

**EVALUACION DEL SUERO LÁCTEO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y
LIPIDOS EN LA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* A ESCALA DE
LABORATORIO**

GINA VIVIANA CHAPARRO ROJAS

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

**EVALUACION DEL SUERO LÁCTEO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y
LIPIDOS EN LA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* A ESCALA DE
LABORATORIO**

GINA VIVIANA CHAPARRO ROJAS

**Proyecto integral de grado para optar por el título de
INGENIERO QUÍMICO**

**Director
DIEGO RUBIO FERNÁNDEZ
Biólogo**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado 1

Jurado 2

Bogotá, D.C., Julio 28 de 2017

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. Jaime Posada Díaz

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña

Vicerrectoría Académica y de Posgrados

Dr. Ana Josefa Herrera Vargas

Secretario General

Dr. Juan Carlos Posada García-Peña

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. Julio Cesar Fuentes Arismendi

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

Este trabajo de grado se lo dedico

A mi familia encabezada por mi madre Luz Marina Rojas Montoya quien desde el cielo me dirigió en la etapa final de este trabajo de grado. La motivación y ánimo que me dio en el resto de mi carrera, por su preocupación y decisión de sacarme adelante.

A mi padre, Jorge Chaparro que nunca siempre me colaboro y gracias a su apoyo incondicional me permitió estudiar una carrera profesional.

A mis hermanos, tíos, sobrina y demás familiares que siempre me acompañaron en este camino y que de una forma u otra ayudaron a culminar esta etapa de la vida.

A mis compañeros, amigos y demás personas que me acompañaron en esta etapa académica, de los cuales aprendí día a día.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento a:

Principalmente a Dios por brindarme la compañía y ayuda durante el desarrollo de este trabajo de grado y durante toda mi vida, sin él no hubiese sido posible la culminación exitosa de esta investigación.

Las metas que nos proponemos siempre van de la mano con el apoyo de nuestros seres queridos, amigos y personas allegadas por ello queremos agradecer a la familia Chaparro Rojas, al profesor Diego Rubio investigador de la Fundación Universidad de América, por su acompañamiento y dirección para el desarrollo de esta investigación.

A la Fundación Universidad de América, quienes me prestaron la ayuda necesaria para el buen desarrollo de esta investigación.

A Juan Andrés Sandoval, Docente de la Fundación Universidad de América, por el acompañamiento en el desarrollo de este trabajo de grado.

Y a todas las personas que de una u otra forma colaboraron durante el desarrollo de este trabajo de grado.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	21
OBJETIVOS	22
1. MARCO TEÓRICO	23
1.1 MICROALGAS, APLICACIONES E IMPORTANCIA	23
1.2 CHLORELLA VULGARIS	24
1.3 MODOS DE CULTIVO SEGÚN LA FUENTE DE ENERGIA	25
1.3.1 Cultivo autotrófico	25
1.3.2 Cultivo heterotrófico	26
1.3.3 Cultivo mixotrófico	27
1.4 CONDICIONES DE CULTIVO	31
1.4.1 Luz	31
1.4.2 Temperatura	32
1.4.3 Agitación	32
1.5 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE MICROALGAS	32
1.6 TRATAMIENTO DE LA BIOMASA	33
1.6.1 Sedimentación	34
1.6.2 Floculación	34
1.6.3 Centrifugación	34
1.6.4 Filtración	34
1.6.5 Flotación	34
1.7 CURVA DE CRECIMIENTO	35
1.7 LÍPIDOS	36
1.9 SUERO LÁCTEO	37
2. METODOLOGÍA	39
2.1 PRIMERA ETAPA	40
2.1.1 Condiciones de cultivo.	40
2.1.1.1 Nutrientes	40

2.1.1.2 Fuente de luz y fotoperiodo	40
2.1.1.3 Agitación	41
2.1.2 Esterilización de los materiales y del medio de cultivo.	41
2.1.3 Preparación inicial de biomasa	41
2.1.4 Obtención del suero lácteo	42
2.1.5 Medios de cultivo enriquecido y preparación del inóculo	42
2.2 SEGUNDA ETAPA	43
2.2.1 Pre-experimentación con las diferentes proporciones del medio de cultivo, suero lácteo y agua destilada	43
2.2.2 Definición de los tratamientos pre-experimentales	44
2.2.3 Seguimiento al cultivo y cuantificación celular	45
2.2.4 Curvas de crecimiento	45
2.2.5 Cultivo con mayor producción de biomasa	46
2.3 TERCERA ETAPA	47
2.3.1 Desarrollo experimental	47
2.3.2 Cultivo control	48
2.3.3 Cuantificación de la biomasa	48
2.4 CUARTA ETAPA	48
2.4.1 Separación inicial y secado de la biomasa	48
2.4.2 Peso seco, rendimiento húmedo y productividad volumétrica	49
2.4.3 Extracción y cuantificación de lípidos	50
3. RESULTADOS Y ANALISIS	51
3.1 CRECIMIENTO CELULAR DEL INÓCULO	51
3.2 CRECIMIENTO CELULAR DE LOS PRE-EXPERIMENTOS	51
3.3 CULTIVO CON MAYOR PRODUCCIÓN DE BIOMASA	55
3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA DEL EXPERIMENTO	55
3.5 CONCENTRACION DE BIOMASA	57
3.6 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA SECA	58
3.7 PESO SECO DEL CULTIVO ENRIQUECIDO	60
3.8 COMPARACIÓN DEL CULTIVO CONTROL VS MEDIO ENRIQUECIDO	60
3.9 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACION DE LÍPIDOS	61

3.10 POTENCIAL DEL SUERO LÁCTEO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL	64
4. CONCLUSIONES	66
5. RECOMENDACIONES	67
BIBLIOGRAFIA	68
ANEXOS	72

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición del suero lácteo.	37
Tabla 2. Volúmenes de los ensayos.	43
Tabla 3. Estructura tabla ANOVA.	47
Tabla 4. Resultados tabla ANOVA de un factor.	55
Tabla 5. Biomasa húmeda obtenida.	58
Tabla 6. Cantidades de biomasa.	59
Tabla 7. Rendimiento húmedo y productividad volumétrica.	60
Tabla 8. Perfil lipídico del cultivo enriquecido con suero lácteo.	63
Tabla 9. Composición del fertilizante Foliagro™	73

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Características del alga Chlorophyta y el tipo de compuesto de almacenamiento.	25
Cuadro 2. Metabolismo de asimilación de carbono.	28
Cuadro 3. Concentración celular por días de los pre-experimentos uno.	78
Cuadro 4. Concentraciones celulares promedios del pre-experimento dos.	81
Cuadro 5. Concentraciones celulares promedios del pre-experimento tres.	82
Cuadro 6. Concentraciones celulares promedios del pre-experimento tres.	82
Cuadro 7. Concentraciones celulares promedios de cultivo control.	83
Cuadro 8. Equipos y materiales del montaje de fotobiorreactor adaptado.	84
Cuadro 9. Equipos y materiales de la extracción de biomasa.	85

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Proceso y aplicaciones de cultivos microalgales.	24
Figura 2. Sistemas de producción. (A) Sistema abierto y (B, C, D) sistema cerrado.	32
Figura 3. Curva de crecimiento de cultivo batch.	35
Figura 4. Contenido y producción de lípidos según la especie de microalga.	36
Figura 5. Fotobiorreactores adaptados.	39
Figura 6. Plano incubadora y esquema montaje de los cultivos.	40
Figura 7. FBRs adaptados con cultivo inicial en la incubadora.	42
Figura 8. Esquema secuencia de enfoque en cada tratamiento para la selección del ensayo con mayor concentración celular final.	44
Figura 9. Moldes desechables de aluminio.	49
Figura 10. Cambio de coloración del inóculo.	51
Figura 11. Concentración de biomasa.	58
Figura 12. Moldes con biomasa seca y biomasa seca recogida.	59
Figura 13. Microscopio OPTIKA ITALY B-150.	76
Figura 14. Cámara de Neubauer.	76
Figura 15. Cuadrícula de conteos cámara de Neubauer.	77
Figura 16. Conteos en cuadrículas de la forma zigzag.	77

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfico 1. Comparación de la curva de crecimiento de <i>Chlorella</i> heterotrófica entre glucosa y medio de maíz hidrogenado.	27
Gráfico 2. Densidad celular en fase estacionaria de <i>Chroomonas</i> sp. y <i>Chlorella</i> sorokiniana, crecidas a diferentes concentraciones de fracción soluble de gallinaza (% FSG).	29
Gráfico 3. Cinética de cultivo de <i>C. vulgaris</i> desarrollados en medio Bristol (control) y residual de ablandamiento de soya.	30
Gráfico 4. Curvas de crecimiento de <i>Graesiella emersonii</i> en cultivos alimentados con almidón al 1% (flechas azules: alimentación del almidón).	31
Gráfico 5. Curva de crecimiento tratamiento uno.	52
Gráfico 6. Curva de crecimiento tratamiento dos.	53
Gráfico 7. Curva de crecimiento Tratamiento tres.	54
Gráfico 8. Comparación curvas de crecimiento del experimento y del cultivo control.	56
Gráfico 9. Composición de ácidos grasos.	62
Gráfico 10. Composición de omega 3 y omega 6 en las PUFAS.	63

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Concentración celular en la Cámara de Neubauer	45
Ecuación 2. Suma de cuadrados totales.	46
Ecuación 3. Suma de cuadrados totales.	46
Ecuación 4. Suma de cuadrados dentro de tratamientos.	46
Ecuación 5. Suma de muestras	46
Ecuación 6. Total de la suma de las muestras.	46
Ecuación 7. Total de la suma de las muestras	46
Ecuación 8. Número totales de datos.	46
Ecuación 9. Cuadrados medios entre tratamientos.	46
Ecuación 10. Cuadrados medios dentro de tratamientos.	46
Ecuación 11. Cuadrados medios totales.	46
Ecuación 12. Numerador estadístico de contraste F.	46
Ecuación 13. Peso seco.	49
Ecuación 14. Rendimiento biomasa húmeda.	49
Ecuación 15. Productividad volumétrica.	49

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Composición de fertilizante foliar (foliagro).	73
Anexo B. Producción de queso	74
Anexo C. Cámara de Neubauer.	76
Anexo D. Conteos celulares en cámara de Neubauer.	78
Anexo E. Descripción de equipos y materiales usados	84

ABREVIATURAS

UHT: Ultra altas temperaturas.

CO₂: Dióxido de carbono

O: Oxígeno

nm: Nanómetro.

°C: Grados Celsius

FBR: Fotobiorreactor.

% V/V: Porcentaje volumen – volumen.

% P-V: Porcentaje peso – volumen.

L: Litros.

cm: Centímetros.

P₂O₅: Pentóxido de difósforo.

K₂O: Óxido de potasio.

CaO: Óxido de calcio.

MgO: Óxido de magnesio.

min: Minutos.

cc: Centímetros cúbicos.

PVC: Policloruro de vinilo.

EPS: Poliestireno expandido.

mm³: Milímetros cúbicos.

mL: Mililitros

RPM: Revoluciones por minuto

g: gramos

1:2/3: Proporción 1 a 2/3

W: Watts

V: Voltios.

GLOSARIO

BIOMASA: materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO: representación gráfica del comportamiento de un microorganismo durante su crecimiento, usualmente representan las etapas de crecimiento como la fase de adaptación, exponencial y estacionaria.

CROMATOGRAFÍA: técnica analítica para la separación de compuestos semi-volátiles que se basa en una fase móvil y una fase estacionaria apolar; por medio de ella se puede caracterizar un compuesto por medio del uso de diferentes sensores acondicionados para los compuestos de interés, estos pueden variar desde detectores electroquímicos, de absorbancia, de índice de refracción, entre otros.

CULTIVO: conjunto de microorganismos que crecen en un recipiente, con el objetivo de producir biomasa o un metabolito de interés.

EXTRACCIÓN: procedimiento por el cual se extrae un compuesto de interés de la biomasa producida por la microalga.

LÍPIDO: cada uno de los compuestos orgánicos que resultan de la esterificación de alcoholes, como la glicerina y el colesterol, con ácidos grasos.

MICROALGA: microorganismo fotosintético que se caracteriza por ser uno de los más usados en biotecnología, ya que convierte la energía del sol rápidamente en biomasa y productos que pueden ser aprovechables, como los azúcares y los lípidos.

RENDIMIENTO BIOMASA/PRODUCTO: es una medida del rendimiento de un proceso biotecnológico en el cual se compara la cantidad de producto obtenido contra la cantidad de biomasa producida en el proceso.

SUERO DE LA LECHE: parte que permanece líquida al coagularse la leche.

RESUMEN

Con el objeto de evaluar el uso potencial de microalgas para obtener lípidos por medio de la implementación de sustratos residuales de las industrias, se evaluó la influencia del suero lácteo en la producción de biomasa de microalgas y lípidos en fotobiorreactores adaptados los cuales son recipientes de vidrio en una incubadora que permiten generar las condiciones y cultivar las microalgas en escala de laboratorio.

Las microalgas se cultivaron en fotobiorreactores adaptados usando medio de cultivo compuesto por fertilizante foliar (Foliagro) y medio de cultivo enriquecido compuesto por medio de cultivo y suero lácteo; en el cual se variaron las relaciones entre los componentes del medio de cultivo enriquecido en 13 ensayos del pre-experimento y se seleccionó el de mayor concentración celular. El crecimiento celular se cuantificó por conteos en la cámara de Neubauer por alrededor de 20 días donde se obtuvo una concentración celular de $1,11 \times 10^6$ (células/mL).

El proceso de tratamiento de la biomasa consistió en la separación inicial de las fases líquida y sólida por el método de centrifugación, para luego ser secada a 40 °C en una estufa de secado, obteniendo una productividad volumétrica en peso seco de $1,52 \times 10^{-3}$ g/mL en comparación del cultivo alimentado con medio de cultivo, el cual fue de $7,5 \times 10^{-4}$ g/mL siendo menor, por lo cual nos demuestra que el medio enriquecido con suero lácteo tuvo un mejor rendimiento de biomasa seca.

El rendimiento de biomasa húmeda y de productividad volumétrica es mayor en el cultivo enriquecido con suero lácteo con 70,63 g/L y 0,076 g/d*L, en comparación con el cultivo con medio de cultivo con 14,90 g/L y 0,05 g/d*L.

El perfil lipídico se determinó por cromatografía de gases y la extracción de los lípidos fue por Bligh & Dyer en la Universidad Nacional sede Bogotá; el medio enriquecido con suero lácteo dio cantidades cercanas entre la cantidad de PUFAS, MUFAS Y SFAS con 34,6%, 33,6% y 31,8% respectivamente; obteniendo en mayor cantidad ácidos grasos poliinsaturados los cuales son ácidos grasos esenciales en la nutrición humana los cuales están conformados por el omega 3 y omega 6.

PALABRAS CLAVE: Biomasa, lípidos, suero lácteo, producción, microalgas.

INTRODUCCIÓN

Debido a los contaminantes que producen las industrias el medio ambiente se ve afectando y deteriorado, ya que algunos son arrojados sin ningún tratamiento, por esto se buscan nuevos procesos que puedan aprovechar estos residuos para obtener productos con valor agregado que ayuden a mitigar el daño ambiental y tener una utilidad.

Las microalgas son capaces de utilizar sustratos ricos en fuentes de carbono tanto orgánico como inorgánico, para producir entre otras moléculas de interés tales como lípidos, pigmentos, proteínas entre otros, los cuales a su vez pueden ser utilizados en industrias de cosméticos o para producir biodiesel u otros productos. Varios de estos sustratos pueden ser residuos o desechos de procesos industriales y entre estos está el sector alimenticio que genera residuos a partir de procesos como la producción de quesos.

En Colombia la industria láctea representa un mercado importante ya que su consumo es muy elevado, en el 2015 se produjeron 6.623 millones de litros los cuales se usan 78,6 millones de litros (44,8 millones de litros de leche en polvo, 22,1 millones de litros de leche UHT y el equivalente a 11,5 millones de litros de quesos maduros) y el resto en otros productos¹. Como parte de este proceso se genera el suero lácteo que no es del todo utilizado para las cadenas productivas de la industria láctea. El suero se dispone como residuo y es vertido a alcantarillados, suelos o en cuerpos de agua.

Dado el aumento en la producción de suero lácteo, se ha generado la necesidad de aprovecharlo de una forma eficiente en nuevos procesos que generen productos de valor agregado en la industria.

Esta investigación busca aproximarse al uso del suero lácteo como fuente de carbono en cultivos de microalgas y obtener lípidos de la biomasa microalgal obtenida.

¹LACTO NOTAS: boletín 3. Periodo de análisis. En: FEDEGAN [en línea]. (enero 2014 a junio 2015) < <http://www.fedegan.org.co> > [citado en 20 de abril de 2016].

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del suero de leche en la producción de biomasa en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener las cinéticas de crecimiento celular bajo diferentes concentraciones de sustrato.
- Analizar el efecto de la variación en la concentración del sustrato sobre la producción de biomasa.
- Cuantificar los lípidos generados para el tratamiento con mayor concentración de biomasa.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 MICROALGAS, APLICACIONES E IMPORTANCIA

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes (cianobacterias) y eucariontes², que se pueden cultivar en diversos medios, a diferencia de otros cultivos no necesitan de tierras fértiles o de aguas tratadas, en sustratos orgánicos o inorgánicos para su crecimiento. Son los primeros intercambiadores biológicos de dióxido de carbono (CO₂) y oxígeno (O), lo que demuestra su gran importancia económica y ecológica. Las microalgas se clasifican según diversos parámetros como pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular³. Los periodos de cultivo son relativamente cortos ya que tienen una alta tasa de crecimiento promedio pudiendo duplicar su biomasa aproximadamente en 24 horas, dando la opción de generar cultivos múltiples o continuos.⁴

Las microalgas acumulan metabolitos secundarios como pigmentos, lípidos o vitaminas que se emplean en procesos industriales como alimentos, acuicultura, cosméticos, biocombustibles, biofertilizantes (Figura 1)⁵. El cultivo microalgal depende de la cepa, las condiciones de cultivo y como se manipulan en el proceso de cultivo, los cuales han derivado un gran número de investigaciones para estudiar estos parámetros con el fin de mejorar los cultivos a menores costos.

