoléculas. Retomando la explicación de Komor &Tanner (1974) [202], el glicerol inhibe la ruta pentosas, pero se fosforila para transformarse en gliceraldehído-3-fosfato y seguir activamente la ruta de la gluconeogénesis, incrementando la síntesis de carbohidratos mediante ciclo de Krebs (Figura 2-7). Los tratamientos en luz no fueron significativamente diferentes del control, por lo tanto, ni la modalidad autotrófica, fotoheterotrófica ni mixotrófica promueven su acumulación.

Para un potencial uso de la biomasa obtenida en procesos de licuefacción hidrotermal, sería conveniente el cultivo de *P. kessleri* en un tratamiento heterotrófico suplementado con 1 $g \cdot L^{-1}$, modalidad bajo la cual se obtuvo la mayor acumulación de lípidos y carbohidratos.

También es posible utilizar la biomasa obtenida en procesos fermentativos para la obtención de bioetanol.

4.3.3 Pigmentos

Durante el análisis de los resultados se observó una relación entre la pérdida de color de los cultivos (que se pudo apreciar a simple vista), y la cantidad de fuente de carbono orgánica agregada al medio. Sin embargo, el contenido de pigmentos no fue cuantificado debido a que según la bibliografía su contenido es de entre 0,4-4% en las microalgas [5], [100], cantidad que no es significativa para las posteriores aplicaciones que se pretende dar a la biomasa obtenida en este estudio. Por lo tanto, se realizará una descripción cualitativa de los resultados.

La Figura 4-12 y Figura 4-13 corresponden a fotografías de los tratamientos suplementados con glucosa y glicerol respectivamente. Estas imágenes se tomaron en el momento en que cada uno de los cultivos ya había alcanzado la fase exponencial y se habían extraído cantidades considerables para hacer análisis e peso seco o preinóculos de los cultivos siguientes, por lo cual una marcada disminución en el volumen de cultivo en la fotografía no necesariamente es indicio de excesiva evaporación.

En ellos se observa cómo los ensayos suplementados con 3 y 5 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa y glicerol en todos los regímenes de cultivo, presentan tonalidades más pálidas si se compara con el ensayo control o con aquellos suplementados con 1 $g \cdot L^{-1}$.

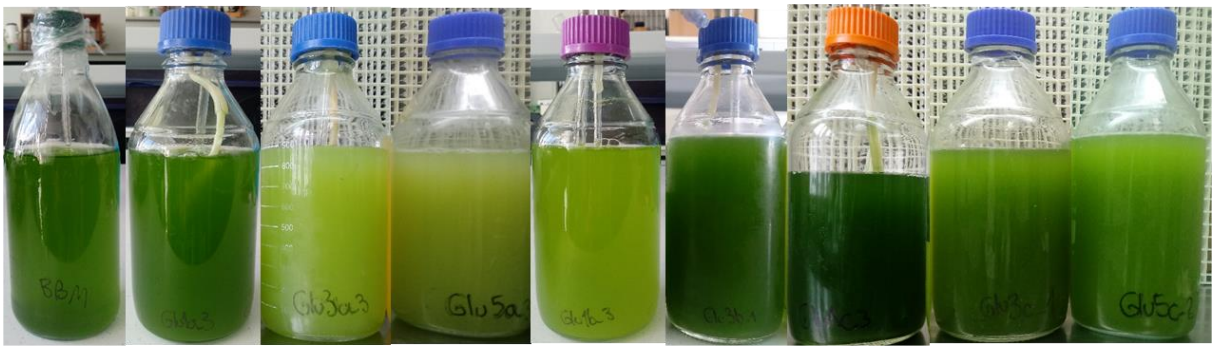

Figura 4-12: Fotografías de los tratamientos suplementados con glucosa. En estas fotografías puede evidenciarse los cambios en el color de los cultivos. De izquierda a derecha las botellas corresponden a: ensayo control o AUT (autotrófico), Glu1 FT, Glu3 FT, Glu5 FT, Glu1 HT, Glu3 HT, Glu1 MX, Glu3 MX, Glu5 MX.

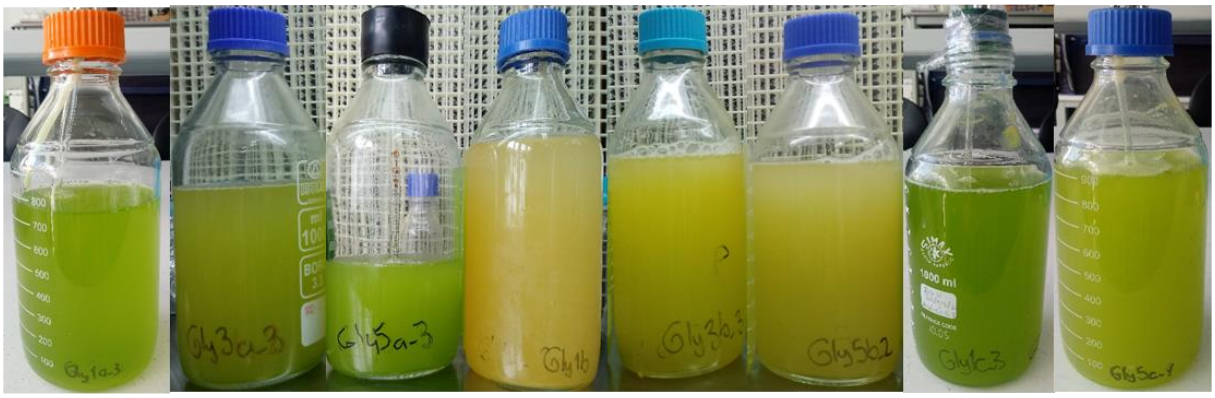

Figura 4-13: Fotografías de los tratamientos suplementados con glicerol. En estas fotografías puede evidenciarse los cambios en el color de los cultivos. De izquierda a derecha las botellas corresponden a: Gly1 FT, Gly3 FT, Gly5 FT, Gly1 HT, Gly3 HT, Gly5 HT, Gly1 MX y Glu5 MX.

Para los tratamientos mixotróficos y fotoheterotróficos esta reducción de pigmentos es ligeramente más marcada mientras se incrementa la concentración dela fuente de carbono. Esta observación concuerda con lo postulado en una gran cantidad de estudios que afirman que la adición de fuentes de carbono orgánicas a menudo disminuye la producción de pigmentos fotosintéticos [78], [184], Narayan *et al.* (2005) [19] encontró también una marcada disminución en el contenido de los pigmentos clorofila a y ficocianina comparando con el medio control cuando *Spirulina platensis* creció en medios con glicerol. Deng *et al.*

(2019) [164] explica que esto sucede porque el carbono orgánico suministrado regula negativamente la expresión de algunas proteínas que se codifican en el núcleo. Algunas de ellas podrían ser proteínas de unión a la clorofila desarrolladas en el fotosistema II (específicamente la proteína coproporfirina III), incluso la enzima (RuBisCO); y de esta manera se altera tanto el proceso de absorción de fotones como la fijación del carbono inorgánico en el ciclo de Calvin. Además este proceso de inhibición por fuente de carbono es mitigado a medida que la misma es consumida por la célula, razón que explicaría por qué no llega a perderse del todo el color verde característico [162]–[164].

Por otro lado, respecto los cultivos en oscuridad suplementado con glicerol donde la reducción de los pigmentos es evidente; un estudio cuantificó la cantidad de clorofila que pierde *P. Kessleri* cuando es cultivada de manera heterotrófica en glucosa y encontró que el contenido de clorofila en un cultivo heterotrófico justamente en el tiempo inicial del cultivo era de 13,1 $mg \cdot g^{-1}$, después de dos días de crecimiento esa cantidad se redujo a 2,30 $mg \cdot g^{-1}$, acompañado de un cambio en el color del cultivo de verde a amarillento durante el transcurso del experimento [164]. En ausencia de luz todo el sistema requerido para realizar la fotosíntesis no se desarrolla, los pigmentos colectores de luz no se acumulan y por lo tanto la célula debe mantenerse netamente mediante la respiración de la fuente de carbono orgánica suministrada. La presencia de glicerol afecta más negativamente la producción de pigmentos que aquellos tratamientos suplementados con glucosa. Esto concuerda con lo afirmado por Lewitus et al. (1991) [213] quien describe que la presencia de glicerol afecta negativamente la acumulación de pigmentos y las estructuras plastídicas mediante la reducción el tamaño de los cloroplastos.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Esta investigación constituye uno de los primeros acercamientos al conocimiento de la composición bioquímica de la microalga *P. kessleri*, utilizando glucosa y glicerol como fuentes de carbono bajo regímenes de crecimiento auto, fotohetero, mixo y heterotrófico. Esta exploración es importante porque durante mucho tiempo esta especie fue confundida con otras especies del género *Chlorella* que pudo haber generado una colecta de información equivocada en cuanto a su comportamiento y composición bioquímica.

Bajo las condiciones de cultivo estudiadas, se demostró que tanto el régimen de cultivo como la fuente de carbono orgánica (glucosa o glicerol) o inorgánica (CO_2) influyen en el crecimiento y la composición bioquímica de la microalga *Parachlorella kessleri.*

Utilizando glucosa como fuente de carbono, hay una relación directa entre el crecimiento de la microalga y el contenido de glucosa para los regímenes fotoheterotrófico y heterotrófico, pero no para el mixotrófico. Los mayores incrementos en la biomasa se obtuvieron con los tratamientos fotoheterotróficos y heterotróficos suplementados con 5 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa, en los cuales el número de células incrementó desde aproximadamente $1 \cdot 10^6$ $células \cdot mL^{-1}$ hasta 7,7 y 9,7 $\cdot 10^7$ $células \cdot mL^{-1}$, lo anterior en un tiempo de cultivo de 5 días.

El buen desempeño en condiciones de oscuridad es un indicador de posibles ahorros en costos, gracias a que se elimina la necesidad de suministro de iluminación lo que se traduce en ahorro energético.

En los cultivos con glicerol hay un incremento en la velocidad de crecimiento con respecto al control (autotrófico) pero el aumento de la concentración de glicerol no estimula el crecimiento de la microalga.

La estrategia de cultivo mixotrófica fue la más eficiente en cuanto a la remoción de la fuente de carbono orgánica para todos los tratamientos en glicerol, lo cual la hace promisoria para procesos en los cuales se requiera remover este tipo de fuentes del carbono del medio sin necesariamente esperar altos rendimientos de biomasa.

La condición de cultivo más promisoria en la cual *Parachlorella kessleri* presentó la menor cantidad de proteínas (18.29%) y aumentó la cantidad de carbohidratos (46.01%) y lípidos (24%) fue aquella suplementada con 5 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol y expuesta a condiciones de oscuridad.

Se observó que *P. kessleri* bajo estudio fue alta productora de carbohidratos bajo las condiciones aquí tratadas, lo cual la posiciona como candidata a procesos de producción de bioetanol.

El aumento en la concentración de la fuente de carbono promueve el incremento en la concentración de moléculas de almacenamiento como lípidos y carbohidratos y la disminución de las proteínas.

5.2 Recomendaciones

De acuerdo con los resultados obtenidos de esta investigación, la cepa de *P. kessleri* bajo estudio podría ser usada para procesos fermentativos de los cuales se obtenga bioetanol.

Optimizar las condiciones de cultivo con glicerol para promover mayores rendimientos celulares sin que se vea afectada la acumulación de lípidos.

Profundizar el estudio utilizando concentraciones de glucosa y glicerol mayores a 5 $g \cdot L^{-1}$ para observar la evolución en la acumulación de lípidos y carbohidratos.

Realizar el cultivo de *P. kessleri* utilizando glicerol crudo proveniente de la transesterificación de ácidos grasos siempre y cuando se haga una adaptación adecuada de la microalga a su uso.

Se recomienda complementar la investigación aquí expuesta con la realización del análisis del perfil de ácidos grasos de la microalga con el fin de explorar como afectan las condiciones de cultivo a la relación de ácidos grasos saturados e insaturados.

Verificar continuamente la calibración de los equipos del laboratorio con el fin de obtener resultados confiables.

A. Anexo: Composición del medio BBM.

Código solución patrón	Nombre solución patrón	Componente	Concentración en la solución patrón	Volumen a adicionar (mL)	Concentración en el medio final
Agua	Agua destilada y desionizada	H_2O	[-]	936 (c.s.p. 1000 mL)	[-]
SP-1	Nitrato de sodio	$NaNO_3$	25,00 $g \cdot L^{-1}$	10	$2{,}94 \cdot 10^{-3}$ $mol \cdot L^{-1}$
SP-2	Sulfato de Magnesio	$MgSO_4$	7,50 $g \cdot L^{-1}$	10	$3{,}04 \cdot 10^{-4}$ $mol \cdot L^{-1}$
SP-3	Cloruro de sodio	NaCl	2,50 $g \cdot L^{-1}$	10	$4{,}28 \cdot 10^{-4}$ $mol \cdot L^{-1}$
SP-4	Fosfato monoácido de Potasio	K_2HPO_4	7,50 $g \cdot L^{-1}$	10	$4{,}31 \cdot 10^{-4}$ $mol \cdot L^{-1}$
SP-5	Fosfato diácido de potasio	KH_2PO_4	17,50 $g \cdot L^{-1}$	10	$1{,}29 \cdot 10^{-3}$ $mol \cdot L^{-1}$
SP-6	Cloruro de calcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,50 $g \cdot L^{-1}$	10	$1{,}70 \cdot 10^{-4}$ $mol \cdot L^{-1}$
SP-7	Metales traza	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,82 $g \cdot L^{-1}$	1	$3{,}07 \cdot 10^{-5}$ $mol \cdot L^{-1}$
		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,44 $g \cdot L^{-1}$		$7{,}28 \cdot 10^{-6}$ $mol \cdot L^{-1}$
		MoO_3	0,71 $g \cdot L^{-1}$		$4{,}93 \cdot 10^{-6}$ $mol \cdot L^{-1}$
		$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1,57 $g \cdot L^{-1}$		$6{,}29 \cdot 10^{-6}$ $mol \cdot L^{-1}$
		$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,49 $g \cdot L^{-1}$		$1{,}68 \cdot 10^{-6}$ $mol \cdot L^{-1}$
SP-8	Solución de boro	H_3BO_3	11,42 $g \cdot L^{-1}$	1	$1{,}85 \cdot 10^{-4}$ $mol \cdot L^{-1}$
SP-9	Solución EDTA Alcalina	$EDTA \cdot Na_2$	50,00 $g \cdot L^{-1}$	1	$1{,}71 \cdot 10^{-4}$ $mol \cdot L^{-1}$
		KOH	31,00 $g \cdot L^{-1}$		$5{,}53 \cdot 10^{-4}$ $mol \cdot L^{-1}$
SP-10	Solución ácida de Hierro	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4,98 $g \cdot L^{-1}$	1	$1{,}79 \cdot 10^{-5}$ $mol \cdot L^{-1}$
		H_2SO_4 (98%)	1 $mL \cdot L^{-1}$		-

Tabla A-1: Composición del medio BBM [232]

Nota 1: Adicione las soluciones patrón a aproximadamente 850 mL de agua en el orden señalado y con agitación y espere a que cada una se disuelva completamente antes de agregar la siguiente. Finalmente añada el agua restante hasta completar 1000 mL.

