

**EVALUACIÓN DE CAROTENOIDES Y LÍPIDOS EN LA MICROALGA
Scenedesmus dimorphus A ESCALA LABORATORIO BAJO CONDICIONES
DE FOTOBIOREACTOR**

**INGRID GERALDIN MANRIQUE RUIZ
RUTH JULIANA CORZO PIÑEROS**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C
2019**

**EVALUACIÓN DE CAROTENOIDES Y LÍPIDOS EN LA MICROALGA
Scenedesmus dimorphus A ESCALA LABORATORIO BAJO CONDICIONES
DE FOTOBIOREACTOR.**

**INGRID GERALDIN MANRIQUE RUIZ
RUTH JULIANA CORZO PIÑEROS**

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

**Director
DIEGO RUBIO FERNÁNDEZ
M.Sc. Biólogo**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C
2019**

Nota de aceptación (Dirección de investigaciones)

Presidente del jurado

Jurado 1

Jurado 2

Bogotá, D.C., Febrero 2019

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

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director General de Investigación y Proyección Social

Dr. MANUEL CANCELADO JIMÉNEZ

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

En primera instancia dedico este proyecto de grado a Dios, el cual me ha brindado día a día fortaleza y empeño para cumplir las metas propuestas.

A mis padres, por haberme inculcado valores y enseñarme a luchar por mis propósitos de vida; les agradezco su apoyo, paciencia, amor y todo su trabajo para poder brindarme esta valiosa oportunidad.

A mi familia, por su ayuda y compañía en este proceso de formación.

A mi sobrino Samuel, por darme felicidad, amor y vida.

A mi pareja, Alejandro Suan, siendo una persona que le aporta estabilidad y amor a mis días, le agradezco a él por permanecer en este proceso y ayudarme a llevar con valentía mi condición de salud.

A cada uno de mis compañeros y profesores, porque ellos me enseñaron variedad de cosas, dándome herramientas que serán útiles para mi vida.

Para finalizar, a mi compañera Juliana Corzo, quien compartió conmigo este proceso, gracias por su compromiso, dedicación y comprensión.

Ingrid Geraldin Manrique Ruiz

DEDICATORIA

Siendo el primero en mi vida dedico este trabajo a Dios, ya que es mi guía, mi fortaleza y esperanza, porque siempre me acompaña en los momentos más difíciles y en los más victoriosos como este trabajo, a ti la gloria Señor Dios de todos mis triunfos.

A mi madre que es mi más grande ejemplo de fortaleza y perseverancia, gracias por brindarme la oportunidad de estudiar y siempre creer en mí.

A los profesores que he tenido a lo largo de la carrera por instruirme en la profesión, y a los compañeros con los que compartí a lo largo de esta, en especial a Ingrid Manrique por confiar en mi para emprender este proyecto, además de ser un apoyo incondicional en la vida.

Por ultimo dedico esta victoria a todo el resto de mi familia, mi abuela por cuidarme siempre, mi novio por llenar mi vida de esperanza, mis animalitos que han sido mi consuelo e impulso, mi padre por darme la vida y mi familia en la fe ICC que han sido una voz de aliento en los momentos de angustia.

Ruth Juliana Corzo Piñeros

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo de grado agradecen a:

Inicialmente a la Fundación Universidad de América, por tener un excelente nivel académico debido a que cuentan con docentes capacitados que se enfocan en formar profesionales competentes.

Al grupo de investigación BIOTECFUA que nos incentivó y enseñó el valor de la investigación, logrando así la obtención de conocimiento en el área de bioprocesos.

A nuestro director de proyecto de grado, Diego Rubio, quien nos guio y brindo su valioso conocimiento, gracias por confiar en nosotras y aportarnos a nuestra formación académica.

Igualmente, a Jenny Hernández la coordinadora de laboratorios, que siempre nos colaboró en todo lo que pudo y nos brindó una buena actitud.

Finalmente, a todas aquellas personas que nos contribuyeron en este proceso, en especial a cada uno de los jurados por sus asesorías, aportes y apoyo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	24
OBJETIVOS	26
1. MARCO TEÓRICO	27
1.1 METABOLISMO DE MICROORGANISMOS	27
1.1.1 Metabolitos primarios	27
1.1.2 Metabolitos secundarios	27
1.2 MICROALGAS	27
1.2.1 Scenedesmus	28
1.3 METABOLITOS EN MICROALGAS	29
1.3.1 Carotenoides	29
1.3.2 Lípidos	31
1.4 CONDICIONES DE CULTIVO	32
1.4.1 pH	32
1.4.2 Luz	32
1.4.3 Agitación	33
1.4.4 Temperatura	33
1.4.5 Nutrición microalgal	34
1.5 FACTORES QUE AFECTAN LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN MICROALGAS	34
1.5.1 Irradiación y luz	34
1.5.2 Temperatura	35
1.5.3 pH	35
1.5.4 Salinidad	36
1.6 FOTOBIORREACTOR	37
1.6.1 Fotobiorreactor adaptado	37
1.7 CUANTIFICACIÓN Y TASA DE CRECIMIENTO MICROALGAL	38
1.7.1 Recuento celular	38
1.7.2 Cámara de Neubauer	39
1.8 CURVA DE CRECIMIENTO	40
1.8.1 Fases de crecimiento	40
1.9 SEPARACIÓN DE BIOMASA	41
1.9.1 Sedimentación	41
1.9.2 Centrifugación	42
1.10 SECADO DE BIOMASA	42
1.10.1 Liofilización	42
1.11 DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	42
1.11.1 Espectrofotometría	43
2. METODOLOGÍA	44
2.1 PRIMERA FASE	48

2.1.1	Parámetros para matriz de selección según revisión bibliográfica	48
2.2	SEGUNDA FASE	49
2.2.1	Condiciones del pre-experimento para la generación de biomasa	49
2.2.1.1	Cepa microalgal (<i>Scenedesmus dimorphus</i>)	49
2.2.1.2	Medio de cultivo	50
2.2.1.3	Fuente lumínica y fotoperiodos	50
2.2.1.4	Temperatura	50
2.2.1.5	Agitación	51
2.2.2	Recuento celular y construcción de curvas de crecimiento	51
2.2.2.1	Cámara de Neubauer y curva de crecimiento	51
2.2.2.2	Protocolo para el recuento	51
2.2.2.3	Cálculos para el recuento	52
2.2.2.4	Ecuaciones que definen el crecimiento	52
2.2.3	Condiciones del pre-experimento de la etapa uno	52
2.2.3.1	Análisis estadístico diseño factorial del pre-experimento de la etapa uno	55
2.2.4	Condiciones del pre-experimento de la etapa dos	57
2.2.4.1	Análisis estadístico diseño factorial pre-experimento etapa dos	58
2.2.5	Preparación de las muestras para técnica espectrofotométrica	58
2.2.5.1	Protocolo para la extracción de pigmentos liposolubles	59
2.2.5.2	Ecuaciones para cuantificar carotenoides totales	61
2.3	TERCERA FASE	61
2.3.1	Sistema y modo de operación fotobiorreactor adaptado en el experimento	62
2.3.2	Escalamiento y siembra a fotobiorreactor en el experimento	62
2.3.3	Secado de la biomasa y la productividad volumétrica del cultivo control del experimento	63
2.3.4	Espectrofotometría UV-VIS en el experimento	64
2.3.5	Liofilización de la muestra de biomasa en el experimento	64
2.3.6	Cuantificación de lípidos por cromatografía en el experimento	65
2.4	CUARTA FASE	65
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	67
3.1	PRIMERA FASE	67
3.2	SEGUNDA FASE	73
3.2.1	Pre-experimento de la etapa uno	73
3.2.1.1	Cultivos en los fotobiorreactores adaptados en la etapa uno del pre-experimento	73
3.2.1.2	Curva de crecimiento del pre-experimento de la etapa uno	74
3.2.1.3	Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación para el pre-experimento de la etapa uno	78
3.2.1.4	Diseño factorial del pre-experimento de la etapa uno	81
3.2.2	Pre-experimento de la etapa dos	82
3.2.2.1	Cultivos en los fotobiorreactores adaptados en la etapa dos del pre-experimento	82
3.2.2.2	Curva de crecimiento del pre-experimento de la etapa dos	87

3.2.2.3 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación del pre-experimento de la etapa dos	89
3.2.2.4 Extracción - cuantificación de los pigmentos y clorofilas del pre-experimento de la etapa dos	92
3.2.2.5 Diseño factorial del pre-experimento de la etapa dos	100
3.3 TERCERA FASE	101
3.3.1 Cultivo en el fotobiorreactor adaptado del experimento	101
3.3.2 Curva de crecimiento del experimento	103
3.3.3 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación del experimento.	106
3.3.4 Extracción - cuantificación de pigmentos y clorofilas del experimento	107
3.3.5 Liofilización de la muestra y extracción-cuantificación de los lípidos del experimento	111
3.3.6 Peso seco y productividad del experimento	117
3.4 CUARTA FASE	118
4. CONCLUSIONES	123
5. RECOMENDACIONES	125
BIBLIOGRAFÍA	126
ANEXOS	139

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Peso de sal necesario para el pre-experimento en la etapa uno para el día 10 de conteo celular	54
Tabla 2. Peso de NaCl según el volumen del fotobiorreactor en el pre-experimento de la etapa dos	58
Tabla 3. Peso de KNO ₃ según el volumen del fotobiorreactor en el pre-experimento de la etapa dos	58
Tabla 4. Parámetros para evaluar matriz de selección del factor de estrés	68
Tabla 5. Calificación parámetros para la matriz de selección del factor de estrés	70
Tabla 6. Parámetros para evaluar matriz de selección del tipo de sal	70
Tabla 7. Calificación parámetros para la matriz de selección del factor de estrés	72
Tabla 8. Concentraciones celulares para las diferentes sales en el último día de cultivo en el pre-experimento de la etapa uno	77
Tabla 9. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación para la curva de crecimiento de la <i>Scenedesmus dimorphus</i> del pre-experimento de la etapa uno	78
Tabla 10. Resultados y conclusiones finales del método de análisis por diseño factorial del pre-experimento de la etapa uno	81
Tabla 11. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de la curva de crecimiento para <i>Scenedesmus dimorphus</i> del pre-experimento de la etapa dos	89
Tabla 12. Resultados y conclusiones finales del método de análisis por diseño factorial del pre-experimento de la etapa dos	100
Tabla 13. Perfil lipídico del cultivo con KNO ₃ a 0,6M en el experimento	115
Tabla 14. Costos comunes asociado a materias, materiales y equipos experimento	119
Tabla 15. Costos operativos o de servicios asociados al consumo de agua y energía eléctrica en el experimento	121
Tabla 16. Costos de la liofilización de la biomasa y la cromatografía de lípidos en el experimento	122
Tabla 17. Costos totales del proceso experimental y el análisis de resultados en el experimento	122

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Carotenoides presentes en las microalgas	30
Figura 2. Estructura de los principales ácidos grasos poliinsaturados	32
Figura 3. Fotobiorreactor adaptado	38
Figura 4. Reglilla de Neubauer de 9 mm ²	39
Figura 5. Curva de crecimiento típica, en la cual se muestran las diferentes fases	41
Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología del proceso	45
Figura 7. Fotobiorreactor adaptado de 375 mL	49
Figura 8. Protocolo de extracción de pigmentos liposolubles	60
Figura 9. Molde de aluminio	63
Figura 10. Cambio de la morfología de apariencia delgada y alargada a circular	74
Figura 11. Registro fotográfico del pre-experimento de la etapa dos	84
Figura 12. Registro fotográfico de la extracción de pigmentos liposolubles del pre-experimento de la etapa dos	93
Figura 13. Registro fotográfico experimento	102
Figura 14. Registro fotográfico de la extracción de pigmentos liposolubles del experimento	108
Figura 15. Registro fotográfico muestra concentrada y liofilizada de cultivo con KNO ₃ a 0,6M	112
Figura 16. Registro fotográfico del peso seco del blanco del experimento	117

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Descripción general de varias especies de microalgas del género Chlorophyceae y el carotenoide de mayor proporción	28
Cuadro 2. Nombre comercial, volumen útil de recuento, profundidad, objetivos usados, tamaño de las células en la muestra e intervalo de concentraciones aconsejadas para las cámaras más comunes utilizadas para el recuento celular de microorganismos	39
Cuadro 3. Composición del fertilizante Foliagro	141

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Concentración celular en células por mililitro [cel/mL]	52
Ecuación 2. Velocidad específica de crecimiento o Tasa de crecimiento	52
Ecuación 3. Tiempo de duplicación o generación	52
Ecuación 4. Molaridad	53
Ecuación 5. Gramos de soluto	54
Ecuación 6. Ecuaciones para realizar el diseño factorial	55
Ecuación 7. Correlaciones para realizar el diseño factorial	56
Ecuación 8. Ecuaciones para calcular la concentración de las clorofilas propuestas por Jeffrey y Humphrey (1975) en algas verdes	61
Ecuación 9. Ecuaciones para calcular la concentración de carotenoides totales propuestas por Strickland y Parsons (1972) en microalgas clorofíceas y cianobacterias	61
Ecuación 10. Peso seco de biomasa	63
Ecuación 11. Productividad de biomasa	63
Ecuación 12. Porcentaje de materia seca de la muestra liofilizada	64
Ecuación 13. Porcentaje de humedad de la muestra microalgal	64
Ecuación 14. Costos comunes de materiales, materias y equipos	65
Ecuación 15. Costos de operación o servicios de electricidad y agua	66

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Curva de crecimiento celular del pre-experimento de la etapa uno	76
Gráfica 2. Curva linealizada del crecimiento celular del pre-experimento de la etapa uno	76
Gráfica 3. Velocidad específica de crecimiento para <i>Scenedesmus dimorphus</i> del pre-experimento de la etapa uno	79
Gráfica 4. Diagrama de barras velocidad específica de crecimiento para <i>Scenedesmus dimorphus</i> del pre-experimento de la etapa uno	79
Gráfica 5. Tiempo de duplicación de la curva de crecimiento para <i>Scenedesmus dimorphus</i> del pre-experimento de la etapa uno	80
Gráfica 6. Diagrama de barras tiempo de duplicación curva de crecimiento para <i>Scenedesmus dimorphus</i> del pre-experimento de la etapa uno	80
Gráfica 7. Curva de crecimiento celular del pre-experimento de la etapa dos	88
Gráfica 8. Curva linealizada del crecimiento celular del pre-experimento de la etapa dos	89
Gráfica 9. Velocidad específica de crecimiento para <i>Scenedesmus dimorphus</i> del pre-experimento de la etapa dos	90
Gráfica 10. Diagrama de barras velocidad específica de crecimiento para <i>Scenedesmus dimorphus</i> del pre-experimento de la etapa dos	90
Gráfica 11. Tiempo de duplicación de la curva de crecimiento para <i>Scenedesmus dimorphus</i> del pre-experimento de la etapa dos	91
Gráfica 12. Diagrama de barras tiempo de duplicación de la curva de crecimiento para <i>Scenedesmus dimorphus</i> del pre-experimento de la etapa dos	91
Gráfica 13. Carotenoides totales de la muestra del cultivo con KNO ₃ y NaCl del pre-experimento de la etapa dos	95
Gráfica 14. Clorofilas y Carotenoides totales de la muestra del cultivo con KNO ₃ del pre-experimento de la etapa dos	97
Gráfica 15. Clorofilas y Carotenoides totales de la muestra del cultivo con NaCl del pre-experimento de la etapa dos	97
Gráfica 16. Clorofilas y Carotenoides totales de la muestra del cultivo blanco del pre-experimento de la etapa dos	98
Gráfica 17. Curva de crecimiento celular del experimento	105
Gráfica 18. Curva linealizada del crecimiento celular en el experimento	105
Gráfica 19. Diagrama de barras de velocidad específica de crecimiento para <i>Scenedesmus dimorphus</i> del experimento	106
Gráfica 20. Diagrama de barras del tiempo de duplicación para <i>Scenedesmus dimorphus</i> del experimento	107
Gráfica 21. Carotenoides totales de la muestra del cultivo con KNO ₃ y el Blanco en el experimento	109
Gráfica 22. Clorofila a total de la muestra del cultivo con KNO ₃ y el Blanco en el experimento	110
Gráfica 23. Clorofila b total de la muestra del cultivo con KNO ₃ y el Blanco en el experimento	110