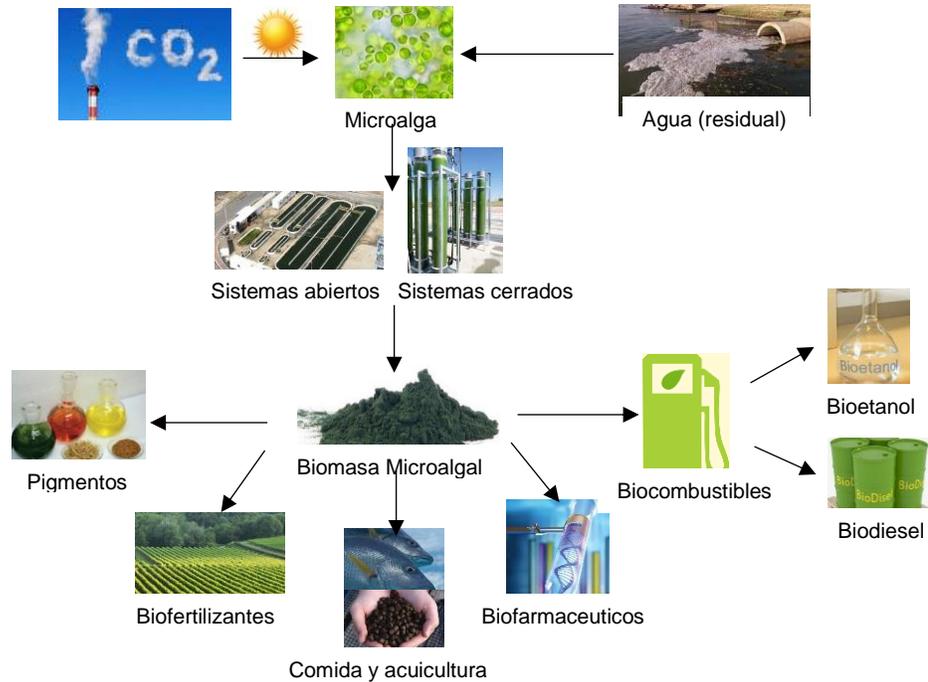
² GARIBAY, Adriana. Biodiesel a Partir de Microalgas. En: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. BioTecnología. 2009, Vol. 13 No. 3, p. 42.

³ *Ibid.*, p. 42.

⁴ ARIAS, Martha; MARTÍNEZ, Alfredo y CAÑIZARES, Rosa. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. En: Acta Biológica Colombiana [en línea], Enero 2013, No. 1. [citado en 2 de Enero de 2017]. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319028010004> >

⁵ YU, X., CHEN, L., and ZHANG, W. (2015). Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. En: Frontiers in Microbiology. [citado el 2 de Enero de 2017]. p. 1–10. Disponible en: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00056>.

Figura 1. Proceso y aplicaciones de cultivos microalgales.



Fuente: Debabrata das. Algal biorefinery: an integrated approach; Department of biotechnology.2015.

1.2 CHLORELLA VULGARIS

Chlorella Vulgaris es un alga unicelular de color verde, de forma esférica. Su color lo obtiene de los cloroplastos, que son las estructuras encargadas de realizar la fotosíntesis⁶. Pertenece a la división *Chlorophyta* y a la clase de las *Chlorophyceae* en el cuadro 1 se puede observar la clasificación. Se ha cultivado de forma intensiva con fines de alimentación y obtención de metabolitos. El sistema por lote es el más utilizado a gran escala por su bajo riesgo de contaminación y fácil implementación.⁷

⁶ "Microalgas como elementos de fitorremediación," biotecnología; 2009. p. 1–11.

⁷ INFANTE, Cherlys, *et al.* Propagación de la microalga *chlorella sp.* en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. EN: Avances en Ciencias e Ingeniería. Cartagena. (Abril/Junio, 2012). p. 159.

Cuadro 1. Características del alga *Chlorophyta* y el tipo de compuesto de almacenamiento.

Grupo	Nombre	Morfología	Pigmentos	Representante típico	Material de reserva	Pared celular
<i>Chlorophyta</i>	Algas verdes	Unicelular	Clorofilas a y b	<i>Chlamydomonas</i>	Almidón; (α -1,4-glucano), sacarosa	Celulosa

Sus ciclos de vida y necesidades nutricionales son simples; al ser unicelulares, la energía se dirige a través de la fotosíntesis al crecimiento y la reproducción⁸; es un organismo altamente eficiente en la fijación del CO₂ debido a su habilidad de crecer en medios enriquecidos con altas concentraciones de CO₂, lo cual le da una gran ventaja sobre otras especies del mismo género⁹.

1.3 MODOS DE CULTIVO SEGÚN LA FUENTE DE ENERGIA

1.3.1 Cultivo autotrófico. En el cultivo autotrófico, las microalgas usan luz como fuente de energía, y carbono inorgánico como fuente de carbono como el CO₂, produciendo energía por medio de la fotosíntesis¹⁰.

Esta forma de cultivo es una de las más usadas y prometedoras ya que las microalgas absorben el CO₂ proveniente de los gases de combustión de las industrias, obteniendo productos de valor agregado como biocombustibles, biofertilizantes entre otros. Cuando el CO₂ es la fuente de carbono inorgánico, la microalga debe ser cultivada cerca de fábricas o fuentes de CO₂ aumentando el área de trabajo y por ende los costos.¹¹

⁸ RODRÍGUEZ, Andrea; SERRANO, Luna y FIRSON Andrés; Efecto de la relación Carbono/ Nitrógeno en la productividad de Biomasa y Lípidos en cultivos de *Chlorella Vulgaris UTEX 1803*. EN: Fotobiorreactores a escala de laboratorio. Universidad Industrial de Santander. Ingeniería Química, 2012. p. 15.

⁹ YUN, Ys, *et al.* Carbon dioxide fixation by algal cultivation using waste water nutrients. *J. of Chem. EN: Technol. Biotechnol.* 1997.

¹⁰ JARAMILLO, Juan. Evaluación tecno-económica de la producción de biocombustibles a partir de microalgas. Universidad Nacional de Colombia. Manizales, Colombia. 2011. [citado el 10 de Enero de 2017]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/6751/1/8110005.2012.pdf>

¹¹ ANTOLLI, P and LIU, Z. *Bioreactors: Design, Properties, And Applications* [e-book]. New York: Nova Science Publishers, Inc; 2012. Available from: eBook Collection (EBSCOhost), Ipswich, MA. Citado en [Mayo 31, 2017].

1.3.2 Cultivo heterotrófico. Los cultivos de crecimiento heterotrófico utilizan moléculas orgánicas como fuente de energía. El medio de cultivo heterotrófico es similar al cultivo autotrófico con la única excepción de la adición de fuente de carbono inorgánico en los autotróficos, el carbono orgánico en los heterotróficos se asimila adecuadamente proporcionando una producción de biomasa a gran escala; en muchos casos el cultivo heterotrófico es más económico, más fácil de construir que el cultivo autotrófico ya que no necesita una fuente de luz constante y a que los heterotróficos logran producir mayor volumen de biomasa e implementar fuentes de carbono más simple y económicas provenientes de diferentes industrias, pero también tienen varias limitaciones como el número limitado de especies de microalgas que pueden crecer heterotróficamente, la contaminación, la competencia de las microalgas con otros microorganismos e inhibición de crecimiento por exceso de sustrato orgánico entre otros¹².

La principal fuente de carbono de los cultivos heterotróficos que se ha implementado es la glucosa. Sin embargo, debido al alto costo de la glucosa, se ha investigado diferentes fuentes de carbono orgánico en especial que sean residuos provenientes de algún proceso industrial. El tipo de fuentes de carbono pueden afectar el crecimiento de las microalgas. Los sistemas heterotróficos son más adecuados para generar altas densidades celulares de microalgas, aumentando la acumulación de lípidos en comparación con los cultivos autotróficos¹³.

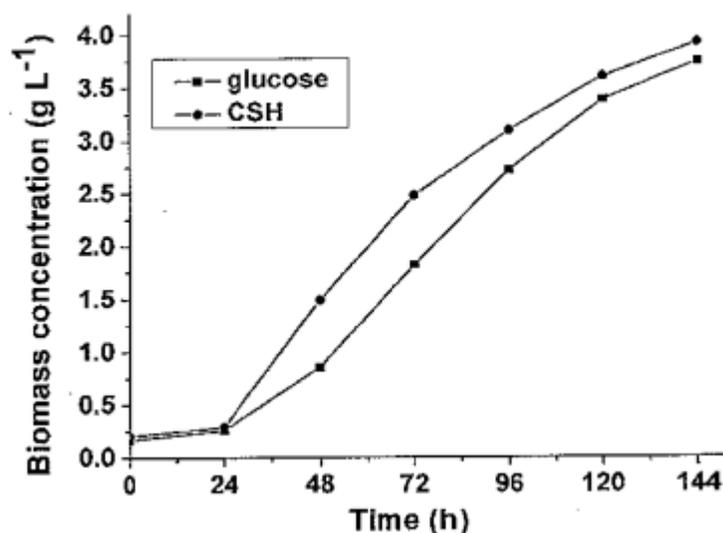
Los estudios y las investigaciones se han basado en buscar sustratos orgánicos más económicos que puedan generar mayor crecimiento celular de las microalgas según la especie como es el hidrogenado de maíz el cual es comparado con la glucosa que ha sido uno de los sustratos orgánicos más implementados en los cultivos heterotróficos, como se puede observar (Gráfico 1) el crecimiento celular de la microalga *Chlorella protothecoides* es mayor y genera mejor rendimiento celular cuando es alimentada con hidrolizado de maíz.¹⁴

¹² PEREZ, Octavio, *et al.* Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. EN: Water research. Estados unidos. Vol. 45, No. 36 (2011). p. 12-14.

¹³ ZHAN, Jiao; RONG, Junfeng and WANG, Qiang; Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. EN: International journal of hydrogen energy. China. Vol.13 (2016). p. 2-3.

¹⁴ XU, Han; MIAO, Xiaoling and WU, Qingyu. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. EN: Journal of Biotechnology. China. Vol. 126 (2006). p. 499-507.

Gráfico 1. Comparación de la curva de crecimiento de *Chlorella* heterotrófica entre glucosa y medio de maíz hidrogenado.



Fuente: XU, Han; MIAO, Xiaoling and WU, Qingyu. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. En: Journal of Biotechnology. China. Vol. 126 (2006). p. 499-507.

1.3.3 Cultivo mixotrófico. En el cultivo mixotrófico, las microalgas se someten a fotosíntesis pero con compuestos orgánicos y CO₂ como fuentes de carbono para el crecimiento y el metabolismo; lo que significa que las microalgas pueden crecer en condiciones autotróficas o heterotróficas, o las dos al mismo tiempo por lo cual se les da el nombre de cultivo mixotrófico absorbiendo compuestos orgánicos y CO₂. Muchas microalgas se adaptan satisfactoriamente a las condiciones mixotróficas, por lo cual muchos cultivos no dependen directamente solo de la luz.¹⁵ El cultivo mixotrófico puede acortar el periodo de crecimiento, aumentar el rendimiento de la biomasa en comparación de cultivos autotróficos y disminuir el costo de cultivos de microalgas heterotróficas; también puede aumentar el contenido de lípidos, que es la principal materia prima para la producción de biodiesel a partir de microalgas.¹⁶

¹⁵ ANTOLLI, P; LIU, Z. Op. cit.

¹⁶ MINXI, W, *et al.* The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. EN: Applied Microbiology & Biotechnology [serial online]. August 2011;91(3):835-844. Available from: Academic Search Complete, Ipswich, MA. Citado en [Mayo 31, 2017].

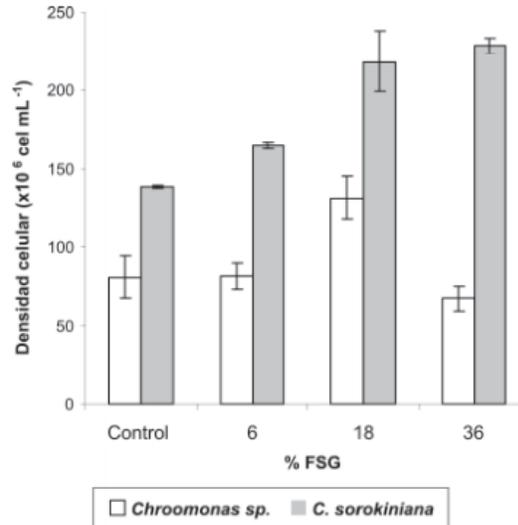
Cuadro 2. Metabolismo de asimilación de carbono.

Condición de cultivo	Fuente de energía	Densidad de carbono
Autotrófico	Luz	Bajo
Heterotrófico	Orgánico	Alto
Mixotrófico	Luz y Orgánico	Medio

En la actualidad se han desarrollado cultivos que incorporan residuos orgánicos provenientes de diferentes industrias como la avicultura usando sustratos lixiviados de gallinaza, en los cuales se reporta el aumento de la densidad celular con respecto a los cultivos con fertilizante ALGAL de nitrato de sodio (NaNO_3). Como se puede observar (Gráfico 2) se está evaluando el crecimiento de dos especies de microalgas en condiciones mixotróficas, en las cuales aumenta el crecimiento celular en los cultivos con sustrato orgánico en comparación con el cultivo llamado control; en la microalga *Chroomonas sp.* la densidad celular mayor fue de $131,37 \pm 13,66 \times 10^6$ cel mL^{-1} al 18% de concentración de la fracción soluble de gallinaza (FSG) y de la microalga *Chlorella sorokiniana* fue de $228,64 \pm 4,90 \times 10^6$ cel mL^{-1} al 36% de concentración FSG.¹⁷

¹⁷ ROSALES, N, *et al.* Gallinaza: un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. EN: Revista Colombiana de Biotecnología. 2007. Vol 9. No.1. p. 41-48.

Gráfico 2. Densidad celular en fase estacionaria de *Chroomonas* sp. y *Chlorella sorokiniana*, crecidas a diferentes concentraciones de fracción soluble de gallinaza (% FSG).

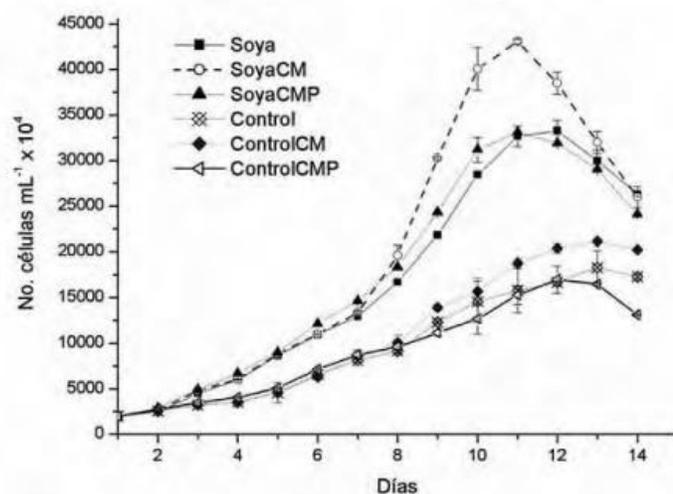


Fuente: ROSALES, N, *et al.* Gallinaza: un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para la producción de biomasa microalgal. EN: Revista Colombiana de Biotecnología. (2007). Volumen 9. No.1. p. 41-48.

Los residuos del ablandamiento del procesamiento de la soya es otro sustrato orgánico implementado en las investigaciones para el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en condiciones mixotróficas, en el cual se puede evidenciar que la microalga tiene mayor rendimiento en el crecimiento celular en el proceso con el sustrato orgánico en comparación del cultivo control en medio Bristol que permite tener una idea del comportamiento de la microalga en cultivos mixotróficos (Gráfico 3).¹⁸

¹⁸ GÓMEZ, Luna; ÁLVAREZ, Inaudis y RIVERO, Roger. Cultivo de *Chlorella Vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. EN: Revista Colombiana de Biotecnología. Vol 13. No. 2. 2011. p. 27-38.

Gráfico 3. Cinética de cultivo de *C. Vulgaris* desarrollados en medio Bristol (control) y residual de ablandamiento de soya.

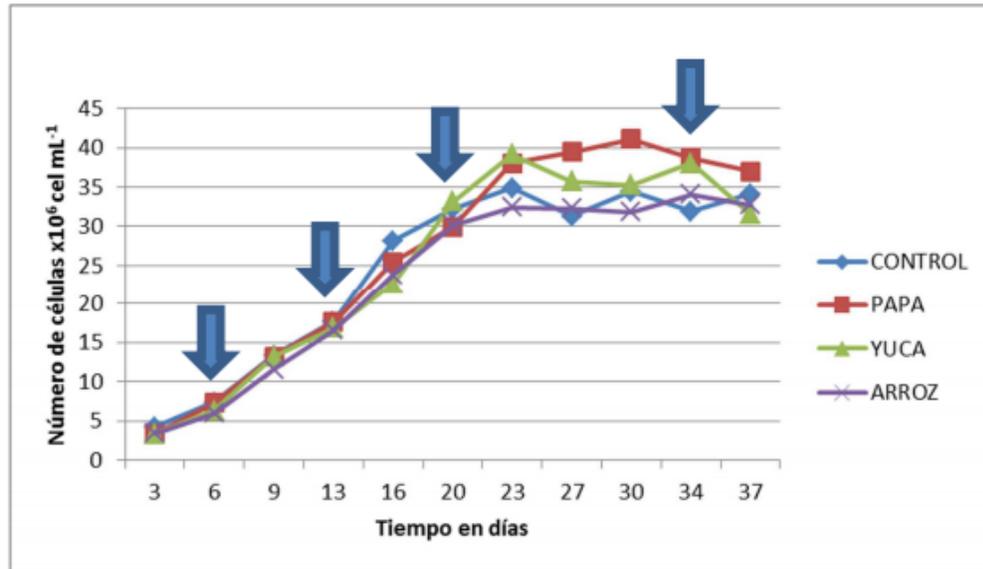


Fuente: GÓMEZ, Luna; ÁLVAREZ, Inaudis y RIVERO, Roger. Cultivo de *Chlorella Vulgaris* sobre residual de soya con la aplicación de un campo magnético. EN: Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. 13. No. 2. (2011). p. 27-38.

Otros sustratos orgánicos estudiados han sido los amiláceos de yuca, papa, maíz y achira, en el siguiente estudio se evaluaron estos sustratos sobre el crecimiento de la microalga *Graesiella emersonii* en condiciones mixotróficas. Los experimentos fueron desarrollados con almidones de 1% de cada uno de los sustratos; como se puede observar (Gráfico 4) el cultivo con sustrato de almidón de papa fue el de mayor crecimiento con respecto a los otros almidones y al cultivo de control autotrófico. El crecimiento celular del almidón de papa fue de $41,134 \times 10^6$ cel.mL⁻¹, yuca con $39,184 \times 10^6$ cel.mL⁻¹, control con $34,905 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ y arroz con $34,081 \times 10^6$ cel.mL⁻¹; siendo mayor el del almidón de arroz convirtiéndose en un sustrato prometedor para el cultivo de microalgas mixotróficas y demostrando que el rendimiento es más alto en comparación de las condiciones autotróficas.¹⁹

¹⁹ MALDONADO, Evelyn; MORALES, Ever y ROMERO, Pedro. Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chorella emersonii*) con sustratos amiláceos. ESPE. Universidad de las Fuerzas Armadas. 2014.