Nota 2: Todas las soluciones patrón (excepto la SP-7) pueden ser almacenadas sin esterilizar a 4°C en recipientes de vidrio. Para preparar la solución patrón SP-7, disuelva cada componente después del otro; puede necesitar esterilización en autoclave para lograr disolución total. Esta solución no debe ser almacenada en recipientes de vidrio sino en recipientes de teflón o policarbonato para evitar que el metal se adsorba en la superficie del contenedor. Almacene a 4 °C.

Nota 3: El pH final del medio BBM antes de esterilizar debería estar entre 6,4 y 6,8 y la conductividad alrededor de 1400 $\mu S \cdot cm^{-1}$. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 30 min. Esperar 24 h antes de inocular o airear por un período suficiente (~1 h) antes de inocular para ajustar equilibrio gaseoso del medio.

Nota 4: Para preparar agar BBM, se parte del medio BBM y se le adiciona Agar-Agar en concentración de 10 a 13 $g \cdot L^{-1}$.

B. Anexo: Método conteo de microalgas por cámara de Neubauer

Materiales:

- Cámara de conteo de Neubauer
- Centrifuga (Hettich Zentrifugen ROTOFIX 32)
- 2 pipetas 1000 µL
- 1 pipeta 200 µL
- Microscopio con cámara incorporada (OMAX A35140U)
- Cabina de flujo laminar
- Tubos de centrifuga de 50 mL

Reactivos:

- Medio de cultivo BBM fresco (100 mL aprox.)
- Muestra de cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* (80 mL aprox.)

Toma y preparación de la muestra:

De un cultivo de microalgas, en la cabina de flujo laminar, tomar una muestra de 100 mL en dos tubos de centrifuga de 50 mL. El cultivo debe agitarse antes de tomar la muestra para que sea homogénea.

Para tener un amplio espectro de concentraciones, las muestras tomadas del cultivo se concentran por centrifugación a criterio del investigador, eliminando el sobrenadante y mezclando las dos muestras precipitadas.

La microalga concentrada debe resuspenderse en agua destilada, centrifugarse y eliminar el sobrenadante, con el fin de reducir las sales precipitadas del medio y así disminuir el ruido que estas ocasionan cuando se realiza el conteo. Este procedimiento debe repetirse mínimo 5 veces.

Una vez terminado el lavado de la microalga este debe resuspenderse nuevamente en medio fresco BBM previamente centrifugado.

Conteo celular en Cámara de Neubauer:

1. Separar el cultivo concentrado en tres muestras, cada una con volumen aproximado de 10 mL (replicas) en tubos de centrifuga de 15 mL. Antes de separar el cultivo se debe agitar para evitar la sedimentación de las microalgas y garantizar que las tres muestras sean estadísticamente iguales. Nombre de las muestras R1, R2 y R3.
2. Con una pipeta (200 µL) tomar 30 µL de la muestra R1; agitar varias veces con la pipeta para evitar sedimentación antes de tomar la muestra.
3. Colocar aproximadamente 2 gotas sobre la cuadricula de la cámara de Neubauer (Figura B-1)

las

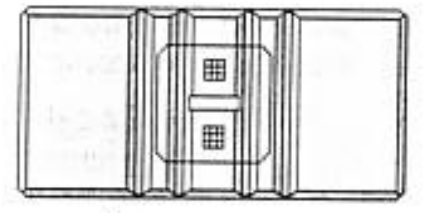

Figura B-1. Esquema de la cámara de Neubauer, donde se representa la ubicación de dos cuadriculas.

4. Colocar el cubre objetos sobre la cámara evitando la aparición de burbujas y que el líquido se desborde; si esto llega a suceder, lavar y volver a repetir desde el paso 2.
5. Poner al microscopio la cámara y enfocar hasta que las células se vean nítidas a objetivo 10x
6. Ubicar el cuadro grande 1 (Figura B-2) y tomar una foto; asegurarse que quede enfocado y nítido todo el cuadro.

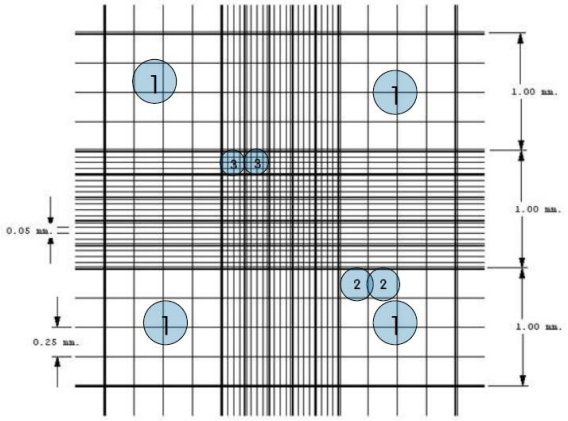

Figura B-2 Cuadrícula de una cámara de Neubauer

7. Tomar las fotos para los tres cuadros restantes marcados como (1) en la Figura B-2 y tomar las fotos (4 fotos en total).

Nomenclatura de las fotos: Rx-y. Donde “x” corresponde al número de la réplica y “y” al cuadrante de la cámara (Figura B-3). Por ejemplo, R1-3 corresponde a la foto del cuadrante 3 de la réplica 1.

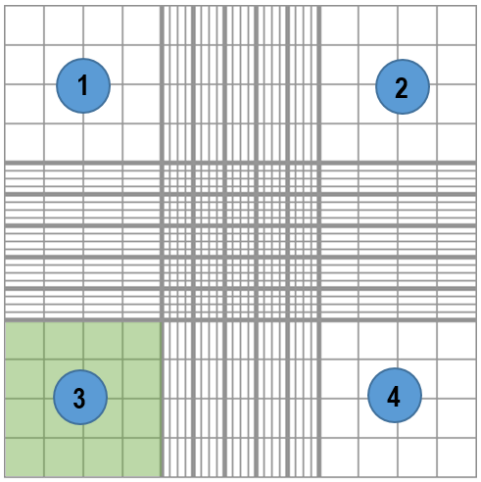

Figura B-3. Numeración de cada uno de los cuadrantes de la cámara de Neubauer. En la imagen se resalta el cuadrante correspondiente a una foto Rx-3; donde “x” corresponde al número de la réplica que se esté analizando.

8. Retirar la cámara, lavar y secar. Repetir los pasos de 1 -7 para la muestras R2 y R3 (réplicas de la medición) (12 fotos en total)

9. Una vez se tengan las fotos, realizar el conteo de todas las células que se encuentran dentro de cada cuadrante, como sigue:

a. Las células se cuentan en zigzag siguiendo la Figura B-4.
b. Cada cuadrante está delimitado por una línea triple, para el conteo solo se tendrá en cuenta la segunda línea de cada borde (Figura B-4)

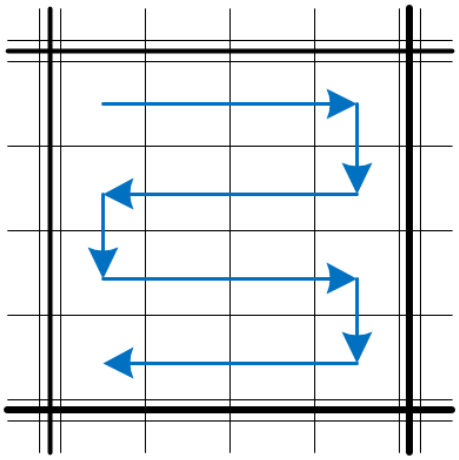

Figura B-4. Esquema de conteo de los cuadros de un cuadrante de la cámara de Neubauer. Para el conteo se tendrán como limites las líneas intensas de la figura, correspondientes a la segunda línea de delimitación de cada cuadrante. Cada uno de los cuadros de un cuadrante se enumera siguiendo el zigzag

c. Las células que toquen o estén por dentro de la segunda línea superior e izquierda se cuentan (Figura B-5)

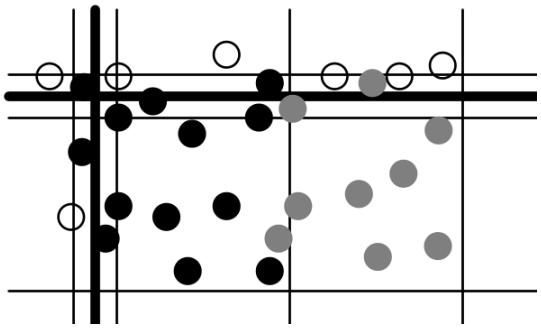

Figura B-5. Representación del conteo de células que tocan líneas superiores e izquierdas. En negro, las células que se cuentan dentro del cuadro 1 (13 células); en gris las células que se cuentan dentro del cuadro 2 (9 células); y en blanco, las células que no hacen parte del conteo.

d. Las células que toquen la segunda línea derecha o inferior no se tienen en cuenta en el conteo (Figura B-6)

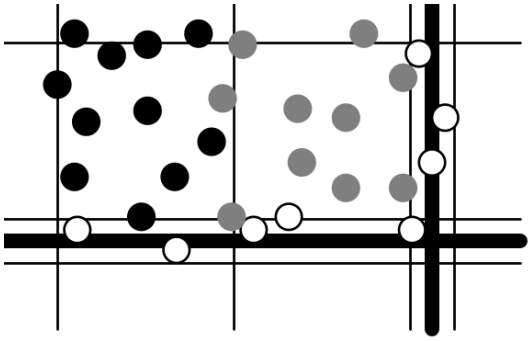

Figura B-6. Representación del conteo de células que tocan líneas inferiores y derechas. En gris, las células que se cuentan dentro del cuadro 13 (10 células); en negro las células que se cuentan dentro del cuadro 14 (11

células); y en blanco, las células que no hacen parte del conteo.

e. Los *cluster* de células se cuentan como una unidad (Figura B-7).

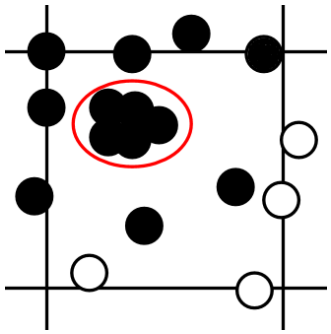

Figura B-7. Representación de un *cluster* de células. En la figura se cuentan 9 células.

f. Sólo se cuentan las células. La presencia de otras sustancias, como sales, polvo, etc., no se deben contar (Figura B-8).

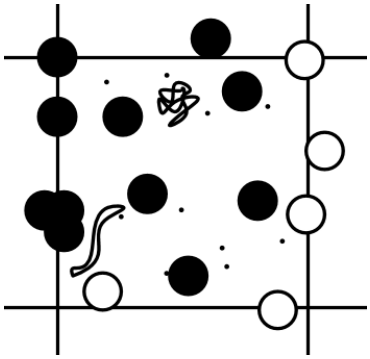

Figura B-8. Representación de sustancias que no se deben confundir y contar como células. En la figura se cuentan 9 células.

10. Anotar el número de células contadas para cada foto y llenar la Tabla B-1.

Tabla B-1. Conteo celular para la muestras R1, R2 y R3

Cuadro	R1.1	R1.2	R1.3	R1.4	R2.1	R2.2	R2.3	R2.4	R3.1	R3.2	R3.3	R3.4
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												

14												
15												
16												
Total												

11. Para el cálculo de la concentración aplicar la fórmula:

$$Concentración\ \left(\frac{cel}{mL}\right) = \frac{número\ de\ células}{volumen\ (mL)}$$

Donde el volumen de un cuadrante = 0,0001 mL

12. Calcular el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para todas las muestras.

Tabla B-2. Resumen del conteo celular

Promedio	Desviación	%CV

Referencias

[1] Celoromics. “Guía de conteo celular”. En línea. Último acceso: 7 de junio de 2016. http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf.

C. Anexo: Determinación de glucosa en cultivos de microalgas.

Principio del método

El ácido 3,5-dinitrosalicílico reacciona con el grupo aldehído terminal de la glucosa, el cual le confiere características reductoras. La glucosa reduce el ácido 3,5-dinitrosalicílico en medio alcalino formando ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, un compuesto aromático con máxima absorción a 540 nm y que posee un característico color anaranjado. La densidad óptica del color producido es directamente proporcional a la cantidad de glucosa en la solución [236]–[239]. La figura C-1 esquematiza la reacción.

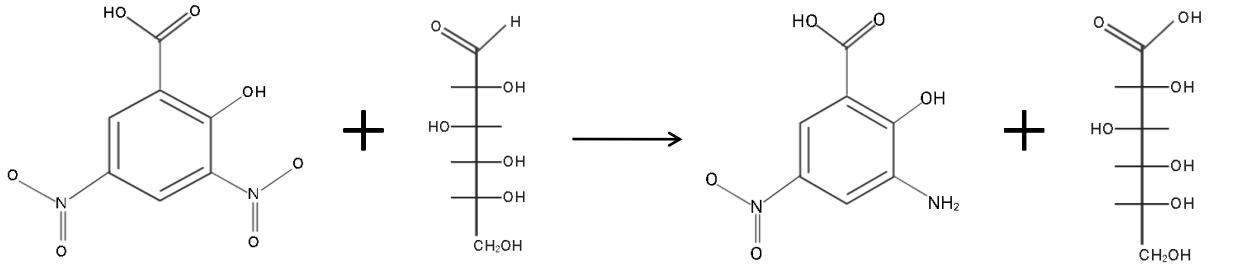

Figura C-1: reacción de la glucosa con el ácido 3,5-dinitrosalicílico [240].

Materiales

- Tubos de reacción tipo Eppendorf® de 2,0 mL.
- Balón aforado con capacidad para 5 mL.
- Puntas para micropipetas de 10, 100 y 1000 µL.
- Microplaca de 96 pozos transparente sin tapa.
- Gradilla para Eppendorf® 2,0 mL.
- Espátula, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas)
- Toallas de papel absorbente.
- Papel filtro Whatman #1.

- Embudo.
- Frasco ámbar de 10 mL.
- Termómetro.

Reactivos

- Glucosa (Panreac ®)
- Acido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma)
- Agua destilada desionizada
- Tartrato de sodio y potasio (Merck ®)
- Hidróxido de sodio (Merck ®)
- Hielo

Equipos

- Balanza analítica AB204 (Mettler Toledo)
- Juego de micropipetas de rangos de 20 a 200 µL y 100 a 1000 µL.
- Espectrofotómetro Cytation 3 (BioTek®).
- Plancha de calentamiento.
- Cronómetro.

Preparación de soluciones:

Reactivo DNS:

Para preparar 10 mL de reactivo DNS, en un balón aforado agregar 2 mL de agua destilada desionizada; 0,1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico; 0,3 gramos de tartrato de sodio y potasio y 0,16 gramos de hidróxido de sodio, mezclar en vórtex hasta disolver completamente, aforar, filtrar, transferir a un recipiente ámbar y almacenar en oscuridad a temperatura ambiente.

Patrón de calibración:

Pesar aproximadamente 0,5 gramos de glucosa, registrar el peso en la bitácora de laboratorio, disolver con 20 mL de agua destilada desionizada y aforar a 100 mL para obtener una solución de glucosa de concentración 5 $g \cdot L^{-1}$.