Gráfica 24. Composición de ácidos monoinsaturados, poliinsaturados y saturados en el experimento	113
Gráfica 25. Composición de omega-3 y omega-6 en los PUFAS en el experimento	113
Gráfica 26. Caracterización del perfil lipídico en el experimento.	116

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Protocolo para puesta en marcha del fotobiorreactor adaptado	140
Anexo B . Composición fertilizante agrícola oliagro	141
Anexo C. Recomendaciones para aplicar técnica séptica	142
Anexo D. Registro fotográfico pre-experimento etapa uno	143
Anexo E. Concentración celular para realización de curva de crecimiento del pre-experimento etapa uno	145
Anexo F. Tablas de datos y resultados parciales del análisis por diseño factorial pre-experimento etapa uno	149
Anexo G. Concentración celular para realización de curva de crecimiento del pre-experimento etapa dos	150
Anexo H. Cuantificación clorofilas y carotenoides totales por espectrofotometría en el pre-experimento etapa dos	155
Anexo I. Tablas de datos y resultados parciales del análisis por diseño factorial pre-experimento etapa dos	158
Anexo J. Concentración celular para realización de curva de crecimiento del experimento	159
Anexo K. Cuantificación clorofilas y carotenoides totales por espectrofotometría en el experimento	160
Anexo L. Resultados liofilización del cultivo con KNO_3 a 0,6M	162
Anexo M. Resultados cromatografía de lípidos del cultivo con KNO_3 a 0,6M	163
Anexo N. Peso seco y productividad del cultivo Blanco	164

ABREVIATURAS

% p / v:	Porcentaje peso sobre volumen.
%:	Porcentaje.
%DW:	Porcentaje de peso seco (g L ⁻¹).
”:	Pulgada.
°C:	Grados centígrados.
μ _e :	Velocidad específica de crecimiento o tasa de crecimiento.
cel/mL:	Células sobre mililitro.
cm:	Centímetro.
CO:	Monóxido de carbono.
CO ₂ :	Dióxido de carbono.
COP:	Peso colombiano.
gDCW:	Gram Dry Cell Weight.
h:	Hora.
kg:	Kilogramo.
KNO ₃ :	Nitrato de potasio.
kW:	Kilowatts
L:	Litro.
M:	Molaridad.
mg / gDCW:	Miligramo sobre gramos de peso seco de la célula.
mg/g:	Miligramo sobre gramo.
mg/L:	Miligramo sobre litro.
MJ/kg:	Mega julios sobre kilogramo
mL:	Mililitros.
mm:	Milímetro.
mm ³ :	Milímetros cúbicos.
N o N _{t0} :	Concentración celular.
NaCl:	Cloruro de sodio.
NaHCO ₃ :	Bicarbonato de sodio.
NaNO ₃ :	Nitrato de sodio.
ng:	Nanogramo.
nm:	nanómetro.
N _{t1} :	Crecimiento poblacional.
O ₂ :	Oxígeno.
p.s.:	Peso seco.
P:	Presión.
Pa:	Pascal.
rpm:	Revoluciones por minuto.
T:	Temperatura.
t _g :	Tiempo de duplicación o de generación.
UPS:	Unidades prácticas de salinidad.
v/v:	Proporción volumen/volumen.
vvm:	Volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto.
β:	Beta.

$\mu\text{g} / \text{mL}$: Microgramo sobre mililitro.
 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$: Micromol sobre metro por segundo.
[]: Concentración.
%MS: Porcentaje de materia seca.
HPLC: High performance liquid chromatography o Cromatografía líquida de alta eficacia.

GLOSARIO

BIOMASA: material orgánico con contenido energético obtenido a partir del proceso de fotosíntesis¹.

CÁMARA NEUBAUER: instrumento que consiste en una placa gruesa con forma de portaobjetos, usada para determinar el número de partículas por unidad de volumen en un medio líquido².

CAROTENOIDES: pigmentos naturales considerados terpenos liposolubles, su función es proteger las células vegetales de la oxidación y descomposición³.

CEPA: células genéticamente similares provenientes de un cultivo y con capacidad de reproducirse de una generación a otra⁴.

CROMATOGRAFÍA: técnica física de separación que se fundamenta en la distribución de los componentes de una mezcla en dos fases inmiscibles, siendo una estacionaria y otra móvil⁵.

CULTIVO: población de células en un lugar y tiempo establecido con ciertas condiciones para la generación de biomasa o producto deseado⁶.

CURVA DE CRECIMIENTO: grafica que representa el número de células viables por unidad de volumen en determinado tiempo, de forma general cuenta con 4 fases siendo de adaptación, exponencial, estacionaria y muerte⁷.

ESCALAMIENTO: proceso en el que a través de una serie de criterios se genera un cambio de tamaño en una operación⁸.

ESPECTROFOTOMETRÍA: técnica que se fundamenta en la interacción de la luz con las especies químicas presentes en la muestra para así lograr la identificación y cuantificación de las mismas⁹.

¹HERGUEDAS, A. Biomasa, biocombustible y sostenibilidad. Centro Tecnológico Agrario y Agroalimentario.

²BRAND. Cámaras de recuento. [En línea].

³ARGUEDAS, P. Comparación del contenido de carotenoides en productos nutraceuticos elaborados a partir de dos variedades de camote y yuca.

⁴UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Glosario de microbiología y parasitología. [En línea].

⁵CETZ, A. Conceptos básicos de cromatografía. Instituto tecnológico de Mérida.

⁶ROJAS, F. Cepas: Material de referencia, manejo y aplicaciones en área de microbiología.

⁷CASTRO, N. Reproducción y crecimiento microbiano.

⁸CONDE, C. Escalamiento: el arte de la ingeniería química. [En línea].

⁹ Arenas, I. Espectrofotometría de absorción.

FERTILIZANTE: sustancia o material que contiene ciertos compuestos favorables o esenciales para el crecimiento de las plantas¹⁰.

FOTOBIOREACTOR: dispositivo expuesto a la luz con la finalidad de que se presente el proceso biológico de fotosíntesis; estos están adaptados para el cultivo de microalgas al mantener un medio estable con los nutrientes y condiciones adecuadas¹¹.

FOTOPERIODO: tiempo de exposición de luz y oscuridad a la que es sometido el medio de cultivo para su crecimiento¹².

FOTOSÍNTESIS: proceso fisicoquímico donde las plantas u organismos fotosintéticos usan la energía solar para la síntesis de compuestos orgánicos¹³.

INÓCULO: microorganismos vivos suspendidos adaptados para poder reproducirse en un medio determinado¹⁴.

LÍPIDOS: biomoléculas que poseen como similitud el ser no polar, insolubles en el agua y solubles en los solventes orgánicos, están formadas por carbono, hidrógeno, oxígeno, pero en algunos casos también presenta fósforo, nitrógeno y azufre¹⁵.

MICROALGA: microorganismos fotosintéticos que son altamente eficientes en la producción de biomasa, siendo fuente de biomoléculas o compuestos de valor industrial¹⁶.

MEDIO DE CULTIVO: sustrato o material compuesto de nutrientes que permite el desarrollo de los microorganismos¹⁷.

TERPENO: compuesto aromático y volátil conformado por unidades de isopreno, es decir, hidrocarburo de 5 átomos de carbono¹⁸.

¹⁰MURO, E. Fertilizantes. [En línea].

¹¹FERNÁNDEZ, M. Diseño, montaje y caracterización de fotobiorreactores airlift para el cultivo de la microalga *Chlorella sorokiniana*.

¹²ALBERTO, J. Fotoperiodo. [En línea].

¹³PÉREZ, E. Fotosíntesis: Aspectos básicos.

¹⁴MANUAL DE LUMBRICULTURA. Inóculo. [En línea].

¹⁵UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO. Bioquímica interactiva. [En línea].

¹⁶HEINRICH, J. Producción de microalgas con fines alimenticios y energéticos.

¹⁷TORRES, C. Medios de cultivo.

¹⁸FUNDACIÓN CANNA. Los terpenos. [En línea].

RESUMEN

Con el fin de evaluar el uso potencial de la especie de microalga *Scenedesmus dimorphus* para la generación de carotenoides, se seleccionó a la salinidad como un factor económico y accesible. Sin embargo, al ser una especie de microalga de agua dulce, se evaluó primero la posible tolerancia o resistencia a la sal; para ello en el pre-experimento de la etapa uno, se compararon dos concentraciones (0,01M y 0,4 M) para tres sales diferentes (NaCl, NaHCO₃ y KNO₃), y se determinó que ninguna de las concentraciones de las sales afectaba negativamente el crecimiento celular.

Por ende, con base a la curva de crecimiento reportada en el pre-experimento etapa uno, se decidió seleccionar las sales KNO₃ y NaCl, ya que estas presentaron un comportamiento contrario en el crecimiento celular, esto con el fin de analizar si la generación de carotenoides favorecía el crecimiento celular o lo mantenía estable. En esta ocasión la sal se aplicó en la fase estacionaria del cultivo, en conjunto con luz LED azul, la cual favorece la generación de carotenoides, y se adicionaron 4 concentraciones (0,5 , 0,6 , 0,7 y 0,8 M); obteniendo que a mayor concentración de sal, se mantenía constante el crecimiento celular con KNO₃ y aumentaba con NaCl, excepto en la concentración de 0,8 M donde el crecimiento celular decreció para ambas sales, indicando el límite en la tolerancia a la salinidad para esta especie de microalga. Al realizar los análisis espectrofotométricos, en pre-experimento de la etapa dos, se determinó que la máxima generación de carotenoides totales se presentó en el cultivo con KNO₃ a 0,6 M, con un total de 0,3357 µg de carotenoides mL⁻¹, mientras que para el cultivo de NaCl es de 0,1791 µg de carotenoides mL⁻¹, para 0,7 M, por lo que para el experimento final se eligió la concentración de 0,6 M de KNO₃.

Al escalar el proceso (experimento final) en un fotobiorreactor adaptado de 4 L, se presencié la fase estacionaria en el día 12 y tres días después se adicionó KNO₃ en la concentración de 0,6M, hasta el día 20 de conteo celular; luego se realizó la técnica espectrofotométrica, obteniendo un total de 0,7395 µg carotenoides mL⁻¹. En cuanto a la productividad del cultivo con salinidad fue de 0,0927 g L⁻¹ Dia⁻¹, con un peso seco 5,7 g; y por cromatografía HPLC, se reportó la presencia de MUFAS en 21,1%, SFAS en 35,9% y PUFAS en 43% (omega-6 del 34% y omega-3 del 8,9%). Por último, se analizaron los costos fijos y operativos del proceso de experimentación final a escala laboratorio, obteniendo un total de \$22.842.398 COP. Por tanto, aunque el total de carotenoides por gramo presentados en el presente trabajo son bajos comparados con los costos; se analizó que la salinidad incrementó la generación de lípidos, en una proporción 1:2500 carotenoides y lípidos respectivamente.

PALABRAS CLAVE: Microalga, biomasa, carotenoides, lípidos, condición de estrés y fotobiorreactor.

INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo se ha ido buscando de forma ardua alternativas para poder suplir las materias primas o compuestos que por diversas razones ya no son adecuados para su uso; a causa de su no renovabilidad, costos, generación de residuos o contaminación, efectos en la salud, entre otros. A partir de esto, una de las problemáticas es el consumo de alimentos que cuentan en su composición con pigmentos sintéticos, a causa de que la industria alimentaria busca que los alimentos se muestren atractivos a través del color; esto ocasiona problemas de salud como alergias, complicaciones digestivas, cáncer y otros síntomas¹⁹. Por ende, el objetivo es poder suplir estos compuestos perjudiciales por unos viables para el consumo.

Con base en lo anterior, uno de los compuestos de valor agregado que puede ser una posible solución del uso de pigmentos sintéticos son los carotenoides. A nivel estructural estos pigmentos naturales son conocidos como terpenos liposolubles, que poseen la función biológica de ser pigmentos accesorios en el proceso fotosintético a través de la recolección de la luz, y como sustancias fotoprotectoras, las cuales evitan la generación de radicales libres²⁰. Su importancia radica en que los animales no pueden sintetizar este tipo de compuestos y deben ser suplementados, a causa de su importancia nutricional, y por sus características antioxidantes y al ser precursores de la vitamina A²¹.

Sin embargo, para la obtención de estos pigmentos naturales, es importante tener en cuenta que se encuentran en los cloroplastos de las células vegetales y son sintetizados por las plantas, bacterias, hongos y algas. Por consiguiente, la producción anual de carotenoides en la naturaleza es de 10^8 toneladas; donde específicamente se conocen alrededor de 700 carotenoides²².

A partir del potencial de generación reportado por la naturaleza, se seleccionarán a las microalgas para evaluar la generación del compuesto de interés, ya que estos microorganismos fotosintéticos generan biomasa útil para la obtención de compuestos de valor agregado²³; cada uno de estos compuestos posee un potencial en diversas industrias, específicamente las del sector de alimentos, farmacéutico, energético, entre otros. Por consiguiente, se evaluará la generación de carotenoides

¹⁹VELÁZQUEZ, J. Problemas de salud ocasionados por los aditivos, preservativos, colorantes y sabores artificiales, hormonas y antibióticos en la alimentación industrial del mundo moderno.

²⁰HORNERO, D. MÍNGUEZ, M y PÉREZ, A. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples “colorantes” naturales. [En línea].

²¹LEMUS, X. Obtención de carotenoides con la microalga *Scenedesmus incarssatulus* en un biorreactor tipo airlift.

²²HORNERO, D. MÍNGUEZ, M y PÉREZ, A. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples “colorantes” naturales. [En línea].

²³AGUILARA, C. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in *Chlorophyceae* species.

a partir de cultivos de microalgas, al implementar una estrategia, ya sea nutricional o física, para así generar una condición de estrés, y que la microalga como mecanismo de respuesta empiece a producir el compuesto de alto valor agregado a nivel industrial; algunos de los factores que se implementan en el medio de cultivo son luz, temperatura, pH, CO₂, limitación de nitrógeno o fósforo, agitación, salinidad, entre otros²⁴.

Para lograr la selección del factor que favorezca la generación de carotenoides se debe realizar una ardua investigación y además considerar la tecnología presente en el laboratorio de investigación de la Fundación Universidad de América. Por consiguiente, el presente proyecto de grado se llevara a cabo en la línea de investigación de microalgas perteneciente al grupo de investigación BIOTECFUA; en este se han realizado proyectos de grado enfocados en la obtención de biomoléculas como lípidos, proteínas y carbohidratos al usar la microalga *Chlorella vulgaris* a escala laboratorio; no obstante, no se ha evaluado la generación de pigmentos y lípidos a través de la microalga *Scenedesmus dimorphus* con la que cuenta actualmente el grupo de investigación, por ende este sería el primer proyecto enfocado en esta temática.

A partir de esto, en este proyecto de grado se evaluará el potencial de producción de carotenoides en la microalga *Scenedesmus dimorphus* en el fotobiorreactor bajo una condición experimental seleccionada a través de revisión bibliográfica, para posteriormente a través de la sección pre-experimental evaluar cuáles son las condiciones adecuadas para escalar el proceso a nivel experimental y así determinar la proporción de carotenoides-lípidos, por medio de la técnica espectrofotométrica y cromatografica. Finalmente realizar un análisis de costos a escala laboratorio y especificar la viabilidad del proyecto.