Gráfico 4. Curvas de crecimiento de *Graesiella emersonii* en cultivos alimentados con almidón al 1% (flechas azules: alimentación del almidón).



Fuente: MALDONADO, Evelyn; MORALES, Ever y ROMERO, Pedro. Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chorella emersonii*) con sustratos amiláceos. ESPE. Universidad de las Fuerzas Armadas. (2014).

1.4 CONDICIONES DE CULTIVO

En los cultivos de microalgas se deben tener en cuenta y controlar los parámetros que afectan el crecimiento de los cultivos, sin embargo, dependen de la especie de microalga que presentan sus características específicas respecto a las condiciones óptimas de crecimiento.²⁰

1.4.1 Luz. Las microalgas como organismos fotosintéticos emplean espectros de luz entre 350 y 700 nm es decir el espectro de la luz solar. El crecimiento de las microalgas es condicionado por el espectro de la luz hasta un rango máximo en el cual se inhibe el crecimiento y se puede afectar de manera insatisfactoria a la microalga; el problema del control de la luz es que no se puede definir como un único parámetro ya que depende de la Intensidad, su calidad espectral y la necesidad de establecer un fotoperiodo²¹. La intensidad luminosa influye notablemente en la actividad fotosintética, el contenido de pigmentos y composición química de la microalga.²²

²⁰ MALGAS. Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. Asturias: AST ingeniería S.L. 2013, p. 9.

²¹ *Ibíd.*, p. 9-10.

²² ARIAS, Martha; MARTÍNEZ, Alfredo y CAÑIZARES, Rosa. *Op. cit.*, p. 57.

1.4.2 Temperatura. Las microalgas son capaces de crecer en un amplio rango de temperatura, el cual depende de la microalga empleada para el cultivo, por ejemplo para la microalga *Chlorella vulgaris* la temperatura favorable es entre 25°C y 30°C²³. El cambio de la temperatura afecta la composición de los lípidos, la velocidad de crecimiento y en la composición de los ácidos grasos de la microalga.

1.4.3 Agitación. La agitación de los cultivos de microalgas es necesaria para evitar la sedimentación celular y para asegurar su exposición uniforme a la luz y a los nutrientes, además de que favorece el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el medio externo. Un mezclado inadecuado, reduce la productividad de biomasa y puede ocurrir muerte celular y fermentación del cultivo.²⁴

1.5 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE MICROALGAS

Para la producción de microalgas existen principalmente dos diseño básicos: cultivos cerrados donde el medio de cultivo tienen poco o ningún contacto con el exterior son llamados fotobiorreactores o FBR y sistemas abiertos en donde el cultivo está en contacto con el medio ambiente que se pueden observar en la figura 2.²⁵

Los sistemas abiertos fueron los primeros en emplearse en la producción de microalgas a gran escala, existen diferentes sistemas abiertos como aguas superficiales naturales, estanques, lagunas y lagos, y estanques artificiales. Los sistemas artificiales presentan diferentes diseños: inclinados o de capa fina, circulares y de mayor tamaño como lo son los estanques de carrusel o canales (*raceway ponds*). Los sistemas abiertos tienen la desventaja que es difícil de mantener una sola especie de microalga, la facilidad de contaminación biológica, difícil control de temperatura y de agitación uniforme.²⁶

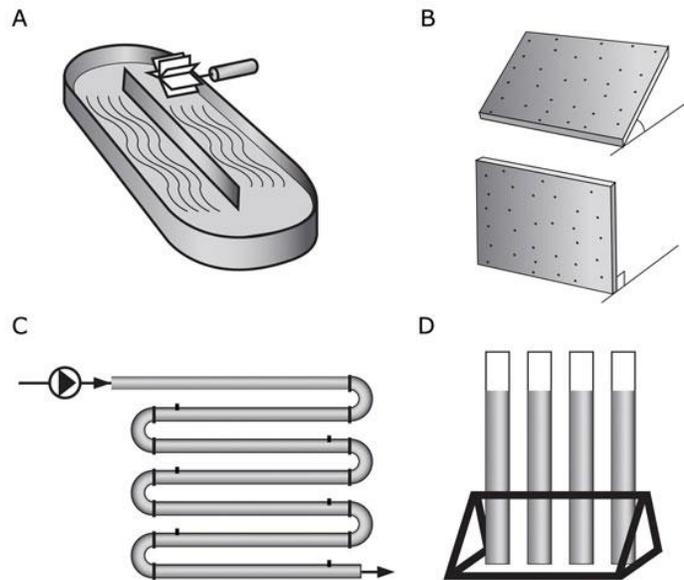
²³ GUAUQUE, Catalina y ALCALA, Camilo. Evaluación de la incidencia de la temperatura en la producción de lípidos obtenidos a partir de biomasa microalga a escala laboratorio. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá D.C. Fundación Universidad de América. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química, 2011, p. 46

²⁴ ARIAS, Martha; MARTÍNEZ, Alfredo y CAÑIZARES, Rosa. Op. cit., p. 58.

²⁵ HERNÁNDEZ, Alexis y LABBE, José. Microalgas, cultivo y beneficios. EN: Biología marina y oceanográfica. Vol. 49, No. 2 (agost. 2014). p. 160.

²⁶ MALGAS. Op. cit., p. 13-15.

Figura 2. Sistemas de producción. (A) Sistema abierto y (B, C, D) sistema cerrado.



Fuente: HERNÁNDEZ, Alexis y LABBE, José. Microalgas, cultivo y beneficios. EN: Biología marina y oceanográfica. Vol. 49, No. 2 (agost. 2014). p. 161. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>

Los sistemas cerrados ayudan a reducir los problemas generados en los abiertos, son un poco más costosos, permiten un importante control de parámetros²⁷. Los sistemas cerrados se encuentran en prácticamente total aislamiento del exterior, por tanto sin contacto con la atmosfera obteniendo un mayor control de las condiciones de cultivos, y en general, una mayor rentabilidad. Los sistemas cerrados son cámaras de algas, fotobiorreactores siendo los más estudiados y desarrollados como los tubulares, de paredes planas, columna vertical e iluminados interiormente.²⁸

1.6 TRATAMIENTO DE LA BIOMASA

En la producción de microalgas el tratamiento que se le realiza a la biomasa es el más costoso ya que representa entre el 20% y el 30% debido a la dificultad que representa la separación de la biomasa del medio de cultivo por el pequeño tamaño de las microalgas; en la actualidad no existe un método de separación universal. La

²⁷ HERNÁNDEZ, Alexis y LABBE, José. Op. cit., p. 162.

²⁸ MALGAS, Op., cit., p. 16-20.

técnica de separación depende de la especie de microalga, la densidad de cultivo, el uso posterior y factores económicos²⁹.

1.6.1 Sedimentación. Este método funciona mediante la gravedad, aprovechando la densidad del cultivo, tiene una desventaja y es el tiempo en el que se logra separar el medio de cultivo de la microalga, para acelerar la sedimentación se opera en conjunto con el método de floculación³⁰.

1.6.2 Floculación. Consiste en adicionar cationes multivalentes o poliméricos para neutralizar las cargas negativas facilitando su agregación y acelerando el método de sedimentación³¹.

1.6.3 Centrifugación. Es el método más extendido en la obtención de productos de alto valor agregado, aunque tiene un alto costo de valor energético y el peligro de dañar las células debido al esfuerzo cortante. Es un método rápido y que logra grados de sequedad del 85%³².

1.6.4 Filtración. Es considerado el método más competitivo en comparación con otros métodos de separación ya que la separación se logra por un gradiente de presión para que el cultivo pase por un filtro, separando este en dos fases la biomasa obtenida en el filtro y el medio líquido en un recipiente, la eficiencia de este proceso resulta ser del 90% debido a la poca densidad que presentan los cultivos algales³³.

1.6.5 Flotación. Es un proceso de separación por gravedad en el cual se agrega burbujas de aire y gas a las partículas sólidas las cuales son llevadas a la superficie del líquido. La flotación es más beneficiosa y efectiva que la sedimentación aunque es realmente factible cuando las especies flotan naturalmente³⁴.

Una vez separada la biomasa microalgal del medio de cultivo suele ser secada para evitar descomposición. Para la extracción de lípidos, se debe encontrar el grado de relación entre la humedad y la rentabilidad del proceso final al que se llevaran³⁵.

²⁹ MALGAS. Op. cit., p. 24.

³⁰ L. Miguel y S. Berm, "Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel," Universidad Nacional, 2012. p. 50.

³¹ MALGAS. Op. cit., p. 25.

³² *Ibid.*, p. 25.

³³ L. Miguel y S. Berm. Op. cit., p. 51.

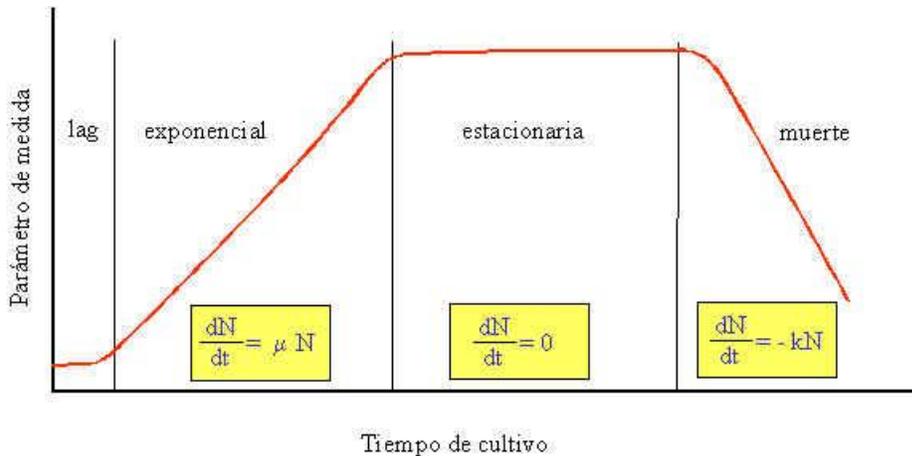
³⁴ JARAMILLO, Juan. Evaluación tecno-económica de la producción de biocombustibles a partir de microalgas. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ingeniería Química. Manizales. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Maestría en Ingeniería-Ingeniería Química, 2011. p. 22.

³⁵ MALGAS. Op. cit., p. 25-26.

1.7 CURVA DE CRECIMIENTO

La curva de crecimiento microbiano constituye en una de las herramientas más utilizadas por la ingeniería de alimentos y la biotecnología. La curva de crecimiento de cultivos batch o discontinuo tienen fases de crecimiento que se pueden observar en la figura 3³⁶.

Figura 3. Curva de crecimiento de cultivo batch.



Fuente: SALVUCCI, Emiliano. Crecimiento microbiano. 2010; citado 20 de octubre del 2016. Disponible en: <https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/>.

Se pueden distinguir cuatro fases:

Fase logarítmica: es la etapa en que el microorganismo se adapta a las nuevas condiciones para luego poder crecer en la siguiente etapa. La duración de esta fase es variable y en general es mayor cuando los cambios de condiciones son drásticas.

Fase exponencial: es la etapa donde el crecimiento es activo.

Fase estacionaria: es la etapa donde no hay aumento neto de microorganismos ya que es directamente proporcional el crecimiento con la muerte de los microorganismos.³⁷

Fase de muerte: es la etapa en donde ya no crecen más microorganismos, si no que la cantidad de microorganismos muertos es cada vez más grande.

³⁶ ARIAS, Edison y LASTRA Jorge. Cinética del crecimiento. España: El cid, 2009. p. 16-17.

³⁷ ARIAS, Edison. Op. Cit., p. 16-17.

1.8 LÍPIDOS

Son un conjunto de sustancias muy diversas pero que tienen en común ser solubles en disolventes orgánicos (no polares). Las estructuras de estas biomoléculas comprenden largas cadenas hidrocarbonadas, unidades de isopreno y grupos funcionales diversos (oxigenados principalmente). En las microalgas los principales componentes de la fracción lipídica son triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos (predominantes en membranas cloroplásticas), fosfolípidos (abundantes en plasmalema y diversos sistemas endomembranosos) y pigmentos (carotenoides, clorofilas, ficobilinas, etc.)³⁸.

Los lípidos de las microalgas tienen un metabolismo similar al de las demás plantas, principalmente en la biosíntesis de triglicéridos y ácidos grasos que ocurre en los cloroplastos, también depende su producción de la especie de microalgas y de las condiciones del cultivo (Figura 4).

Figura 4. Contenido y producción de lípidos según la especie de microalga.

Cultivo	Especie de microalga	Contenido lipídico (% peso seco)	Productividad lipídica (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
Agua dulce	<i>Botryococcus</i> sp.	25.0 – 75.0	-
	<i>Chlorella</i> emersonii	25.0 – 63.0	10.3 – 50.0
	<i>Chlorella</i> vulgaris	5.0 – 58.0	11.2 – 40.0
	<i>Chlorella</i> sp.	10.0 – 48.0	42.1
	<i>Chlorococcus</i> sp.	19.3	53.7
	<i>Scenedesmus</i> obliquus	11.0 – 55.0	-
	<i>Scenedesmus</i> quadricauda	1.9 – 18.4	35.1
	<i>Scenedesmus</i> sp.	19.6 – 21.1	40.8 – 53.9
	<i>Dunaliella</i> salina	6.0 – 25.0	116.0
	<i>Dunaliella</i> sp.	17.5 – 67.0	33.5
Agua Marina	<i>Nannochloris</i> sp.	20.0 – 56.0	60.9 – 76.5
	<i>Nannochloropsis</i> oculata	22.7 – 29.7	84.0 – 142.0
	<i>Nannochloropsis</i> sp.	12.0 – 53.0	60.9 – 76.5
	<i>Neochloris</i> oleoabundans	29.0 – 65.0	90.0 – 134.0
	<i>Pavlova</i> salina	30.9	49.4
	<i>Spirulina</i> platensis	4.0 – 16.6	-

Fuente: MATA, T. M; CAETANO, N. S and MARTINS, A. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol 14. p. 217-232.

³⁸ HERNÁNDEZ, Adriana; VÁZQUEZ, Rafael y SÁNCHEZ, Pilar. Biodiesel a Partir de Microalgas. En: BioTecnología [en línea]. Año 2009, Vol. 13 No. 3 [citado el 12 de mayo de 2016]. Disponible en: < http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Biodiesel.pdf >

1.9 SUERO LÁCTEO

El suero lácteo o el lacto suero es el líquido resultante de la coagulación de la leche en la fabricación del queso, después de la separación de la caseína y de la grasa³⁹, este representa alrededor del 90% de la leche que se usa para la fabricación del queso; es un desecho de la industria láctea ya que en Colombia no se le da un gran uso a este líquido que contiene en su composición principalmente lactosa, proteína cruda, cenizas, grasa, ácido láctico, agua. La fracción proteica está compuesta por β lacto globulina, α lacto albumina, inmunoglobulinas, proteasa peptona, enzimas nativas, urea, creatina, ácidos nucleicos y amoniaco. (Revilla, 1976)⁴⁰.

A pesar de que el suero lácteo tiene un gran valor nutricional como se puede observar en la tabla 1. gran parte de este es descartado, causando problemas en ríos y suelos como la infertilidad de suelos y la contaminación de los acuíferos, esto se debe a que hay mucho desconocimiento de sus propiedades y porque en Colombia aún hay producción a baja escala o artesanal en la que no se tiene conciencia de la cantidad de materia orgánica que este contiene y el daño que hace en el medio ambiente; en Colombia se ha venido incorporando el suero lácteo en la industria alimentaria pero a pocas concentraciones y se necesitan procesos adicionales para cada aplicación como alpina que usa el suero lácteo en polvo para elaborar bebidas derivadas de lácteos.

Tabla 1. Composición del suero lácteo.

Componente	Observaciones
Lactosa	Corresponde al 95% de la lactosa de la leche, en una cantidad de (4,5 – 5,0 % p-v) 46,0 – 52,0 g/L en suero dulce.
Proteína	Corresponde alrededor del 25% de las proteínas contenidas normalmente en la leche como caseína.
Globulina	Corresponde al 10% del total de las proteínas.
Proteasas y peptonas	Corresponde al 10% de las proteínas totales como albúmina, glicoproteínas, enzimas entre otras.
Lípidos	Corresponde al 0,5% y 8% de la materia grasa de la leche.

³⁹ REPÚBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. (1986). Resolución 2310 referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los Derivados Lácteos.

⁴⁰ UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA. Suero lácteo [en línea]. <http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211613/Modulo_zip/leccin_35_suero_lcteo.html> [citado en 12 de mayo de 2016].

Tabla 2. (Continuación)

Vitaminas	Contiene tiamina, riboflavina, Ácido ascórbico, Ácido nicótico entre otras.
Minerales	Corresponde del 8-10% del extracto seco, se encuentran como el calcio, potasio, fosforo, sodio y magnesio.

FUENTE: POVEDA, Elpidia. Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad.

Las principales aplicaciones del suero lácteo son la de alimento para animales o en una transformación para ser aprovechado industrialmente como concentración, secado, ultrafiltración entre otros, que es lo que pone a dudar a las industrias en implementarlo porque se requiere un aumento económico al hacer estos procesos para su aprovechamiento.

El suero lácteo se puede considera como un sustrato apto para implementarlo en la producción de microalgas, debido a su alto contenido de lactosa que representa el 95% de la leche usada para la producción de queso.

2. METODOLOGÍA

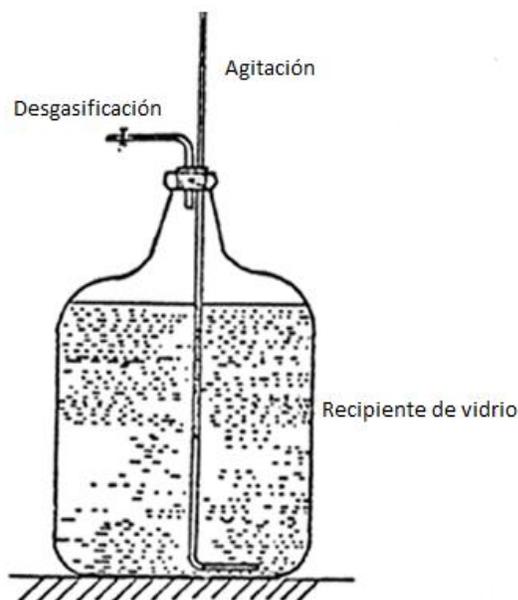
La metodología se desarrolló en cuatro etapas. En la primera etapa se realizó el inóculo, en la segunda etapa se desarrolló la mayor parte experimental en el cual se varió la concentración de suero lácteo.

El tercer paso fue la repetición del ensayo con mayor producción de biomasa en la etapa dos en un volumen superior y posteriormente la extracción de los lípidos por medio del método Bligh & Dyer y el perfil lipídico por cromatografía de gases y analizar la composición de los lípidos obtenidos. Con base en los resultados obtenidos fue posible calcular el rendimiento del proceso.