Preparación de la curva de calibración

En un ensayo típico, en un tubo de reacción de 2 mL, se lleva a cabo la siguiente metodología por triplicado:

Agregar el volumen de patrón de calibración y de agua especificados en la Tabla C-1, con ayuda de una micropipeta.

#	Patrón (µL)	Agua (µL)
1	500	0
2	450	50
3	400	100
4	350	150
5	300	200
6	250	250
7	200	300
8	150	350
9	100	400
10	50	450
Blanco	0	500

Tabla C-1: Mezclas para la elaboración de estándares de la curva de calibración para determinación de glucosa.

- Transferir 100 µL de cada una de las mezclas de la Tabla C-1 a nuevos tubos de reacción y marcar según corresponda para identificarlos.
- Agregar a cada uno de ellos 100 µL de reactivo DNS.
- La reacción inicia cuando los tubos de reacción con la mezcla son calentados a 100 °C. Esta temperatura debe ser mantenida durante 5 minutos.
- Al cumplir el tiempo, detener la reacción mediante choque térmico en hielo.
- Agregar 300 µL de agua destilada desionizada y mezclar en vórtex, las muestras pueden ser almacenadas en la nevera hasta el momento de su lectura que en todo caso no debe ser superior a 24 horas.

- Para realizar la lectura de la absorbancia de las muestras, se debe encender el equipo Cytation 3 (BioTek®) y precalentar a 25 ºC.
- Cuando se alcance la temperatura, leer la absorbancia a 540 nm de una placa de 96 pozos vacía y sin tapa y utilizar aquellas celdas donde la absorbancia leída sea menor que 0,08, guardar registro de las absorbancias de los pozos vacíos.
- Depositar en cada pozo de la placa 100 µL de cada una de las mezclas de reacción
- Leer la absorbancia a 540 nm a 25 °C.
- Restar a las absorbancias de la muestra y el blanco, las absorbancias dadas por la caja vacía.
- Restar a las lecturas de las absorbancias de las muestras, la lectura de absorbancia del blanco.

Finalmente se elabora la gráfica concentración de glucosa ($g \cdot L^{-1}$) vs. Absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la gráfica (Figura C-2).

El contenido de glucosa en el medio de cultivo se determina a partir de la curva de calibración elaborada previamente, por medio de la siguiente fórmula:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Donde:

x = Concentración de glucosa en el medio en $g \cdot L^{-1}$.
y = Promedio de las absorbancias de las muestras (restando el blanco) a 540 nm.
b = intercepto de la curva de calibración.
m = pendiente de la curva de calibración ($g \cdot L^{-1}$).

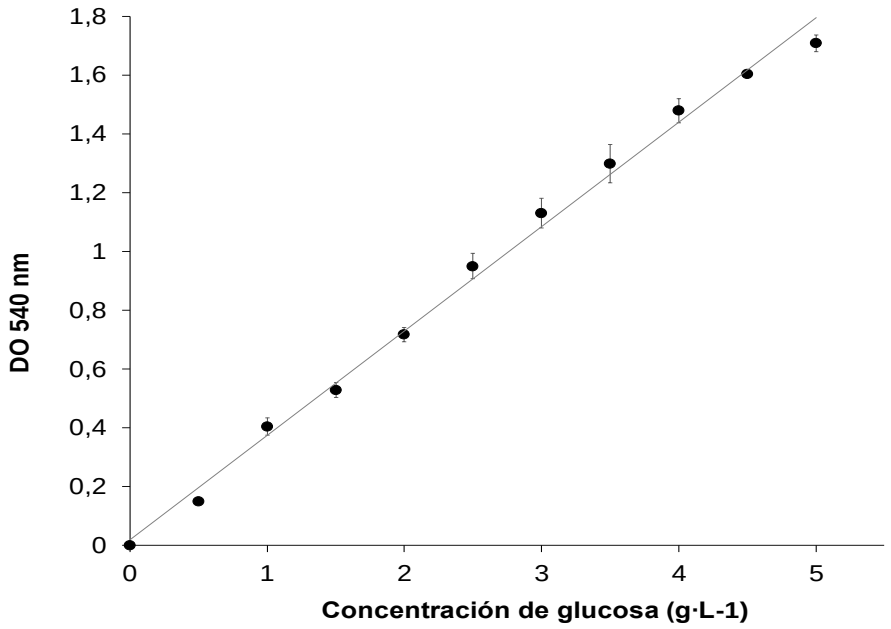

Figura C-2: Curva de calibración Absorbancia a 540 nm en función de la cantidad de glucosa en el medio de cultivos, n=3, Barra error: 1 Desv. Estándar

De esta manera la curva de calibración que se ajustó es la descrita por la Ecuación C-1, donde X es la concentración de glucosa ($g \cdot L^{-1}$) y DO_{540} es la densidad óptica leída a 540 nm.

$$X = \frac{DO_{540} - 0{,}0178}{0{,}3552} R^2 = 0.9947 \qquad \text{Ecuación C-1}$$

Cuantificación de glucosa en el medio de cultivo

- Centrifugar cada una de las alícuotas extraídas diariamente del cultivo durante 5 minutos a 2500 x g.
- Transferir 100 µL del sobrenadante a un nuevo tubo de reacción tipo Eppendorf y marcar según corresponda para identificarlos.
- Agregar a cada uno de los tubos de reacción 100 µL de reactivo DNS.
- Incluir en el ensayo un blanco de reactivos (100 µL de medio BBM con 100 µL de reactivo DNS).

- Calentar los tubos durante 5 minutos a 100 °C.
- Detener la reacción mediante choque térmico en hielo.
- Agregar 300 µL de agua destilada desionizada y mezclar en vórtex.
- Medir la absorbancia a 540 nm a 25°C.
- Aplicar la Ecuación C-1 para hallar la concentración de glucosa en la muestra estudiada.

D. Anexo: Determinación de glicerol en cultivos de microalgas.

Principio del método

Para monitorear el consumo de glicerol en cultivos de microalgas se adaptó la metodología propuesta por Horstkotte *et al.* [241]. El método está basado en las reacciones de Malaprade y Hantzsch. En un primer paso, el glicerol es oxidado con metaperyodato de sodio para obtener formaldehido y ácido fórmico. La Figura D-1 esquematiza esta reacción:

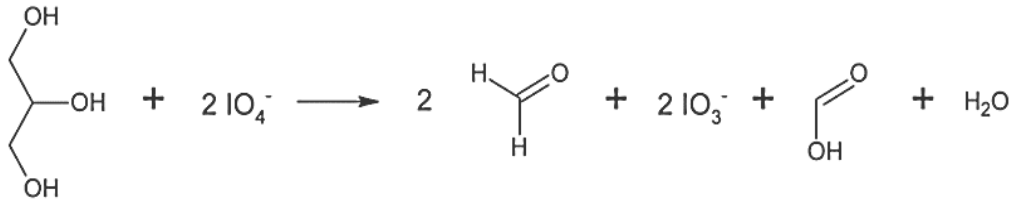

Figura D-1: Esquema de la reacción de Malaprade. Tomado de Kuhn [242].

El siguiente paso es hacer reaccionar el formaldehído con acetilacetona y acetato de amonio que forman un complejo coloreado llamado 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL) (reacción de Hantzsch), que puede ser detectado en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm; la figura D-2 esquematiza este proceso.

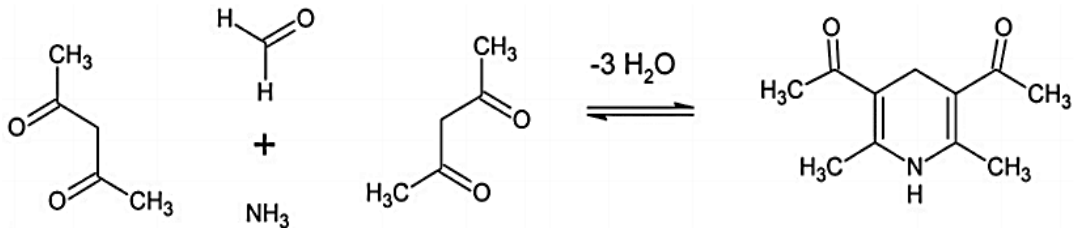

Figura D-2: Esquema de la reacción de Hantzsch. Tomado de Kuhn [242].

Interferencias

El método puede verse afectado por restos de jabón provenientes del lavado de material. Se recomienda el uso de material nuevo para su desarrollo o perfectamente lavado.

Materiales

- Microplaca de 96 pozos transparente sin tapa.
- Gradilla para Eppendorf® 2,0 mL.
- Espátula, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas)
- Toallas de papel absorbente.
- Frasco ámbar de 10 mL.
- Reactivos
- Glicerol 95% (J.T. Baker)
- Agua desionizada
- Acetato de Amonio (Merck)
- Ácido acético glacial (MallinKrodt)
- Metaperyodato de sodio (Merck)
- Acetilacetona (Sigma)
- Medio Basal Bold para cultivo de microalgas (Anexo A)
- Fosfato de potasio monobásico (Merck)
- Fosfato de potasio dibásico (Merck)

Equipos

- Balanza analítica AB204 (Mettler Toledo)
- Juego de micropipetas de rangos de 20 a 200 µL y 100 a 1000 µL.
- Espectrofotómetro Cytation 3 (BioTek®)
- Cabina de extracción de gases

Preparación de soluciones:

- **Buffer fosfatos 0,1 M pH 6:**

Para la preparación de esta solución tampón, se siguió la metodología descrita en el portal web AAT Bioquest® [243]:

- Para preparar 1L de solución tampón medir 800 mL de agua en un recipiente volumétrico.
- Agregar 2,405 g de K_2HPO_4.

- Agregar 11,73 g de KH_2PO_4.
- Mezclar para disolver las sales y medir pH. Ajustar el pH con K_2HPO_4 si se requiere basificar o KH_2PO_4 si es necesario acidificar.
- Aforar a 1 L.

- **Reactivo I:**

Deberá contener los siguientes reactivos en las concentraciones indicadas:
- Acetilacetona: 0,2% v/v
- Acetato de amonio: 2 Molar
- Buffer fosfato: 4 mM
- Ácido acético glacial 0,3% v/v

Para preparar 5 mL de reactivo I, en un balón aforado agregar 2 mL de agua destilada desionizada. Agregar 0,7708 gramos de acetato de amonio y mezclar por agitación hasta observar la disolución de la sal. En una cabina de extracción de gases agregar 10 µL de acetilacetona, 200 µL de buffer fosfatos 0,1 M, 15 µL de ácido acético glacial, aforar y mezclar por agitación. Transferir a un recipiente ámbar, mezclar en vórtex durante 60 segundos, y almacenar en oscuridad a temperatura ambiente.

- **Reactivo II:**

Para preparar 5 mL de reactivo II, en un balón aforado agregar 2 mL de agua destilada desionizada. Agregar 0,1 gramos de metaperyodato de sodio. Aforar y mezclar por agitación. Transferir a un recipiente ámbar, mezclar en vórtex durante 60 segundos, y almacenar en oscuridad a temperatura ambiente.

NOTA: el buffer fosfato es estable hasta por seis meses si se almacena a temperaturas de -20 °C; se recomienda distribuir en alícuotas y descongelar solamente las que vayan a ser utilizadas. Los reactivos I y II son estables hasta por 5 días.

Patrón de calibración:

Pesar aproximadamente 0,526 gramos de glicerol al 95% de pureza, registrar el peso en la bitácora de laboratorio. Disolver con 20 mL de agua destilada desionizada y aforar a 100 mL para obtener una solución de glicerol de concentración 5 $g \cdot L^{-1}$.

Preparación de la curva de calibración:

En un ensayo típico, en un tubo de reacción tipo Eppendorf de 2 mL, se lleva a cabo la siguiente metodología por triplicado:

Agregar el volumen de patrón de calibración y de agua especificados en la Tabla D-1, con ayuda de una micropipeta.

#	Patrón (µL)	Agua (µL)
1	500	0
2	450	50
3	400	100
4	350	150
5	300	200
6	250	250
7	200	300
8	150	350
9	100	400
10	50	450
Blanco	0	500

Tabla D-1: Mezclas para la elaboración de estándares de la curva de calibración para determinación de glicerol.

- Encender el equipo Cytation 3 (BioTek®) y precalentar a 44 ºC.
- Cuando se alcance la temperatura, leer la absorbancia a 410 nm de una placa de 96 pozos vacía y sin tapa y utilizar aquellas celdas donde la absorbancia leída sea menor que 0,08; guardar registro de las absorbancias de los pozos vacíos.
- Depositar en cada celda 32 µL de cada una de las mezclas de reacción y agregar 20 µL de agua desionizada.

- Agregar 50 µL de Reactivo y mezclar con la micropipeta tres veces.
- Colocar la placa al equipo Cytation 3 (BioTek®) y adicionar 25 µL de Reactivo II y mezclar 3 veces con la micropipeta. Este paso debe hacerse de forma rápida puesto que la absorbancia deberá ser leída a 410 nm a 44 °C entre el tiempo 1':15" y 1':40" después de adicionar el reactivo II.
- Restar a las absorbancias de la muestra y el blanco, las absorbancias dadas por la caja vacía.
- Restar a las lecturas de las absorbancias de las muestras, la lectura de absorbancia del blanco.

Finalmente se elabora la gráfica concentración de glicerol $g \cdot L^{-1}$ vs. Absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la gráfica.

El contenido de glicerol en el medio de cultivo se determina a partir de la curva de calibración elaborada previamente, por medio de la siguiente fórmula:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Donde

x = Concentración de glicerol en el medio en $g \cdot L^{-1}$.

y = Promedio de las absorbancias de las muestras (restando el blanco) a 410 nm.

b = intercepto de la curva de calibración.

m = pendiente de la curva de calibración ($g \cdot L^{-1}$).

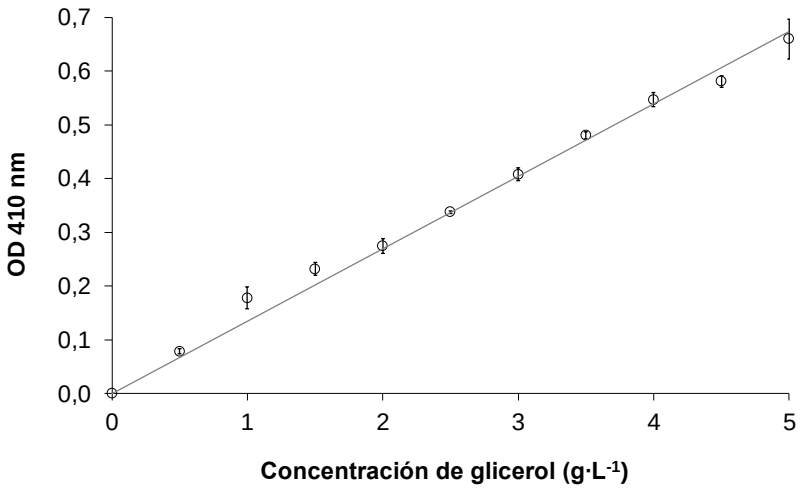

Figura D-3: Curva de calibración Absorbancia a 410 nm en función de la cantidad de glucosa en el medio de cultivos, n=3, Barra error: 1 Desv. Estándar

De esta manera la curva de calibración que se ajustó es la descrita por la Ecuación D-1, donde X es la concentración de glicerol ($g \cdot L^{-1}$) y DO_{410} es la densidad óptica leída a 410 nm.

$$X = \frac{DO_{410} - 0{,}0229}{0{,}1281} \quad R^2 = 0.9951 \qquad \text{Ecuación D-1}$$

Cuantificación de glicerol en el medio de cultivo

- Centrifugar cada una de las alícuotas extraídas diariamente del cultivo durante 5 minutos a 2500 x g.
- Transferir 32 µL del sobrenadante a una celda de una placa de 96 pozos.
- Llevar a cabo la adición de reactivos según como se describe en la sección “Preparación de la curva de calibración”.
- Incluir en el ensayo un blanco de reactivos.
- Medir la absorbancia a 410 nm a 44 °C entre el tiempo 1’:15” y 1’:40” después de adicionar el reactivo II.