²⁴ HERNÁNDEZ, A. Microalgas, cultivo y beneficios.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial de producción de carotenoides y lípidos a partir de la microalga *Scenedesmus dimorphus* a escala laboratorio bajo condiciones de fotobiorreactor.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar teóricamente un factor que induzca la producción de carotenoides a partir de las microalgas.
- Implementar la condición que permita la obtención de carotenoides a partir de *Scenedesmus dimorphus*.
- Evaluar la producción de carotenoides y lípidos en los cultivos microalgales producidos bajo la condición seleccionada a nivel de fotobiorreactor.
- Estimar el costo del proceso a nivel laboratorio.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 METABOLISMO DE MICROORGANISMOS

Al conjunto de reacciones químicas necesarias y que son catalizadas por una serie de enzimas específicas generadas al interior de las células del organismo, con el objetivo de tener energía utilizable para la célula a través de la degradación de compuestos (Catabolismo) o para la fabricación de compuestos a partir de moléculas sencillas y aporte energético (Anabolismo), se le denomina como: metabolismo²⁵. En cuanto al metabolismo de microorganismos se encuentran dos comportamientos, aquel asociado al crecimiento celular denominado primario el cual se presenta en la fase exponencial, y el otro es el secundario que se presenta cuando ha cesado el crecimiento dando lugar a la fase estacionaria²⁶. Por ende, como resultado de estos metabolismos se generan una serie de compuestos que se denominan metabolitos.

1.1.1 Metabolitos primarios. Los metabolitos primarios son compuestos esenciales para el crecimiento celular, estos se obtienen a través del metabolismo primario siendo resultado de varias reacciones químicas catalizadas por las enzimas, proporcionando a las células energía, generando macromoléculas como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos; estos compuestos se generan en fase exponencial, donde se consume el sustrato para la obtención del producto de interés²⁷.

1.1.2 Metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son compuestos que no están relacionados con el crecimiento celular, por ende, estos se generan cuando la velocidad de crecimiento de los microorganismos es igual a su velocidad de muerte (fase estacionaria). Estos compuestos se producen al presentarse condiciones de estrés por limitaciones o cambios en las condiciones del medio, generando pigmentos, toxinas y otros²⁸.

1.2 MICROALGAS

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que son altamente eficientes en la producción de biomasa²⁹, siendo fuente de biomoléculas o compuestos de valor industrial, para la producción de estos según el género de microalga desarrollan distintos comportamientos para la obtención carbono y energía (metabolismo). Estas pueden ser autótrofas, es decir capaz de producir su propio alimento y usan compuestos inorgánicos como fuente de carbono, dentro de esta clasificación se

²⁵VILLAMOR, P. Enfermería-Anatomo Fisiología. Tomo I.

²⁶PARES, R. Bioquímica de los microorganismos.

²⁷ROUSSOS, S. Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido.

²⁸HERNÁNDEZ, A. Microbiología industrial.

²⁹HEINRICH, J. Producción de microalgas con fines alimenticios y energéticos.

encuentran las microalgas fotoautótrofas cuando usan la luz como fuente de energía y quimioautótrofas cuando oxidan compuestos inorgánicos para obtener la energía. Por otro lado, están las heterótrofas que usan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Otras clasificaciones son auxótrofas que requieren una pequeña presencia de un compuesto orgánico no específicamente para fuente de energía, si no para crecimiento en el medio de cultivo y por ultimo las mixotróficas que usan simultáneamente compuestos orgánicos y luz como fuente de energía³⁰. Los géneros de microalgas más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción general de varias especies de microalgas del género *Chlorophyceae* y el carotenoide de mayor proporción

<i>Chlorophyta</i> o <i>Chlorophyceae</i>	Hábitat	Carotenoides
<i>Dunaliella</i>	Marina	β -caroteno
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Agua Dulce	Astaxantina
<i>Scenedesmus/Desmodesmus</i>	Agua Dulce	Luteína

Fuente: Posten, C. (2012). Microalgal Biotechnology: Potential and Production.

En países asiáticos las microalgas se han usado como alimento humano desde hace siglos, pero en los últimos años están siendo usadas en campos como la acuicultura, tratamiento de aguas residuales, obtención de químicos finos, farmacéuticos, bioconversión energética, entre otros³¹.

1.2.1 Scenedesmus. El subgénero *Scenedesmus* pertenece al género *Chlorophyta* o algas verdes; son abundantes en cuerpos de agua dulce, poseen clorofila a y b, y distintos carotenoides. Por otro lado, tienen almidón como producto de reserva el cual se forma en el cloroplasto; en cuanto a su pared celular es celulósica aunque cabe decir que algunas especies carecen de esta³². Este subtipo *Scenedesmus* presenta paredes celulares multicapa, donde la capa interna contiene celulosa, incorporada en una matriz de hemicelulosa; mientras las tres capas externas son de politerpeno y esporopolenina. Además, puede formar carotenoides secundarios, tales como astaxantina y cantaxantina, cuando se presentan situaciones de estrés como limitación de nitrógeno, fósforo o hierro³³ y posee un perfil lipídico en los que está presente ácido palmítico, oleico y linoleico importantes a nivel industrial³⁴.

³⁰HEINRICH, J. Producción de microalgas con fines alimenticios y energéticos.

³¹Ibid., p. 28.

³²LEMUS, X. Obtención de carotenoides con la microalga *Scenedesmus incarssatulus* en un biorreactor tipo airlift.

³³Ibid., p. 12.

³⁴Ibid., p. 13.

1.3 METABOLITOS EN MICROALGAS

Las microalgas son fuentes de carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos poliinsaturados (omega – 3 y omega – 6) y antioxidantes (carotenoides); incluso en el caso del género de *Scenedesmus* posee niveles de aminoácidos superior al patrón que se encuentra en las fuentes convencionales³⁵. Con base en esto se considera una alternativa óptima para la generación de diferentes metabolitos ya sean primarios o secundarios que tienen distintas aplicaciones industriales, estudiando así:

1.3.1 Carotenoides. Los carotenoides son pigmentos naturales considerados terpenoides liposolubles. Específicamente, los terpenoides, son hidrocarburos de origen vegetal, constituidos por una cadena de uno o más unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno); por ende, para denominarse carotenoides, es porque están compuestos por ocho unidades de isopreno³⁶ (Ver Figura 1). Su estructura básica lineal cuenta con grupos cromóforo, siendo dobles enlaces conjugados, los cuales son los responsables de la absorción de la luz. Los grupos cromóforo de los carotenoides absorben en la región azul y verde del espectro y reflejan las longitudes de onda de las regiones del amarillo, naranja y rojo³⁷.

Los carotenoides son sintetizados por plantas, hongos, bacterias y algas, de las cuales se han aislado alrededor de 600 carotenoides a partir de estas fuentes. Dentro de estas se encuentran tanto carotenos (compuestos hidrocarbonados) y xantofilas que presentan oxígeno generalmente en los anillos terminales de su estructura³⁸.

Es importante resaltar que los carotenoides pueden clasificarse en primarios (por ejemplo luteína) y secundarios (astaxantina), representados en la Figura 1. Los primarios son componentes estructurales y funcionales en el sistema fotosintético de las células, siendo fundamentales para su existencia; en cambio los secundarios, al presentarse una situación de estrés logran acumular concentraciones de cuerpos lipídicos dentro o al exterior del cloroplasto, por consiguiente estos tienen la capacidad de actuar como filtros foto-protectores y como antioxidantes para prevenir la acumulación de radicales libres³⁹.

³⁵ACOSTA, A. Crecimiento de *Scenedesmus sp* en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal.

³⁶BLANCO, L. Lípidos no relacionados con ácidos grasos. Terpenoides, carotenoides, esteroides. [En línea].

³⁷LEMUS, X. Obtención de carotenoides con la microalga *Scenedesmus incarssatulus* en un biorreactor tipo airlift.

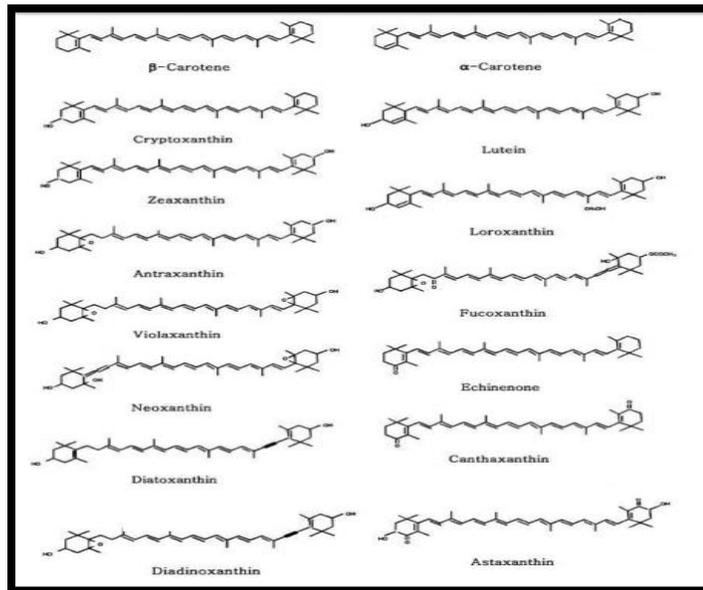
³⁸Ibid., p. 1.

³⁹FERNANDEZ, Baldomero. Producción de carotenoides por microalgas y caracterización de la ruta carotenogénica en *Chlorella zofingiensis*.

Los carotenoides primarios son sintetizados bajo condiciones normales y se favorecen con el crecimiento, mientras que los secundarios se generan bajo una condición de estrés, ya sea físico o nutricional⁴⁰. La importancia industrial de estos pigmentos es amplia, ya que son antioxidantes y precursores de la vitamina A⁴¹, poseen beneficios para la salud humana y la prevención de enfermedades. Otras aplicaciones son en la avicultura, siendo complemento de importancia para la coloración de la carne de aves, con la finalidad de ser atractivo para la compra. En la acuicultura, se usan los pigmentos como complementos alimenticios para salmones y crustáceos, los cuales no son capaces de sintetizar estos pigmentos que habitualmente los absorben del medio marino; y en la industria de alimentos como pigmento de refrescos⁴².

De forma general los carotenoides tienen dos principales funciones en las microalgas, la primera como pigmento accesorio de la fotosíntesis, ya que la presencia de pigmentos con distintas propiedades de absorción asegura que un mayor porcentaje de los fotones incidentes estimule la fotosíntesis; la segunda función es la de fotoprotección, al extraer el exceso de energía de las moléculas excitadas de la clorofila y disiparla como calor, para así no generar muerte celular⁴³.

Figura 1. Carotenoides presentes en las microalgas



Fuente: Eonseon, J. (2003). Xanthophylls in Microalgae from biosynthesis to biotechnological mass production and application.

⁴⁰ LEMUS, Ximena. Obtención de carotenoides con la microalga *Scenedesmus incarssatulus* en un biorreactor tipo airlift.

⁴¹Ibid., p. 5.

⁴²Ibid., p. 2.

⁴³Ibid., p. 10.

1.3.2 Lípidos. Los lípidos son un grupo de biomoléculas que se caracterizan por ser poco o nada solubles en agua y muy solubles en disolventes orgánicos no polares; estas macromoléculas están conformadas por ácidos grasos (compuestos orgánicos que poseen un grupo funcional carboxilo y una cadena hidrocarbonada que puede tener entre 4 a 36 carbonos) que pueden contener o no dobles enlaces (insaturados y saturados, respectivamente)⁴⁴. A nivel celular los lípidos poseen funciones básicas como componentes estructurales de las membranas plasmáticas, almacenamiento de energía y moléculas señalizadoras, es decir, transportadoras de información⁴⁵.

Con respecto a las microalgas el contenido de lípidos varía de una especie a otra, en términos de biomasa seca, entre el 5 y el 77% en peso; esto se debe al ciclo de vida y las condiciones de cultivo como la composición, temperatura, intensidad de iluminación, fotoperiodo de luz y tasa de aireación. Por ejemplo, algunas especies de microalgas al presentar limitación de oxígeno pueden aumentar su contenido de lípidos entre un 10 al 20% en peso⁴⁶.

En cuanto al subgénero *Scenedesmus*, posee un perfil lipídico, es decir un reporte obtenido a través de cromatografía HPLC, de los ácidos grasos presentes en la biomasa microalgal, especificados en porcentaje masa; donde específicamente en este subgénero, se encuentra en la biomasa la presencia de ácido palmítico, oleico y linoleico importantes a nivel industrial⁴⁷, como por ejemplo para la obtención de biodiesel.

Otra aplicación de gran interés es la producción de ácidos grasos polinsaturados conocidos como PUFAS (Figura 2), los cuales estructuralmente cuentan con dobles enlaces; estos son no esenciales, por ende el ser humano no los puede sintetizar por sí mismos y deben ser suplementados en la dieta⁴⁸; debido a que tienen funciones como construcción y el mantenimiento de las membranas celulares, la piel, las células nerviosas y la retina, entre otros beneficios para la salud⁴⁹. La carencia de PUFAS en el organismo, produce trastornos cardiovasculares y neurológicos, cutáneos, en la visión, y otras afectaciones⁵⁰.

⁴⁴ PORTO, A. Lípidos. [En línea].

⁴⁵ MMEGIAS.WEBS.UVIGO.ES. La célula. 5- Membrana celular-Lípidos. Atlas de Histología Vegetal y Animal.

⁴⁶ TEJEDA, L. Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas.

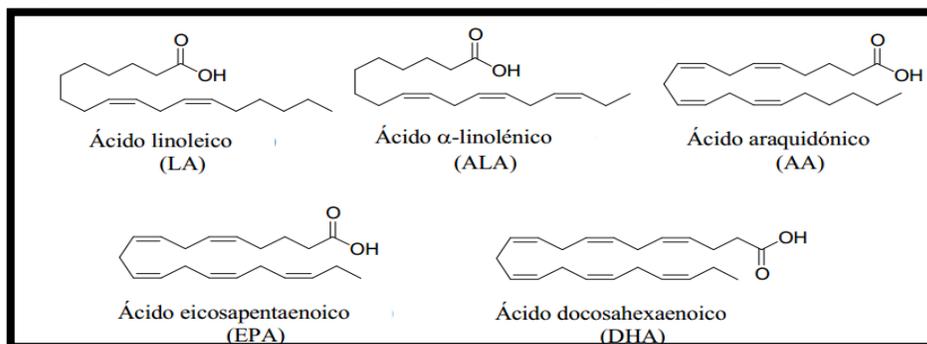
⁴⁷ MAY, E. Cultivo de microalga *Scenedesmus* en un fotobiorreactor acoplado a un sistema de recuperación de biomasa.

⁴⁸ TEJEDA, L. Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas.

⁴⁹ ECURED. Ácidos grasos poliinsaturados. [En línea].

⁵⁰ Ibid. [En línea].

Figura 2. Estructura de los principales ácidos grasos poliinsaturados



Fuente: Rivera, L. Lípidos y Membrana. [En línea]. <<http://blogyanerthbioquimica.blogspot.com.co/2016/06/lipidos-y-membrana.html>> [Citado el 23 de junio de 2018].

1.4 CONDICIONES DE CULTIVO

Para obtener un óptimo crecimiento de la biomasa microalgal, es importante tener en cuenta algunas condiciones que puedan mejorar la velocidad de crecimiento y la cantidad de biomasa generada. Dentro de las condiciones que influyen en esto se encuentra: el pH, la luz, la agitación, la temperatura y la nutrición microalgal; por ende, la cantidad, intensidad o concentración de las anteriores condiciones depende del género de microalga que se desee cultivar. A continuación, se presentan las condiciones anteriormente mencionadas y se describen a mayor profundidad.

1.4.1 pH. El pH puede ser influenciado por varios factores como: la productividad microalgal, el tipo de respiración celular, la composición iónica del medio de cultivo, actividad microbiana adicional en el medio, la cantidad de CO₂ y otros.⁵¹ No obstante, el pH óptimo de crecimiento, dependerá de igual forma de la especie de microalga y la tolerancia al pH. Sin embargo, la mayoría de las microalgas requiere un pH de entre 7 a 9 y éste puede ser controlado de varias formas, como a través de la inyección de CO₂, adición de ácidos, bases débiles o soluciones buffer⁵².

1.4.2 Luz. La luz es una de las condiciones de operación más importantes para el cultivo de microalgas ya que estas son microorganismos fotosintéticos o fotoautótrofos, es decir que convierten la luz en energía metabólica y así poder obtener energía al degradar los sustratos del medio.