Los ensayos se realizaron en fotobiorreactores adaptados o recipientes de vidrio (Figura 5), la agitación se implementó con bombas de acuario a través de mangueras que permitían el paso del aire desde la bomba hasta el cultivo.

Los fotobiorreactores adaptados se dispusieron en una incubadora de poliestireno expandido de 54 cm de ancho, 46 cm de alto, con aberturas en la cara frontal y en la tapa superior; en la cual se puso una lámina de vidrio con medidas de 34 x 34 cm, permitiendo el ingreso de la luz y evitando el ingreso de polvo, o insectos en el interior de la incubadora donde se encontraban los medios de cultivo (Figura 6).

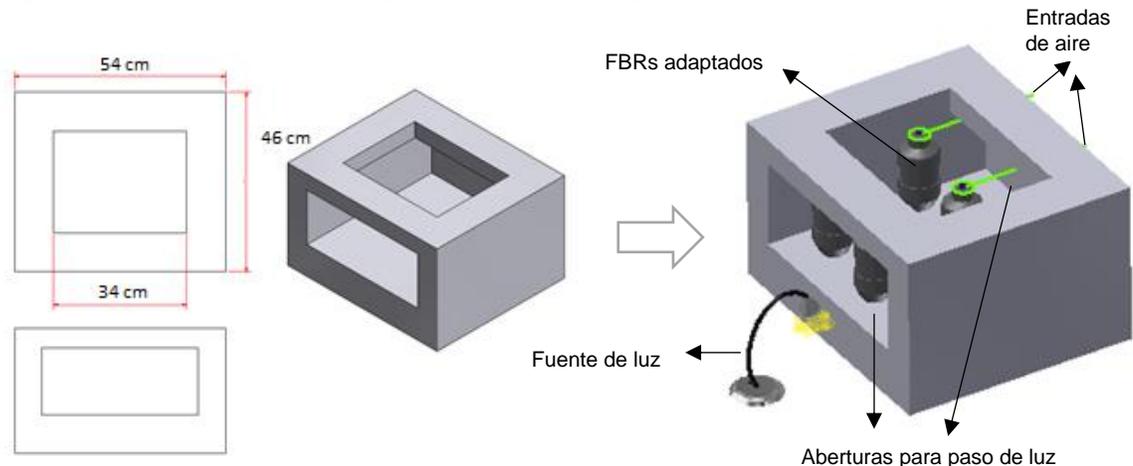
Figura 5. Fotobiorreactores adaptados.



Fuente: FAO.org. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Citado el 30 de Julio del 2017. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S02.htm>. Modificado por el autor.

Se adiciona medio de cultivo en cantidades de 50 mL cada tres días para garantizar el crecimiento de las microalgas con los nutrientes necesarios y evitar que el volumen del medio disminuyera.

Figura 6. Plano incubadora y esquema montaje de los cultivos.



2.1 PRIMERA ETAPA

Se generaron condiciones para el crecimiento de las microalgas como luz, nutrientes y agitación según el esquema planteado (Figura 6).

2.1.1 Condiciones de cultivo.

2.1.1.1 Nutrientes. Los nutrientes necesarios para el crecimiento de las microalgas son aportados diluyendo fertilizante foliar (foliagro) en una proporción de 0,2% V/V en agua destilada⁴¹ (Anexo A).

Adicionalmente, se consideró el enriquecimiento del medio de cultivo con suero lácteo que es el sustrato evaluado en la producción de biomasa.

2.1.1.2 Fuente de luz y fotoperiodo. Se utilizó luz amarilla que se suministró por medio de un bombillo de luz incandescente de 40 W de potencia (Figura 6).

Se definió el fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad⁴². Estos intervalos de luz-oscuridad se controlaron con un temporizador análogo marca Completel (T 100).

⁴¹ CRUZ, Ángel y PIMIENTA, Wendy. "Evaluación de la incidencia del nitrógeno en el medio de cultivo bold basal para la producción de biomasa de la microalga *Chlorella Vulgaris* en un fotobiorreactor, para la obtención de ácidos grasos," Fundación universidad américa, 2012.

⁴² CRUZ y PIMIENTA. Op. cit., p. 64.

2.1.1.3 Agitación. Se emplearon bombas de acuario de dos salidas, cada una con un caudal de 4 L / min, 220V/210V y 5 W de marca Shark (RS-610). La entrada de aire a los cultivos se dio por medio de mangueras de silicona con 4 mm de diámetro (Figura 5)⁴³. Se empleó una bomba por cada dos fotobiorreactores adaptados.

2.1.2 Esterilización de los materiales y del medio de cultivo. La esterilización se llevó a cabo inicialmente en una autoclave Panasonic (MLS-3781 L) en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Nacional sede Bogotá, a una temperatura de 120°C y un tiempo de 20 min, posteriormente se realizaron esterilizaciones solo del medio de cultivo por calor seco en una estufa de secado Nabertherm (TR 120) a 120°C por 20 min en la Fundación Universidad de América.

2.1.3 Preparación inicial de biomasa. La microalga *Chlorella vulgaris* fue suministrada por el grupo de investigación de la Fundación Universidad de América, Biotecfua; Inicialmente fue entregada en medio líquido en un recipiente de vidrio de 800 mL, que se mantuvo con luz solar, a temperatura ambiente y agitación manual. Posteriormente se adaptó la microalga a las condiciones de cultivo generadas en cuatro fotobiorreactores adaptados de 1 L con 250 mL de medio de cultivo, y 25 mL de microalga que se mantuvo en la incubadora (Figura 7). Se adicionó medio de cultivo al cultivo en cantidades de 50 mL.

⁴³ BENAVENTE, J. R.; *et al.* Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. En: AQM [en línea]. Año 2012, Vol 4 No. 7 [citado el 30 de mayo de 2017]. Disponible en: < <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/4.html> >

Figura 7. FBRs adaptados con cultivo inicial en la incubadora.



2.1.4 Obtención del suero lácteo. El suero lácteo se obtuvo por preparación propia, así se pudo garantizar su frescura y la menor contaminación por malas prácticas de manipulación. El suero lácteo se obtiene en el desuerado y lavado de la cuajada en el proceso de producción de queso (Anexo B). La leche utilizada en el proceso fue del mismo día de ordeño con máximo 3 horas y manteniendo la cadena de frío por medio de la refrigeración a 3°C hasta su cocción para la preparación del queso.

2.1.5 Medios de cultivo enriquecido y preparación del inóculo. El inóculo consistió en incorporar un volumen de microalgas preparadas inicialmente al medio de cultivo enriquecido con suero lácteo.

Para garantizar la misma concentración celular inicial del inóculo se seleccionó de un solo cultivo cuyas características cualitativas indicaron una mejor adaptación a las condiciones generadas.

El inóculo se llevó a un volumen de 250 mL de microalga y 150 mL de suero lácteo, para un volumen total de 400 mL.

2.2 SEGUNDA ETAPA

2.2.1 Pre-experimentación con las diferentes proporciones del medio de cultivo, suero lácteo y agua destilada. El pre-experimento consistió en cultivar concentraciones iguales de inóculo en 12 proporciones diferentes de medio de cultivo, suero lácteo y agua destilada. Estas proporciones definieron 13 ensayos en 3 tratamientos (Figura 8).

Dado que no se tenía la certeza de las proporciones adecuadas de medio de cultivo, suero y agua destilada para la producción de biomasa, se definieron tratamientos con diferentes proporciones de estos componentes.

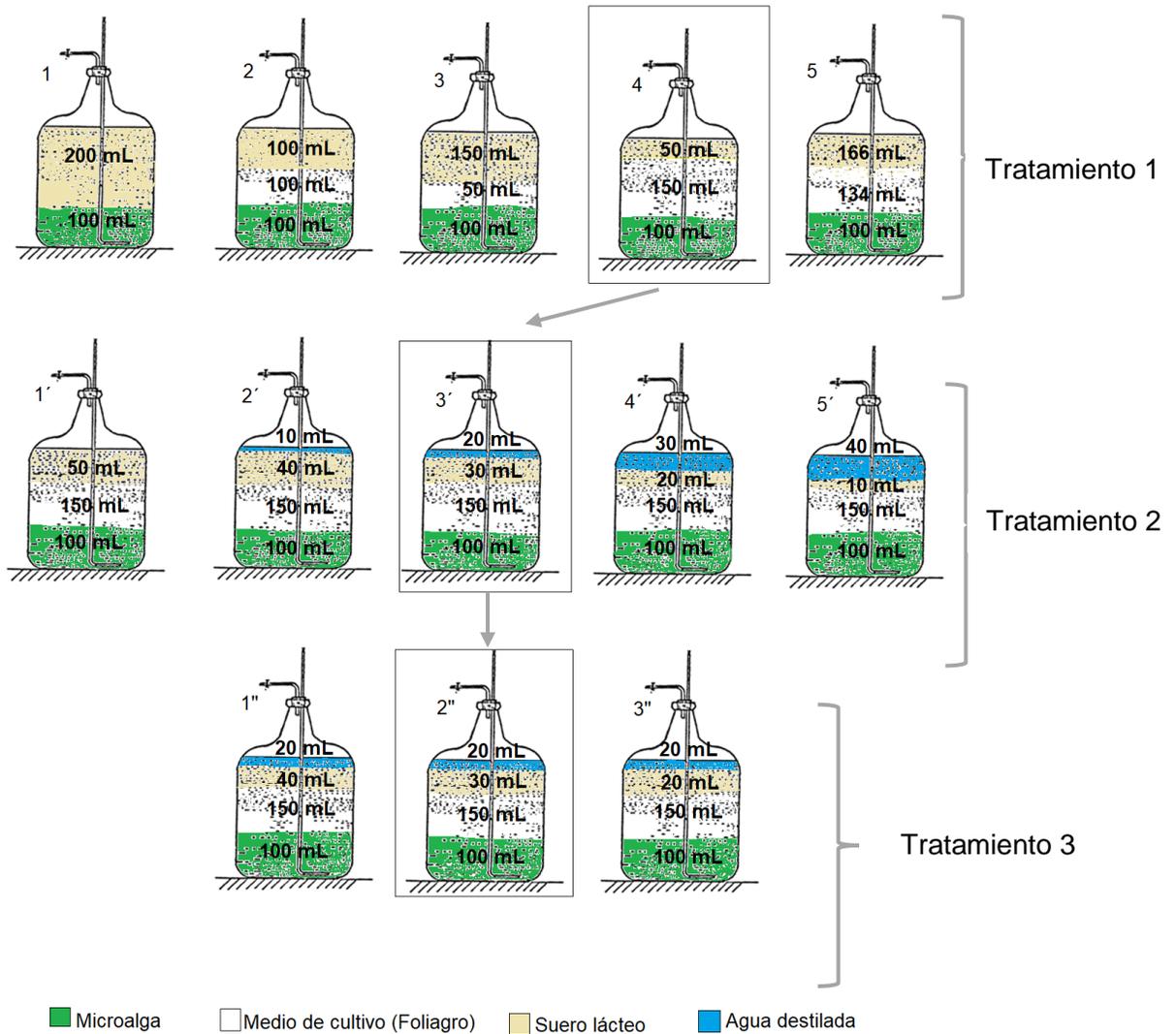
Para definir las proporciones adecuadas de los componentes del medio enriquecido, se seleccionó la de mayor crecimiento celular lo que permitió adicionalmente descartar los ensayos en los que no hubo un crecimiento celular adecuado y enfocar cada ensayo hasta obtener la proporción en la que se evidenció el mayor crecimiento celular (Tabla 2). Los tratamientos dos y tres son consecuencia del resultado del tratamiento inmediatamente anterior.

Tabla 3. Volúmenes de los ensayos.

Tratamiento	Ensayo	Microalga (mL)	Medio de cultivo (mL)	Agua destilada (mL)	Suero lácteo (mL)
1	1	100	0	0	200
	2	100	100	0	100
	3	100	50	0	150
	4	100	150	0	50
	5	100	134	0	66
2	1'	100	150	0	50
	2'	100	150	10	40
	3'	100	150	20	30
	4'	100	150	30	20
	5'	100	150	40	10
3	1''	100	150	20	40
	2''	100	150	20	30
	3''	100	150	20	20

Los volúmenes de trabajo fueron aproximadamente de 300 mL manteniendo en todos los cultivos el volumen de microalga constante de 100 mL.

Figura 8. Esquema secuencia de enfoque en cada tratamiento para la selección del ensayo con mayor concentración celular final. 4: Ensayo con mayor concentración celular final del tratamiento uno. 3': Ensayo con mayor concentración celular final del tratamiento dos. 2'': Ensayo con mayor concentración celular final del tratamiento tres.



2.2.2 Definición de los tratamientos pre-experimentales. En el primer tratamiento los cultivos se enriquecieron con suero sin diluir, por lo cual los cultivos no tenían volúmenes de agua destilada; de este ensayo se seleccionó la proporción de 100 mL de microalga, 150 mL de medio de cultivo y 50 mL de suero lácteo (Tabla 2).

El segundo tuvo como punto de partida la proporción seleccionada del ensayo uno en el cual se mantuvo constante el volumen del medio de cultivo, además del de microalga. Se llevaron a cabo diferentes proporciones en porcentaje volumen-volumen (% V/V) entre suero lácteo y agua destilada, lo que permitió definir cuatro diluciones que fueron 80%, 60%, 40% y 20% (Tabla 2).

En el tercer tratamiento el volumen base considerado fue de 100 mL de microalga, 150 mL de medio de cultivo, 30 mL de suero lácteo, y 20 mL de agua destilada. En este ensayo se mantuvo constante el volumen de agua destilada adicionalmente del volumen de medio de cultivo y microalga, variando solamente el volumen de suero lácteo a un volumen mayor y a un volumen menor (Tabla 2).

2.2.3 Seguimiento al cultivo y cuantificación celular. El conteo celular se realizó diariamente entre 10 y 30 días de acuerdo a los patrones de crecimiento observados. Se realizó por medio de microscopio de marca OPTIKA ITALY B-150 con lente de 10X y con la ayuda de la cámara de Neubauer (Anexo C), contando 5 cuadrantes de 25 y en zigzag por la alta concentración celular.

Se obtiene la cantidad de concentración celular por medio de la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Concentración celular en la Cámara de Neubauer⁴⁴

$$\text{Concentración (celulas/mL)} = \frac{\text{Número de células} \times 10000}{\text{Número de cuadrantes} \times \text{Dilución}}$$

2.2.4 Curvas de crecimiento. Las curvas de crecimiento se construyeron a partir del dato obtenido para la concentración de células/mL (Ecuación 1). El conteo se realizó por triplicado y el dato correspondiente a la concentración celular en el tiempo (día) se definió a partir del promedio obtenido para el conteo mencionado (Anexo D).

Se graficó el tiempo de crecimiento de los cultivos en días versus la concentración celular en unidades de células/mL.

⁴⁴ BASTIDAS, Oscar. Conteo Celular Con Hematocitómetro: Uso Elemental Del Hematocitómetro. [Consultado el 31 de Enero de 2017]. Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>

2.2.5 Cultivo con mayor producción de biomasa. Para definir el tratamiento bajo el cual se presentó una mayor concentración final de biomasa, se analizaron los datos obtenidos del tratamiento tres dado que este tratamiento permitió coleccionar datos referentes a la variación del suero lácteo y así mismo este tratamiento fue el producto de haber realizado una selección de las condiciones de los tratamientos uno y dos.

Este análisis se llevó a cabo por medio de ANOVA de un factor⁴⁵.

Se representa por medio de los siguientes grupos ecuaciones para un diseño balanceado:

$$SCT = \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{N} \text{ (Ecuación 2)}$$

$$SCE_{TR} = \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{N} \text{ (Ecuación 3)}$$

$$SCT = SCE_{TR} + SCD_{ER} \text{ (Ecuación 4)}$$

$$Y_{i.} = \sum_{j=1}^n Y_{ij} \text{ (Ecuación 5)}$$

$$Y_{..} = \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^n Y_{ij} \text{ (Ecuación 6)}$$

$$Y_{..} = \sum_{i=1}^K Y_{i.} \text{ (Ecuación 7)}$$

$$N = n \times K \text{ (Ecuación 8)}$$

$$CME_{TR} = \frac{SCE_{TR}}{K-1} \text{ (Ecuación 9)}$$

$$CMD_{ER} = \frac{SCD_{ER}}{N-K} \text{ (Ecuación 10)}$$

$$CMT = \frac{SCT}{N-1} \text{ (Ecuación 11)}$$

$$F = \frac{CME_{TR}}{CMD_{ER}} \text{ (Ecuación 12)}$$

⁴⁵ MINITAB. (2017). ¿Qué es ANOVA? - Support.minitab.com. [Consultado el 21 de Mayo de 2017]. Disponible en: <http://support.minitab.com/es-mx/minitab/17/topic-library/modeling-statistics/anova/basics/what-is-anova/>.

Tabla 4. Estructura tabla ANOVA.

Fuentes Variación	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	
Entre tratamientos	SCE_{TR}	K-1	CME_{TR}	F
Dentro de tratamientos (erros residual)	SCD_{ER}	N-K	CMD_{ER}	
Total	SCT	N-1	CMT	

2.3 TERCERA ETAPA

Se denominó desarrollo experimental a la producción de microalgas según los resultados obtenidos del crecimiento celular, bajo las condiciones planteadas en la segunda etapa; es decir se seleccionó un único ensayo (de la sección 2.2) y se repitió en idénticas condiciones modificando el volumen total de trabajo.

2.3.1 Desarrollo experimental. La experimentación consistió en repetir el ensayo bajo el cual se obtuvo una mayor concentración de biomasa final en un volumen mayor conservando las proporciones del ensayo microalga, medio de cultivo, suero lácteo y agua destilada. Para alcanzar un volumen de 3 L con tres repeticiones se desarrolló un proceso gradual de aumento de los volúmenes.

Se llevaron a cabo tres cultivos inicialmente con volúmenes de 1000 mL divididos en 332 mL del cultivo microalgal seleccionado en el pre-experimento, 500 mL de medio de cultivo, 100 mL de suero lácteo y 68 mL de agua destilada.

El cultivo se dejó adaptando 6 días ya que se evidenció por medio de la pre-experimentación que era el tiempo promedio de adaptación de la microalga. Posteriormente se llevaron a volúmenes mayores de 3 L, que se realizaron en tres fotobiorreactores adaptados de 4 L cada uno con dimensiones de 26 cm de alto, 16 cm de ancho en la base y 10 cm de ancho en la boca de vidrio.

Las condiciones de cultivo generadas (luz y agitación) para cada uno de los ensayos fueron iguales para el pre-experimento y para el experimento para lo cual se emplearon los mismos elementos en ambos casos (Figura 6).