E. Anexo: Determinación del contenido de proteínas en microalgas.

Principio del método

La metodología propuesta por el método Bradford [220] determina indirectamente el contenido de proteína en una muestra. El método se basa en la utilización del azul brillante de Coomassie, un compuesto catiónico inestable de color marrón-rojizo. El reactivo se encuentra disuelto en medio ácido para facilitar que las proteínas cargadas positivamente reciban un par de electrones del azul de Coomasie, ambos compuestos se unen mediante enlaces iónicos y fuerzas de Van de Waals. Cuando el colorante se une a las proteínas presentes, las moléculas del azul de Coomasie se estabilizan y se torna a un color azul, la máxima absorbancia del complejo se da a 595 nm, siendo la intensidad de color directamente proporcional al contenido de proteína.

Materiales

- Tubos de reacción tipo Eppendorf® de 2,0 mL
- Balón aforado con capacidad para 100 mL
- Balón aforado con capacidad para 1000 mL
- Vaso de precipitado de 500 mL
-Puntas para micropipetas de 10, 100 y 1000 µL
-Microplaca de 96 pozos transparente sin tapa
-Gradilla para Eppendorf® 2,0 mL
-Espátula
- Platos para pesaje
- Equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas)
- Papel filtro Whatman #1
- Embudo de vidrio

- Frasco ámbar de 50 mL

Reactivos

- Microalga liofilizada
- Reactivo de Bradford (Dye Reagent Concentrate kit Bio-Rad® Protein Assay)
- Albúmina
- Cloruro de Sodio
- Cloruro de Potasio
- Fosfato de sodio dibásico
- Fosfato monobásico de potasio
- Agua destilada desionizada

Equipos

- Balanza analítica AB204 (Mettler Toledo)
- Juego de micropipetas de rangos de 20 a 200 µL y 100 a 1000 µL
- Espectrofotómetro Cytation 3 (BioTek®)

Preparación de soluciones

- **Patrón de calibración:** Pesar aproximadamente 0,130 gramos de albúmina, registrar el peso en la bitácora de laboratorio, disolver con 20 mL de agua destilada desionizada y aforar a 100 mL para obtener una solución de albúmina de concentración 1,3 $mg \cdot mL^{-1}$.

- **Buffer *Phosphate Buffered Saline* (PBS):** en un vaso de precipitado con capacidad de 500 mL agregar los reactivos en las siguientes cantidades: NaCl: 8,06 g; KCl: 0,22 g; Na_2HPO_4: 1,15 g; KH_2PO_4: 0,2 g. Disolver con 100 mL de agua y aforar a 1000 mL.

- **Reactivo de Bradford diluido:** Preparar una solución de reactivo de Bradford diluyendo 1 parte de reactivo en 4 partes de agua destilada desionizada. Filtrar y almacenar en frasco ámbar.

Preparación de la curva de calibración

En un ensayo típico, en un tubo de reacción de 2 mL, se lleva a cabo la siguiente metodología por triplicado [244]:

- Agregar el volumen de patrón de calibración y de agua especificados en la Tabla E-1, con ayuda de una micropipeta a tubos de reacción tipo Eppendorf® debidamente rotulados.

#	Volumen de Agua	Volumen de patrón	Conc. final aproximada de albúmina (mg/mL)
1	1000	0	0,000
2	962	38	0,05
3	923	77	0,10
4	885	115	0,15
5	846	154	0,20
6	808	192	0,25
7	769	231	0,30
8	731	269	0,35
9	692	308	0,40

Tabla E-1: Mezclas para la elaboración de estándares de la curva de calibración para determinación de proteínas.

- Encender el equipo Cytation 3 (BioTek®) y precalentar a 25 ºC.
- Cuando se alcance la temperatura, leer la absorbancia a 595 nm de una placa de 96 pozos vacía y sin tapa y utilizar aquellas celdas donde la absorbancia leída sea menor que 0,08, guardar registro de las absorbancias de los pozos vacíos.
- Depositar en cada celda 10 µL de cada una de las mezclas de reacción.
- Agregar 200 µL de reactivo de Bradford diluido y mezclar 3 veces con la micropipeta.
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y leer la absorbancia a 595 nm a 25 °C. El compuesto coloreado es estable por 1 hora.

- Restar a las absorbancias de la muestra y el blanco, las absorbancias dadas por la caja vacía.
- Restar a las lecturas de las absorbancias de las muestras, la lectura de absorbancia del blanco.

Finalmente se elabora la gráfica concentración de proteína total mg·mL^{-1} vs. Absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la gráfica.

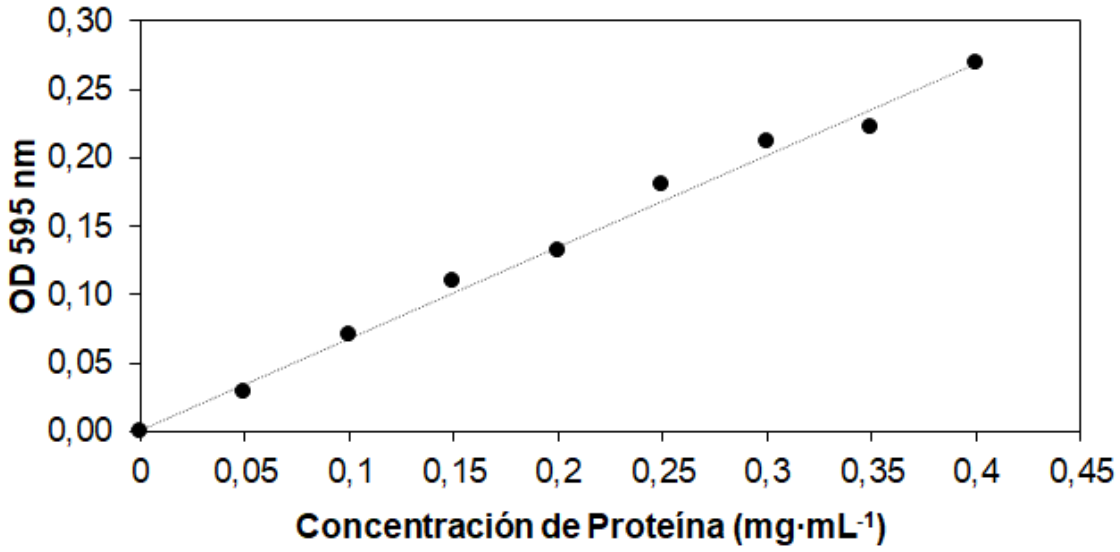

Figura E-1: Curva de calibración Absorbancia a 595 nm en función de la cantidad de proteína. n=3, Barra error: 1 Desv. Estándar

De esta manera la curva de calibración que se ajustó es la descrita por la Ecuación E-1, donde X es la concentración de proteínas (mg·mL^{-1}) y DO_{595} es la densidad óptica leída a 595 nm.

$$X = \frac{DO_{595} - 0{,}0017}{0{,}6696} \quad R^2 = 0.992 \qquad \text{Ecuación E-1}$$

Cuantificación de proteína algal

- Las muestras obtenidas del rompimiento mediante sonicación deben ser centrifugadas y los sobrenadantes transferidos a nuevos Eppendorf debidamente identificados.
- Empleando una micropipeta, transferir 10 µL de los sobrenadantes a celdas de una placa de 96 pozos. Incluir un blanco de reactivos (buffer PBS).
- Agregar a cada muestra 200 µL de reactivo Bradford.
- Medir la absorbancia de las muestras a 595 nm a 25 °C.

El contenido de proteína de la microalga se determina a partir de la curva de calibración elaborada previamente, por medio de la siguiente fórmula:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Donde

x = Concentración de proteína de la microalga en $mg \cdot mL^{-1}$.

y = Promedio de las absorbancias de las muestras (restando el blanco) a 595 nm.

b = intercepto de la curva de calibración.

m = pendiente de la curva de calibración ($mg \cdot mL^{-1}$).

Si dado el caso, la absorbancia de alguna de las muestras se encuentra fuera del rango de las absorbancias de la curva de calibración se debe realzar una dilución de la muestras empleando el buffer PBS y ese factor de dilución debe ser tenido en cuenta dentro del cálculo de la concentración total de proteína de la microalga.

F. Anexo: Determinación del contenido de carbohidratos

Principio del método

La determinación de carbohidratos en biomasa microalgal se realiza siguiendo el método descrito por DuBois [221]. El método detecta todas las clases de carbohidratos incluidos los monos, di, oligo y polisacáridos. Aunque el método detecta casi todos los carbohidratos, la capacidad de absorción de los diferentes carbohidratos varía. Por lo tanto a menos que se sepa que una muestra contiene solo un carbohidrato, los resultados deben expresarse en términos de un carbohidrato de referencia.

En este método el ácido sulfúrico concentrado descompone los polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos en monosacáridos. Las pentosas (azucares de 5 carbonos) luego se deshidratan a furfural y las hexosas (compuestos de 6 carbonos) a hidroximetil furfural. Estos compuestos se condesan con ellos mismos o compuestos fenólicos para producir complejos de color oscuro. El complejo desarrollado absorbe la luz y la absorbancia es proporcional a la concentración de azúcar de una manera lineal, la máxima absorbancia se observa a 485 nm.

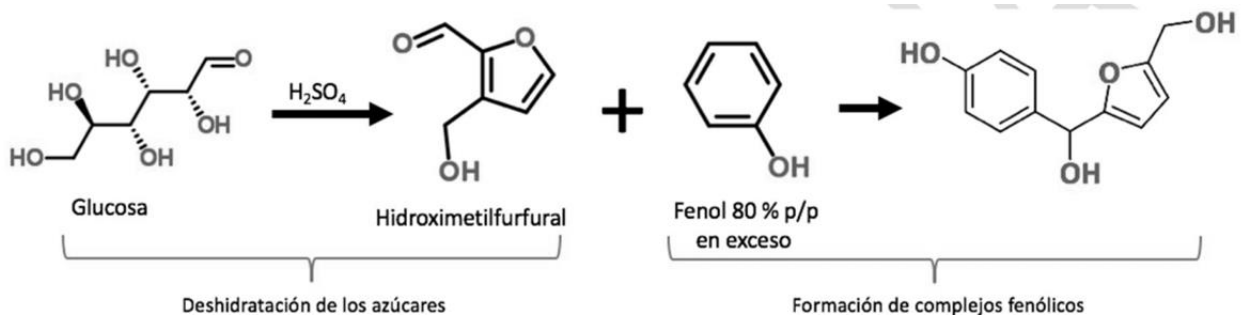

Figura F-1: Mecanismo de reacción del método fenol-sulfúrico para glucosa [245].

Materiales

- Tubos de reacción tipo Eppendorf® de 2,0 mL
- Balón aforado con capacidad para 100 mL
- Puntas para micropipetas de 10, 100 y 1000 µL
- Microplaca de 96 pozos transparente sin tapa
- Gradilla para Eppendorf® 2,0 mL
- Espátula
- Platos para pesaje
- Equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas)
- Reactivos
- Microalga liofilizada
- Ácido sulfúrico concentrado 98% (Panreac ®)
- Fenol (Baker ®)
- D-glucosa (Panreac ®)
- Agua destilada desionizada

Equipos

- Balanza analítica AB204 (Mettler Toledo)
- Juego de micropipetas de rangos de 20 a 200 µL y 100 a 1000 µL
- Espectrofotómetro Cytation 3 (BioTek®)
- Agitador tipo vórtex SBS100 (Select Bioproducts®)
- Microcentrífuga Z-233 M-2 (Hermle®).
- Cabina de extracción de gases

Preparación de soluciones

- **Patrón de calibración:** Pesar aproximadamente 0,1 gramos de glucosa, registrar el peso en la bitácora de laboratorio, disolver con 20 mL de agua destilada desionizada y aforar a 100 mL para obtener una solución de glucosa de concentración 1,0 $mg \cdot mL^{-1}$.

- **Solución de fenol 80% p/p:** En un vaso de precipitado pesar 8,0 gramos de fenol en un frasco ámbar y agregar 2,0 gramos de agua destilada, disolver el fenol agitando fuertemente, transferir a un frasco ámbar y almacenar a temperatura ambiente en oscuridad.

Preparación de la curva de calibración:

En un ensayo típico, en un tubo de reacción de 2 mL, se lleva a cabo la siguiente metodología por triplicado:

- Agregar el volumen de reactivos especificados en la Tabla F-1, con ayuda de una micropipeta a tubos de reacción tipo Eppendorf® debidamente rotulados.
- En una cabina de extracción agregar 100 µL de la solución de fenol al 80% y agitar fuertemente en vórtex durante 60 segundos.
- Adicionar 500 µL de ácido sulfúrico concentrado y agitar fuertemente en vórtex durante 60 segundos.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y en completa oscuridad. El compuesto coloreado que se forma es estable por 36 horas.

#	Volumen de Agua	Volumen de patrón	Fenol (µL)	H_2SO_4 (µL)
1	100	5	100	500
2	95	10	100	500
3	90	15	100	500
4	85	20	100	500
5	80	25	100	500
6	75	30	100	500
7	70	35	100	500
8	65	40	100	500
9	60	45	100	500
Blanco	105	0	100	500

Tabla F-1: Mezclas de reacción para la elaboración de la curva de calibración para determinación de carbohidratos.

Para medir la absorbancia de cada muestra, se sigue los siguientes pasos:

- Encender el equipo Cytation 3 (BioTek®) y precalentar a 25 ºC.
- Cuando se alcance la temperatura, leer la absorbancia a 485 nm de una placa de 96 pozos vacía y sin tapa y utilizar aquellas celdas donde la absorbancia leída sea menor que 0,08, guardar registro de las absorbancias de los pozos vacíos.

- Depositar 100 µL de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos incluido el blanco.
- Medir la absorbancia a 485 nm a 25°C.
- Restar a las absorbancias leídas de las muestras y el blanco, las absorbancias dadas por la caja vacía.
- Restar a las lecturas de absorbancias de las muestras, la lectura de absorbancia del blanco.

Así mismo, para calcular el contenido de glucosa en cada tubo de reacción se sigue la fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Donde:

C_1 = concentración del patrón de glucosa en $\mu g \cdot mL^{-1}$.

V1 = volumen que se adiciono del patrón a cada tubo de reacción (Tabla E-1) en µL.

V2 = volumen total de reacción en µL (705 µL).

C2 = concentración final de glucosa en el tubo de reacción en $\mu g \cdot mL^{-1}$.

Finalmente, se elabora la gráfica: carbohidratos totales (µg/mL) vs. Absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la gráfica.