La luz, está compuesta de dos partes, una es la intensidad lumínica, que es la concentración de luz que afecta un volumen determinado; y el otro es la longitud de

⁵¹MARTÍNEZ, L. Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. Y Park, J. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production.

⁵²BERENGUEL, M. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. Y Sialve, B. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable.

la onda que describe el color de la luz ⁵³. Los periodos de exposición de las microalgas pueden ser de tipo continuo o discontinuos; no obstante, la exposición prolongada de luz, puede afectar negativamente al cultivo, produciendo una disminución en la tasa fotosintética, dando lugar a la fotoinhibición, para lo cual la microalga disminuye clorofila y activa pigmentos fotoprotectores llamados carotenoides con el fin de protegerse de la fuerte radiación de luz⁵⁴.

Para evitar que pase lo anteriormente descrito y conservar un cultivo con una buena generación de biomasa la mayoría de los autores recomiendan una trayectoria de luz con una distancia transversal no mayor a 10 cm⁵⁵, ya que al ser cambiante la densidad celular del cultivo, una distancia mayor afectará la intensidad y homogeneidad de la luz irradiada. Igualmente se recomienda un buen sistema de agitación, permitiendo un acceso periódico de todas las células a la luz. Sin embargo, para la implementación de esta condición (luz), se necesitan equipos de control como sensores para controlar la intensidad de luz suministrada.

1.4.3 Agitación. Dependiendo de la especie de microalga, se determina si es necesaria una mayor o una menor potencia de agitación; esto se debe a que la agitación es un factor importante para el intercambio gaseoso en el medio, conllevando a evitar la sedimentación y la generación de gradientes de concentración de nutrientes. Al presenciar lo descrito anteriormente, se afecta el crecimiento celular y la incidencia homogénea de la luz para que cada una de las células pueda realizar el proceso de fotosíntesis. Es por esto que se recomienda una tasa de aireación entre 0,6 a 4,1 vvm.⁵⁶

1.4.4 Temperatura. La eficiencia fotosintética depende en gran medida de la temperatura, sin embargo, el rango adecuado de temperatura para la adaptación de la microalga varía dependiendo de la especie. De forma general, es posible fijar un rango entre 20°C a 35°C⁵⁷. Por consiguiente, variaciones grandes de temperatura en un cultivo afecta en gran medida la composición y respiración celular, así como los ciclos fotosintéticos de los cuales dependen reacciones enzimáticas del proceso. Por ende, para controlar la temperatura en un fotobiorreactor existen varios mecanismos como: rociadores de agua, inmersión del colector solar en piscinas, reactor dentro de un invernadero, entre otras⁵⁸.

⁵³CONTRERAS, C. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas.

⁵⁴RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology.

⁵⁵ANDERSEN, R. Algal Culturing Techniques.

⁵⁶LEE, I. Photobioreactor Engineering: Design and Performance.

⁵⁷MEHLITZ, T. Temperature Influence and Heat Management Requirements of Microalgae Cultivation in Photobioeractors.

⁵⁸MARTÍNEZ, L. Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas.

1.4.5 Nutrición microalgal. La concentración o disponibilidad de los nutrientes para el cultivo, es un factor que controla la tasa de crecimiento de las microalgas; generalmente está compuesto por macro y micronutrientes⁵⁹. Se encuentran macronutrientes, como el carbono que contribuye a la producción de biomasa, el nitrógeno siendo un constituyente esencial de las proteínas estructurales y funcionales, el fósforo ayuda en la formación de ácidos nucleicos y a la transferencia de energía; también son macronutrientes el hidrógeno, oxígeno, azufre, calcio, magnesio, potasio, sodio y cloro. Por otro lado micronutrientes como hierro, boro, manganeso, cobre, vanadio, cobalto, níquel, silicio y selenio, son importantes en reacciones enzimáticas y biosíntesis de compuestos, donde actúan como cofactores⁶⁰.

1.5 FACTORES QUE AFECTAN LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN MICROALGAS

Existen ciertas condiciones del cultivo de microalgas que se consideran factores fundamentales para inducir la biosíntesis de carotenoides en diferentes especies de microalgas, algunos de estos se muestran a continuación.

1.5.1 Irradiación y luz. La acumulación de carotenoides en microalgas se ve afectado positivamente por irradiación con luz blanca, no obstante la intensidad y el tiempo de exposición a ésta varía dependiendo la especie⁶¹. Es importante tener en cuenta que, si se genera una limitación de nutrientes, la actividad fotosintética aumenta con la intensidad lumínica, para esto se han probado diferentes longitudes de onda, por ejemplo, para producir astaxantina en *Haematococcus pluvialis* es necesaria la luz azul⁶², mientras que para inducir la generación de carotenoides en la especie *Nannochloropsis* se usaron LED rojos, obteniendo un total de 5,65 mg de carotenoides por L⁻¹ por esto se considera como el mejor tratamiento para aumentar el contenido total de carotenoides⁶³, aunque su eficiencia aumenta al combinar este factor con otros que favorezca la generación de carotenoides, como la salinidad o diversas fuentes de nitrógeno, por lo cual es lo que la mayoría de los investigadores realizan.

Un estudio realizado con *Haematococcus pluvialis*, muestra que en un fotobiorreactor con una trayectoria de luz de 5cm y un fotoperiodo de 12:12hr, el incremento de la irradiación aumenta el contenido de carotenoides, disminuyendo de igual forma el contenido de clorofila, obtenido como resultado que irradiaciones

⁵⁹RAOUF, A. Microalgae and wastewater treatment.

⁶⁰GROBBELAAR, J. Algal nutrition: mineral nutrition.

⁶¹LEMUS, X. Obtención de carotenoides con la microalga *Scenedesmus incarssatulus* en un biorreactor tipo airlift.

⁶²ELENA, J. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés.

⁶³ RUIJUAN, M. LED power efficiency of biomass, fatty acid, and carotenoid production in *Nannochloropsis* microalgae.

de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, son óptimas para el crecimiento del cultivo, y representa un umbral por encima del cual ocurren cambios importantes en ambos parámetros fotoquímicos (el crecimiento y la generación de carotenoides)⁶⁴. Otro estudio realizado con la especie *Scenedesmus sp* utilizando una intensidad lumínica de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtuvo un total de $19,01 \text{ mg}$ de carotenoides por L^{-1} durante un experimento que duró 16 días⁶⁵, el mismo investigador al año siguiente realizó otro experimento durante 14 días con la misma microalga, pero con una intensidad lumínica de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un medio de cultivo principalmente de KNO_3 como fuente de nitrógeno, obteniendo como resultado $3,4\% \text{DW}$ (o peso seco) de carotenoides⁶⁶. Es importante resaltar, que para la aplicación adecuada y controlada de luz en los cultivos microalgales, se necesita el uso de sensores.

1.5.2 Temperatura. La temperatura es uno de los aspectos importantes al tratar de acumular carotenoides, esto se puede evidenciar en estudios, como el realizado sobre la especie *Dunaliella*, en donde al variar la temperatura de 34°C a 17°C se vio disminuido el total de carotenoides observados al iniciar el experimento⁶⁷, de lo cual se puede decir que las altas temperaturas aumentan la producción de carotenoides; no obstante, se disminuye la división celular y la síntesis de proteínas⁶⁸. Una investigación realizada con *Haematococcus sp* en fotobiorreactores planos para la producción de astaxantina, sometió al cultivo durante 23 días a una intensidad de luz de $282 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a una temperatura de 39°C , lo que dio como resultado que al final el experimento se obtuviera $1,9 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco de astaxantina, $0,22 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco de cantaxantina, $0,28 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco de β -caroteno y $4,6 \mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco de licopeno⁶⁹.

1.5.3 pH. Para la acumulación de carotenoides en microalgas, la mayoría de los autores concuerdan, que es necesario mantener un pH entre 6 a 7⁷⁰. Un ejemplo de esto es la microalga *Chlorella pyrenoidosa* para la cual se realizó un experimento variando el pH de entre 4,5 y 8,5, concluyendo que el pH de 6,5 favoreció la cantidad de carotenoides producidos en comparación con otros niveles de pH⁷¹.

⁶⁴TORZILLO, G. Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*.

⁶⁵PŘIBYL, P. Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus sp*.

⁶⁶PŘIBYL, P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus sp*.

⁶⁷BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms.

⁶⁸DEL CAMPO, J. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives.

⁶⁹CRUZ, M. Cultivo masivo de la microalga *Haematococcus sp*. en fotobiorreactores planos para la producción de astaxantina bajo diferentes condiciones de estrés.

⁷⁰SÁNCHEZ, L. Carotenoides: estructura, función, biosíntesis y regulación.

⁷¹CAMACHO, F. Influencia pH en el crecimiento Heterotrófico de la *Chlorella pyrenoidosa*. Aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela.

Otro estudio que demuestra lo anteriormente descrito fue el realizado con *Chlorella sp.* nativa, obteniendo que la producción de pigmentos no se ve influenciada por el pH; ya que los mayores valores se produjeron en el cultivo control con un pH 6. Sin embargo, aunque la diferencia es relativamente poca, si se observa un aumento en la clorofila y una disminución en los carotenoides a medida que se aumenta el pH⁷².

1.5.4 Salinidad. La salinidad del medio de cultivo tiene gran influencia sobre el crecimiento, este factor presenta la tendencia de disminuir los procesos metabólicos y la respiración celular; sin embargo, no todas las especies reaccionan de la misma forma al aumentar la salinidad del medio, por lo que es necesario determinar la cinética y la tasa de crecimiento, ya que existe una relación inversa entre la densidad celular y la salinidad, siendo necesario el conocimiento de la cantidad exacta que se le debe aplicar al medio. La sal más usada en la mayoría de los casos es el cloruro de sodio, o NaCl, con una concentración no mayor al 0,8%⁷³.

Se han realizado experimentos con la especie *Haematococcus pluvialis*, donde el objetivo era aumentar la producción de un carotenoide llamado astaxantina, para lo cual se probó una combinación de NaNO₃ y acetato de sodio o malonato de sodio, obteniendo como resultado que la mejor concentración de NaNO₃ era de 0,15 g/L permitiendo un crecimiento óptimo de la microalga; en cuanto al acetato de sodio o al malonato con concentraciones de 0 a 2% p / v, se observó un aumento en la acumulación de astaxantina de tres y cinco veces más, respectivamente, en comparación con el cultivo control⁷⁴. De igual forma al inducir una condición de estrés por salinidad a la microalga *Chlorella sp.* se reporta un aumento con respecto al cultivo de control, al utilizar una salinidad de 35%, esto se debe quizás a la presencia de sales de Mg⁺², Ca⁺², SO₄⁻² y Fe en el agua, siendo específicamente los iones metálicos los que estimulan la síntesis de carotenoides, y por ende la disminución en la relación clorofila/carotenoides⁷⁵.

Entre otros estudios realizados, se tiene el anteriormente citado de KNO₃ en concentraciones de entre 1 – 10 mM realizado en conjunto con un estrés por luz en la especie *Scenedesmus sp.*, donde se obtuvo un total de 3,4%DW (o peso seco) de carotenoides⁷⁶, otra investigación realizada con concentraciones de NaHCO₃ de 0 a 30 gL⁻¹, en la microalga *Dunaliella salina* por un periodo de 17 días, obtuvo muy buenos resultados con un total de 20 µg de carotenoides por mL⁻¹⁷⁷, siendo una de las mejores proporciones de carotenoides obtenidas en la especie de microalga.

⁷²MORA, R. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella sp.*

⁷³SUH, I. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation.

⁷⁴OROSA, M. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth.

⁷⁵MORA, R. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella sp.* aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela.

⁷⁶PŘIBYL, P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus sp.*

⁷⁷KIM, G. Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency

Por otro lado iones metálicos usados en los experimentos de Kobayashi⁷⁸ con sal ferrosa, para la producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*, muestran una acumulación mayor que con el medio de cultivo tradicional, esto fue explicado por Tjahjono⁷⁹, quien dijo que este efecto se debía a la generación de un radical hidroxilo, generado por la reacción conocida como Fenton, la cual involucra la presencia de iones y subespecies metálicas como la sal ferrosa, para estimular la síntesis de carotenoides.

1.6 FOTOBIORREACTOR

Los fotobiorreactores son sistemas cerrados que impiden que el cultivo tenga contacto con el aire atmosférico, evitando que este se contamine con otros microorganismos, estos son empleados principalmente en cultivos microalgas, ya que éstos son microorganismos fotosintéticos y necesitan de una fuente de luz homogénea para crecer⁸⁰.

Generalmente son construidos en materiales transparentes como el vidrio o el policarbonato, con el fin de permitir el paso de la luz necesaria para los procesos fotosintéticos que se dan en su interior⁸¹. Estos equipos permiten controlar, monitorear y modificar, casi por completo, todas las condiciones de operación, como la iluminación, agitación, pH, entre otros, lo que permite tener una alta productividad de biomasa e inducir la acumulación de una mayor cantidad del metabolito de interés.

1.6.1 Fotobiorreactor adaptado. El fotobiorreactor cuenta con una geometría cilíndrica, material de vidrio, un volumen total de 4 Litros y una tapa que tiene orificios para poder insertar las mangueras de aireación; específicamente el sistema de agitación se basa en que un extremo de las 4 mangueras entra en contacto con el cultivo y el otro extremo va conectado a una bomba de acuario, adicionalmente una manguera de menor longitud que no entra en contacto con el medio, pero es necesaria para permitir la liberación de la acumulación de oxígeno, en su parte superior contiene un tapón de algodón para evitar el paso de partículas contaminantes.

Este diseño se encuentra dentro de una incubadora de icopor que en las paredes de su interior cuenta con una cinta LED, que se activa por fotoperiodos de 12 horas luz y 12 de oscuridad, gracias a un temporizador. Este montaje (Figura 3), se ha usado en las investigaciones de la línea de microalgas del grupo de investigación

⁷⁸KOBAYASHI, M. Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*.

⁷⁹TJAHJONO, A. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures.

⁸⁰PULZ, O. Photobioreactors: Production Systems for Phototrophic Microorganisms.

⁸¹CARVALHO, A. Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances.

BIOTECFUA de la Fundación Universidad de América, favoreciendo la adaptación y crecimiento de la microalga usada.

Figura 3. Fotobiorreactor adaptado



Fuente: elaboración propia

1.7 CUANTIFICACIÓN Y TASA DE CRECIMIENTO MICROALGAL

El crecimiento de las microalgas, generalmente se expresa como el incremento de biomasa por número de células sobre mililitro (cel/mL), este es calculado para un periodo de tiempo o fase de crecimiento. El incremento puede ser estimado mediante diversos métodos, dentro de los más usados se encuentra el recuento celular por medio del microscopio, como se muestra a continuación⁸².

1.7.1 Recuento celular. Es una técnica que permite obtener un aproximado del número total de células que se encuentran en un cultivo, es por medio de este que se determina la producción de biomasa, permitiendo conocer la eficiencia del cultivo y llevar un control sobre el cultivo mediante curvas de crecimiento⁸³.

Esta técnica se realiza en cámaras de recuento que contienen un volumen determinado entre la lámina y la laminilla rígida. Existen diversas cámaras como se muestra en el Cuadro 2, sin embargo, la más usada para cultivos microalgales es el hematocitómetro (Neubauer) de 0,1 mm⁸⁴.

⁸²ARREDONDO, B. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento.

⁸³ARNÁIZ, C. Determinación de la biomasa en procesos biológicos.

⁸⁴ARREDONDO, B. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento.