Los cultivos de la fase tres o experimental tenían 998 mL del cultivo microalgal en crecimiento, 1500 mL de medio de cultivo, 300 mL de suero lácteo y 202 mL de agua destilada.

2.3.2 Cultivo control. Se realizó un medio de cultivo de 3,8 L que se componía de medio de cultivo y microalga siendo un blanco de comparación con respecto al experimento realizado.

2.3.3 Cuantificación de la biomasa. La cuantificación de la biomasa se realizó diariamente durante 20 días, por medio de los respectivos conteos celulares para cada cultivo y con los datos obtenidos se procedió a realizar las curvas de crecimiento (Ecuación 1).

2.4 CUARTA ETAPA

En esta etapa se prepara la biomasa para posteriormente obtener los lípidos y su cuantificación.

2.4.1 Separación inicial y secado de la biomasa. La biomasa microalgal obtenida en la fase experimental se separó retirando el medio de cultivo líquido en el que se mantenía suspendida la biomasa⁴⁶.

Se realizó por centrifugación en una centrifuga Baby I 206 en 12 tubos de 14 mL cada uno a 3200 RPM por 5 minutos; el sobrenadante se separó con pipetas de 10 mL y se recolectó el pellet obtenido.

El proceso de secado consistió en depositar el pellet o biomasa recolectada en cápsulas de porcelana y en moldes desechables de aluminio de 13 cm de largo, 10,5 cm de ancho y 4,3 cm de alto (Figura 9); la biomasa se secó a 40 °C en una estufa de secado Nabertherm (TR 120) por 18 horas las de los moldes de aluminio y las cápsulas hasta 32 horas por la cantidad de biomasa agregada.

⁴⁶ Introducción a los procesos biotecnológicos: Separación y purificación en Biotecnología (Downstream processing). 2017. Citado el 26 de julio de 2017. Disponible en: <http://bioprocesos.unq.edu.ar/Bioseparaciones%20Teoria.pdf>

Figura 9. Moldes desechables de aluminio.



2.4.2 Peso seco, rendimiento húmedo y productividad volumétrica. La cuantificación de biomasa seca se realizó por medio del peso por unidad de volumen de cultivo, totalizando el peso de la biomasa por el volumen de cultivo de la fase experimental.

El peso seco de la biomasa da la cantidad de biomasa producida por volumen de cultivo producido por medio de la ecuación 13.

$$\text{Peso seco } \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{\text{Peso de biomasa seca}}{\text{Volumen de la muestra}} \text{ (Ecuación 13)}$$

El peso seco del cultivo con sustrato de suero lácteo se comparó con el peso seco de un cultivo producido en las condiciones normales.

El rendimiento húmedo y la productividad volumétrica se determinaron con las ecuaciones 14 y 15.

Ecuación 14. Rendimiento biomasa húmeda.

$$\text{Rendimiento húmedo } \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Biomasa húmeda obtenida}}{\text{Volumen del medio}}$$

Ecuación 15. Productividad volumétrica.

$$\text{Productividad } \left(\frac{g}{d \times L} \right) = \frac{\text{Gramos de biomasa seca obtenida}}{\text{Días} \times \text{Volumen}}$$

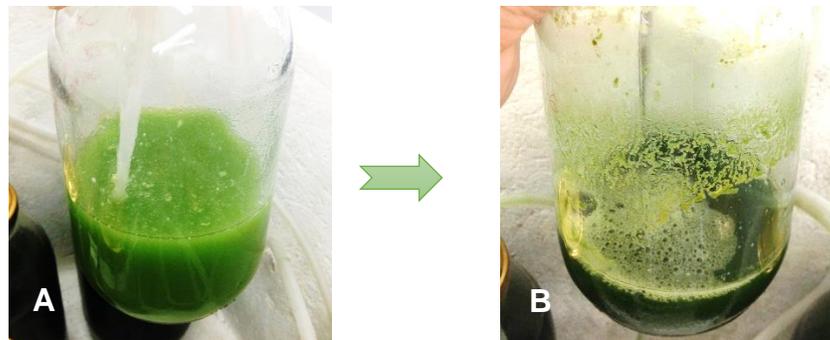
2.4.3 Extracción y cuantificación de lípidos. La extracción y cuantificación de lípidos se realizó en el laboratorio de toxicología de la Universidad Nacional. La extracción de lípidos se llevó a cabo por el método de Bligh & Dyer⁴⁷. La cuantificación de lípidos se realizó por medio de la cromatografía de gases⁴⁸.

3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1 CRECIMIENTO CELULAR DEL INÓCULO

El seguimiento cualitativo del inóculo (2.1.5), es decir, el viraje de color de verde claro a verde oscuro, se dio en un periodo de tiempo de 10 días sugiriendo una adaptación de la microalga al medio de cultivo enriquecido (Figura 10).

Figura 10. Cambio de coloración del inóculo. A: Cultivo microalgal mas el medio enriquecido en el día 1. B: Cultivo microalgal mas el medio enriquecido en el día 10.



3.2 CRECIMIENTO CELULAR DE LOS PRE-EXPERIMENTOS

Las curvas de crecimiento del tratamiento uno (Gráfico 5) sugieren que el crecimiento de la microalga *Chlorella Vulgaris* en el medio de cultivo enriquecido con suero lácteo (2.2.2) presenta las fases de adaptación y crecimiento exponencial. No fue posible determinar la fase estacionaria por cuestiones de tiempo.

El ensayo número cuatro (2.2.1) con volúmenes de 100 mL de microalga, 150 mL de medio de cultivo y 50 mL de suero lácteo presentó una concentración celular final de $7,90 \times 10^5$ (células/mL) en el día 10 a diferencia de los ensayos uno, dos, tres y cinco cuyas concentraciones celulares finales fueron de $5,22 \times 10^5$ (células/mL), $2,20 \times 10^5$ (células/mL), $3,08 \times 10^5$ (células/mL) y $3,16 \times 10^5$ (células/mL) respectivamente. El tiempo de adaptación del ensayo cuatro fue dos días menor

⁴⁷ GONZÁLEZ, Ángel; KAFAROV, Viatcheslav y GUZMÁN, Alexander. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. Universidad Industrial de Santander. 2009; Vol. 7; No. 2. p. 53-60.

⁴⁸ OZORES, Marta. Cromatografía de gases. Laboratorio técnicas instrumentales. [En línea] <<http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-gases>>. [Citado el 12 de Mayo de 2017].

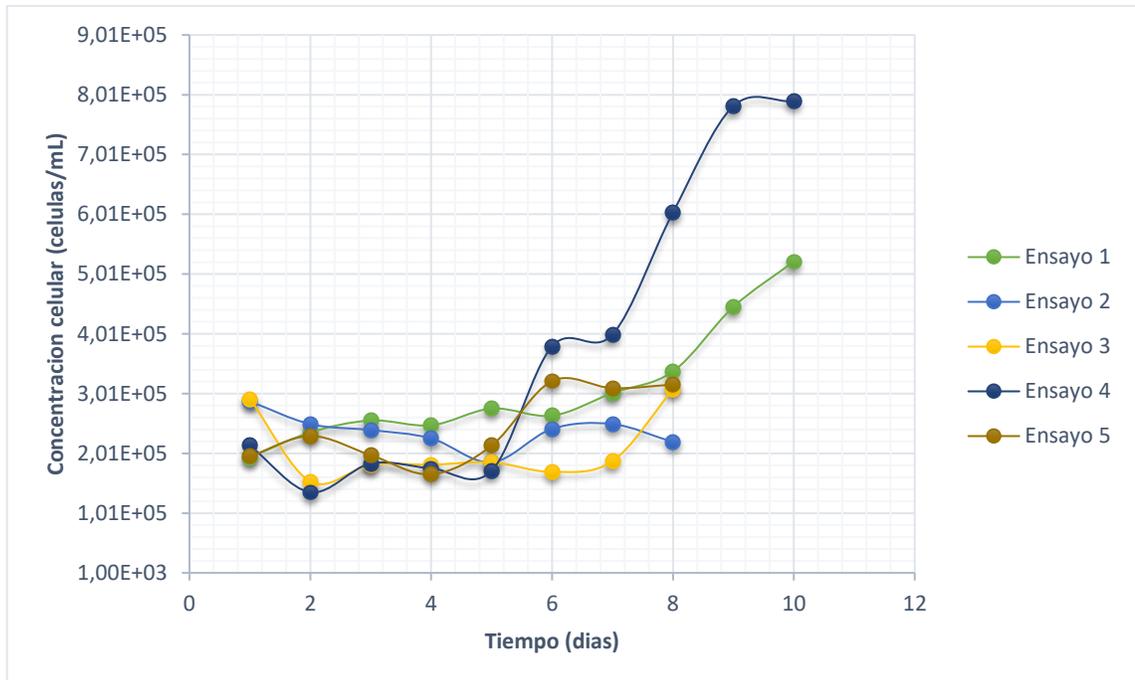
que los ensayos uno, dos, tres y cinco, ya que la fase exponencial inició en el quinto día, mientras que los demás ensayos iniciaron en el día seis o siete.

Lo anterior mencionado sugiere que la cantidad de medio de cultivo usado en el ensayo cuatro, que es mayor, permite que la microalga se adapte con mayor rapidez y eficiencia al suero lácteo y la microalga pueda así mismo, competir favorablemente con las bacterias inicialmente presentes en el suero.

En los ensayos dos, tres y cinco del tratamiento uno, no se realizaron conteos celulares desde el octavo día. Estos cultivos presentaron cambios en sus características cualitativas como color y olor, sugiriendo que se presentó contaminación de los mismos, dado que el proceso de producción de biomasa microalgal con medio de cultivo enriquecido con suero lácteo implicó trabajar con cultivos no axénicos.

El ensayo uno del tratamiento dos se repitió del ensayo anteriormente seleccionado pero el medio de cultivo enriquecido tuvo un proceso de esterilización, el cual, tiene efectos negativos en el cultivo microalgal como mayor producción de espuma y de sólidos.

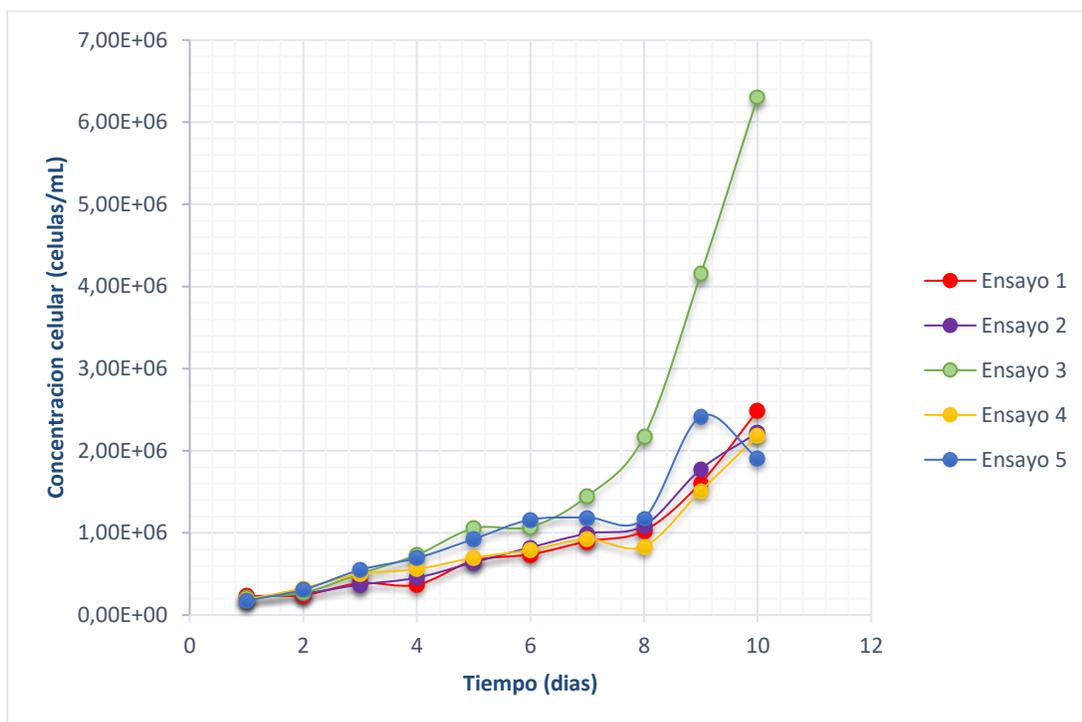
Gráfico 5. Curva de crecimiento tratamiento uno.



Las curvas de crecimiento del tratamiento dos (Gráfico 6) muestran que el ensayo con mayor concentración celular final fue el número tres con volúmenes de 100 mL

de inóculo, 150 mL de medio de cultivo, 30 mL de suero lácteo y 20 mL de agua destilada; lo cual sugiere que la dilución del suero lácteo en una proporción de 60%V/V es adecuada para permitir la producción de biomasa considerando adicionalmente el volumen inicial del inóculo y el volumen del medio de cultivo. Las concentraciones celulares finales fueron de $2,49 \times 10^6$ (células/mL), $2,22 \times 10^6$ (células/mL), $6,31 \times 10^6$ (células/mL), $2,18 \times 10^6$ (células/mL) y $1,91 \times 10^6$ (células/mL) de los ensayos uno, dos, tres, cuatro y cinco respectivamente.

Gráfico 6. Curva de crecimiento tratamiento dos.

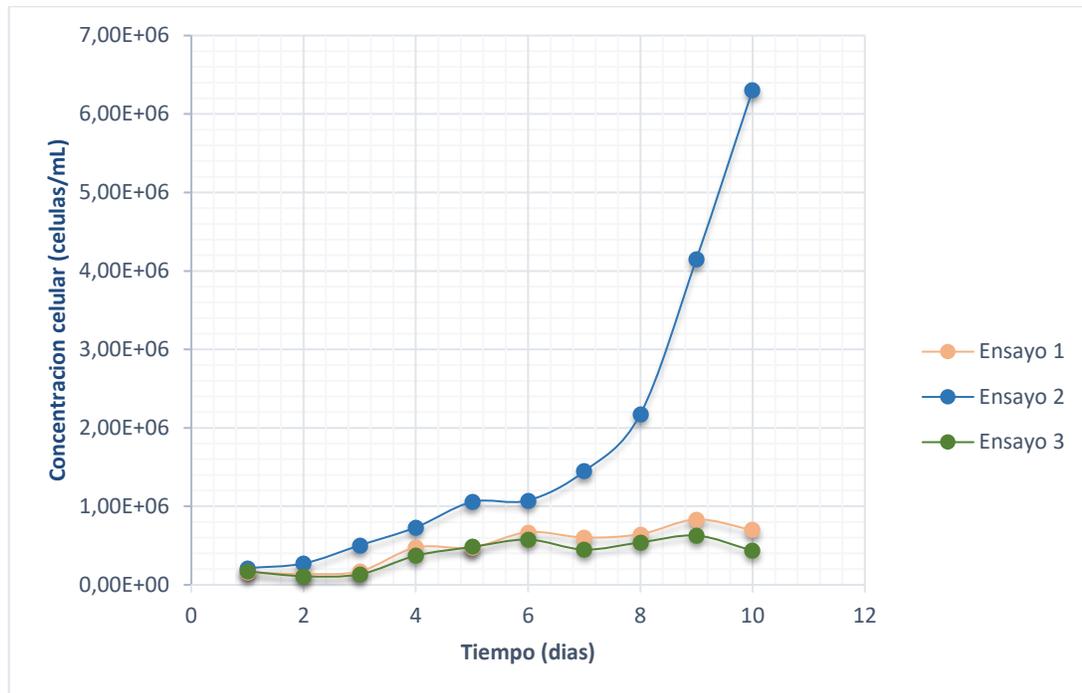


En el tratamiento tres, los volúmenes y las proporciones consideradas para los componentes del medio enriquecido con suero lácteo, utilizados para el crecimiento de las microalgas se basaron en el ensayo de mayor concentración celular final de células microalgales que se generó en el tratamiento dos que fue el ensayo tres con volúmenes de 100 mL de inóculo, 150 mL de medio de cultivo, 30 mL de suero lácteo y 20 mL de agua destilada.

En este ensayo se evaluó solamente la influencia del suero lácteo ya que se mantuvieron el resto de componentes constantes. Los volúmenes de suero lácteo para el tratamiento tres fueron 20 mL, 30 mL y 40 mL.

La microalga *Chlorella Vulgaris* presentó una concentración final de células/mL mayor en el ensayo dos (Gráfico 7) con volúmenes de 100 mL de inóculo, 150 mL de medio de cultivo, 30 mL de suero lácteo y 20 mL de agua destilada con una concentración celular máxima final de $6,31 \times 10^6$ (células/mL).

Gráfico 7. Curva de crecimiento Tratamiento tres.



Los ensayos del pre-experimento tienen como factor común una fase de adaptación que se encuentra entre los 4 y 6 días como se puede evidenciar en las curvas de crecimiento. Este factor común podría deberse a la composición compleja del sustrato ya que el suero lácteo contiene una cantidad significativa de proteínas, lípidos, azúcares y otros compuestos que exigen que la microalga pueda asimilar uno o varios componentes de este sustrato como fuente de carbono ya que los demás nutrientes fueron incorporados en el fertilizante foliar (Foliagro).

Adicionalmente la densidad y viscosidad del suero lácteo puede afectar la disponibilidad de la luz para los cultivos dificultando el proceso fotosintético de éstos⁴⁹.

⁴⁹ ARIAS y MARTÍNEZ. Op. cit., p. 43-65.

3.3 CULTIVO CON MAYOR PRODUCCIÓN DE BIOMASA

Para determinar si se presentaron diferencias significativas en las concentraciones finales de microalgas en los diferentes ensayos del tratamiento tres, se desarrolló un análisis de varianza (ANOVA). La variable independiente se definió como el volumen de suero lácteo en el tratamiento 3 y como variable dependiente la concentración celular final.

Tabla 5. Resultados tabla ANOVA de un factor.

Fuentes variación	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F
Entre tratamientos	1,23E+13	2	6,15E+12	4,64
Dentro de tratamientos	3,57E+13	27	1,32E+12	
Total	4,80E+13	29	1,66E+12	

Ho: No hay diferencia significativa en las concentraciones celulares entre los ensayos.

Hi: Hay diferencia significativa en las concentraciones celulares entre los ensayos.

El F crítico con un nivel de significancia de 0,05 es de 3,35 por lo cual la hipótesis Ho se rechaza ya que hay diferencia significativa en las concentraciones celulares finales de los tres ensayos del tratamiento tres, debido a que el F es mayor que el F crítico.