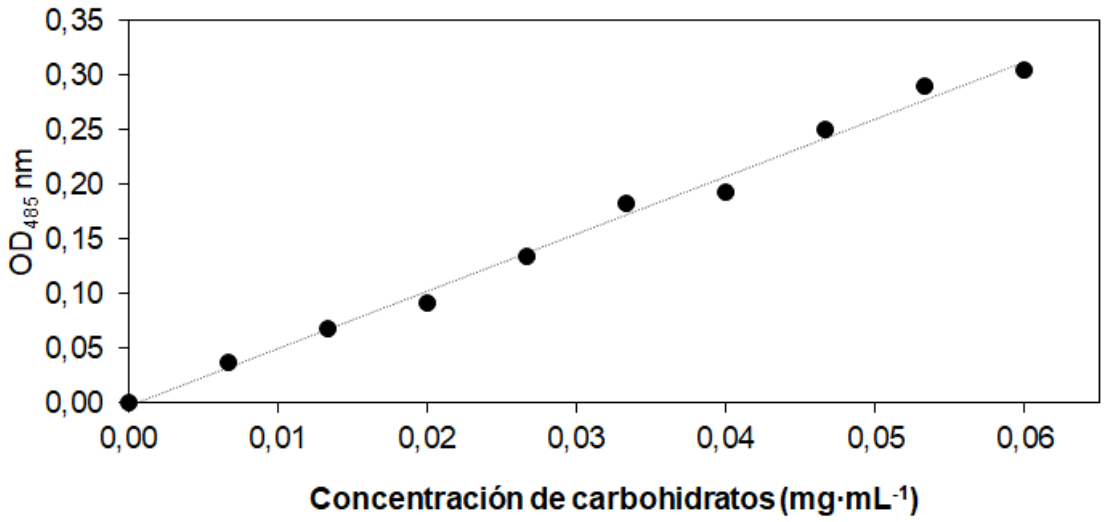

Figura E-1: Curva de calibración Absorbancia a 485 nm en función de la cantidad de carbohidratos. n=3, Barra error: 1 Desv. Estándar

De esta manera la curva de calibración que se ajustó es la descrita por la Ecuación E-1, donde X es la concentración de carbohidratos ($mg \cdot mL^{-1}$) y DO_{485} es la densidad óptica leída a 485 nm.

$$X = \frac{DO_{485} + 0{,}0028}{5{,}2565} R^2 = 0.994 \qquad \text{Ecuación E-1}$$

Cuantificación de carbohidratos algales

- Las muestras obtenidas del rompimiento mediante sonicación deben ser centrifugadas y los sobrenadantes transferidos a nuevos Eppendorf debidamente identificados.
- Empleando una micropipeta, transferir 150 µL de los sobrenadantes a tubos de reacción tipo Eppendorf®. Incluir un blanco de reactivos (105 µL de agua destilada desionizada).
- Llevar a cabo el proceso descrito en la sección “preparación de curva de calibración” para la cuantificación de carbohidratos.
- Depositar 100 µL de cada una de las muestras de reacción en la caja de 96 pozos, incluido un banco de reactivos.
- Medir la absorbancia de las muestras a 485 nm a 25 °C.

El contenido de carbohidratos de la microalga se determina a partir de la curva de calibración elaborada previamente, por medio de la siguiente fórmula:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Donde

x = Concentración de carbohidratos de la microalga en $\mu g \cdot mL^{-1}$.

y = Promedio de las absorbancias de las muestras (restando el blanco) a 485 nm.

b = intercepto de la curva de calibración.

m = pendiente de la curva de calibración ($\mu g \cdot mL^{-1}$).

Si dado el caso, la absorbancia de alguna de las muestras se encuentra fuera del rango de las absorbancias de la curva de calibración se debe realzar una dilución de la muestras empleando agua y ese factor de dilución debe ser tenido en cuenta dentro del cálculo de la concentración total de carbohidratos de la microalga.

G. Anexo: Determinación del contenido de lípidos

Principio del método

Para determinar el contenido de lípidos en microalgas, se utiliza la metodología propuesta por Cheng [222]. La reacción ocurre en dos etapas, la primera involucra un paso de oxidación en el cual los lípidos insaturados reaccionan con el ácido sulfúrico a 90 ° que genera carbocationes, es decir, átomos de carbono cargados positivamente. En la segunda etapa los carbocationes reaccionan con la fosfovainillina, la vainillina es un aldehído poco reactivo que es activada por la presencia de ácido fosfórico mediante la formación de un grupo carbonilo reactivo capaz ce formar complejos con carbocationes. Al producirse esta última reacción se forma un compelo coloreado que absorbe la luz a 540 nm [246].

Materiales

- Tubos de reacción tipo Eppendorf® de 2,0 mL
- Balón aforado con capacidad para 10 mL
- Puntas para micropipetas de 10, 100 y 1000 µL
- Microplaca de 96 pozos transparente sin tapa
- Gradilla para Eppendorf® 2,0 mL
- Espátula
- Platos para pesaje
- Equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas)

Reactivos

- Microalga liofilizada
- Ácido sulfúrico concentrado 98% (Panreac ®)

- Ácido fosfórico concentrado, 97% (Panreac ®)
- Vainillina (99%, Merck)
- Aceite de canola comercial.
- Cloroformo (Panreac®)
- Metanol (Panreac®)

Equipos

- Balanza analítica AB204 (Mettler Toledo)
- Juego de micropipetas de rangos de 20 a 200 µL y 100 a 1000 µL
- Espectrofotómetro Cytation 3 (BioTek®)
- Agitador tipo vórtex SBS100 (Select Bioproducts®)
- Microcentrífuga Z-233 M-2 (Hermle®).
- Cabina de extracción de gases
- Horno INC 116-001 (Memmert®)

Preparación de soluciones

- **Solvente:** Mezclar por partes iguales cloroformo y metanol. Almacenar en nevera en un frasco hermético.

- **Patrón de calibración:** Pesar 0,015 gramos de aceite de canola en un matraz de 10 mL, registrar el peso exacto en la bitácora de laboratorio. Aforar con la mezcla de solventes, agitar y almacenar. La concentración final de este patrón es de 1,5 mg/mL de aceite.

- **Reactivo ácido fosfórico-vainillina:** Pesar 0,2 gramos de vainillina por cada mililitro de ácido fosfórico al 17%. Almacenar en frasco ámbar.

Preparación de la curva de calibración

En un ensayo típico, en un tubo de reacción de 2 mL, se lleva a cabo la siguiente metodología por triplicado:

- En un tubos Eppendorf® de 2,0 mL, colocar con ayuda de micropipeta la cantidad de patrón de calibración especificada en la tabla F-1.
- En una cabina de extracción y con el equipo de protección, agregar 300 µL de ácido sulfúrico concentrado y, agitar fuertemente en un vórtex entre 30 y 60 segundos.
- Calentar los tubos en el horno a 90 °C por 20 minutos para evaporar los solventes y propiciar la reacción de hidrolisis.
- Una vez transcurrido el tiempo de calentamiento, enfriar rápidamente en un baño de hielo.
- Agregar 500 µL del reactivo ácido fosfórico-vainillina y agitar fuertemente en un vórtex entre 30 y 60 segundos, el compuesto que se forma es estable por 1 hora.

#	Patrón(µL)	H_2SO_4 (µL)	H_3PO_4 – Vainillina (µL)
1	10	300	500
2	20	300	500
3	30	300	500
4	40	300	500
5	50	300	500
6	60	300	500

Tabla G-1: Mezclas de reacción para la elaboración para la elaboración de la curva de calibración de lípidos

Para esta metodología, para cada punto de la curva debe elaborarse un blanco; se debe partir de las mismas cantidades especificadas en la Tabla G-1 reemplazando el patrón por volúmenes equivalentes de la mezcla cloroformo:metanol sin el aceite.

Para medir la absorbancia de cada muestra, se sigue los siguientes pasos:

- Encender el equipo Cytation 3 (BioTek®) y precalentar a 25 ºC.
- Cuando se alcance la temperatura, leer la absorbancia a 540 nm de una placa de 96 pozos vacía y sin tapa y utilizar aquellas celdas donde la absorbancia leída sea menor que 0,08, guardar registro de las absorbancias de los pozos vacíos.
- Depositar 100 µL de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos incluido el blanco.
- Medir la absorbancia a 540 nm a 25 °C.

- Restar a las absorbancias leídas de las muestras y el blanco, las absorbancias dadas por la caja vacía.
- Restar a las lecturas de absorbancias de las muestras, la lectura de absorbancia del blanco correspondiente a ese punto de la curva.

Así mismo, para calcular el contenido de lípidos en cada tubo de reacción se sigue la fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Donde:

C_1 = concentración del patrón de lípidos en $\mu g \cdot mL^{-1}$.

V_1 = volumen que se adicionó del patrón a cada tubo de reacción (Tabla G-1) en µL.

V_2 = volumen total de reacción en µL. Que equivale a 800 µL, debido a que los solventes son evaporados en el horno.

C_2 = concentración final de lípidos en el tubo de reacción en $\mu g \cdot mL^{-1}$.

Finalmente, se elaborará la gráfica: lípidos total ($\mu g \cdot mL^{-1}$) *vs.* absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada punto de la gráfica.

Cuantificación de lípidos algales

- Las muestras obtenidas del rompimiento mediante sonicación deben ser centrifugadas y los sobrenadantes transferidos a nuevos Eppendorf debidamente identificados.
- Empleando una micropipeta, transferir 60 µL de los sobrenadantes a tubos de reacción tipo Eppendorf®. Incluir un blanco de reactivos (60 µL de mezcla de solventes).
- Llevar a cabo el proceso descrito en la sección “preparación de curva de calibración” para la cuantificación de lípidos.
- Depositar 100 µL de cada una de las muestras de reacción en la caja de 96 pozos, incluido un banco de reactivos.
- Medir la absorbancia de las muestras a 540 nm a 25 °C.

El contenido de lípidos de la microalga se determina a partir de la curva de calibración elaborada previamente, por medio de la siguiente fórmula:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Donde

x = Concentración de lípidos de la microalga en $\mu g \cdot mL^{-1}$.

y = Promedio de las absorbancias de las muestras (restando el blanco) a 540 nm.

b = intercepto de la curva de calibración.

m = pendiente de la curva de calibración ($\mu g \cdot mL^{-1}$).

Si dado el caso, la absorbancia de alguna de las muestras se encuentra fuera del rango de las absorbancias de la curva de calibración se debe realzar una dilución de la muestras empleando la mezcla de solventes y ese factor de dilución debe ser tenido en cuenta dentro del cálculo de la concentración total de lípido.

H. Anexo: Análisis estadístico

- **GLUCOSA: COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA**

Randomized Complete Block AOV Table for PROTEÍNAS

Source	DF	SS	MS	F	P
Régimen	2	114.27	57.135	0.99	
Concentración	3	529.28	176.426	3.06	0.0476
Error	24	1384.87	57.703		
Total	29				

F crítico Régimen: 3.403
Note: SS are marginal (type III) sums of squares
Grand Mean 57.006 CV 13.33
Relative Efficiency, RCB 1.00

Randomized Complete Block AOV Table for CARBOHIDR

Source	DF	SS	MS	F	P
Régimen	2	18.842	9.4209	1.18	
Concentración	3	229.289	76.4297	9.63	0.0002
Error	24	190.464	7.9360		
Total	29				

F crítico: 3.403 Régimen
Note: SS are marginal (type III) sums of squares
Grand Mean 25.057 CV 11.24
Relative Efficiency, RCB 1.03

Randomized Complete Block AOV Table for LIPIDOS

Source	DF	SS	MS	F	P
RÉGIMEN	2	125.584	62.7918	7.6180	
CONCENTRACIÓN	3	56.816	18.9387	2.2976	0.1031
Error	24	197.820	8.2425		
Total	29				

F crítico: 3.403 Régimen
Note: SS are marginal (type III) sums of squares
Grand Mean 14.994 CV 19.15
Relative Efficiency, RCB 2.20

- **GLICEROL**

Randomized Complete Block AOV Table for PROTEÍNAS

Source	DF	SS	MS	F	P
RÉGIMEN	2	5554.43	2777.21	26.91	
CONCENTRACIÓN	3	282.09	94.03	0.91	0.4503
Error	24	2476.84	103.20		
Total	29				

F crítico: 3.403 Régimen
Note: SS are marginal (type III) sums of squares
Grand Mean 55.482 CV 18.31
Relative Efficiency, RCB 5.71

Randomized Complete Block AOV Table for CARBOHIDR

Source	DF	SS	MS	F	P
RÉGIMEN	2	2854.53	1427.26	46.53	
CONCENTRACIÓN	3	289.23	96.41	3.14	0.0438
Error	24	736.18	30.67		
Total	29				

F crítico: 3.403 Régimen
Note: SS are marginal (type III) sums of squares
Grand Mean 28.375 CV 19.52
Relative Efficiency, RCB 9.28

Randomized Complete Block AOV Table for LIPIDOS

Source	DF	SS	MS	F	P
RÉGIMEN	2	325.219	162.610	17.84	
CONCENTRACIÓN	3	136.923	45.641	5.01	0.0077
Error	24	218.709	9.113		
Total	29				

F crítico: 3.403 Régimen
Note: SS are marginal (type III) sums of squares
Grand Mean 14.486 CV 20.84
Relative Efficiency, RCB 4.06

BIBLIOGRAFÍA

[1] M. G. de Morais and J. A. V. Costa, “Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono,” *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 32, no. 4, pp. 1245–1251, 2008.

[2] M. Ballen Segura, L. Hernandez Rodriguez, D. Parra Ospina, A. Vega Bolaños, and K. Perez, “Using *Scenedesmus sp.* for the Phycoremediation of Tannery Wastewater,” *Tecciencia*, vol. 11, no. 21, pp. 69–75, 2016.

[3] L. Ardila Forero, “Medición de la capacidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* para la remoción de cromo de aguas de curtiembre,” Universidad Nacional de Colombia, 2012.

[4] O. Komolafe, S. B. Velasquez Orta, I. Monje-Ramirez, I. Y. Noguez, A. P. Harvey, and M. T. Orta Ledesma, “Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater,” *Bioresour. Technol.*, vol. 154, pp. 297–304, 2014.

[5] X. Y. Deng *et al.*, “Glucose addition-induced changes in the growth and chemical compositions of a freshwater microalga *Chlorella kessleri*,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 94, no. 4, pp. 1202–1209, 2019.

[6] T. Heredia-Arroyo, W. Wei, and B. Hu, “Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 162, no. 7, pp. 1978–1995, 2010.

[7] A. K. Patel, J. M. Joun, M. E. Hong, and S. J. Sim, “Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae,” *Bioresour. Technol.*, vol. 282, pp. 245–253, Jun. 2019.

[8] B. S. Grama, S. N. Agathos, and C. S. Jeffryes, “Balancing Photosynthesis and Respiration Increases Microalgal Biomass Productivity during Photoheterotrophy on Glycerol,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 4, no. 3, pp. 1611–1618, 2016.

[9] Y. Liang, N. Sarkany, and Y. Cui, “Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 31, no. 7, pp. 1043–1049, 2009.

[10] T. Heredia-Arroyo, W. Wei, R. Ruan, and B. Hu, “Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 35, no. 5, pp. 2245–2253, 2011.