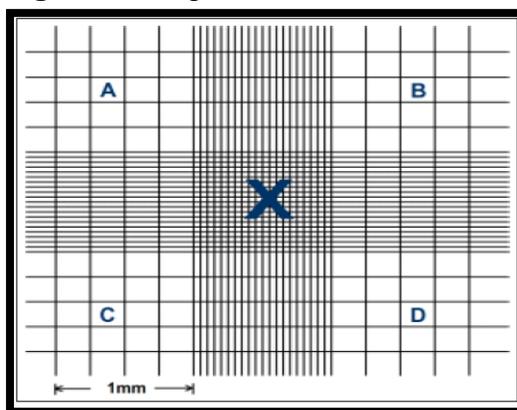
Cuadro 2. Nombre comercial, volumen útil de recuento, profundidad, objetivos usados, tamaño de las células en la muestra e intervalo de concentraciones aconsejadas para las cámaras más comunes utilizadas para el recuento celular de microorganismos

Nombre	Volumen (μL)	Profundidad (mm)	Área (mm ²)	Objetivo	Tamaño celular (μm)	Cel/mL
Petroff Hauser	0,2	0,02	10	40-100	0.5-5	10 ⁶ -10 ⁸
Speirs Levy	0,4	0,2	2	10-20	5-75	10 ⁴ -10 ⁶
Neubauer	0,9	0,1	9	20-40	2-30	10 ⁴ -10 ⁷
Fuchs-Rosenthal	3,2	0,2	16	10-20	5-75	10 ⁴ -10 ⁶
Palmer	100	0,4	250	10-45	5-150	10 ² -10 ⁵
Maloney						
Sedgwick-Rafter	1000	1	1000	2.5-10	50-500	30-10 ⁴

Fuente: Guillard, R. (2005). Counting cells in cultures with the light microscope. Algal Culturing Techniques.

1.7.2 Cámara de Neubauer. Es una de las cámaras más usadas, cuenta con 0,1 mm de profundidad que consta de 9 cuadrados con lados de 1 mm cada uno para obtener un área total de 0,9 mm², cada de estos cuadrados corresponden a un volumen de 0,1 μL. Los cuatro extremos A, B, C y D están divididos en 16 cuadros pequeños como se muestra en la Figura 4. El cuadro central marcado con una X contiene 25 cuadros, cada uno con un área de 0,04 mm², que a su vez están subdivididos en 16 cuadros más pequeños. Cuando las células son pequeñas y la concentración de los cultivos es muy alta, se recomienda usar cinco cuadros menores del cuadro central marcado con X⁸⁵.

Figura 4. Reglilla de Neubauer de 9 mm²



Fuente: Arredondo, B., Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la Biomasa Microalgal. Capítulo 2: Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

⁸⁵ARREDONDO, B. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento.

1.8 CURVA DE CRECIMIENTO

La curva de crecimiento permite reconocer las diferentes fases de crecimiento que experimenta un cultivo microalgal, esto sirve para describir de una forma visual el cambio de concentración celular o biomasa con respecto al tiempo, la gráfica resultante dependerá de las condiciones de cultivo a los que esté siendo sometida la microalga como los nutrientes del medio, la temperatura, concentración de oxígeno, agitación, fuente de luz, entre otros. Para crear la gráfica se utilizan principalmente la velocidad específica de crecimiento o tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación o generación (t_g)⁸⁶.

1.8.1 Fases de crecimiento.

- Fase de Adaptación (1): Es un periodo durante el cual el microorganismo se adapta a las condiciones del medio de cultivo donde ha sido inoculado. Este comportamiento inicial depende de las condiciones de las células inoculadas, igualmente condiciones como temperatura, iluminación y pH pueden causar un retardo en el crecimiento inicial del cultivo⁸⁷.
- Fase de aceleramiento (2): En esta fase diferentes componentes estructurales del microorganismo se incrementan secuencialmente, generando una gran actividad fisiológica, iniciando con el RNA o ácido ribonucleico, seguido de las proteínas, entre otros compuestos metabólicos importantes para el crecimiento y reproducción, permitiendo que el inóculo comience a crecer⁸⁸.
- Fase exponencial (3): Durante este periodo la concentración celular aumenta rápidamente y en forma exponencial, alcanzando el valor máximo de la velocidad de crecimiento, debido a que no existe un factor limitante en el cultivo, permitiendo un crecimiento constante⁸⁹.
- Fase de desaceleración (4): En esta fase se empiezan a agotar los nutrientes, acumulándose sustancias inhibitorias del crecimiento, generando como consecuencia una menor tasa de división celular⁹⁰.
- Fase estacionaria (5): Durante esta fase cesa el crecimiento poblacional, igualando la tasa de generación a la tasa de mortalidad, esto debido a las condiciones limitantes del cultivo, como la baja concentración de algún nutriente esencial, valores altos de pH, excesiva concentración de oxígeno, la insuficiente

⁸⁶Ibid., p. 25.

⁸⁷RIVERÓN, E. Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez.

⁸⁸ARREDONDO, B. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento.

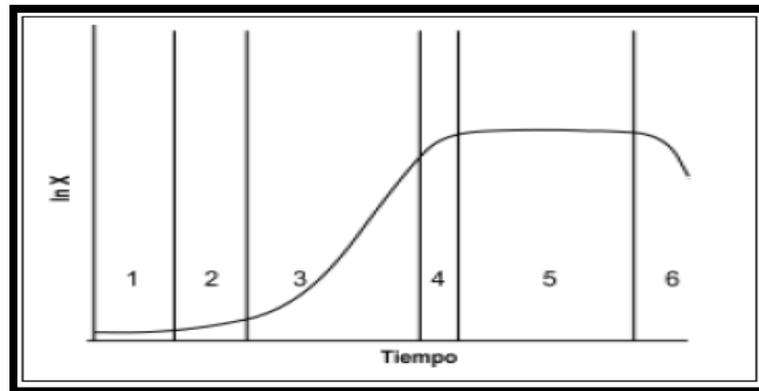
⁸⁹Ibid., p. 26.

⁹⁰Ibid., p. 26.

exposición a la fuente lumínica o la gran concentración de productos catabólicos excretados en el medio⁹¹.

- Fase de muerte (6): Es una fase donde la tasa de mortalidad es muy superior a la de tasa de generación, por lo cual la concentración celular disminuye, debido a la falta de nutrientes, provocando la muerte o lisis celular⁹².

Figura 5. Curva de crecimiento típica, en la cual se muestran las diferentes fases



Fuente: Arredondo, B., Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la Biomasa Microalgal. Capítulo 2: Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

1.9 SEPARACIÓN DE BIOMASA

La separación de biomasa del medio de cultivo es una etapa importante para el posterior análisis o extracción del metabolito de interés. A continuación, se muestran los utilizados en el presente proyecto de grado.

1.9.1 Sedimentación. Este método utiliza la gravedad con el fin de agrupar la biomasa al fondo del recipiente, siendo uno de los métodos más usados debido a su simplicidad. La sedimentación aprovecha la densidad del cultivo de las células, para que bajen hasta el fondo del recipiente, separando la biomasa del medio de cultivo. No obstante, por si solo es un proceso bastante lento por lo que en la mayoría de los casos se utiliza la floculación para que el proceso se dé con una mayor rapidez⁹³.

⁹¹BENINTENDE, S. Crecimiento bacteriano.

⁹²ARREDONDO, B. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento.

⁹³BRENNAN, L. Biofuels from Microalgae- A Review Technologies for Production, Processing and Extractions of Biofuels and Co-products.

1.9.2 Centrifugación. Este método utiliza la fuerza centrífuga, la cual incrementa la fuerza gravitacional para realizar una sedimentación acelerada, donde por medio de la rotación a altas velocidades dentro de un contenedor, se separa la fase sólida de biomasa del medio líquido donde se encontraba suspendida⁹⁴, esto se da gracias a la diferencia de densidades que hay entre ambas fases. Es un proceso que presenta gran eficiencia: mayor del 90% en la recuperación de biomasa a nivel laboratorio; no obstante, es inviable a nivel industrial ya que su costo de operación es considerablemente alto⁹⁵.

1.10 SECADO DE BIOMASA

Es necesario secar la biomasa, ya que aún no existen métodos que permitan analizar o extraer los componentes internos en humedad. Para realizar el proceso sin alterar o degradar estos compuestos, es necesario secar a temperaturas menores a los 75°C⁹⁶. Por otra parte, el tiempo de secado dependerá directamente de la cantidad de humedad a retirar y de la temperatura de secado.

1.10.1 Liofilización. Es un método utilizado para secar biomasa. Este proceso, también llamado *criodesecación*, consiste en congelar la biomasa húmeda y luego vaporizar a bajas presiones el hielo generado. De esta forma se conservan mejor los compuestos sensibles al calor; sin embargo, tiene un alto costo, debido al gran consumo energético utilizado en el proceso, donde la eliminación de la humedad se realiza mediante la sublimación. Para congelar la biomasa, se debe llevar a presiones y temperaturas por debajo del punto triple del agua ($T < 0,0099^{\circ}\text{C}$ y $P < 610,5 \text{ Pa}$) y luego adicionar un calor latente de 2,84 MJ/Kg para evaporar directamente el hielo⁹⁷.

1.11 DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

Uno de los métodos más utilizados para la determinación de carotenoides es la espectrofotometría, el cual se explica a continuación.

⁹⁴HEASMAN, M. Development of Extended Shelf-life Microalgae Concentrate Diets Harvested by Centrifugation for Bivale Molluscs-A Summary.

⁹⁵MONTHIEU, C. Estudio técnico económico de la extracción de los lípidos de las microalgas para la producción de biodiesel

⁹⁶CEBALLOS. A. Estudio comparativo de tres sistemas de secado para la producción de un polvo deshidratado de fruta.

⁹⁷INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS. Deshidratación: secado y liofilización.

1.11.1 Espectrofotometría. La técnica de análisis por espectrofotómetro mide la cantidad de luz absorbida por la muestra en diferentes longitudes de onda de luz visible. Cada compuesto presente en la muestra tiene una longitud de onda con un pico de absorción; es por medio de este pico que es posible identificar a cada compuesto. Así mismo, del ancho del pico y de la absorbancia es posible calcular la concentración, o cantidad, de cada tipo de compuesto extraído de las células. Los carotenoides por lo general son expuestos a bandas o longitudes de onda entre 400 y 540 nm⁹⁸.

⁹⁸ARREDONDO, B. Determinación de pigmentos por espectrofotometría.

2. METODOLOGÍA

El desarrollo del trabajo de grado se ejecutó en 4 fases, esquematizadas en el diagrama de flujo de la metodología del proceso (Figura 6); estas actividades se encuentran representadas por los objetivos específicos del proyecto.

Con base en esto, en la primera fase se realizó una revisión bibliográfica de los últimos diez años, sobre los factores que tienen mayor efecto en la producción de carotenoides en microalgas y se seleccionó un factor a través de una matriz de selección. Según lo obtenido, se eligió como factor de estrés a la salinidad, para ser evaluada en la especie de microalga *Scenedesmus dimorphus*; ya que es una especie que no ha sido estudiada a profundidad en el grupo de investigación BIOTECFUA de la Fundación Universidad de América.

Posteriormente en la segunda fase, se llevó a cabo el pre-experimento dividido en dos etapas. La primera etapa del pre-experimento consistió en evaluar la resistencia de la cepa a la salinidad, debido a que es una especie de agua dulce. Para esto se seleccionaron de la matriz (Tabla 3) tres tipos de sales (NaCl^{99} , KNO_3^{100} y NaHCO_3^{101}) que reportaron generación de carotenoides en especies similares a la trabajada. Con base en lo anterior, se realizó un inóculo inicial ($5,50 \times 10^5$ cel/mL) en 6 recipientes de 375 mL, con un volumen de trabajo total de 150 mL (100 mL de medio de cultivo Foliagro y 50 mL de microalga). La concentración celular se monitoreó cada 24 horas mediante recuento celular por cámara de Neubauer y la curva de crecimiento se realizó con 13 días de conteo. El estrés por salinidad se implementó en el día 10, teniendo en cuenta dos concentraciones para cada sal (0,01 M y 0,4 M), como se explica en la sección 2.2.3 Condiciones del pre-experimento de la etapa uno; por ende, la resistencia a la salinidad se evaluó por medio del comportamiento que tuvo el crecimiento de la microalga una vez aplicado el factor y mediante un análisis por diseño factorial. Además, por medio de la curva de crecimiento se reportaron comportamientos contrarios, debido a que con KNO_3 a 0,4 M presentó el mayor crecimiento celular y con NaCl a 0,4 M el menor crecimiento. Esto conllevó a seleccionar estas dos sales para la segunda etapa del pre-experimento, para así determinar con cuál comportamiento se favoreció la generación de carotenoides al agregar la sal en la fase estacionaria.

En la segunda etapa del pre-experimento, se pusieron en marcha 8 recipientes de 375 mL que contenían 250 mL de medio de cultivo y 50 mL de microalga, con un inóculo inicial que contaba con una concentración celular de $4,03 \times 10^5$ cel/mL. Al llegar a fase estacionaria (día 7), se esperaron tres días más para confirmar que

⁹⁹GARCIA, L. MONCAYO, S y PASTUZO, M. Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal.

¹⁰⁰PŘIBYL, P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp.

¹⁰¹KIM, G. Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbón utilization efficiency.

estaba en la fase adecuada. Es por esto que en el día 10 se agregaron las 4 concentraciones (0,5, 0,6, 0,7, y 0,8 M) de NaCl en 4 fotobiorreactores y de KNO₃ en otros cuatro. Durante la permanencia del pre-experimento de la etapa dos, se monitoreó cada 24 horas la concentración celular hasta alcanzar un total de 14 días del cultivo. Al culminar el tiempo, se realizó la determinación de carotenoides totales por espectrofotometría UV-VIS. Para finalizar, se analizaron los resultados entregados mediante análisis por diseño factorial.

Posteriormente, en la tercera fase (experimento), se utilizó un fotobiorreactor adaptado de 4 L, al cual se le hizo una limpieza previa al arranque del mismo (Anexo A), con el fin de garantizar un ambiente adecuado para el crecimiento de la microalga. Se inició el experimento con un volumen de trabajo total de 3535 mL (3L de medio de cultivo y 535 mL de microalga), con un inóculo inicial de 2×10^6 cel/mL. Los conteos celulares a través de la cámara de Neubauer se llevaron a cabo cada 24 horas, evaluando las curvas de crecimiento para así conocer cuando el cultivo entró a fase estacionaria, en la cual se implementó la concentración del factor seleccionado en la etapa dos (KNO₃ a 0,6 M). La cuantificación de los carotenoides se realizó por medio de espectrofotometría UV-VIS y para poder especificar la proporción carotenoides-lípidos; los lípidos se cuantificaron por medio de cromatografía de gases.

Por último, en la cuarta fase, se determinó un estimativo de costos del proceso experimental a nivel laboratorio, teniendo en cuenta los diferentes costos presentes en el proceso operativo para la producción de biomasa y carotenoides, con base en la productividad volumétrica y en cuanto a los materiales o recursos usados.