3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA DEL EXPERIMENTO

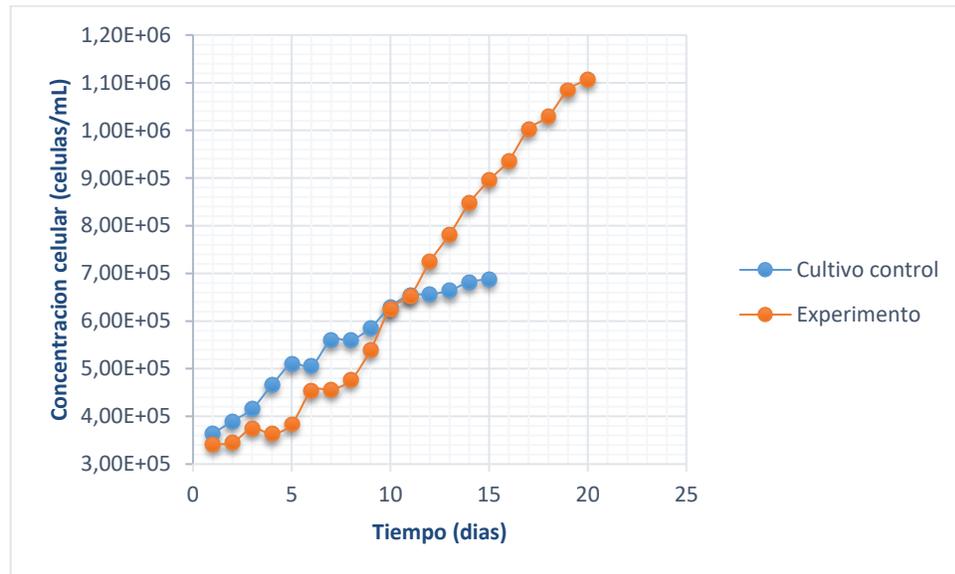
El experimento se desarrolló con las relaciones de $\frac{2}{3} : 1 : \frac{1}{5} : \frac{2}{15}$ de inóculo, medio de cultivo, suero lácteo y agua destilada respectivamente. Esta proporción se consideró dado que fue el ensayo que mostró una mayor concentración celular final con volúmenes de 100 mL de inóculo, 150 mL de medio de cultivo, 30 mL de suero lácteo y 20 mL de agua destilada, en una proporción de 60%V/V de suero lácteo en agua destilada.

Con el objeto de definir el tiempo en el que se observaba la fase estacionaria del cultivo, se realizaron conteos durante 20 días.

El ensayo mostró en sus tres repeticiones que tuvo cinco días de adaptación y a partir de este día su crecimiento fue exponencial. La concentración final de biomasa del experimento, $1,11 \times 10^6$ (células/mL), fue mayor que la del ensayo cuatro del tratamiento uno: $7,90 \times 10^5$ (células/mL); y menor en comparación con el ensayo tres

en el tratamiento dos: $6,31 \times 10^6$ (células/mL). Esto se puede deber al tiempo de seguimiento del experimento y a los volúmenes mayores del experimento que fue mayor en comparación con los pre-experimentos.

Gráfico 8. Comparación curvas de crecimiento del experimento y del cultivo control.



La concentración celular máxima del cultivo (Gráfico 8) con adición de suero lácteo es de $1,11 \times 10^6$ (células/mL) en comparación con la concentración celular máxima del cultivo control de $6,88 \times 10^5$ (células/mL) siendo $4,22 \times 10^5$ (células/mL) menor que el experimento.

El suero lácteo permitió un mayor crecimiento de la microalga *Chlorella Vulgaris* en algunas proporciones de los componentes del cultivo enriquecido a diferencia de otras. Se evidenció por medio de las curvas de crecimiento que no todos los cultivos tuvieron el mismo comportamiento y que a volúmenes mayores de cultivo la microalga necesita más tiempo para adaptarse y para mostrar una fase exponencial.

El proceso realizado en esta investigación llegó a la proporción adecuada entre las evaluadas para el crecimiento de la microalga registrando la mayor concentración celular. En próximas investigaciones se debe optimizar el proceso, por lo cual se sugiere un tratamiento previo al suero lácteo como la centrifugación para eliminar la mayor parte de impurezas o un secado del suero para evitar la proliferación bacteriana, generando un cultivo más limpio⁵⁰. En el presente trabajo se observó

⁵⁰ CONOCIMIENTOSWEB.NET. Centrifugación de la leche; cursos gratis. Citado el 09 de agosto del 2017. Disponible en: <http://www.conocimientosweb.net/dcmt/ficha19372.html>.

que la esterilización del medio de cultivo por autoclavado genera efectos negativos en el cultivo.

Manjarrés y Muñoz⁵¹ usaron glicerol como una fuente orgánica de carbono para enriquecer el medio de cultivo. Se reportó una concentración celular máxima de $2,35 \times 10^7$ (células/mL), en 12 días de observación pero en un tiempo menor al del presente trabajo. No fue posible llevar a cabo los cultivos con glicerol industrial por las condiciones fisicoquímicas de este, por lo cual fue necesario adquirir comercialmente un glicerol de calidad óptima lo que aumentó los gastos del proyecto; el suero lácteo fue preparado, pero con un costo de dos mil pesos (\$2.000) por litro y medio de sustrato producido lo que indicaría desde el punto de vista económico que es un sustrato adecuado para enriquecer el medio de cultivo para la producción de biomasa. Por cuestiones logísticas no fue posible en este trabajo evaluar suero lácteo proveniente de procesos industriales por lo cual podría llevarse a cabo en investigaciones posteriores.

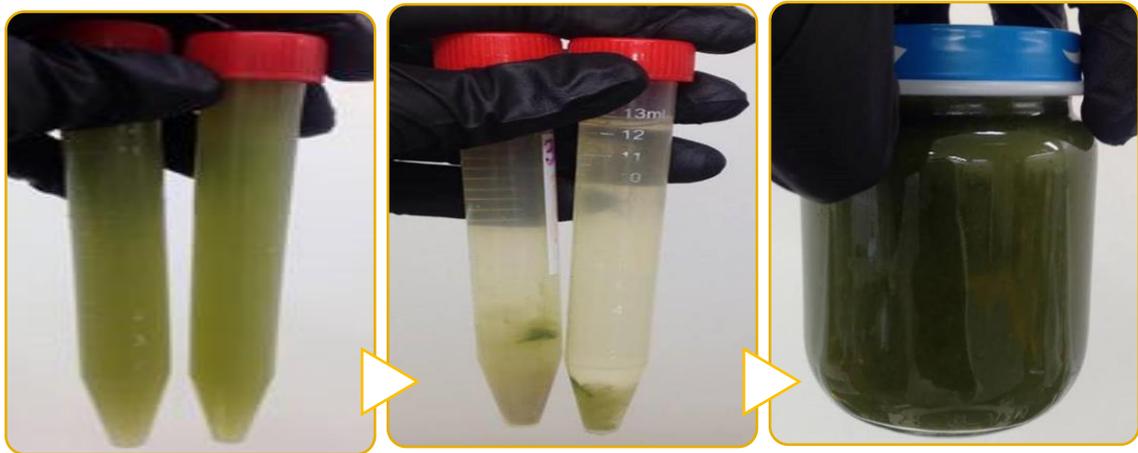
3.5 CONCENTRACION DE BIOMASA

La separación inicial de biomasa se logró por centrifugación de 6,2 L de los 9 L desarrollados en la experimentación (2.3.1), debido a las condiciones cualitativas de uno de los ensayos siendo contraproducentes como el color amarillento y olor de la fermentación, lo cual indicaba la contaminación del cultivo.

El sobrenadante recolectado del proceso de centrifugación se desechó conservando el pellet en recipientes de vidrio (Figura 11).

⁵¹ MANJARRÉS, C.; MUÑOZ, L., y LACHE, A. (2015, junio). Efecto del glicerol como fuente de carbono adicional en la obtención de biomasa y ácidos grasos en cultivos *Chlorella Vulgaris* en un foto-biorreactor de panel plano a escala de laboratorio. Universidad de América.

Figura 11. Concentración de biomasa.



La cantidad de biomasa húmeda obtenida fue de 437,91 g la cual se dividió en un recipiente de vidrio de 250 mL y dos de 100 mL (Tabla 5).

Tabla 6. Biomasa húmeda obtenida.

Recipiente	1	2	3
Cantidad			
Peso recipiente vacío (g)	139,87	75,42	70,69
Peso recipiente con biomasa (g)	369,06	184,76	170,07
Biomasa húmeda (g)	229,19	109,34	99,38

3.6 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA SECA

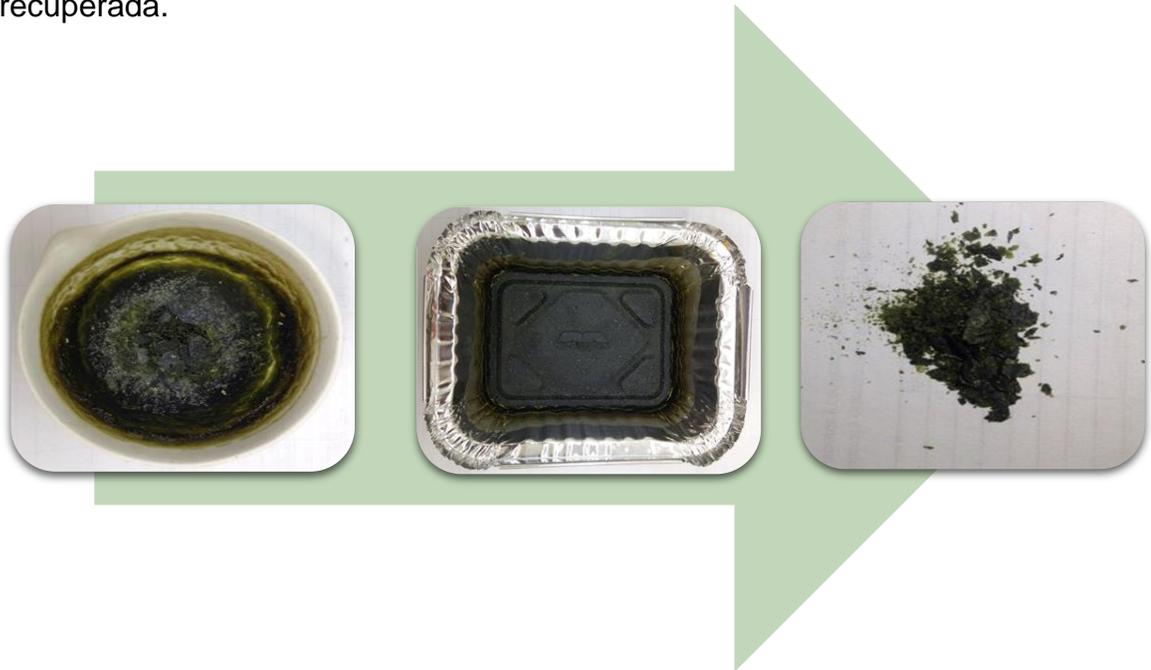
Después de obtener la biomasa húmeda se prosiguió a secarla, obteniendo las cantidades (Tabla 6) de los diferentes moldes de aluminio y de las cápsulas de porcelana (Figura 12).

Tabla 7. Cantidades de biomasa.

Recipiente	Molde 1	Molde 2	Molde 3	Molde 4	Molde 5	Cápsula 1	Cápsula 2
Vacío (g)	6,40	6,45	6,40	6,45	6,52	52,26	52,07
Biomasa húmeda + recipiente (g)	66,02	48,75	114,52	63,35	46,85	108,39	115,68
Biomasa húmeda (g)	59,62	42,3	108,12	56,9	40,33	56,13	63,61
Biomasa seca + recipiente (g)	7,66	7,33	8,67	7,99	7,60	53,38	53,37
Biomasa seca (g)	1,26	0,88	2,27	1,54	1,08	1,12	1,3

La cantidad de biomasa seca en total fue de 9,42 g de 6,2 L del cultivo microalgal, de los cuales se recuperó 6,58 g de biomasa seca de los moldes y cápsulas. La diferencia entre el total de biomasa seca y recuperada se debió a que parte de la biomasa quedó adherida a las cápsulas. La biomasa seca de las cápsulas se desechó ya que emanaba olor fuerte de fermentación.

Figura 12. Moldes con biomasa seca y biomasa seca recuperada. Cápsula de porcelana con biomasa seca, molde de aluminio con biomasa seca y biomasa seca recuperada.



3.7 PESO SECO DEL CULTIVO ENRIQUECIDO

El peso seco (Ecuación 13) del cultivo enriquecido con suero lácteo después del proceso de secado y recuperación de biomasa seca fue de $1,52 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$.

$$\text{Peso seco (g/mL)} = \frac{9,42}{6200} = 1,52 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$$

3.8 COMPARACIÓN DEL CULTIVO CONTROL VS MEDIO ENRIQUECIDO

Se obtuvo del cultivo control 56,63 g de biomasa húmeda concentrada, 2,85 g de biomasa seca y peso seco de $7,5 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$, por lo cual se puede evidenciar que se obtuvo mayor rendimiento de biomasa seca del cultivo enriquecido con suero lácteo en comparación con el medio de cultivo con una diferencia de $7,7 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$.

El rendimiento húmedo (Ecuación 14) y la productividad volumétrica (Ecuación 15) se presentan en la tabla 7.

$$\text{Rendimiento húmedo experimento (g/L)} = \frac{437,91}{6,2} = 70,63$$

Ecuación 15. Productividad volumétrica.

$$\text{Productividad experimento (g/d x L)} = \frac{9,42}{20 \times 6,2} = 0,06$$

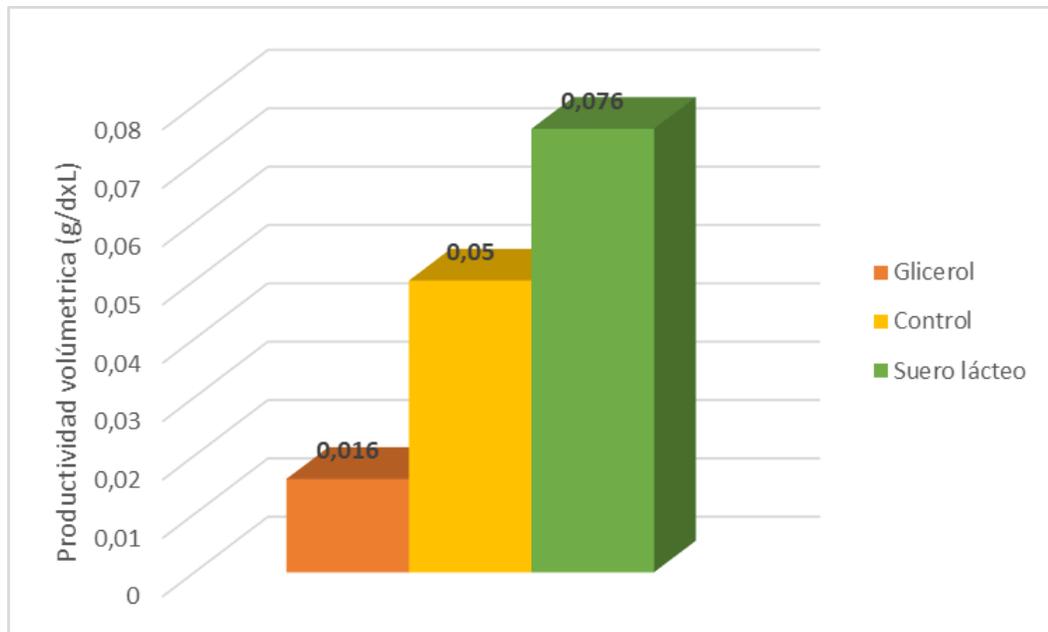
Tabla 8. Rendimiento húmedo y productividad volumétrica.

	Cultivo control	Experimento
Biomasa húmeda total (g)	56,63	437,91
Biomasa seca total (g)	2,85	9,42
Volumen (L)	3,8	6,2
Días	15	20
Rendimiento biomasa húmeda (g/L)	14,90	70,63
Productividad volumétrica (g/d*L)	0,05	0,076

El rendimiento de biomasa húmeda es mayor en el medio de cultivo con suero lácteo con 70,63 g/L en comparación con el cultivo control con 14,90 g/L, demostrando que el enriquecimiento del cultivo con suero lácteo es viable para la producción de biomasa húmeda.

De igual manera la productividad volumétrica es mayor en el cultivo enriquecido con suero lácteo con 0,076 g/d*L en comparación con el cultivo control con 0,05 g/d*L y Manjarrés y Muñoz⁵² reportaron un rendimiento de biomasa húmeda de 0,016 g/d*L en el cultivo enriquecido con glicerol siendo también menor que el cultivo enriquecido con suero lácteo (Gráfico 9).

Gráfico 9. Comparación de la productividad volumétrica.

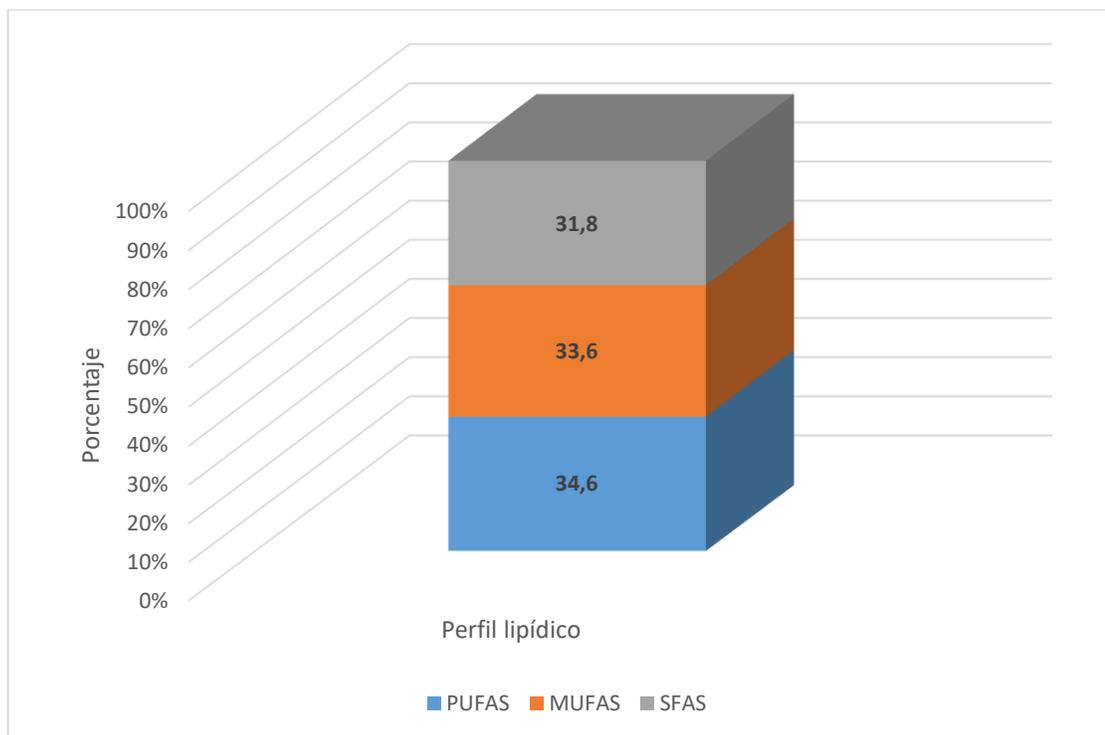


3.9 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACION DE LÍPIDOS

Una vez la biomasa seca fue recuperada, se llevó al laboratorio de toxicología de medicina veterinaria y zootecnia en la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

⁵² MANJARRÉS, C.; MUÑOZ, L.; y LACHE, A. Op. cit., p. 60.