[11] P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert, “Commercial applications of microalgae,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 101, no. 2, pp. 87–96, 2006.

[12] O. P. Ward and A. Singh, “Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production,” *Process Biochem.*, vol. 40, no. 12, pp. 3627–3652, 2005.

[13] R. Kroes, E. J. Schaefer, R. A. Squire, and G. M. Williams, “A review of the safety of DHA45-oil,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 41, no. 11, pp. 1433–1446, 2003.

[14] D. Morales-Sánchez, O. A. Martinez-Rodriguez, J. Kyndt, and A. Martinez, “Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, no. 1, pp. 1–9, 2015.

[15] J. O’Grady and J. A. Morgan, “Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 34, no. 1, pp. 121–125, 2011.

[16] M. Shamzi Mohamed, L. Zee Wei, and A. B. Ariff, “Heterotrophic Cultivation of Microalgae for Production of Biodiesel,” *Recent Pat. Biotechnol.*, vol. 5, no. 2, pp. 95–107, 2011.

[17] J. M. Lv, L. H. Cheng, X. H. Xu, L. Zhang, and H. L. Chen, “Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 17, pp. 6797–6804, 2010.

[18] Y. Liang, N. Sarkany, Y. Cui, and J. W. Blackburn, “Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 17, pp. 6745–6750, 2010.

[19] M. S. Narayan, G. P. Manoj, K. Vatchravelu, N. Bhagyalakshmi, and M. Mahadevaswamy, “Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina platensis*,” *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 56, no. 7, pp. 521–528, 2005.

[20] Ö. Tokuşoglu and M. K. Ünal, “Biomass nutrient profiles of three microalgae:

Spirulina platensis, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrisis galbana*," *J. Food Sci.*, vol. 68, no. 4, pp. 1144–1148, 2003.

[21] M. C. Cerón García, J. M. Fernandez Sevilla, F. G. Acien Fernandez, E. Molina Grima, and F. García Camacho, "Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol : growth rate and fatty acid profile," *J. Appl. Phycol. 12*, vol. 12, pp. 239–248, 2000.

[22] K. L. Yeh and J. S. Chang, "Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels," *Biotechnol. J.*, vol. 6, no. 11, pp. 1358–1366, Nov. 2011.

[23] R. D. Ashby, D. K. Y. Solaiman, and G. D. Strahan, "Efficient utilization of crude glycerol as fermentation substrate in the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) Biopolymers," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 88, no. 7, pp. 949–959, 2011.

[24] A. Bahadar and M. Bilal Khan, "Progress in energy from microalgae: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 27, pp. 128–148, 2013.

[25] Y. Chisti, "Biodiesel from microalgae beats bioethanol," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 3, pp. 126–131, 2008.

[26] S. N. Naik, V. V. Goud, P. K. Rout, and A. K. Dalai, "Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 2, pp. 578–597, 2010.

[27] N. R. Moheimani, M. P. McHenry, K. de Boer, and P. Bahri, *Biomass and Biofuels from Microalgae*, vol. 2. 2015.

[28] L. Moreno-Garcia, K. Adjallé, S. Barnabé, and G. S. V. Raghavan, "Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 76, no. January, pp. 493–506, 2017.

[29] Y. Guan, M. Deng, X. Yu, and W. Zang, "Two stage photo-production of hydrogen by marine green algae *Platymonas subcordiformis*.," *Biochem Eng J*, vol. 19, pp. 69–73, 2004.

[30] T. V. Laurinavichene, S. N. Kosourov, M. L. Ghirardi, M. Seibert, and A. A. Tsygankov, "Prolongation of H2 photoproduction by immobilized, sulfur-limited *Chlamydomonas reinhardtii* cultures," *J. Biotechnol.*, vol. 134, no. 3–4, pp. 275–277, 2008.

[31] C. Tian, B. Li, Z. Liu, Y. Zhang, and H. Lu, “Hydrothermal liquefaction for algal biorefinery: A critical review,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 38, pp. 933–950, 2014.

[32] S. Leow, J. R. Witter, D. R. Vardon, B. K. Sharma, J. S. Guest, and T. J. Strathmann, “Prediction of microalgae hydrothermal liquefaction products from feedstock biochemical composition,” *Green Chem*, vol. 17, no. 6, pp. 3584–3599, 2015.

[33] D. Zhou, L. Zhang, S. Zhang, H. Fu, and J. Chen, “Hydrothermal liquefaction of macroalgae *Enteromorpha prolifera* to bio oil,” *Energy and Fuels*, vol. 24, no. 7, pp. 4054–4061, 2010.

[34] U. Jena, K. C. Das, and J. R. Kastner, “Comparison of the effects of Na_2CO_3, $Ca_3(PO_4)_2$, and NiO catalysts on the thermochemical liquefaction of microalga *Spirulina platensis*,” *Appl. Energy*, vol. 98, pp. 368–375, 2012.

[35] P. Biller and A. B. Ross, “Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 215–225, 2011.

[36] P. Biller, R. Riley, and A. B. Ross, “Catalytic hydrothermal processing of microalgae: Decomposition and upgrading of lipids,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 7, pp. 4841–4848, 2011.

[37] P. Duan, B. Wang, and Y. Xu, “Catalytic hydrothermal upgrading of crude bio-oils produced from different thermo-chemical conversion routes of microalgae,” *Bioresour. Technol.*, vol. 186, pp. 58–66, 2015.

[38] ASTM, “D5291-16, Standard Test Methods for Instrumental Determination of Carbon, Hydrogen, and Nitrogen in Petroleum Products and Lubricants.” ASTM, West Conshohocken, PA, 2016.

[39] N. Neveux *et al.*, “Pre- and post-harvest treatment of macroalgae to improve the quality of feedstock for hydrothermal liquefaction,” *Algal Res.*, vol. 6, pp. 22–31, Oct. 2014.

[40] International Energy Agency, “Key world energy statistics,” 2019. .

[41] International Energy Agency, “CO_2 emissions from fuel combustion: Overview (2017 edition),” 2017.

[42] A. Vengoechea, “Las cumbres de las naciones unidas sobre cambio climático,” 2012.

[43] Instituto de Hidrología Meteorología y Estudios Ambientales, *Primera Comunicación Nacional ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático*. 2001.

[44] International Energy Agency, "CO_2 emmisions from fuel combustion highlights," 2019.

[45] Congreso de la República, "Ley 788," *Diario Oficial No. 45.046*, 2002. [Online]. Available: http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=7260.

[46] L. M. Serrano Bermúdez, "Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel," Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2012.

[47] R. M. Herrera, "Evaluación de los exopolisacáridos producidos por una cepa nativa de cianobacteria *Nostoc sp.* como sustrato en la producción de bioetanol," p. 105, 2012.

[48] J. Moncada, J. J. Jaramillo, J. C. Higuita, C. Younes, and C. A. Cardona, "Production of bioethanol using *Chlorella vulgaris* cake: A technoeconomic and environmental assessment in the colombian context," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, no. 47, pp. 16786–16794, 2013.

[49] A. Rojan, P. J.; Anisha, G. S.; Nampoothiri, K. M.; Pandey, "Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol.," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 186–196, 2011.

[50] J. C. Quinn, A. Hanif, S. Sharvelle, and T. H. Bradley, "Microalgae to biofuels: Life cycle impacts of methane production of anaerobically digested lipid extracted algae," *Bioresour. Technol.*, vol. 171, pp. 37–43, 2014.

[51] F. Passos, M. Solé, J. García, and I. Ferrer, "Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment," *Appl. Energy*, vol. 108, pp. 168–175, 2013.

[52] C. Santibáñez, M. T. Varnero, and M. Bustamante, "Residual Glycerol from Biodiesel Manufacturing, Waste or Potential Source of Bioenergy: A Review," *Chil. J. Agric. Res.*, vol. 71, no. 3, pp. 469–475, 2011.

[53] K. K. Lum, J. Kim, and X. G. Lei, "Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed," *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, vol. 4, no. 1, p. 53, 2013.

[54] M. J. Griffiths, *Microalgal cultivation reactor systems*, vol. 6, no. 126. Taylor &

Francis Group, 2013.

[55] N. F. Santos-Sánchez, R. Valadez-Blanco, B. Hernández-Carlos, A. Torres-Ariño, P. C. Guadarrama-Mendoza, and R. Salas-Coronado, “Lipids rich in ω-3 polyunsaturated fatty acids from microalgae,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 20, pp. 8667–8684, 2016.

[56] I. Priyadarshani and B. Rath, “Commercial and industrial applications of micro algae – A review,” *J. Algal Biomass Util.*, vol. 3, no. 4, pp. 89–100, 2012.

[57] M. Koller, A. Muhr, and G. Braunegg, “Microalgae as versatile cellular factories for valued products,” *Algal Res.*, vol. 6, no. PA, pp. 52–63, 2014.

[58] A. E. Harman-Ware *et al.*, “Microalgae as a renewable fuel source: Fast pyrolysis of Scenedesmussp.,” *Renew. Energy*, vol. 60, pp. 625–632, Dec. 2013.

[59] R. Thilakaratne, M. M. Wright, and R. C. Brown, “A techno-economic analysis of microalgae remnant catalytic pyrolysis and upgrading to fuels,” *Fuel*, vol. 128, pp. 104–112, Jul. 2014.

[60] E. B. Connelly, L. M. Colosi, A. F. Clarens, and J. H. Lambert, “Life cycle assessment of biofuels from algae hydrothermal liquefaction: The upstream and downstream factors affecting regulatory compliance,” *Energy and Fuels*, vol. 29, no. 3, pp. 1653–1661, 2015.

[61] H. Xu, X. Miao, and Q. Wu, “High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters,” *J Biotechno*, vol. 126, pp. 499–507, 2006.

[62] I. T. D. Cabanelas *et al.*, “From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol,” *Appl. Energy*, vol. 109, pp. 283–290, 2013.

[63] V. Kumar, M. Muthuraj, B. Palabhanvi, A. K. Ghoshal, and D. Das, “High cell density lipid rich cultivation of a novel microalgal isolate *Chlorella sorokiniana* FC6 IITG in a single-stage fed-batch mode under mixotrophic condition,” *Bioresour. Technol.*, vol. 170, pp. 115–124, 2014.

[64] R. Praveenkumar *et al.*, “Improved biomass and lipid production in a mixotrophic culture of *Chlorella sp.* KR-1 with addition of coal-fired flue-gas,” *Bioresour. Technol.*, vol. 171, pp. 500–505, 2014.

[65] J. M. Girard *et al.*, “Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production,” *Algal Res.*, vol. 5, no. 1, pp. 241–248, 2014.

[66] Z. Chi, D. Pyle, Z. Wen, C. Frear, and S. Chen, “A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation,” *Process Biochem.*, vol. 42, no. 11, pp. 1537–1545, 2007.

[67] Y. H. Chen and T. H. Walker, “Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 33, no. 10, pp. 1973–1983, 2011.

[68] I. Shihira and R. W. Krauss, *Chlorella. Physiology and taxonomy of forty-one isolates*. Maryland, 1965.

[69] P. J. Syrett and H. A. Wong, “The fermentation of glucose by Chlorella vulgaris,” *Biochem. J.*, vol. 89, no. 1958, pp. 308–315, 1963.

[70] M. Vinayakumar and E. Kessler, “Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella* - X. Products of glucose fermentation,” *Arch. Microbiol.*, vol. 103, no. 1, pp. 13–19, 1975.

[71] E. P. Karlander and R. W. Krauss, “Responses of Heterotrophic Cultures of *Chlorella vulgaris* Beyerinck to Darkness and Light. II. Action Spectrum for and Mechanism of the Light Requirement for Heterotrophic Growth,” *Plant Physiol.*, vol. 41, no. 1, pp. 7–14, 1966.

[72] D. J. Griffiths, C. L. Thresher, and H. E. Street, “The heterotrophic nutrition of *Chlorella vulgaris* (Brannon No. 1 strain),” *Ann. Bot.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–11, 1960.

[73] A. Kamiya and W. Kowallik, “Photoinhibition of glucose uptake in *Chlorella*,” *Plant Cell Physiol.*, vol. 28, no. April, pp. 611–619, 1987.

[74] K. Chojnacka and A. Noworyta, “Evaluation of *Spirulina sp.* growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 34, no. 5, pp. 461–465, 2004.

[75] M. E. de Swaaf, T. C. de Rijk, G. Eggink, and L. Sijtsma, “Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Crypthecodinium cohnii*,” *J. Biotechnol.*, vol. 70, no. 1–3, pp. 185–192, Apr. 1999.

[76] W. Q. Xiong W, Li X, Xiang J, “High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 78, pp. 29–36, 2008.

[77] X. Miao and Q. Wu, “Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil,” *Bioresour. Technol.*, vol. 97, no. 6, pp. 841–846, 2006.

[78] B. Cheirsilp and S. Torpee, “Enhanced growth and lipid production of microalgae

under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation," *Bioresour. Technol.*, vol. 110, pp. 510–516, 2012.

[79] F. Yang, M. A. Hanna, and R. Sun, "Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 5, no. 1, p. 13, 2012.

[80] Federación Nacional de Biocombustibles, "Producción y ventas del biodiesel," 2018. [Online]. Available: http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-mostrar_info-titulo-Biodiesel.htm. [Accessed: 01-Jul-2018].

[81] D. Montoya, "Bioprocesos aplicados a la valorización del glicerol residual en la producción de biodiésel," *Palmas*, vol. 31, no. 2, pp. 126–135, 2010.

[82] M. Ayoub and A. Z. Abdullah, "Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 16, no. 5, pp. 2671–2686, 2012.

[83] R. Ciriminna, C. Della Pina, M. Rossi, and M. Pagliaro, "Understanding the glycerol market," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 116, no. 10, pp. 1432–1439, 2014.

[84] Asad-ur-Rehman, R. G. Saman Wijesekara, N. Nomura, S. Sato, and M. Matsumura, "Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 83, no. 7, pp. 1072–1080, 2008.

[85] T. Ito, Y. Nakashimada, K. Senba, T. Matsui, and N. Nishio, "Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 100, no. 3, pp. 260–265, 2005.

[86] R. Jitrwung and V. Yargeau, "Optimization of media composition for the production of biohydrogen from waste glycerol," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 36, no. 16, pp. 9602–9611, 2011.

[87] S. Papanikolaou and G. Aggelis, "Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*," *Lipid Technol.*, vol. 21, no. 4, pp. 83–87, 2009.

[88] G. Mothes, C. Schnorpfeil, and J. U. Ackermann, "Production of PHB from crude glycerol," *Eng. Life Sci.*, vol. 7, no. 5, pp. 475–479, 2007.

[89] J. D. Taconi KA, Venkataramanan KP, "Growth and solvent production by *Clostridium pasteurianu* ATCC® 6013™ utilizing biodiesel- derived crude glycerol as the sole carbon source," *Env. Prog Sustain. Energy*, vol. 28, pp. 100–110, 2009.

[90] S. S. Yazdani and R. Gonzalez, “Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 18, no. 3, pp. 213–219, 2007.

[91] R. G. Wijesekara, N. Nomura, S. Sato, and M. Matsumura, “Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 83, pp. 1072–1080, 2008.