Lo anteriormente descrito se muestra de una forma más simplificada en la Figura 6, en donde se muestra el diagrama de flujo de la metodología del proceso, presentada a continuación:

Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología del proceso

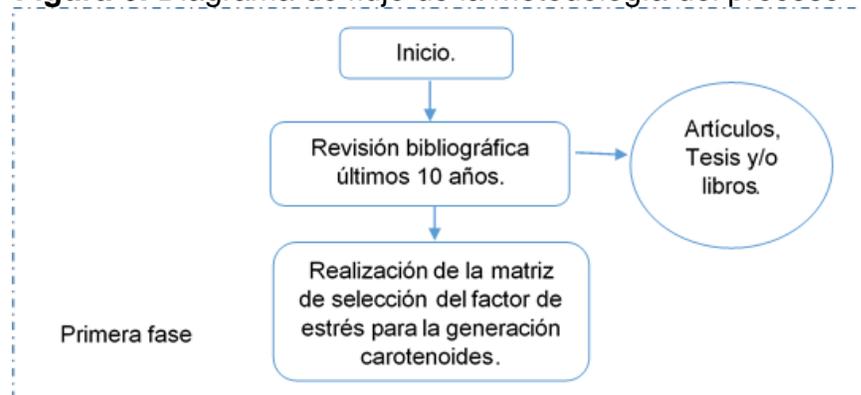


Figura 6. (Continuación)

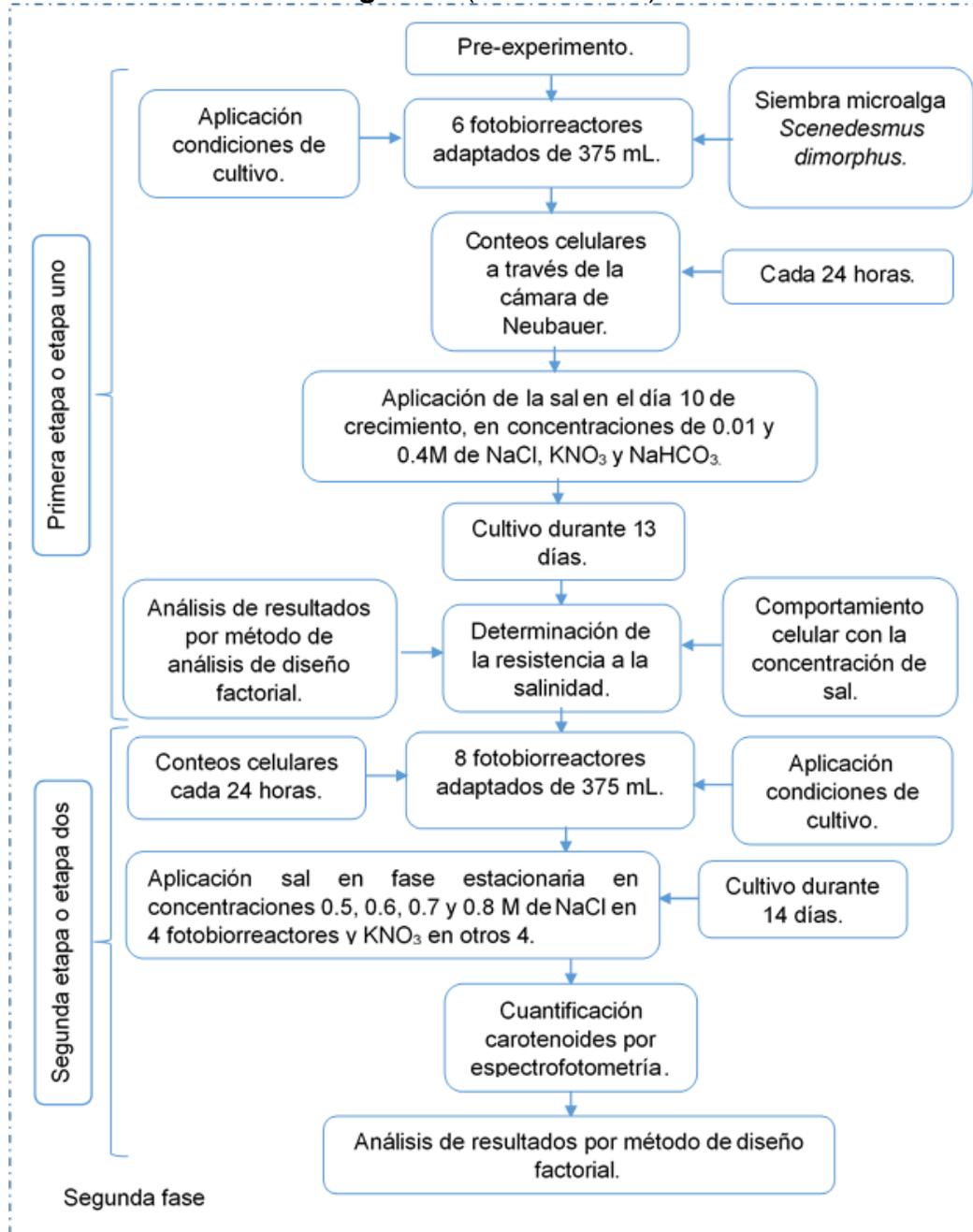
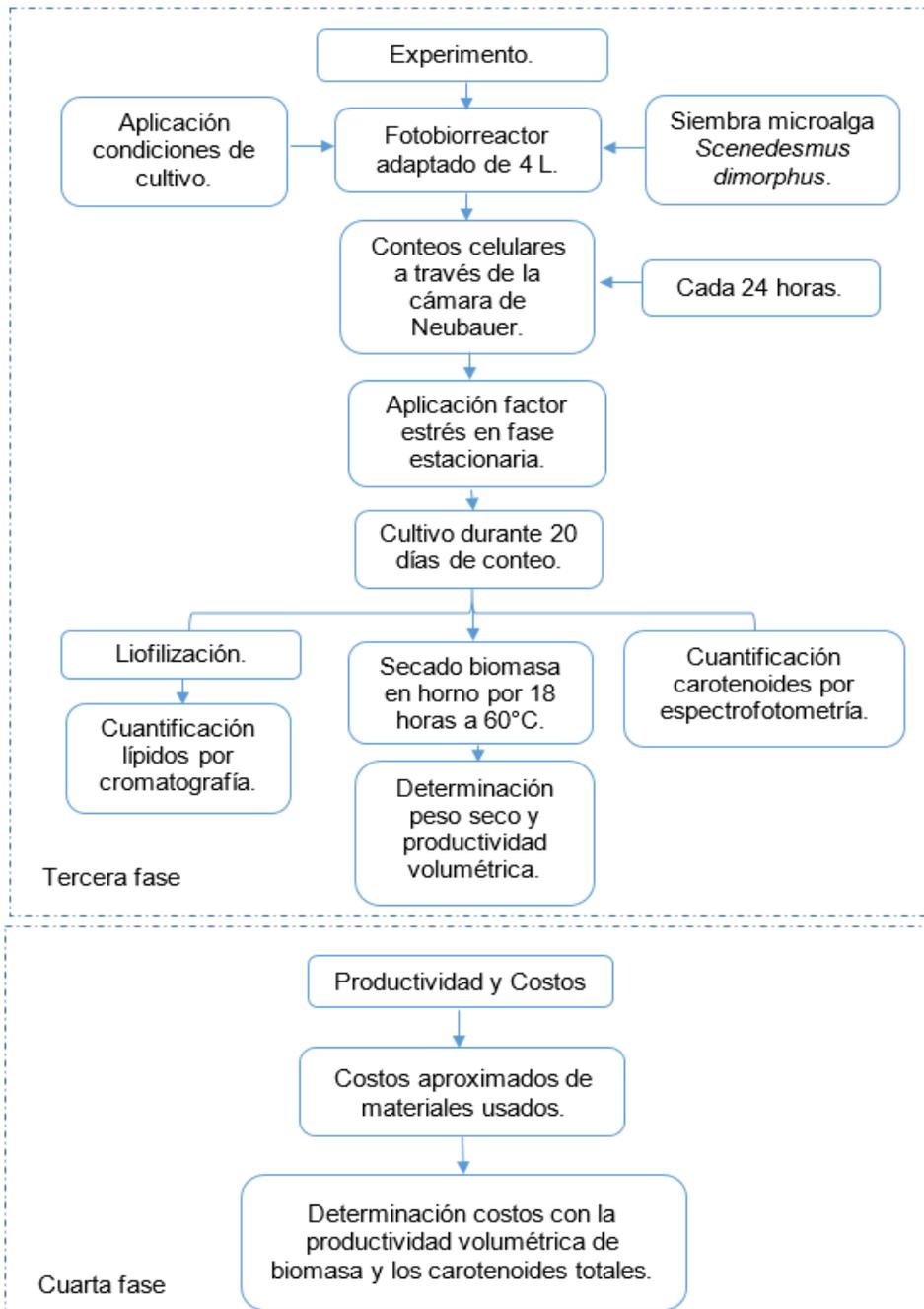


Figura 6. (Continuación)



Fuente: elaboración propia

2.1 PRIMERA FASE

A través de revisión bibliográfica, se seleccionó un factor que favoreciera la producción de carotenoides en la microalga *Scenedesmus dimorphus*. Para esto se tuvieron en cuenta estrategias a nivel nutricional o a nivel físico. Siendo a nivel nutricional, aquellos cambios en la composición del medio de cultivo (limitación de nitrógeno o de fósforo). Y a nivel físico, la manipulación de las condiciones operacionales y factores externos como la aplicación de intensidades de luz, salinidad u otras.

2.1.1 Parámetros para matriz de selección según revisión bibliográfica.

Teniendo en cuenta artículos y tesis de los últimos diez años, se elaboró una matriz de selección, en la cual, se evaluaron diversos parámetros para cada factor de estrés. Para esto, se asignó una calificación de 0 a 5, siendo 0: Totalmente desfavorable; 1: Desfavorable; 2: Medianamente desfavorable; 3: Neutro; 4: Favorable; y, 5: Totalmente favorable. Con base en lo anterior, los parámetros evaluados fueron:

- Factor de estrés: Factor que indujo la producción de metabolitos secundarios. Por ende, se debe tener en cuenta que son compuestos que no están relacionados con el crecimiento celular, siendo producidos al presentarse una condición de estrés en la fase estacionaria del crecimiento celular.
- Viabilidad de aplicación según sistemas de instrumentación y control: Instrumentos usados para la medición de los diferentes parámetros que se deben regular en el medio de cultivo; es decir temperatura, luz y otros. El punto central de análisis la infraestructura y tecnología en el laboratorio.
- Tiempo de duración del experimento: La optimización de tiempo trae consigo beneficios a nivel de proceso; por ende, el rango de tiempo adecuado en que se tarde en llegar a fase estacionaria la microalga, es de 10 a 15 días máximo.
- Costos en la aplicación del factor: Para el desarrollo del proyecto se debe tener en cuenta el presupuesto económico, al igual que la viabilidad de aplicación del factor que genera factibilidad.
- Semejanza con la especie *Scenedesmus dimorphus*: Se especificó el tipo de microorganismo, especie o cepa; ya que cada uno presenta un comportamiento diferente al aplicar determinado factor.
- Productividad de carotenoides: Por medio de este parámetro se analizó cómo el factor beneficia la generación del producto de interés.

- Escala: Según lo estipulado en la investigación, se determinó la escala en la que se realizó el experimento, siendo la de laboratorio la que se ajusta al proyecto planteado.

Posteriormente, al tener los resultados de la matriz de selección, se llevó a cabo la elaboración de una segunda matriz, evaluando los mismos parámetros, pero en vez de evaluar la “Viabilidad de aplicación según sistemas de instrumentación y control”, se tuvo en cuenta el volumen en el que se realizó la experimentación.

2.2 SEGUNDA FASE

En esta fase se realizan los pre-experimentos que sirven de base teórica y experimental para el experimento final, a continuación, se explica el procedimiento realizado.

2.2.1 Condiciones del pre-experimento para la generación de biomasa. Como primera medida fue necesario adaptar 8 recipientes de vidrio de 375 mL, como fotobiorreactores; para luego agregar medio de cultivo y microalga *Scenedesmus dimorphus* a cada uno de los fotobiorreactores adaptados. Esta especie fue proporcionada por el grupo de investigación BIOTECFUA de la Fundación Universidad de América.

Cada uno de los fotobiorreactores (Figura 7), se sometieron durante todo el pre-experimento a las condiciones que describen a continuación:

Figura 7. Fotobiorreactor adaptado de 375 mL



Fuente: elaboración propia

2.2.1.1 Cepa microalgal (*Scenedesmus dimorphus*). Esta especie de *Scenedesmus* tiene una forma ovalada, con un tamaño de aproximadamente 10 μm , por lo que se le conoce como un alga pesada ya que presenta una pared celular rígida, facilitando la sedimentación de esta, lo que vuelve complicado la agitación constante y homogénea de la misma¹⁰².

¹⁰²GÓMEZ, L. Microalgas: Aspectos Ecológicos y Biotecnológicos

2.2.1.2 Medio de cultivo. De acuerdo a estudios realizados previamente por la línea de investigación de microalgas del grupo de investigación BIOTECFUA de Fundación la Universidad de América¹⁰³, la opción más adecuada es un fertilizante denominado Foliagro, el cual cuenta con una composición similar al medio de cultivo Bold Basal. La composición del fertilizante se describe en el Cuadro 3, en el Anexo B del documento. El medio de cultivo se preparó siguiendo la proporción de 2 mL de Foliagro/ 1 L de agua destilada.

2.2.1.3 Fuente lumínica y fotoperiodos. La fuente lumínica utilizada fue luz roja, proveniente de cintas LED colocadas a lo largo de la incubadora, este tipo de luz visible fue escogida debido a la información proporcionada por estudios realizados en anteriores trabajos de grado de la línea de investigación de microalgas en el grupo de investigación BIOTECFUA¹⁰⁴, los cuales afirman que la luz roja se localiza en el rango fotosintético activo de las microalgas, favoreciendo el crecimiento. Sin embargo, al llegar a fase estacionaria se aplicó solo luz azul por medio de una cinta LED, la cual favoreció la generación de carotenoides¹⁰⁵; esto se debe a que los grupos cromóforo de los carotenoides absorben en la región azul y verde del espectro; y reflejan las longitudes de onda de las regiones del amarillo, naranja y rojo¹⁰⁶. Por ende, los carotenoides por lo general son expuestos a bandas o longitudes de onda de entre 400 y 540 nm¹⁰⁷.

Por otro lado, se estableció un fotoperiodo de 12hr de luz y 12 de oscuridad, ya que este permite que la microalga este expuesta a un largo periodo de irradiación, pero sin entrar en fotoinhibición¹⁰⁸.

2.2.1.4 Temperatura. Debido a que Bogotá permanece en promedio a 18°C, al interior de la incubadora el cultivo estará a temperatura ambiente, este se presta como un medio propicio para el cultivo de la especie *Scenedesmus dimorphus*, ya que se encuentra dentro del rango de temperaturas a la que la mayoría de las microalgas crecen sin mayor dificultad¹⁰⁹.

¹⁰³ÁNGEL, C. 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.

¹⁰⁴ibid., p. 27.

¹⁰⁵ ACACIO, N., et al. Desarrollo de un procedimiento para la extracción de β -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.* en la salina Las Cumaraguas.

¹⁰⁶LEMUS, X. Obtención de carotenoides con la microalga *Scenedesmus incarssatulus* en un biorreactor tipo airlift.

¹⁰⁷ARREDONDO, B. Determinación de pigmentos por espectrofotometría.

¹⁰⁸TORZILLO, G. Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*.

¹⁰⁹MEHLITZ, T. Temperature Influence and Heat Management Requeriments of Microalgae Cultivation in Photobioeractors.

2.2.1.5 Agitación. Se realizó por medio de bombas de acuario de marca Jeneca de cuatro salidas cada una, manteniendo un caudal de aire de 4L/min, conectadas mangueras de 3/16" que llegan hasta los fotobiorreactores adaptados permitiendo una agitación continua; suplementado a través de agitación manual, debido que *Scenedesmus dimorphus*, es un alga pesada por su pared celular rígida; por ende, se presenta sedimentación¹¹⁰.

2.2.2 Recuento celular y construcción de curvas de crecimiento. Para cada una de las etapas experimentales se aplicaron las siguientes pautas y parámetros:

2.2.2.1 Cámara de Neubauer y curva de crecimiento. El grupo de investigación BIOTECFUA, cuenta con 2 cámaras de Neubauer con volumen estándar de 0,1 mm³, para realizar el recuento celular se siguió el protocolo descrito posteriormente, este se realizó durante un tiempo aproximado de 13 a 14 días cada 24 horas, donde el periodo incluye la generación de biomasa de alrededor de 10 a 12 días y el tiempo de generación de carotenoides por salinidad de 3 días; además se midió la concentración inicial celular el primer día de puesta en marcha del sistema, con la finalidad de observar la adaptación del cultivo a las condiciones con respecto al tiempo. Al terminar el recuento diario, se calculó la concentración celular y la velocidad específica de crecimiento, dadas por la ecuación 1 y 2. En cuanto a la curva de crecimiento, se realizó con la ayuda de los datos obtenidos diariamente de concentración celular (cel/mL) como eje Y el tiempo en días como eje X, esto permitió monitorear el cultivo y saber con exactitud cuando entraba a fase estacionaria para aplicar las diferentes concentraciones de sal e inducir la carotenogénesis.