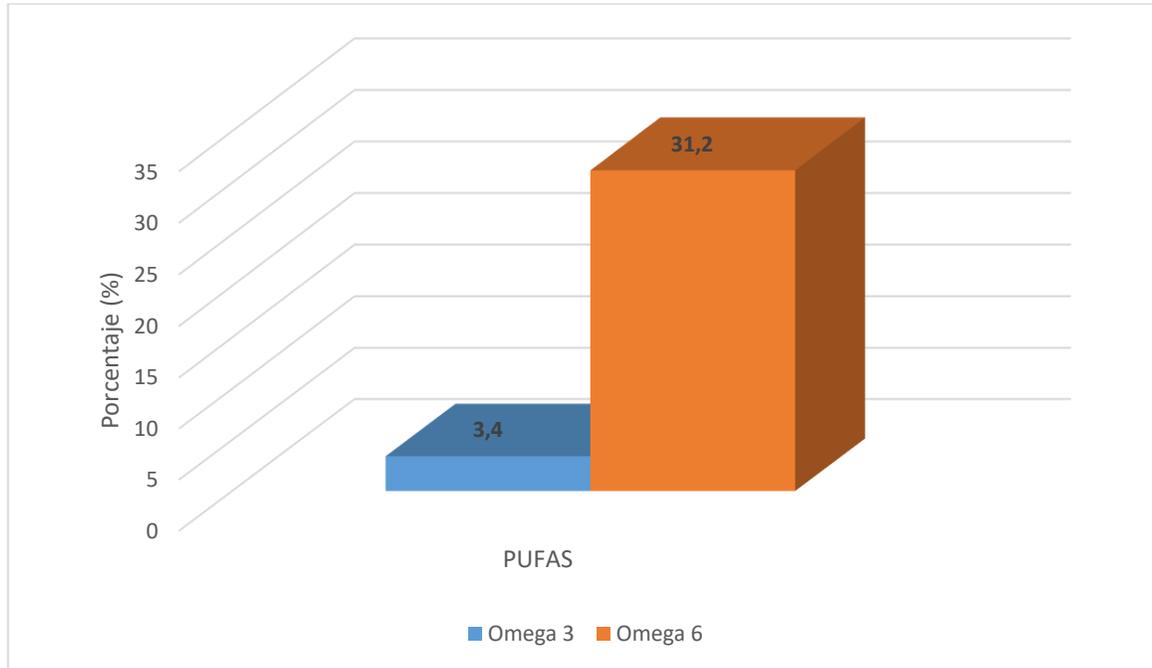
Gráfico 10. Composición de ácidos grasos.



La composición (Gráfico 9) de ácidos grasos poliinsaturados obtenidos en el experimento fue de 34,6%, de ácidos grasos monoinsaturados es 33,6% y ácidos grasos saturados es de 31,8% siendo la más baja.

La producción de ácidos grasos poliinsaturados es alta lo cual es favorable porque son ácidos grasos esenciales que se pueden utilizar en la industria de alimento o incluso en la misma industria láctea para el enriquecimiento de sus productos.

Gráfico 91. Composición de omega 3 y omega 6 en las PUFAS.



La cantidad de omega 6 en comparación del omega 3 (Gráfico 10) que componen los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) es mayor en un porcentaje del 10,8% y en una proporción de 1:9 de omega 3 y omega 6 respectivamente, siendo adecuada para la producción de alimentos o como consumo complementario en una dieta saludable como una fuente adecuada de ácidos esenciales.

Tabla 9. Perfil lipídico del cultivo enriquecido con suero lácteo.

FAMES	Nombre	Porcentaje (%)
C14:0	Mirístico	1,60
C14:1	Mirístoleato	0,66
C15:0	Pentadecanoato	1,20
C15:1	Pentadecenoato	0,31
C16:0	Palmítico	17,44
C16:1	Palmítoleico	3,11

Tabla 8. (Continuación)

FAMES	Nombre	Porcentaje (%)
C17:0	Margárico – Heptadecanoico	2,93
C17:1	Heptadecenoico	3,09
C18:0	Esteárico	7,92
C18:1n-9t	Elaídico	23,57
C18:1n-9c	Oleico	2,71
C18:2n-6c	Linoleico	25,67
C18:3n-6	g-Linolenico	5,58
C18:3n-3	Linolenico	3,17
C20:0	Araquídico	0,68
C20:1n-9	Eicosenoico	0,18
C20:3n-3	Eicosatrino	0,20
	Total	100,0

Debido al alto contenido de ácido linoleico (Tabla 8) del 25,67% el aceite producido por el cultivo enriquecido con suero lácteo es más adecuado para la industria cosmética, industria de las pinturas, industria de los alimentos y en especial para la producción de jabones por sus propiedades de emulgente y su composición de poliinsaturados.

La producción de ácido elaídico también es una de las más altas en un 23,57% siendo uno de los principales ácidos monoinsaturados y el de ácido palmítico que es del 17,44% correspondiendo al ácido graso saturado en mayor cantidad presente en este experimento. Los ácidos grasos extraídos son adecuados para la producción de biodiesel debido a que contiene cadenas largas de carbono desde 16 hasta 18 carbonos y tienen bajo o ningún grado de insaturación.

3.10 POTENCIAL DEL SUERO LÁCTEO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL

Los resultados obtenidos en la presente experimentación, puede evidenciar que el suero lácteo es una fuente promisoriosa para el crecimiento microalgal en especial para procesos en los cuales su finalidad sea la producción de biomasa húmeda ya

que su rendimiento fue mayor en comparación con otro estudio realizado por Manjarrés y Muñoz⁵³.

El suero lácteo es un residuo que se genera a partir de la producción de queso, por lo cual existe manipulación de éste, lo que hace compleja su implementación por su disposición a la proliferación bacteriana. Al realizar tratamiento con temperatura se degradan los componentes del suero lácteo deseados como en este caso la lactosa; también la conservación es de gran importancia debido a la rápida fermentación.

El proceso de extracción y cuantificación de lípidos se decidió realizar en los laboratorios de veterinaria y zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, debido a la falta de equipos y a la experiencia satisfactoria de otra investigación, evitando cualquier imprevisto en el desarrollo del trabajo de grado.

Los resultados de la composición de ácidos grasos en la microalga *Chlorella Vulgaris*, depende de diferentes factores como los nutrientes y las condiciones de cultivo.⁵⁴

El suero lácteo empleado no proviene de fuentes industriales. Por lo cual se recomienda para próximas investigaciones implementar suero lácteo de procesos a nivel industrial.

Con el presente trabajo se demostró el potencial del suero lácteo como sustrato de carbono para el cultivo microalgal, siendo un proceso que puede dar un valor agregado a este residuo del cual se puede obtener biomasa y acumulación de lípidos pudiéndose implementar en otros procesos de producción.

⁵³ MANJARRÉS, C.; MUÑOZ, L.; y LACHE, A. Op. cit., p. 60.

⁵⁴ ARIAS y MARTÍNEZ. Op. cit., p. 43-65.

4. CONCLUSIONES

- Se demostró que la microalga *Chlorella Vulgaris* se adaptó en la mayoría de ensayos al suero lácteo implementado como sustrato de enriquecimiento, ya que el crecimiento fue exponencial demostrándose por medio de las curvas de crecimiento.
- El suero lácteo implementado como sustrato en un cultivo mixotrófico para el crecimiento microalgal debe estar diluido en agua destilada y en concentraciones bajas en relación a la concentración de microalgas.
- El efecto que tiene el suero lácteo como sustrato de enriquecimiento en los cultivos de microalga *Chlorella Vulgaris*, es de aportar nutrientes como la fuente de carbono para el crecimiento de estas.
- El rendimiento de la biomasa seca obtenido del proceso por volumen es mayor, cuando el medio de cultivo es enriquecido con suero lácteo obteniendo $1,52 \times 10^{-3}$ g/mL en comparación con el cultivo control que fue de $7,5 \times 10^{-4}$ g/mL, con una diferencia de $7,7 \times 10^{-4}$ g/mL.
- El rendimiento de biomasa húmeda y de productividad volumétrica es mayor en el cultivo enriquecido con suero lácteo con 70,63 g/L y 0,076 g/d*L, en comparación con el cultivo control con 14,90 g/L y 0,05 g/d*L siendo una fuente de carbono ideal para la producción de biomasa húmeda.
- Los ácidos grasos obtenidos en mayor cantidad fueron el linoleico, elaídico y palmítico en porcentajes de 25,67%, 23,56% y 17,44% respectivamente, por lo cual la mayor proporción de ácidos grasos son ácidos poliinsaturados (PUFAS), el cual es un aceite que podría ser utilizado en la industria alimentaria, industria cosmética y la industria de pinturas.

5. RECOMENDACIONES

- En el monitoreo de las variables se recomienda controlar y tener en cuenta la variable de temperatura y pH, debido a que el suero lácteo contiene ácido láctico que puede influir considerablemente en la producción de biomasa microalgal.
- En el montaje del fotobiorreactor adaptado se recomienda esterilizar siempre todos los materiales implementados y mantener en la mayor proporción las condiciones asépticas.
- En el secado de la biomasa se recomienda realizar una liofilización para obtener las condiciones necesarias y la mejor calidad de la biomasa para posteriormente realizar la extracción de lípidos en vez de realizar el secado en estufa por vaporización.
- Se recomienda realizar un diseño de experimentos para ser más riguroso en la realización de los pre-experimentos y analizar con mayor formalidad la influencia del suero lácteo.
- Si el análisis del perfil lipídico se realiza en laboratorios de otras instituciones o privados se recomienda llevar la muestra con tiempo ya que se demora en la entrega de resultados.

BIBLIOGRAFIA

AIDER, M., D. HALLEUX and I. MELNIKOVA. 2009. Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10(3): 334-341.

AKHTAR, M. and E. DICKINSON. 2007. Whey protein-maltodextrin conjugates as emulsifying agents: An alternative to gum arabic. *Journal Food Hydrocolloids* 21(4): 607-616.

ANTOLLI, P. and LIU, Z. *Bioreactors: Design, Properties, And Applications* [e-book]. New York: Nova Science Publishers, Inc; 2012. Available from: eBook Collection (EBSCOhost), Ipswich, MA. Citado en [Mayo 31, 2017].

ARIAS, Martha; MARTÍNEZ, Alfredo y CAÑIZARES, Rosa. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. En: *Acta Biológica Colombiana* [en línea], Enero 2013, No. 1. [Citado en 2 de Enero de 2017]. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319028010004> >

BASTIDAS, Oscar. *Conteo Celular Con Hematocitómetro: Uso Elemental Del Hematocitómetro*. [Citado el 31 de Enero de 2017]. Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>

BENAVENTE, J. R., *et al.* Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. En: *AQM* [en línea]. Año 2012, Vol. 4 No. 7 [citado el 30 de mayo de 2017]. Disponible en: <<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/4.html> >

CASTRO, K. & ORTIZ E. (2014, Mayo). Determinación de la incidencia en la relación Carbono: Nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos en la microalga *Chlorella Vulgaris* a escala laboratorio. *Fundación Universidad de América*, Vol. 6.

CONOCIMIENTOSWEB.NET. Centrifugación de la leche; cursos gratis. Citado el 09 de agosto del 2017. Disponible en: <http://www.conocimientosweb.net/dcmt/ficha19372.html>.

CRUZ, ángel y PIMIENTA, Wendy, "Evaluación de la incidencia del nitrógeno en el medio de cultivo bold basal para la producción de biomasa de la microalga *Chlorella Vulgaris* en un fotobiorreactor, para la obtención de ácidos grasos," *Fundación universidad América*, 2012.

GARIBAY, Adriana. Biodiesel a Partir de Microalgas. En: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Biotecnología. 2009, Vol. 13 No. 3.

GONZÁLEZ, Ángel y GUZMÁN, Alexander. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. Universidad Industrial de Santander. 2009; Vol. 7; No. 2. p. 53-60.

GÓMEZ, Luna; ÁLVAREZ, Inaudis y RIVERO, Roger. Cultivo de *Chlorella Vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. EN: Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. 13. No. 2. 2011. p 27-38.

GUAUQUE, Catalina y ALCALA, Camilo. Evaluación de la incidencia de la temperatura en la producción de lípidos obtenidos a partir de biomasa microalga a escala laboratorio. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de América, 2013.

HERNÁNDEZ, Adriana; VÁZQUEZ, Rafael y SÁNCHEZ, Pilar. Biodiesel a Partir de Microalgas. En: Biotecnología [en línea]. Año 2009, Vol. 13 No. 3 [citado el 12 de mayo de 2016]. Disponible en: <
http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Biodiesel.pdf >

HERNÁNDEZ, Alexis y LABBE, José. Microalgas, cultivo y beneficios. EN: Biología marina y oceanográfica. Vol. 49, No. 2 (agost. 2014); p. 160.

INFANTE Cherlys, *et al.* Propagación de la microalga *chlorella sp.* en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. EN: Avances en Ciencias e Ingeniería. Cartagena. (Abril/Junio, 2012).

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. ICONTEC. NTC 1486. Documentación, presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. Bogotá, Colombia. 2008.

_____ NTC 5613. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. Bogotá, Colombia. 2008.

_____ NTC-ISO 9001. Sistema de gestión de la calidad fundamentos y vocabulario. Bogotá, Colombia. 2005

Introducción a los procesos biotecnológicos: Separación y purificación en Biotecnología (Downstream processing). 2017. Citado el 26 de julio de 2017. Disponible en: <http://bioprocesos.unq.edu.ar/Bioseparaciones%20Teoria.pdf>

JARAMILLO, Juan. Evaluación tecno-económica de la producción de biocombustibles a partir de microalgas. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ingeniería Química. Manizales. Universidad

Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Maestría en Ingeniería- Ingeniería Química, 2011.

LACTO NOTAS: boletín 3. [Citado en 20 de abril de 2016]. Disponible en <http://evirtual.lasalle.edu.co/info_basica/nuevos/guia/GuiaClaseNo.3.pdf >

L. Miguel y S. Berm, “Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel,” Universidad Nacional, 2012, p. 50.

MADIGAN Michael, MARTINKO John y PARKER Jack. Brock: Biología de los microorganismos. Décima edición. Madrid: Pearson, 2003.

MALDONADO, Evelyn; MORALES, Ever y ROMERO, Pedro. Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chorella emersonii*) con sustratos amiláceos. ESPE. Universidad de las Fuerzas Armadas. 2014.

MANJARRÉS, C., MUÑOZ, L., y LACHE, A. (2015, junio). Efecto del glicerol como fuente de carbono adicional en la obtención de biomasa y ácidos grasos en cultivos *Chlorella Vulgaris* en un foto-biorreactor de panel plano a escala de laboratorio. Universidad de américa.

“Microalgas como elementos de fitorremediación,” biotecnología; 2009. p. 1-11.

MALGAS. Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. Asturias: AST ingeniería S.L. 2013.

MINITAB. (2017). ¿Qué es ANOVA? - Support.minitab.com. [Consultado el 21 de Mayo de 2017]. Disponible en: <http://support.minitab.com/es-mx/minitab/17/topic-library/modeling-statistics/anova/basics/what-is-anova/>.

MINXI, W, et al. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. EN: Applied Microbiology & Biotechnology [serial online]. August 2011; 91(3):835-844. Available from: Academic Search Complete, Ipswich, MA. Citado en [Mayo 31, 2017].

PEREZ, Octavio, *et al.* Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. EN: Water research. Estados unidos. Vol. 45, No. 36 (2011).

OZORES, Marta. Cromatografía de gases. Laboratorio técnicas instrumentales. [En línea] <<http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografia-de-gases>>. [Citado el 12 de Mayo de 2017].

REPÚBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. (1986). Resolución 2310 referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los Derivados Lácteos.

RODRÍGUEZ, Andrea; SERRANO, Luna y FIRSON Andrés; Efecto de la relación Carbono/ Nitrógeno en la productividad de Biomasa y Lípidos en cultivos de *Chlorella Vulgaris Utex 1803*. EN: Fotobiorreactores a escala de laboratorio. Universidad Industrial de Santander. Ingeniería Química, 2012.

ROSALES, N., *et al.* Gallinaza: un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. EN: Revista Colombiana de Biotecnología. 2007. Vol. 9. No.1. p. 41-48.

RUBIO, D., ALCALÁ, C. y G, Ingrid, “Evaluación de la incidencia de la temperatura en la producción de lípidos obtenidos a partir de biomasa microalgal a escala laboratorio,” Revista de Investigación. Universidad de América, 2013. Vol. 6, No. 2.

TRINIDAD, M.; MARTÍNEZ, A. y CAÑIZARES, R. (enero, 2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Marzo 19, 2016, EN: Acta Biológica Colombiana Sitio web:<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/32832/40207>.

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA. Suero lácteo [en línea]. <http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211613/Modulo_zip/leccin_35_suero_lcteo.html > [citado en 12 de mayo de 2016].

XU, Han; Miao, Xiaoling and WU, Qingyu. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. En: Journal of Biotechnology. China. Vol. 126 (2006); p. 499-507.

YUN, Ys, *et al.* Carbon dioxide fixation by algal cultivation using waste water nutrients. J. of Chem. IN: Technol. Biotechnol. 1997.

YU, X.; CHEN, L.; and ZHANG, W.. (2015). Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. EN: *Frontiers in Microbiology*. [citado el 2 de Enero de 2017]. 1–10. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00056>.

ZHAN, Jiao; RONG, Junfeng and WANG, Qiang. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. EN: International journal of hydrogen energy. China. Vol.13 (2016)

ANEXOS

ANEXO A.

COMPOSICIÓN DE FERTILIZANTE FOLIAR (FOLIAGRO)

En la siguiente tabla se evidencia la composición del medio foliar (Tabla 9).

Tabla 10. Composición del fertilizante Foliagro™

Compuesto	Cantidad (g/L)
Nitrógeno Total	100.0
Nitrógeno Amoniacal	72.0
Nitrógeno nítrico	3.2
Nitrógeno ureico	24.8
Fosforo Asimilable (P ₂ O ₅)	300.0
Potasio Soluble en agua (K ₂ O)	100.0
Calcio (CaO)	0.20
Magnesio (MgO)	0.20
Azufre total	0.80
Boro	0.20
Cobre	0.20
Hierro	0.40
Manganeso	0.40
Molibdeno	0.03
Zinc	0.50

ANEXO B.