[92] M. González-Pajuelo, I. Meynial-Salles, F. Mendes, J. C. Andrade, I. Vasconcelos, and P. Soucaille, “Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol,” *Metab. Eng.*, vol. 7, no. 5–6, pp. 329–336, 2005.

[93] K. R. Hampy *et al.*, “Glycerol as a supplemental energy source for meat goats,” *Arkansas Anim. Sci. Dep. Rep.*, vol. 553, pp. 65–66, 2007.

[94] Glicerol Bio D, “GlicerolBio una fuente de energía alternativa,” 2016. [Online]. Available: http://gys.com.co/glicerol_biod/. [Accessed: 27-Oct-2016].

[95] J. A. Posada Duque and C. A. Cardona Alzate, “Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la producción de biodiesel,” *Ing. y Univ.*, vol. 14, no. 1, pp. 9–28, 2010.

[96] D. Cárdenas, C. Pulido, Ó. Aragón, F. Aristizábal, Z. Suárez, and D. Montoya, “Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium sp.* mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiésel,” *Rev. Colomb. Ciencias Químico - Farm.*, vol. 35, no. 1, pp. 120–137, 2006.

[97] D. J. Pyle, R. A. Garcia, and Z. Wen, “Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: Effects of impurities on DHA production and algal biomass composition,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 11, pp. 3933–3939, 2008.

[98] W. Kong, H. Song, Y. Cao, H. Yang, S. Hua, and C. Xia, “The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation.,” *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 55, pp. 11620–11630, 2011.

[99] B. J. B. Wood, P. H. K. Grimson, J. B. German, and M. Turner, “Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms,” *Prog. Ind. Microbiol.*, vol. 35, no. C,

pp. 175–183, 1999.

[100] W. B. Kong, H. Yang, Y. T. Cao, H. Song, S. F. Hua, and C. G. Xia, “Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture,” *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 51, no. 1, pp. 62–69, 2013.

[101] L. L. Estévez-Landazábal, A. F. Barajas-Solano, C. Barajas-Ferreira, and V. Kafarov, “Improvement of lipid productivity on *Chlorella vulgaris* using waste glycerol and sodium acetate,” *CTyF - Ciencia, Tecnol. y Futur.*, vol. 5, no. 2, pp. 113–126, 2013.

[102] M. C. Cerón García, M. D. Macías Sánchez, A. ánchez Mirón, F. García Camacho, and E. Molina Grima, “A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source,” *Appl. Energy*, vol. 103, pp. 341–349, 2013.

[103] G. Markou, E. Kougia, I. Kefalogianni, V. Tsagou, D. Arapoglou, and I. Chatzipavlidis, “Effect of glycerol concentration and light intensity on growth and biochemical composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: A study in semi-continuous mode with non-aseptic conditions,” *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 21, 2019.

[104] V. A. R. Huss, G. Huss, and E. Kessler, “Deoxyribonucleic acid reassociation and interspecies relationships of the genus *Chlorella* (Chlorophyceae),” *Plant Syst. Evol.*, vol. 168, no. 1–2, pp. 71–82, 1989.

[105] V. A. R. Huss, A. Hehenberger, and E. Kessler, “Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of the genus *Chlorella* - III. *Chlorella fusca* and *Chlorella kessleri*,” *Arch. Microbiol.*, vol. 149, no. 1, pp. 1–3, 1987.

[106] V. A. R. Huss *et al.*, “Biochemical Taxonomy and Molecular Phylogeny of the Genus *Chlorella* Sensu Lato (Chlorophyta),” *J. Phycol.*, vol. 35, no. 3, pp. 587–598, 1999.

[107] L. Krienitz, E. H. Hegewald, D. Hepperle, V. A. R. Huss, T. Rohr, and M. Wolf, “Phylogenetic relationship of Chlorella and Parachlorella gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae),” *Phycologia*, vol. 43, no. 5, pp. 529–542, Sep. 2004.

[108] K. Brandt, “Ueber Das Zussamenleben von Thieren und Algen,” *Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin*, vol. 9, pp. 140–146, 1881.

[109] A. Artari, “Untersuchungen über die entwicklung und systematik einiger Protococcoiden.,” *Bull. Soc. Impr. Nat.*, vol. 6, pp. 222–261, 1893.

[110] E. A. George, *The culture collection of algae and protozoa. List of strains.* Cambridge: The Botany School, 1966.

[111] W. Koch, “Verzeichnis der Sammlung von Algenkulturen am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen,” *Arch. Mikrobiol.*, vol. 47, no. 4, pp. 402–432, 1964.

[112] R. . Starr, “A comparative study of Chlorococcum meneghini and other spherical, , zoospore-producing genera of the Chlorococcales,” *Indiana Univ. Publ. Sci.*, vol. 20, pp. 1–111, 1955.

[113] E. Kessler, W. Langner, I. Ludewing, and H. Wiechmann, “Bildung von sekundar-carotinoiden bei stickstoffmangel und hydrogenase-activitat als taxonomische markmale in der gattung *Chlorella*,” in *Studies on microalgae and photosyntetic bacteria*, University of Tokio, Ed. Tokio, Japan, 1963, pp. 7–20.

[114] B. Fott and M. Nováková, “A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species,” in *Studies in Phycology*, no. 11, Prague, 1969, pp. 10–74.

[115] R. E. Lee, “Phycology, fourth edition,” in *Phycology, Fourth Edition*, 4th editio., Cambridge: Cambridge University Press, 2008, pp. 1–547.

[116] C. Bock, L. Krienitz, and T. Pröschold, “Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species,” *Fottea*, vol. 11, no. 2, pp. 293–312, 2011.

[117] E. Kessler, “Chemotaxonomy in the Chlorococcales,” in *Progr.Phycol.Res.*, vol. 1, E. B. P. B.V., Ed. Amsterdam, 1982, pp. 111–135.

[118] E. Kessler, W. Langner, and I. Ludewing, “Separation of *Chlorella ellipsoidea* from *C. saccharophila* (Chlorophyceae): No growth on mannitol and cadmium sensitivity,” *Plant Syst. Evol.*, vol. 157, no. 3–4, pp. 247–251, 1987.

[119] E. Kessler, “A general review on the contribution of chemotaxonomy to the systematics of green algae,” in *Systematics of the green algae*, vol. 27, J. D. Irvine DEG, Ed. London Orlando, 1984, pp. 391–407.

[120] E. Hegewald, “Taxonomisch–morphologische Untersuchungen von *Scenedesmus*–Isolaten aus Stammsammlungen,” *Arch. für Hydrobiol.*, vol. 60, pp. 375–406, 1982.

[121] F. Hindák, “Taxonomic position of the chlorococcal alga *Chlorella zofingiensis*,” *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.*, vol. 40, pp. 13–23, 1982.

[122] J. Komarek, “Species concept in coccal green algae,” *Arch. für Hydrobiol.*, vol. 73, no. 4, pp. 437–471, 1987.

[123] T. Kalina and M. Puncochárová, “Taxonomy of the subfamily Scotiellocystoideae Fott 1976 (Chlorellaceae, Chlorophyceae),” *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.*, vol. 45, pp. 473–521, 1987.

[124] V. A. R. Huss and M. L. Sogin, “Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences,” *J. Mol. Evol.*, vol. 31, no. 5, pp. 432–442, Nov. 1990.

[125] E. Kessler, “Limits of growth of five Chlorella species in the presence of toxic heavy metals.,” *Algol. Stud.*, vol. 73, pp. 123–128, 1986.

[126] E. Kessler, “Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella* - VII. Die Thermophilie von Chlorella vulgaris f. tertia Fott et Nováková,” *Arch. Mikrobiol.*, vol. 87, no. 3, pp. 243–248, 1972.

[127] E. Kessler, “Upper limits of temperature for growth in *Chlorella* (Chlorophyceae),” *Plant Syst. Evol.*, vol. 151, no. 1–2, pp. 67–71, Dec. 1985.

[128] E. Kessler and F.-C. Czygan, “Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella* IV. Verwertung organischer Stickstoffverbindungen,” *Arch. Mikrobiol.*, vol. 70, no. 3, pp. 211–216, 1970.

[129] T. Ikeda and H. Takeda, “Species-Specific Differences of Pyrenoids in *Chlorella* (Chlorophyta),” *J. Phycol.*, vol. 31, no. 5, pp. 813–818, 1995.

[130] V. A. R. Huss, T. K. Scharpf, and E. Kessler, “Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of the genus *Chlorella* - V. *Chlorella vulgaris*, *C. luteoviridis*, *C. minutissima*, and *C. zofingiensis*,” *Arch. Microbiol.*, vol. 152, no. 5, pp. 512–514, Oct. 1989.

[131] V. Hellmann and E. Kessler, “Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella* VIII. Die Basenzusammensetzung der DNS,” *Arch. Microbiol.*, vol. 95, no. 1, pp. 311–318, Dec. 1974.

[132] K. Wolgfan and E. Kessler, “Physiological and Biochemical Contributions to the Taxonomy of the Genus *Chlorella* XI. DNA Hybridization,” *Arch. Microbiol.*, vol. 116, pp. 97–103, 1978.

[133] J. S. Heeg and M. Wolf, “ITS2 and 18S rDNA sequence-structure phylogeny of *Chlorella* and allies (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellaceae),” *Plant Gene*, vol. 4, pp. 20–28, 2015.

[134] M. Turmel, C. Otis, and C. Lemieux, “The chloroplast genomes of the green algae pedinomonas minor, *Parachlorella kessleri*, and *Oocystis solitaria* reveal a shared

ancestry between the pedinomonadales and chlorellales," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 26, no. 10, pp. 2317–2331, 2009.

[135] E. Kessler, "Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella* - IX. Salzresistenz als taxonomisches merkmal," *Arch. Microbiol.*, vol. 100, no. 1, pp. 51–56, 1974.

[136] E. Kessler, "Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. XII. Starch hydrolysis and a key for the identification of 13 species," *Arch. Microbiol.*, vol. 119, no. 1, pp. 13–16, 1978.

[137] A. B. Juarez *et al.*, "A *Parachlorella kessleri* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina," *Phycologia*, vol. 50, no. 4, pp. 413–421, 2011.

[138] A. B. Juarez and C. G. Velez, "Sobre la presencia de *Chlorella kessleri* (Chlorococcales, Chlorophyta) en aguas del complejo termal Copahue (prov. Del Neuquen, Argentina)," *Bol. Soc. Argent. Bot.*, vol. 29, no. 1–2, pp. 105–107, 1993.

[139] E. Kessler, "Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella* I. Saiureresistenz als taxonomisehes Merkmal," *Arch. Mikrobiol.*, vol. 52, no. 4, pp. 291–296, 1965.

[140] T. Řezanka and M. Podojil, "The very long chain fatty acids of the green alga, *Chlorella kessleri*," *Lipids*, vol. 19, no. 6, pp. 472–473, 1984.

[141] T. Rězanka, J. Vokoun, J. Slavíček, and M. Podojil, "Determination of fatty acids in algae by capillary gas chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 268, no. C, pp. 71–78, 1983.

[142] X. Li *et al.*, "The microalga *Parachlorella kessleri* - A novel highly efficient lipid producer," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 110, no. 1, pp. 97–107, Jan. 2013.

[143] Y. Mizuno *et al.*, "Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species," *Bioresour. Technol.*, vol. 129, pp. 150–155, 2013.

[144] K. Liang, Q. Zhang, M. Gu, and W. Cong, "Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella sp.*," *J. Appl. Phycol.*, vol. 25, no. 1, pp. 311–318, 2013.

[145] T. Yamazaki *et al.*, "Independent regulation of the lipid and starch synthesis pathways by sulfate metabolites in the green microalga *Parachlorella kessleri* under sulfur starvation conditions," *Algal Res.*, vol. 36, no. January, pp. 37–47,

2018.

[146] B. Fernandes *et al.*, “Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 144, pp. 268–274, Sep. 2013.

[147] M. M. El-Sheek and A. A. Rady, “Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*,” *Phyton (B. Aires).*, vol. 35, pp. 139–151, 1995.

[148] P. Přibyl, V. Cepák, and V. Zachleder, “Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 94, no. 2, pp. 549–561, 2012.

[149] G. G. Bozzo, B. Colman, and Y. Matsuda, “Active transport of CO2 and bicarbonate is induced in response to external CO2 concentration in the green alga *Chlorella kessleri*,” *J. Exp. Bot.*, vol. 51, no. 349, pp. 1341–1348, 2000.

[150] N. Sato, M. Tsuzuki, and A. Kawaguchi, “Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11 h - II. Effect of the CO2 concentration during growth,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1633, no. 1, pp. 35–42, 2003.

[151] B. Zhao and Y. Su, “Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 31, pp. 121–132, 2014.

[152] O. El-Ansari and B. Colman, “Inorganic carbon acquisition in the acid-tolerant alga *Chlorella kessleri*,” *Physiol. Plant.*, vol. 153, no. 1, pp. 175–182, 2015.

[153] N. Sato, M. Tsuzuki, and A. Kawaguchi, “Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h - I. Existence of a eukaryotic pathway,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1633, no. 1, pp. 27–34, 2003.

[154] R. Grotjohann, M. -S Rho, and W. Kowallik, “Influences of Blue and Red Light on the Photosynthetic Apparatus of *Chlorella kessleri*,” *Bot. Acta*, vol. 105, no. 3, pp. 168–173, 1992.

[155] A. B. Juarez *et al.*, “In vivo microspectroscopy monitoring of chromium effects on the photosynthetic and photoreceptive apparatus of *Eudorina unicocca* and *Chlorella kessleri*,” *J. Environ. Monit.*, vol. 10, no. 11, pp. 1313–1318, 2008.

[156] D. M. Romero, M. C. Rios de Molina, and A. B. Juarez, “Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 74, no. 4, pp. 741–747, 2011.

[157] S. Kasiri, S. Abdulsalam, A. Ulrich, and V. Prasad, “Optimization of CO_2 fixation by *Chlorella kessleri* using response surface methodology,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 127, pp. 31–39, 2015.

[158] M. G. De Morais and J. A. V Costa, “Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri, C. vulgaris, Scenedesmus obliquus* and *Spirulina sp*. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 29, no. 9, pp. 1349–1352, 2007.

[159] J. H. Mussgnug, V. Klassen, A. Schlüter, and O. Kruse, “Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept,” *J. Biotechnol.*, vol. 150, no. 1, pp. 51–56, 2010.

[160] K. K. Dandinpet, “Dark grown *Chlorella kessleri* corn, sorghum and lignocellulosic hydrosylates for algal biodiesel production,” no. July, p. 86, 2013.

[161] Y. Wang, T. Chen, and S. Qin, “Differential fatty acid profiles of *Chlorella kessleri* grown with organic materials,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 88, no. 4, pp. 651–657, 2013.

[162] T. Shiratake, A. Sato, A. Minoda, M. Tsuzuki, and N. Sato, “Air-drying of cells, the novel conditions for stimulated synthesis of triacylglycerol in a green alga, *Chlorella kessleri*,” *PLoS One*, vol. 8, no. 11, pp. 1–9, 2013.

[163] L. Gabrielyan, L. Hakobyan, and A. Trchounian, “Characterization of light-dependent hydrogen production by new green microalga *Parachlorella kessleri* in various conditions,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 175, pp. 207–210, 2017.