2.2.2.2 Protocolo para el recuento. Antes de extraer la muestra se agitó el cultivo para permitir que las células tengan una distribución homogénea. Seguidamente se tomó una muestra mediante succión con una pipeta Pasteur, con esta se llenó la cámara ya con el cubre objeto puesto, colocando una gota cerca del margen del cubre objetos, evitando que esta gota se expanda a la parte superior del mismo y cuidando que el volumen almacenado en el mismo sea suficiente para que una parte llegue hasta los canales laterales, pero sin inundarlos completamente.

Posteriormente, se colocó la cámara en su posición correspondiente en el microscopio B-150 Optika y se enfocó la cámara (Zenith Lab Inc.) con el objetivo 40X facilitando la identificación de las células. El recuento se hizo contando las células que quedan en cinco de los cuadros menores del cuadro central marcado con X (Figura 4), cuando las células se encontraban sobre las líneas de los cuadros, no se contaron. Para tener un recuento preciso se realizaron 2 repeticiones del conteo, con submuestras de la muestra principal; al terminar el conteo se utilizó la ecuación 1 para obtener concentración celular en cel/mL¹¹¹.

¹¹⁰GÓMEZ, L. Microalgas: Aspectos Ecológicos y Biotecnológicos

¹¹¹ARREDONDO, B. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento.

2.2.2.3 Cálculos para el recuento. Debido a que las células se contaron en el cuadro central marcado con X (Figura 4), y solo se usaron 5 cinco cuadros menores, la concentración celular se calculó de la siguiente forma:

Ecuación 1. Concentración celular en células por mililitro [cel/mL]

$$\text{Concentración o } N \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \# \text{células totales (5C)} * \text{Factor de Dilución} * 50,000$$

Fuente: Murcia, L., Parra, M. (2017). Producción de proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* enriqueciendo el medio de cultivo con fuentes de nitrógeno. Universidad de América.

2.2.2.4 Ecuaciones que definen el crecimiento. Con la finalidad de determinar cuál fue el cultivo que presentó un crecimiento rápido, fue necesario calcular velocidad específica de crecimiento (μ), mediante la ecuación 2, siendo:

Ecuación 2. Velocidad específica de crecimiento o Tasa de crecimiento

$$\mu_e (\text{dia}^{-1}) = \frac{\text{Ln} \left(\frac{X_2}{X_1} \right)}{t_2 - t_1}$$

Fuente: Arredondo, B., Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Siendo X_1 la concentración inicial y X_2 concentración final de la fase exponencial, t_1 día de la concentración inicial de la fase exponencial y t_2 día de la concentración final de la fase exponencial.

Por otro lado, se calculó el tiempo de duplicación o generación (t_g), siendo:

Ecuación 3. Tiempo de duplicación o generación

$$t_g (\text{dia}) = \frac{\text{Ln}(2)}{\mu_e} = \frac{0,693}{\mu_e}$$

Fuente: Arredondo, B., Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

2.2.3 Condiciones del pre-experimento de la etapa uno. Debido a que la microalga *Scenedesmus dimorphus* es una especie de agua dulce, se evaluó la resistencia de la microalga a la salinidad, para esto, se tomó como guía dos referencias bibliográficas, la primera fue de Garcia, Moncayo y Pastuso del 2016, en la cual los autores usaron NaCl en concentraciones de 0.1M, 0.5M, 1M, 2M, 3M y 4.5 M, con el fin de inducir la generación de carotenoides en la especie de microalga *Dunaliella viridis*, obteniendo el mejor resultado con la concentración de NaCl 0,5M, igualmente este trabajo aportó que las concentraciones mayores a 1M generaban la muerte de la cepa.

En cuanto a la segunda referencia utilizada fue de Přebyl del 2016, donde el autor estudio el efecto de una fuente de nitrógeno, como la sal KNO_3 , en concentraciones de 1-10 mM en la especie de microalga *Scenedesmus sp.* para la generación de carotenoides, concluyendo que la concentración de 10 mM indujo la mayor cantidad de carotenoides en la especie, sin afectar el crecimiento de la cepa.

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, se decido utilizar el rango proporcionado por estas dos referencias, de 0.01 M y 0.5 M, sin embargo debido a que el rango de 0.5M fue comprobado por los autores en un cepa de agua salina con alta resistencia a la sal, se decido disminuir este rango a 0.4M con el fin de no generar una posible muerte del cultivo, por lo cual para el presente pre-experimento de la etapa uno se usaron dos concentraciones (0,01 M y 0,4 M) de las tres sales escogidas de la matriz de selección (NaCl , KNO_3 y NaHCO_3). Por ende, los resultados obtenidos estaban en función de la concentración celular, ya que si se presentaba inhibición del crecimiento, la curva de crecimiento decaería por el efecto de la concentración de sal o de la sal usada.

Las respectivas concentraciones fueron preparadas con base en el volumen de trabajo total de cada fotobiorreactor, el cual constaba inicialmente con 50 mL de microalga y 100 mL de medio de cultivo. Sin embargo, debido a la adaptación diferente de los cultivos, se presenciaron volúmenes finales de trabajo distintos. A partir de esto, se tomó la decisión de agregar 50 mL de medio de cultivo al finalizar el conteo celular del día 7, con la finalidad de alargar el tiempo de vida de los mismos y así tener un medio de cultivo robusto que no se viera afectado abruptamente por la adición de la sal.

Los cultivos se dejaron crecer hasta el día 10 de conteo y se les adicionó la solución salina, que constaba de un volumen de 50 mL de agua destilada y los correspondientes gramos de sal, pesados en una balanza con una legibilidad de 0.0001 gramos de la marca VIBRA Modelo HT-220E. Por ende, la cantidad de sal requerida para las soluciones fue calculada con la ayuda de la molaridad, despejando la cantidad de moles de soluto, para luego ser multiplicada por el peso molecular de la sal, como se muestran en las siguientes ecuaciones:

Ecuación 4. Molaridad

$$M = \frac{\text{moles de soluto}}{\text{Litros de solucion}}$$

Fuente: Hernández, G. (2014). Evaluación de las incidencias de salinidad y pH sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana. Fundación universidad de américa.

Ecuación 5. Gramos de soluto

$$g \text{ de soluto} = \text{Peso molecular} * \text{moles de soluto}$$

Fuente: Hernández, G. (2014). Evaluación de las incidencias de salinidad y pH sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana. Fundación universidad de américa.

Despejando moles de soluto de la ecuación, se obtiene:

$$\text{moles de soluto} = M * \text{Litros de solución}$$

Conforme a lo descrito se midió de forma aproximada el volumen total que contenían cada fotobiorreactor adaptado en el día 10, al cual se les adicionó 50 mL de agua destilada, en los que se realizaría la disolución de la sal antes de aplicarla a los cultivos, obteniendo un volumen total, por consiguiente, se calcularon los gramos requeridos de sal para lograr la molaridad deseada.

Las sales contaban con una pureza de 99,9% NaCl, 99% KNO₃ y 99% NaHCO₃. A continuación, se muestran en la Tabla 1 la cantidad en gramos necesaria para el pre-experimento en la etapa uno para el día 10 de conteo celular, así como los volúmenes de cada fotobiorreactor:

Tabla 1. Peso de sal necesario para el pre-experimento en la etapa uno para el día 10 de conteo celular

[Sal] (M)	Volumen total día 10 (mL)	Volumen agua destilada (mL)	Volumen total (L)	Moles de soluto (mol)	Peso molecular (g/mol)	Peso agregado (g)
NaCl (0,01 M)	7,7	50	0,0577	0,000577	58,44	0,03
NaCl (0,4 M)	60	50	0,11	0,044	58,44	2,57
KNO ₃ (0,01M)	40	50	0,09	0,0009	101,1032	0,09

Tabla 1. (Continuación)

[Sal] (M)	Volumen total día 10 (mL)	Volumen agua destilada (mL)	Volumen total (L)	Moles de soluto (mol)	Peso molecular (g/mol)	Peso agregado (g)
KNO ₃ (0,4 M)	5,7	50	0,0557	0,02228	101,1032	2,26
NaHCO ₃ (0,01 M)	10,7	50	0,0607	0,000607	84,007	0,05
NaHCO ₃ (0,4 M)	40	50	0,09	0,036	84,007	3,02

Fuente: elaboración propia

2.2.3.1 Análisis estadístico diseño factorial del pre-experimento de la etapa uno. Para analizar la resistencia a la salinidad de la microalga *Scenedesmus dimorphus*, se planteó un diseño factorial el cual cuenta con tres niveles (NaCl, KNO₃ y NaHCO₃) y dos factores por cada sal (0,01 M y 0,4 M), con una sola repetición. Para los cuales se describen las siguientes hipótesis, H₀: La concentración celular final no se ve afectada por la concentración de sal y H₁: La concentración celular final se ve afectada por la concentración de sal. Para realizar este método de análisis se utilizaron las siguientes ecuaciones:

Ecuación 6. Ecuaciones para realizar el diseño factorial

$$C = \left(\frac{1}{a * b}\right) \left(\sum_i \sum_j \sum_k y_{ijk}\right)^2$$

$$SCT = \sum_i \sum_j \sum_k y_{ijk}^2 - C$$

$$SCA = \left(\frac{1}{b}\right) \sum_i \left(\sum_j \sum_k y_{ijk}\right)^2 - C$$

$$SCB = \left(\frac{1}{a}\right) \sum_j \left(\sum_i \sum_k y_{ijk}\right)^2 - C$$

$$SCAB = \left(\frac{1}{r}\right) \sum_i \sum_j \left(\sum_k y_{ijk}\right)^2 - C - SCA - SCB$$

$$SCE = SCT - SCA - SCB$$

Ecuación 6. (Continuación)

$$MCA = \frac{SCA}{a - 1} \quad MCB = \frac{SCB}{b - 1}$$

$$MCAB = \frac{SCAB}{(a - 1) * (b - 1)}$$

$$MCE = \frac{SCE}{(a * b)}$$

$$FA = \frac{MCA}{MCE} \quad FB = \frac{MCB}{MCE}$$

$$FAB = \frac{MCAB}{MCE}$$

Fuente: Lara, A. Diseño estadístico de experimentos, análisis de la varianza y temas relacionados: tratamiento informático mediante SPSS. Proyecto sur de ediciones. [En línea]. <<http://wpd.ugr.es/~bioestad/wp-content/uploads/Factorial-dos-factores.pdf>> [Citado el 23 de junio de 2018].

Entonces:

Ecuación 7. Correlaciones para realizar el diseño factorial

$$F > F_{\alpha}, (v1), (v2)$$
$$FAB > F_{\alpha}, (a - 1)(b - 1), (ab)$$
$$FA > F_{\alpha}, (a - 1), (ab)$$
$$FB > F_{\alpha}, (b - 1), (ab)$$

Fuente: Lara, A. Diseño estadístico de experimentos, análisis de la varianza y temas relacionados: tratamiento informático mediante SPSS. Proyecto sur de ediciones. [En línea]. <<http://wpd.ugr.es/~bioestad/wp-content/uploads/Factorial-dos-factores.pdf>> [Citado el 23 de junio de 2018].

Con respecto a las ecuaciones 6 y 7, la nomenclatura es la siguiente: factor de corrección (C), suma total de cuadrados (SCT), suma de cuadrados para factor a (SCA), suma de cuadrados para factor b (SCB), suma de cuadrados para interacción del factor a y b (SCAB), suma de cuadrados por variabilidad del error experimental (SCE), media cuadrática de factor a (MCA), media cuadrática de factor b (MCB), media cuadrática de interacción factor a y b (MCAB), media cuadrática de error experimental (MCE), factores (a), los niveles del factor (b), error (α), repeticiones (r), F medias cuadráticas. En este caso se analiza FAB (Interacciones), FA (Factor A) y FB (Factor B). Por último, si las correlaciones de la ecuación 7, son mayor que (>), se debe rechazar la hipótesis nula.

2.2.4 Condiciones del pre-experimento de la etapa dos. Con base en lo obtenido en el pre-experimento etapa uno, se observó que la microalga *Scenedesmus dimorphus* es resistente a la salinidad en un valor de 0,4 M con las tres sales seleccionadas. A partir de esto, se realizó el pre-experimento etapa dos, teniendo como concentración mínima 0,5 M.

Por otro lado, a lo largo del pre-experimento etapa uno, surgió la incógnita de si la generación de carotenoides estaba asociada o no al crecimiento celular; por ende, se seleccionaron las sales KNO_3 al 0,4 M y NaCl al 0,4 M, para evaluar los dos comportamientos contrarios evidenciados en la curva de crecimiento del pre-experimento etapa uno. Lo anterior, se fundamenta en el artículo “Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal” realizado por Leonardo Garcia y Shirley Moncayo en el año 2016¹¹²; en el cual atribuyen la generación de carotenoides al crecimiento celular; sin embargo esta investigación se realizó con una especie de microalga diferente. Por consiguiente, fue válido evaluar el comportamiento de la sal que menor crecimiento celular reportó (NaCl al 0,4 M) y la de mayor (KNO_3 al 0,4 M).

A partir de esto, se subdividió el pre-experimento de la etapa dos. Por un lado, cuatro fotobiorreactores fueron para aplicar NaCl , los otros cuatro KNO_3 y un cultivo de referencia o blanco. Para ambas fases se puso en marcha los fotobiorreactores con 250 mL de medio de cultivo y 50 mL de microalga, los cuales cuentan con las mismas condiciones de luz, temperatura y agitación descritas anteriormente en las condiciones de pre-experimento (2.2.1). Además, se realizó de forma diaria el conteo celular en cámara de Neubauer, para evidenciar a través de la curva de crecimiento en que día se llegó a fase estacionaria.

Al entrar el cultivo microalgal en fase estacionaria, se agregó la salinidad, con el fin de inducir la carotenogénesis en la microalga; mientras que el resto de las condiciones de operación permanecieron iguales a las de generación de biomasa. Esta condición de estrés se adicionó a las concentraciones de 0,5, 0,6, 0,7 y 0,8 M, con base a que 0,4 M fue soportado por la especie; las respectivas concentraciones fueron preparadas como se mostró en la etapa uno, con las dos sales seleccionadas. Cabe resaltar que el fotobiorreactor número 7 fue el de menor volumen al llegar el día 10 razón por la cual se le aplicó 0,5 M con la finalidad de que soportara la concentración de sal, ya que si no tenía un buen volumen podría presentarse la muerte del cultivo en poco tiempo.

Con base en lo anterior, al usar las ecuaciones 4 y 5, se calculó la cantidad en gramos de sal, según el volumen de cada fotobiorreactor, siendo:

¹¹² GARCIA, L. MONCAYO, S y PASTUZO, M. Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal.

Tabla 2. Peso de NaCl según el volumen del fotobiorreactor en el pre-experimento de la etapa dos

[Sal] (M)	Volumen solución total (L)	Moles soluto (mol)	Peso molecular (g/mol)	Peso agregado (g)
0,5	0,08	0,04	58,44	2,34
0,6	0,12	0,072	58,44	4,21
0,7	0,13	0,091	58,44	5,32
0,8	0,13	0,104	58,44	6,07

Fuente: elaboración propia

Tabla 3. Peso de KNO₃ según el volumen del fotobiorreactor en el pre-experimento de la etapa dos

[Sal] (M)	Volumen solución total (L)	Moles soluto (mol)	Peso molecular (g/mol)	Peso agregado (g)
0,5	0,13	0,065	101,1032	6,57
0,6	0,16	0,096	101,1032	9,71
0,7	0,13	0,091	101,1032	9,2
0,8	0,16	0,128	101,1032	12,94

Fuente: elaboración propia

En este pre-experimento etapa dos, se agregó la sal al medio de cultivo de forma directa, con la finalidad de evitar la dilución del medio al agregarlo en la solución salina de 50 mL, ya que alteraba el verdadero comportamiento de la curva de crecimiento.

En lo concerniente a la cuantificación de los carotenoides se llevó a cabo el protocolo planteado en la sección 2.2.5, en el laboratorio de investigación de la Fundación Universidad de América.