PRODUCCION DE QUESO

DESCRIPCION DEL PROCESO⁵⁵

Recepción: La leche de buena calidad se pesa para conocer la cantidad que entrará a proceso. La leche debe filtrarse a través de una tela fina, para eliminar cuerpos extraños.

Análisis: Deben hacerse pruebas de acidez, antibióticos, porcentaje de grasa y análisis organoléptico (sabor, olor, color). La acidez de la leche debe estar entre 16 y 18 ° (grados Dornic).

Pasteurización: Consiste en calentar la leche a una temperatura de 65°C por 30 minutos, para eliminar los microorganismos patógenos y mantener las propiedades nutricionales de la leche, para luego producir un queso de buena calidad. Aquí debe agregarse el cloruro de calcio en una proporción del 0.02-0.03% en relación a la leche que entró a proceso.

Enfriamiento: La leche pasteurizada se enfría a una temperatura de 37-39 °C, pasando agua fría en la chaqueta o con sacos con hielo. **Adición del cultivo láctico:** Cuando la leche es pasteurizada es necesario agregar cultivo láctico (bacterias seleccionadas y reproducidas) a razón de 0.3%.

Adición del cuajo: Se agrega entre 7 y 10 cc de cuajo líquido por cada 100 litros de leche o bien 2 pastillas para 100 litros (siga las instrucciones del fabricante). Se agita la leche durante un minuto para disolver el cuajo y luego se deja en reposo para que se produzca el cuajado, lo cual toma de 20 a 30 minutos a una temperatura de 38-39 °C.

Corte: La masa cuajada se corta, con una lira o con cuchillos, en cuadros pequeños para dejar salir la mayor cantidad de suero posible. Para mejorar la salida del suero debe batirse la cuajada. Esta operación de cortar y batir debe durar 10 minutos y al finalizar este tiempo se deja reposar la masa durante 5 minutos. La acidez en este punto debe estar entre 11 y 12 °Dornic.

Desuerado: Consiste en separar el suero dejándolo escurrir a través de un colador puesto en el desagüe del tanque o marmita donde se realizó el cuajado. Se debe separar entre el 70 y el 80% del suero. El suero se recoge en un recipiente y por lo general se destina para alimentación de cerdos.

⁵⁵ FAO. Fichas técnicas de procesados de lácteos [En línea].2017. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-au170s.pdf> [citado el 01 de mayo de 2017].

Lavado de la cuajada: La cuajada se lava para eliminar residuos de suero y bloquear el desarrollo de microorganismos dañinos al queso. Se puede asumir que por cada 100 litros de leche que entra al proceso, hay que sacar 35 litros de suero y reemplazarlo con 30 litros de agua tibia (35°C), que se escurren de una vez.

Salado: Se adicionan de 400 a 500 gramos de sal fina por cada 100 litros de leche y se revuelve bien con una paleta. Haga pruebas para encontrar el nivel de sal que prefieren los compradores.

Moldeo: Los moldes, que pueden ser de acero inoxidable o de plástico PVC, cuadrados o redondos, se cubren con un lienzo y se llenan con la cuajada. En este momento, se debe hacer una pequeña presión al queso para compactarlo mejor. Este queso no se prensa, solamente se voltean los moldes tres veces a intervalos de 15 minutos. Seguidamente, se deja reposar por 3 horas y luego se sacan los moldes y se guarda el queso en refrigeración.

Pesado: Se hace para llevar registros de rendimientos, es decir los kilogramos obtenidas por litro de leche que entraron al proceso y preparar las unidades para la venta.

Empaque: El empaque, se hace con material que no permita el paso de humedad. Generalmente se usa un empaque plástico.

Almacenado: Se debe almacenar en refrigeración, para impedir el crecimiento de microorganismos y tener siempre queso fresco. El almacenamiento no debe ser mayor de 5 -7 días.

ANEXO C.
CAMARA DE NEUBAUER.

Los conteos celulares se llevaron a cabo por medio de la cámara de Neubauer, la cual tiene un porta objetos que contiene la muestra líquida con un volumen de $0,1 \text{ mm}^3$ y por medio de la cuadrícula que tiene en su interior se puede visualizar con la ayuda de un microscopio en un lente de 10X.

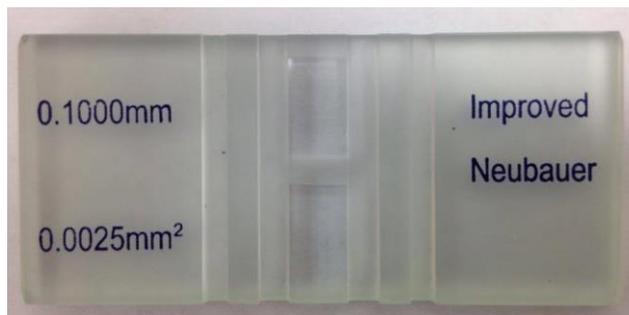
Figura 13. Microscopio OPTIKA ITALY B-150.



Tomado de: http://www.optikamicroscopes.com/index.php?option=com_virtuemart&view=category&virtuemart_category_id=10&lang=es.

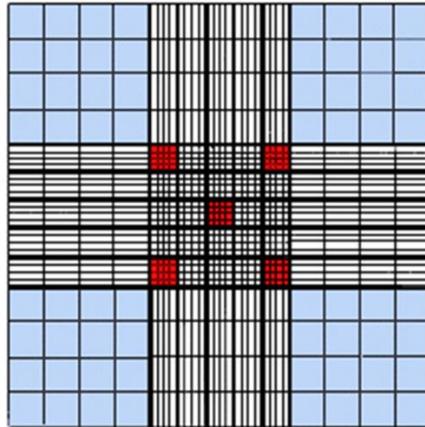
El 13 de mayo de 2017

Figura 14. Cámara de Neubauer.



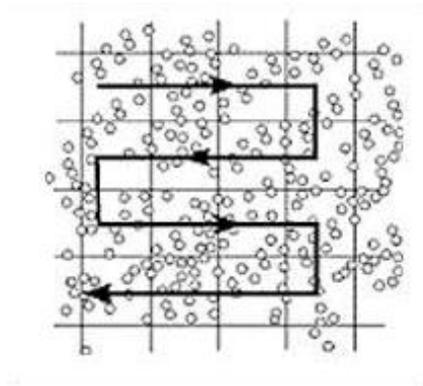
Los conteos se realizaron en los cuadros sombreados en rojo que se observan en la figura 15, realizando conteos en zigzag, facilitando el conteo y evitando la pérdida o el doble recuento de las células.

Figura 15. Cuadrícula de conteos cámara de Neubauer.



Tomado de: <http://mat-lab-minmenez.blogspot.com.co/2009/05/camara-de-neubauer-recuento-de.html>. El 13 de mayo de 2017.

Figura 16. Conteos en cuadrículas de la forma zigzag.



Tomado de: <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/Como-contar-celulas-con-camara-de-Neubauer-Paso2.php>. El 13 de mayo de 2017.

ANEXO D.

CONTEOS CELULARES EN CAMARA DE NEUBAUER.

Se realizaron 3 réplicas de cada pre-experimento y experimento para así disminuir el error humano que se pudiera cometer.

Cuadro 3. Concentración celular por días de los pre-experimentos uno.

• Pre-experimento uno.							
➤ Día 1							
Inóculo							
1	5	13	21	25	Total	Concentración	
34	36	45	41	33	189	3,78E+05	
#1							
1	5	13	21	25	Total	Concentración	
19	24	19	16	19	97	1,94E+05	
#2							
1	5	13	21	25	Total	Concentración	
26	20	26	39	33	144	2,88E+05	
#3							
1	5	13	21	25	Total	Concentración	
34	25	39	20	28	146	2,92E+05	
#4							
1	5	13	21	25	Total	Concentración	
24	26	15	18	24	107	2,14E+05	
#5							
1	5	13	21	25	Total	Concentración	
19	21	19	15	24	98	1,96E+05	
➤ Día 2							
#1							
1	5	13	21	25	Total	Concentración	
30	26	22	25	15	118	2,36E+05	
#2							
1	5	13	21	25	Total	Concentración	
23	28	25	23	26	125	2,50E+05	
#3							
1	5	13	21	25	Total	Concentración	
19	11	15	18	14	77	1,54E+05	
#4							
1	5	13	21	25	Total	Concentración	
9	15	16	15	13	68	1,36E+05	
#5							
1	5	13	21	25	Total	Concentración	
26	23	27	23	16	115	2,30E+05	

Cuadro 3. (Continuación.)

➤ Día 3

#1					Total	Concentración
1	5	13	21	25	128	2,56E+05
24	22	31	19	32		

#2					Total	Concentración
1	5	13	21	25	120	2,40E+05
22	25	28	20	25		

#3					Total	Concentración
1	5	13	21	25	91	1,82E+05
11	15	21	22	22		

#4					Total	Concentración
1	5	13	21	25	92	1,84E+05
12	24	22	19	15		

#5					Total	Concentración
1	5	13	21	25	99	1,98E+05
17	19	20	24	19		

➤ Día 4

#1					Total	Concentración
1	5	13	21	25	124	2,48E+05
25	22	26	25	26		

#2					Total	Concentración
1	5	13	21	25	113	2,26E+05
23	25	23	22	20		

#3					Total	Concentración
1	5	13	21	25	91	1,82E+05
17	23	19	13	19		

#4					Total	Concentración
1	5	13	21	25	88	1,76E+05
23	18	24	14	9		

#5					Total	Concentración
1	5	13	21	25	83	1,66E+05
15	17	15	18	18		

➤ Día 5

#1					Total	Concentración
1	5	13	21	25	138	2,76E+05
22	24	25	34	33		

#2					Total	Concentración
1	5	13	21	25	93	1,86E+05
22	18	14	20	19		

#3					Total	Concentración
1	5	13	21	25	93	1,86E+05
22	24	16	19	12		

#4					Total	Concentración
1	5	13	21	25	86	1,72E+05
23	16	18	14	15		

Cuadro 3. (Continuación)

#5						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
23	16	25	24	19	107	2,14E+05

➤ Día 6

#1						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
22	25	28	31	26	132	2,64E+05

#2						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
22	27	20	29	23	121	2,42E+05

#3						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
10	18	21	20	16	85	1,70E+05

#4						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
34	36	33	35	52	190	3,80E+05

#5						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
36	24	29	34	38	161	3,22E+05

➤ Día 7

#1						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
37	43	24	31	16	151	3,02E+05

#2						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
23	25	26	24	27	125	2,50E+05

#3						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
24	14	28	16	12	94	1,88E+05

#4						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
30	41	43	46	40	200	4,00E+05

#5						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
27	28	32	29	39	155	3,10E+05

Cuadro 3. (Continuación).

➤ Día 8						
#1						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
25	36	32	29	47	169	3,38E+05
#2						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
23	13	22	31	21	110	2,20E+05
#3						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
34	35	23	34	28	154	3,08E+05
#4						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
43	69	72	53	65	302	6,04E+05
#5						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
29	23	39	38	29	158	3,16E+05
➤ Día 9						
#1						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
40	39	55	42	47	223	4,46E+05
#4						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
71	66	64	91	99	391	7,82E+05
➤ Día 10						
#1						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
47	46	55	59	54	261	5,22E+05
#4						
1	5	13	21	25	Total	Concentración
53	72	86	82	102	395	7,90E+05

- **Pre-experimento 2.**

Promedios de las concentraciones celulares por cada día y sus réplicas.

Cuadro 4. Concentraciones celulares promedios del pre-experimento dos.

Día	#1	#2	#3	#4	#5
1	2,35E+05	2,17E+05	2,13E+05	1,89E+05	1,77E+05
2	2,44E+05	2,63E+05	2,73E+05	3,28E+05	3,11E+05
3	3,90E+05	3,71E+05	5,03E+05	5,03E+05	5,51E+05
4	3,70E+05	4,55E+05	7,33E+05	5,59E+05	6,95E+05

Cuadro 4. (Continuación.)

5	6,63E+05	6,42E+05	1,06E+06	6,98E+05	9,27E+05
6	7,39E+05	8,24E+05	1,08E+06	7,93E+05	1,16E+06
7	8,98E+05	9,94E+05	1,45E+06	9,25E+05	1,19E+06
8	1,03E+06	1,09E+06	2,17E+06	8,37E+05	1,18E+06
9	1,61E+06	1,78E+06	4,15E+06	1,51E+06	2,42E+06
10	2,49E+06	2,22E+06	6,31E+06	2,18E+06	1,91E+06

- **Pre-experimento 3.**

Promedios de las concentraciones celulares del pre-experimento 3 por cada día y sus respectivas replicas.

Cuadro 5. Concentraciones celulares promedios del pre-experimento tres.

DIA	#1	#2	#3
1	1,55E+05	2,13E+05	1,72E+05
2	1,39E+05	2,73E+05	1,10E+05
3	1,72E+05	5,03E+05	1,34E+05
4	4,76E+05	7,33E+05	3,71E+05
5	4,75E+05	1,06E+06	4,82E+05
6	6,71E+05	1,08E+06	5,76E+05
7	6,03E+05	1,45E+06	4,49E+05
8	6,45E+05	2,17E+06	5,41E+05
9	8,33E+05	4,15E+06	6,27E+05
10	6,31E+06	6,97E+05	4,35E+05

- **Experimento**

Promedio de la concentración celular del experimento y sus réplicas.

Cuadro 6. Concentraciones celulares promedios del pre-experimento tres.

DIA	Concentración celular
1	2,90E+05
2	3,95E+05
3	3,75E+05

Cuadro 6. (Continuación.)

4	3,63E+05
5	3,84E+05
6	4,53E+05
7	4,56E+05
8	4,77E+05
9	5,40E+05
10	6,26E+05
11	6,53E+05
12	7,25E+05
13	7,81E+05
14	8,47E+05
15	8,95E+05
16	9,37E+05
17	1,00E+06
18	1,03E+06
19	1,08E+06
20	1,11E+06

- **Cultivo control**

Cuadro 7. Concentraciones celulares promedios de cultivo control.

DIA	Concentración celular
Día 1	3,35E+05
Día 2	3,89E+05
Día 3	4,55E+05
Día 4	4,76E+05
Día 5	5,20E+05
Día 6	5,49E+05
Día 7	5,59E+05
Día 8	5,75E+05
Día 9	6,62E+05
Día 10	6,96E+05
Día 11	7,69E+05
Día 12	8,59E+05
Día 13	8,81E+05
Día 14	9,46E+05
Día 15	1,01E+06

ANEXO E.

DESCRIPCION DE EQUIPOS Y MATERIALES USADOS.

Cuadro 8. Equipos y materiales del montaje de fotobiorreactor adaptado.

Equipo o material	Características	Propósito
<p>Incubadora de EPS</p> 	<p>54 cm de ancho X 46 cm de alto.</p>	<p>Evitar el ingreso de insectos o polvo manteniendo los medios de cultivo aislados del exterior.</p>
<p>Recipientes de vidrio</p> 	<p>18 cm y 26 cm de alto, 9 cm y 16 cm de ancho en la base y 7 cm y 10 cm de ancho en la boca.</p>	<p>Contener el medio de cultivo.</p>
<p>Bombas de aire</p> 	<p>Bombas Shark (RS-610), caudal de 4L/min, 5W.</p>	<p>Proveer de agitación y aireación al cultivo en el fotobiorreactor adaptado.</p>
<p>Temporizador</p> 	<p>Temporizador análogo de pestañas Completel (T 100).</p>	<p>Mantener los fotoperiodos de luz.</p>
<p>Lámpara de mesa</p> 	<p>Bombillo ahorradores de</p>	<p>Proporcionar la luz para los ciclos de fotosíntesis</p>

Cuadro 9. Equipos y materiales de la extracción de biomasa.

Equipo o material	Características	Propósito
<p>Centrifuga 1</p> 	<p>Baby I centrifuga 206, 8 tubos, 45 minutos y 3800 rpm.</p>	<p>Separar la biomasa microalgal del medio de cultivo.</p>
<p>Centrifuga 2</p> 	<p>Centrifuga EBA20, 8 tubos, 6000 rpm y 99 minutos</p>	<p>Separar la biomasa microalgal del medio de cultivo.</p>
<p>Pipeta</p> 	<p>Pipeta de vidrio de 10 mL</p>	<p>Mide la alícuota del líquido sobrenadante con precisión.</p>
<p>Pipeteador</p> 	<p>Capacidad de 10 mL</p>	<p>Succionar los líquidos por medio de la pipeta.</p>

Cuadro 9. (Continuación.)

Equipo o material	Características	Propósito
<p>Tubos de centrifuga</p> 	<p>Material de plástico</p>	<p>Mantener la muestra y permitir el proceso de centrifugación.</p>
<p>Balanza analítica</p> 	<p>Balanza Radwag AS220/C/2 Capacidad máxima: 200g Carga mínima:10mg</p>	<p>Usada para determinar el peso de las muestras.</p>
<p>Balanza</p> 	<p>Balanza Scout Pro SP202 Capacidad máxima: 400g Carga mínima: 10g</p>	<p>Usada para determinar el peso de las muestras.</p>

Cuadro 9. (Continuación.)

Equipo o material	Características	Propósito
<p data-bbox="337 315 612 346">Estufa de secado 1</p> 	<p data-bbox="678 436 1005 541">Estufa de secado Nabertherm (TR 120), T máx.: 300°C y 3 kW²</p>	<p data-bbox="1045 436 1463 541">Secado por vaporización del medio de cultivo para obtener la biomasa seca.</p>
<p data-bbox="337 672 612 703">Estufa de secado 2</p> 	<p data-bbox="672 779 1021 877">Estufa de secado Binder (950837), T: 5-300°C y 115 V</p>	<p data-bbox="1045 779 1463 877">Secado por vaporización del medio de cultivo para obtener la biomasa seca.</p>

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2017

AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES

Yo **Gina Viviana Chaparro Rojas** en calidad del titular de la obra **EVALUACIÓN DEL SUERO LÁCTEO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y LÍPIDOS EN LA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* A ESCALA DE LABORATORIO**, elaborada en el año 2016, autorizo al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que me corresponde y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autor manifiesto conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autor establezco las siguientes condiciones de uso de mi obra de acuerdo con la **licencia Creative Commons** que se señala a continuación:

	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2017

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	<input checked="" type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	<input type="checkbox"/>

Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a su autor.

De igual forma como autor autorizo la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:

AUTORIZO	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	X	
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación	X	

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicará, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
		X

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá D.C, a los 16 días del mes de agosto del año 2017.

EL AUTOR:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Gina Viviana	Chaparro Rojas
Documento de identificación No	Firma
1.032.466.812	

Nota: Incluya un apartado (copie y pegue el cuadro anterior), para los datos y la firma de cada uno de los autores de la obra.