[164] X. Y. Deng, B. Chen, C. Xue, D. Li, X. Hu, and K. Gao, “Biomass production and biochemical profiles of a freshwater microalga *Chlorella kessleri* in mixotrophic culture: Effects of light intensity and photoperiodicity,” *Bioresour. Technol.*, vol. 273, no. 2, pp. 358–367, 2019.

[165] H. A. Hamza, R. A. Hamouda, S. S. Abd-Elwahid, and M. H. Husein, “The characteristics of biomass production and lipid accumulation of *Chlorella kessleri* growth under mixotrophic and heterotrophic conditions.,” *Egypt. Soc. Exp. Biol.*, vol. 9, no. 1, pp. 19–26, 2013.

[166] J. Wang, H. Yang, and F. Wang, “Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and prospects,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 172, no. 7, pp. 3307–3329, 2014.

[167] D. Mitra, J. (Hans) van Leeuwen, and B. Lamsal, “Heterotrophic/mixotrophic

cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products," *Algal Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 40–48, 2012.

[168] N. Zhang, "Mixotrophic Cultivation of Microalgae for Biomass Production Optimization Using Statistical Methods," Clemson University, 2016.

[169] Y. K. Lee, S. Y. Ding, C. H. Hoe, and C. S. Low, "Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor.," *J Appl Phycol*, vol. 8, pp. 163–169, 1996.

[170] O. Perez-Garcia and Y. Bashan, *Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: From metabolic routes to techno-economics*. 2015.

[171] L. Brennan and P. Owende, "Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.," *Renew Sustain Energy Rev*, vol. 14, pp. 557–577, 2010.

[172] F. Chen, "High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth," *Trends Biotechnol.*, vol. 14, no. 11, pp. 421–426, 1996.

[173] X. Li, H. Xu, and Q. Wu, "Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 98, no. 4, pp. 764–771, 2007.

[174] Y. Lu, Y. Zhai, M. Liu, and Q. Wu, "Biodiesel production from algal oil using cassava (Manihot esculenta Crantz) as feedstock," *J. Appl. Phycol.*, vol. 22, no. 5, pp. 573–578, 2010.

[175] J. C. Ogbonna, H. Yoshizawa, and H. Tanaka, "Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms," *J. Appl. Phycol.*, vol. 12, no. 3–5, pp. 277–284, 2000.

[176] O. Perez-Garcia, L. E. De-Bashan, J. P. Hernandez, and Y. Bashan, "Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*," *J. Phycol.*, vol. 46, no. 4, pp. 800–812, 2010.

[177] P. G. Falkowski, "Photosynthesis: the paradoxon of carbon dioxide efflux.," *Curr Biol*, vol. 7, pp. R637–R639, 1997.

[178] P. G. Falkowski, "The ocean's invisible forest," *Sci. Am.*, vol. 287, no. 2, p. 54, 2002.

[179] J. Masojídek, G. Torzillo, and M. Koblížek, "Photosynthesis in Microalgae," *Handb. Microalgal Cult. Appl. Phycol. Biotechnol.*, pp. 21–36, 2013.

[180] C. Posten and S. F. Chen, *Microalgae Biotechnology*. Springer International Publishing, 2016.

[181] P. J. L. B. Williams and L. M. L. Laurens, “Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics,” *Energy Environ. Sci.*, vol. 3, no. 5, pp. 554–590, 2010.

[182] M. T. Madigan, J. M. Martinko, K. T. Bender, and D. A. Stahl, *Brock biology of microorganisms*, Fourteenth. Boston: Pearson Education, Inc., 2015.

[183] M. K. Ji *et al.*, “Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 6, pp. 2701–2710, 2013.

[184] C. Yang, Q. Hua, and K. Shimizu, “Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 6, no. 2, pp. 87–102, 2000.

[185] M. A. B. J. B. J. A. Raven, *The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing, 2016.

[186] C. Li, K. L. Lesnik, and H. Liu, “Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products,” *Energies*, vol. 6, no. 9, pp. 4739–4768, 2013.

[187] O. Perez-Garcia, F. M. E. Escalante, L. E. De-Bashan, and Y. Bashan, “Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products,” *Water Res.*, vol. 45, no. 1, pp. 11–36, 2011.

[188] H. H. Chen and J. G. Jiang, “Lipid Accumulation Mechanisms in Auto- and Heterotrophic Microalgae,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 37, pp. 8099–8110, 2017.

[189] R. Wünschiers, “Metabolism,” in *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology: Second Edition*, 2013, pp. 37–209.

[190] S. Ota *et al.*, “Highly efficient lipid production in the green alga *Parachlorella kessleri*: Draft genome and transcriptome endorsed by whole-cell 3D ultrastructure,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 9, no. 1, Jan. 2016.

[191] J. McMurry, *Química Orgánica*, Séptima. CengageE Learning, 2008.

[192] P. Mayes and K. Botham, “Biosynthesis of Fatty Acids,” in *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, Twenty-Six., McGraw-Hill, pp.

173–193.

[193] I. Khozin-Goldberg, “Lipid Metabolism in Microalgae,” in *The Physiology of Microalgae*, vol. 6, M.A. Borowitzka et al. (eds.), Ed. 2016, pp. 413–484.

[194] D. J. Oliver, B. J. Nikolau, and E. S. Wurtele, “Acetyl-CoA-Life at the metabolic nexus,” *Plant Sci.*, vol. 176, no. 5, pp. 597–601, 2009.

[195] J. C. Ogbonna and N. R. Moheimani, “Potentials of Exploiting Heterotrophic Metabolism for Biodiesel Oil Production by Microalgae,” in *Biofuel and Biorefinery Technologies 2 Biomass and Biofuels from Microalgae Advances in Engineering and Biology*, 2015, pp. 45–61.

[196] R. O’Rourke, M. Gaffney, and R. Murphy, “The effects of *Parachlorella kessleri* cultivation on brewery wastewater,” *Water Sci. Technol.*, vol. 73, no. 6, pp. 1401–1408, 2016.

[197] S. S. M. Mostafa, E. A. Shalaby, and G. I. Mahmoud, “Cultivating Microalgae in Domestic Wastewater for Biodiesel Production,” *Not. Sci. Biol.*, vol. 4, no. 1, pp. 56–65, 2012.

[198] C. F. Yang, Z. Y. Ding, and K. C. Zhang, “Growth of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from cassava ethanol fermentation,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 24, no. 12, pp. 2919–2925, 2008.

[199] Y. Li, W. Zhou, B. Hu, M. Min, P. Chen, and R. R. Ruan, “Effect of light intensity on algal biomass accumulation and biodiesel production for mixotrophic strains Chlorella kessleri and *Chlorella protothecoide* cultivated in highly concentrated municipal wastewater,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 9, pp. 2222–2229, 2012.

[200] E. Doria, P. Longoni, L. Scibilia, N. Iazzi, R. Cella, and E. Nielsen, “Isolation and characterization of a *Scenedesmus acutus* strain to be used for bioremediation of urban wastewater,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 24, no. 3, pp. 375–383, 2012.

[201] J. Lalucat, J. Imperial, and R. Pares, “Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella sp.* VJ79.,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 26, no. 7, pp. 677–681, 1984.

[202] W. Komor, E., Tanner, “The hexose-proton symport system of *Chlorella vulgaris*: specificity, stoichiometry and energetics of sugar-induced proton uptake,” *Eur. J. Biochem*, vol. 44, pp. 219–223, 1974.

[203] W. Hilgarth, C., Sauer, N., Tanner, “Glucose increases the expression of the ATP/ADP translocator and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes

in Chlorella.," *J. Biol. Chem*, vol. 266, pp. 24044–24047, 1991.

[204] N. R. Boyle and J. A. Morgan, "Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*," *BMC Syst. Biol*, vol. 3, p. 4, 2009.

[205] C. Yang, Q. Hua, and K. Shimizu, "Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 58, no. 6, pp. 813–822, 2002.

[206] S. J. Hong and C. G. Lee, "Evaluation of central metabolism based on a genomic database of *Synechocystis*," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 12, pp. 165–173, 2007.

[207] B. H. Cho, N. Sauer, E. Komor, and W. Tanner, "Glucose induces two amino acid transport systems in *Chlorella*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 6 I, pp. 3591–3594, 1981.

[208] Y. K. Lee, "Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition," in *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology.*, A. Richmond, Ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004, p. 116.

[209] F. Martinez and M. I. Orus, "Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM101," *Plant Physiol.*, vol. 95, no. 1150–1155, 1991.

[210] E. F. Valiente, M. Nieva, C. Avendano, and E. S. Maeso, "Uptake and utilization of fructose by *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Effect on respiration and photosynthesis.," *Plant Cell Physiol.*, vol. 33, pp. 307–313, 1992.

[211] H. Zhang, W. Wang, Y. Li, W. Yang, and G. Shen, "Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*," *Biomass and Bioenergy*, vol. 35, no. 5, pp. 1710–1715, 2011.

[212] J. Lowrey, R. E. Armenta, and M. S. Brooks, "Nutrient and media recycling in heterotrophic microalgae cultures," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 3, pp. 1061–1075, 2016.

[213] A. J. Lewitus, D. A. Caron, and K. R. Miller, "Effects of Light and Glycerol on the Organization of the Photosynthetic Apparatus in the Facultative Heterotroph *Pyrenomonas Salina* (Cryptophyceae)," *J. Phycol.*, vol. 27, no. 5, pp. 578–587, 1991.

[214] F. Chen and M. R. Johns, "Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic Chlorella sorokiniana," *J. Appl. Phycol.*, vol. 3, no. 3,

pp. 203–209, 1991.

[215] M. E. De Swaaf, L. Sijtsma, and J. T. Pronk, “High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Crypthecodinium cohnii*,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 81, no. 6, pp. 666–672, 2003.

[216] C. Ratledge, K. Kanagachandran, A. J. Anderson, D. J. Grantham, and J. C. Stephenson, “Production of docosahexaenoic acid by *Crypthecodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source,” *Lipids*, vol. 36, no. 11, pp. 1241–1246, 2001.

[217] C. Ratledge and J. P. Wynn, “The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms,” *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 51, pp. 1–52, 2002.

[218] J. Leman, “Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential.,” *Adv. Appl. Microbiol*, vol. 43, pp. 195–243, 1997.

[219] M. I. Orús, E. Marco, and F. Martínez, “Suitability of *Chlorella vulgaris* UAM 101 for heterotrophic biomass production,” *Bioresour. Technol.*, vol. 38, no. 2–3, pp. 179–184, 1991.

[220] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.

[221] M. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, “Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances,” *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956.

[222] Y.-S. Cheng, Y. Zheng, and J. S. VanderGheynst, “Rapid Quantitative Analysis of Lipids Using a Colorimetric Method in a Microplate Format,” *Lipids*, vol. 46, pp. 95–103, 2011.

[223] S. S. Nielsen, “Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates,” in *Food Analysis Laboratory Manual*, 2010, pp. 47–53.

[224] C. Crofcheck, M. Monstross, E. Xinyi, A. Shea, M. Crocker, and R. Andrews, “Influence of media composition on the growth rate of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* utilized for CO2 mitigation,” *Am. Soc. Agric. Biol. Eng. Annu. Int. Meet. 2012, ASABE 2012*, vol. 1, no. 2012, pp. 532–549, 2012.

[225] S. W. Illman, A. M., Scragg, A. H. and Shales, “Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium.,” *Enzyme Microb. Technol.*,

vol. 27, no. 8, pp. 631–635, 2000.

[226] W. M *et al.*, “The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana* .,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 91, pp. 835–844.

[227] T. S. Lin and J. Y. Wu, “Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition,” *Bioresour. Technol.*, vol. 184, pp. 100–107, 2015.

[228] K. L. Yeh and J. S. Chang, “Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga <u>Chlorella vulgaris</i> ESP-31,” *Bioresour. Technol.*, vol. 105, pp. 120–127, 2012.

[229] L. M. Bauer, J. A. V. Costa, A. P. C. da Rosa, and L. O. Santos, “Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations,” *Bioresour. Technol.*, vol. 244, pp. 1425–1432, 2017.

[230] A. K. Sharma, Parul, and T. General, “Variation of both chemical composition and antioxidant properties of newly isolated *Parachlorella kessleri* GB1, by growing in different culture conditions,” *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 112, 2019.

[231] K. Lee and C. Lee, “Effect of Light / dark Cycles on Wastewater Treatments by Microalgae Cell Growth under Different Light Conditions,” *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 6, pp. 194–199, 2001.

[232] R. A. Andersen, J. A. Berges, P. J. Harrison, and M. M. Watanabe, “Recipes for Freshwater and Seawater Media,” in *Algal culturing techniques*, Elsevier Inc., 2005, p. 429.

[233] Z. Yu *et al.*, “The effects of combined agricultural phytohormones on the growth, carbon partitioning and cell morphology of two screened algae.,” *Bioresour. Technol.*, vol. 239, pp. 87–96, 2017.

[234] S. Subramanian, A. N. Barry, S. Pieris, and R. T. Sayre, “Comparative energetics and kinetics of autotrophic lipid and starch metabolism in chlorophytic microalgae: Implications for biomass and biofuel production,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, 2013.

[235] S. Aubert, E. Gout, R. Bligny, and R. Douce, “Multiple effects of glycerol on plant cell metabolism. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 34, pp. 21420–21427, 1994.

[236] A. Negrulescu, V. Patrulea, M. M. Mincea, C. Ionascu, B. A. Vlad-Oros, and V. Ostafe, “Adapting the Reducing Sugars Method with Dinitrosalicylic Acid to Microtiter Plates and Microwave Heating,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 23, no. 12, pp. 2176–2182, 2012.

[237] I. P. Wood, A. Elliston, P. Ryden, I. Bancroft, I. N. Roberts, and K. W. Waldron, “Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates : Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 44, no. 0, pp. 117–121, 2012.

[238] S. Sengupta, M. L. Jana, D. Sengupta, and A. K. Naskar, “A note on the estimation of microbial glycosidase activities by dinitrosalicylic acid reagent,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 53, pp. 732–735, 2000.

[239] M. Bailey, “A note on the use of dinitrosalicylic acid for determining the products of enzymatic reactions,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 29, no. October, pp. 494–496, 1988.

[240] K. R. Uday, “Conjugation of Dextran with Antibiotic Drugs and Release Studies,” Indian Institute of Technology, 2016.

[241] B. Horstkotte *et al.*, “Sequential injection analyzer for glycerol monitoring in yeast cultivation medium,” *Talanta*, vol. 71, no. 2, pp. 941–947, Feb. 2007.

[242] J. Kuhn, H. Müller, D. Salzig, and P. Czermak, “A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation,” *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 18, no. 3, pp. 252–255, 2015.

[243] A. Bioquest®., “Potassium Phosphate (pH 5.8 to 8.0) recipe and preparation,” 2018. [Online]. Available: https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/potassium-phosphate-ph-5-8-to-8-0.

[244] Bio-Rad, “Bio-Rad Protein Assay.” .

[245] L. M. Melgarejo, Luz MarinaMelgarejo, *Experimentos en fisiología vegetal*. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia, 2010.

[246] A. McMahon, H. Lu, and I. A. Butovich, “The Spectrophotometric Sulfo-Phospho-Vanillin Assessment of Total Lipids in Human Meibomian Gland Secretions,” *Lipids*, vol. 48, no. 5, pp. 513–525, 2013.