2.2.4.1 Análisis estadístico diseño factorial pre-experimento etapa dos.

Con el fin de analizar si existe una favorabilidad o no en la generación de carotenoides al aplicar diferentes concentraciones de sal, con respecto a las dos sales seleccionadas (NaCl y KNO₃), se realizó un análisis por diseño factorial, formulando las siguientes hipótesis H₀: La concentración de sal no genera un cambio significativo en la concentración de carotenoides totales y en H₁: La concentración de sal genera un cambio significativo en la concentración de carotenoides totales, para realizar este análisis se usó la ecuación 6 y 7.

2.2.5 Preparación de las muestras para técnica espectrofotométrica.

La preparación de las muestras se llevó a cabo siguiendo el protocolo para la extracción de pigmentos liposolubles, usando la técnica de espectrofotometría UV-VIS, el cual es:

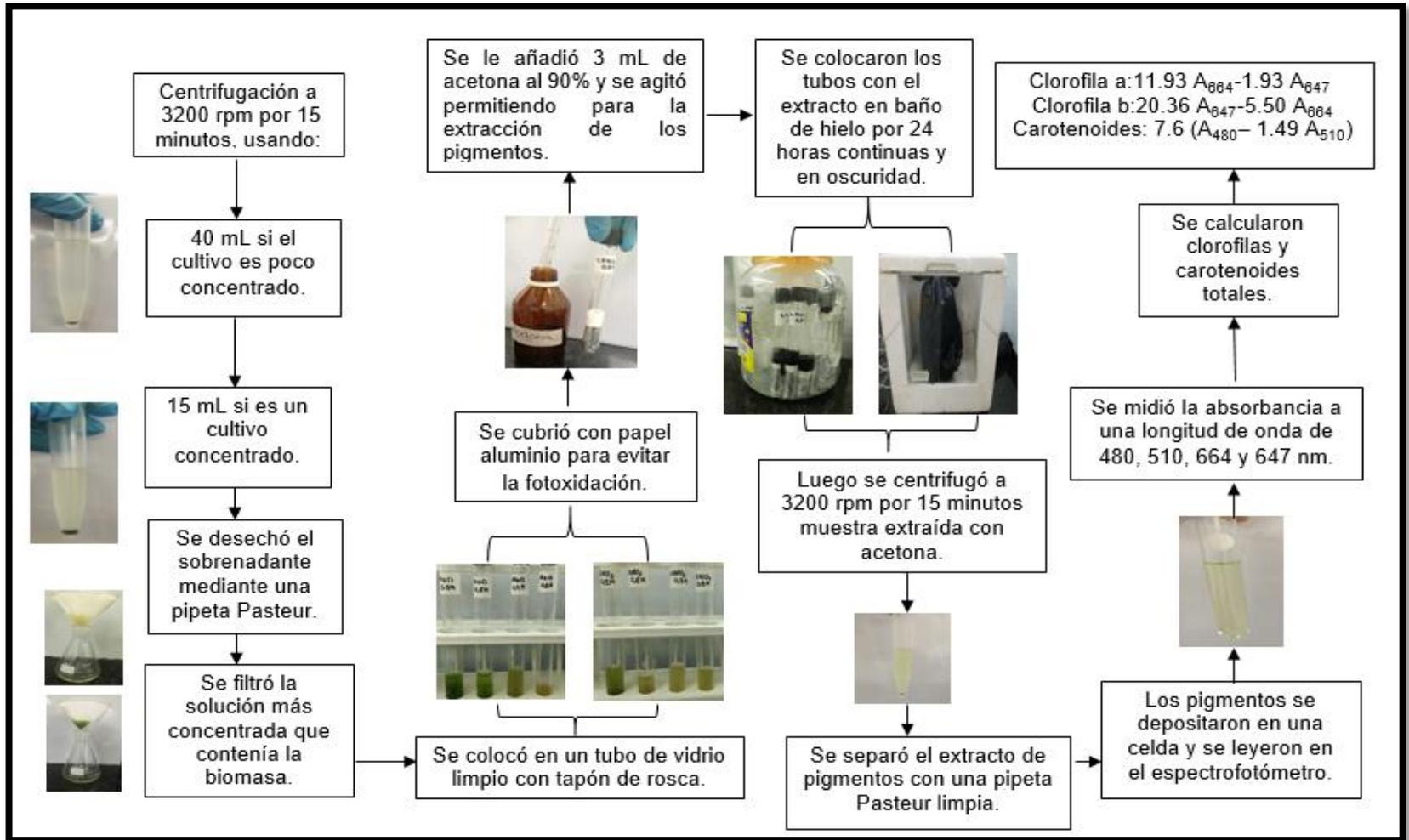
2.2.5.1 Protocolo para la extracción de pigmentos liposolubles. Los carotenoides tienen la característica de ser insolubles en agua y solubles en disolventes no polares, donde su grado de solubilidad depende de los grupos funcionales que constituyen la molécula. A partir de esto, según la bibliografía consultada, los carotenoides son solubles en éter de petróleo, hexano, metanol, acetona, entre otros; según lo reportado en el artículo titulado “Estandarización de un protocolo para extraer y analizar la clorofila a y los carotenoides en *Gracilaria tenuistipitata*¹¹³”, al evaluar distintos disolventes para la extracción, se concluyó que la acetona fue eficiente en la extracción de carotenoides en comparación con la dimetilformida y éter etílico.

Con base a lo anterior, se puede evidenciar que la propiedad de solubilidad es vital para la extracción y purificación del producto de interés. Para la extracción de pigmentos liposolubles se siguió el protocolo creado por los investigadores Strickland y Parsons, 1972; Jeffrey y Humphrey, 1975¹¹⁴:

¹¹³ TORRES, Priscila Bezerra et al. Estandarización de un protocolo para extraer y analizar la clorofila a y los carotenoides en *Gracilaria tenuistipitata*.

¹¹⁴ ARREDONDO, B. Determinación de pigmentos por espectrofotometría.

Figura 8. Protocolo de extracción de pigmentos liposolubles



Fuente: elaboración propia

2.2.5.2 Ecuaciones para cuantificar carotenoides totales. Generalmente para la extracción de pigmentos liposolubles como los carotenoides se utiliza como solvente acetona al 90 %, por ende, para calcular la concentración de las clorofilas se usaron las ecuaciones indicadas por Jeffrey y Humphrey (1975), y para los carotenoides totales se usan las de Strickland y Parsons (1972), que a continuación se presentan.

Ecuación 8. Ecuaciones para calcular la concentración de las clorofilas propuestas por Jeffrey y Humphrey (1975) en algas verdes

$$\text{Clorifila } a (C_a): 11,93 A_{664} - 1,93 A_{647}$$

$$\text{Clorifila } b (C_b): 20,36 A_{647} - 5,50 A_{664}$$

Fuente: Arredondo, B., Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la Biomasa Microalgal. Capítulo 7: Determinación de pigmentos por espectrofotometría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Ecuación 9. Ecuaciones para calcular la concentración de carotenoides totales propuestas por Strickland y Parsons (1972) en microalgas clorofíceas y cianobacterias

$$\text{Carotenos} : 7,6 (A_{480} - 1,49 A_{510})$$

Fuente: Arredondo, B., Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la Biomasa Microalgal. Capítulo 7: Determinación de pigmentos por espectrofotometría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

En donde A es absorbancia de la muestra. Por último, los resultados obtenidos en las ecuaciones 8 y 9, se multiplicaron por el volumen del extracto y se dividieron por el volumen de muestra para obtener la concentración en $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.

2.3 TERCERA FASE

En esta fase se llevó a cabo el experimento con base en el factor seleccionado en la primera sección (salinidad) y la concentración que favorece la generación de carotenoides escogida en la parte pre-experimental (KNO_3 a 0,6M). Además, de manera análoga al pre-experimento se implementó luz LED roja en la fase de adaptación a la exponencial; y luz LED azul en la fase estacionaria. Por consiguiente, se realizó en un fotobiorreactor la siembra de la microalga *Scenedesmus dimorphus*, la aplicación del factor al llegar a la fase estacionaria y el posterior análisis según los resultados de la técnica espectrofotométrica y cromatográfica.

2.3.1 Sistema y modo de operación fotobiorreactor adaptado en el experimento. En el fotobiorreactor adaptado (Figura 3), se presenció un sistema de operación cerrado, este no tenía contacto con la atmósfera, conllevando a disminuir las posibilidades de contaminación y de esta forma tener un medio de cultivo axénico. A diferencia de un sistema abierto en el cual se presentaba baja densidad celular originando baja productividad, contaminación, dificultad para recuperación de producto y menor control de las condiciones de cultivo como la temperatura¹¹⁵.

Se implementó un modo de operación por lotes en el fotobiorreactor de geometría cilíndrica de 4 L, para la generación de carotenoides al aplicar el factor de estrés seleccionado en la fase estacionaria del crecimiento celular. Para un adecuado control de las condiciones de cultivo se definieron los parámetros de operación a nivel de temperatura, agitación, luz y fotoperiodo, de forma análoga al pre-experimento.

2.3.2 Escalamiento y siembra a fotobiorreactor en el experimento. A partir las condiciones de cultivo seleccionadas, se procedió a poner en funcionamiento el fotobiorreactor (Anexo A). Posteriormente, se llevó a cabo el sembrado de la microalga *Scenedesmus dimorphus* en el medio de cultivo Foliagro, durante 20 días de conteo. Específicamente se fijó un volumen de trabajo total de 3535 mL, del cual 3 L son del medio de cultivo y 535 mL de microalga. Con base en lo anterior, se midió la concentración inicial celular el primer día de puesta en marcha del sistema, con la finalidad de observar la adaptación del cultivo a las condiciones con respecto al tiempo y de esta forma a partir de conteo celular con cámara de Neubauer cada 24 horas (análogo a la sección 2.2.2.). Se determinó el día en que se llegó a la fase estacionaria con respecto a la curva de crecimiento (día 12) esperando hasta el día 14, con la finalidad de observar y dar certeza de que realmente estaba en fase estacionaria, para así aplicar el factor estrés seleccionado (KNO_3 a 0,6 M) con respecto a la mejor concentración de carotenoides obtenida en el pre-experimento.

Por ende, al usar las ecuaciones 4 y 5, se calculó la cantidad en gramos de sal, según el volumen de cada fotobiorreactor, siendo de 2290 mL en el día 14, obteniendo así para una molaridad de 0,6 M con la sal de KNO_3 la adición de 138,92 gramos al medio de cultivo. Por último, se esperaron 6 días de conteo después de aplicada la concentración de sal, para observar si se presentaba o no viraje de color, siendo indicativo de presencia de carotenoides y posteriormente rectificado con la técnica espectrofotométrica.

¹¹⁵Ibid., p. 450-451.

2.3.3 Secado de la biomasa y la productividad volumétrica del cultivo control del experimento. Para realizar el secado de la biomasa, primero se concentró el cultivo retirando la mayor cantidad de medio de cultivo posible, para esto se llevaron a una centrifuga (Baby I 206) los 12 tubos de 14 mL de biomasa cada uno, a 3200 rpm por 5 minutos. Se recolectó el sobrenadante y se separaron los 648 mL de pastilla microalgal en 4 moldes desechables de aluminio, los cuales contenían 162 mL de biomasa cada uno (Figura 9).

Posteriormente, los moldes se dejaron en la estufa Nabertherm (TR 120) por 18 horas a 60°C, horas, con el fin de no degradar los compuestos de la muestra, pero retirar la mayor cantidad de humedad posible; para finalmente calcular el peso seco y la productividad con base en las ecuaciones 10 y 11 respectivamente.

Figura 9. Molde de aluminio



Fuente: Chaparro, G. (2017). Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de Laboratorio. Fundación Universidad de América.

La productividad se calculó después de que el cultivo alcanzara la fase estacionaria, es decir que la concentración celular y el volumen del cultivo permanezcan constantes. Esta es determinada como el cociente de biomasa seca obtenida del cultivo, sobre el número de días del cultivo, por el volumen total del mismo. A continuación, se muestran las fórmulas correspondientes:

Ecuación 10. Peso seco de biomasa

$$\text{Peso seco de biomasa (g)} = \frac{\text{Peso seco del filtro con muestra} - \text{Peso seco del filtro sin muestra}}{\text{Volumen de muestra filtrado}}$$

Fuente: Arredondo, B., Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la Biomasa Microalgal. Capítulo 3: Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Ecuación 11. Productividad de biomasa

$$\text{Productividad [g/L * Día]} = \frac{\text{Peso seco de Biomasa}}{\text{Volumen de cultivo * \# de Días}}$$

Fuente: Chaparro, G. (2017). Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de Laboratorio. Fundación Universidad de América.

2.3.4 Espectrofotometría UV-VIS en el experimento. El análisis espectrofotométrico se llevó a cabo según el protocolo planteado en la sección 2.2.5, en el laboratorio de la Fundación Universidad de América, donde para la muestra del cultivo con KNO_3 a 0,6 M y el blanco, se tomaron 40 mL para el análisis con base en los parámetros de la técnica de cuantificación.

2.3.5 Liofilización de la muestra de biomasa en el experimento. La biomasa microalgal obtenida en el cultivo con la condición de estrés pasó por un proceso de liofilización con la finalidad de remover completamente contenido de agua. Específicamente esta técnica consistía en aplicar vacío y bajas temperaturas, siendo un método que no alteró la composición de la muestra a nivel de cantidad de compuestos o características cualitativas. Este procedimiento se realizó en el Departamento de posgrados de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, específicamente en el “Laboratorio de nutrición animal”.

El procedimiento realizado en dicho laboratorio consistió en tomar una caja de aluminio marcada con el código de ingreso asignado a la muestra, para así proceder a pesarla (P_1) en la balanza previamente tarada. Luego se depositaron entre 100 y 200 gramos de muestra dentro de la caja y se pesó (P_m). Posteriormente, se colocó la muestra dentro del congelador, hasta haber logrado un congelamiento total, durante 24 a 48 horas. Seguidamente se colocó la muestra en el liofilizador durante 24 horas a -47 hasta -50°C; pasado ese tiempo, se apagó el equipo, se despresurizo y se aseguró de que no quedaran remanentes de muestra con hielo. Por último, se pesó la caja con la muestra (P_2) y se determinó el porcentaje de materia seca usando la siguiente formula:

Ecuación 12. Porcentaje de materia seca de la muestra liofilizada

$$\%MS = \frac{P_2 - P_1}{P_m} * 100\%$$

Fuente: Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

Siendo P_1 el peso de la caja de aluminio, P_2 el peso de la caja más el material seco y P_m el peso de la muestra.

Finalmente, para la determinación de la humedad de la muestra, se aplicó la siguiente formula:

Ecuación 13. Porcentaje de humedad de la muestra microalgal

$$\% Humedad = 100 - \%MS$$

Fuente: Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

2.3.6 Cuantificación de lípidos por cromatografía en el experimento. Para la realización de la técnica cromatográfica la muestra liofilizada fue entregada al “Laboratorio de toxicología” de la Universidad Nacional; donde finalmente se determinó la cantidad de lípidos presentes y se planteó la correspondiente proporción carotenoides-lípidos. Con respecto, al protocolo utilizado para la extracción y cromatografía de lípidos, se usó el planteado en el artículo titulado “Peces dulceacuícolas como alimento funcional: perfil de ácidos grasos en Tilapia y Bocachico criados en policultivo” realizado por Restrepo, Díaz y Pardo¹¹⁶, el cual se estandarizó como técnica en la aplicación del servicio de cromatografía de lípidos brindado en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad Nacional. Este protocolo radicó en realizar la extracción de lípidos a través del método de Folch, que de forma general consistió en pesar la muestra liofilizada a la cual se le agregó una solución cloroformo: metanol (2:1 v/v) para la extracción de los lípidos, luego la mezcla se agitó a 700 rpm durante 30 minutos y posteriormente se filtró, para así recolectar la muestra extraída. A dicha muestra, se le adicionó agua grado HPLC y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, con la finalidad de permitir la separación de las fases. Por ende, al obtener las dos fases, siendo la del fondo del tubo de la centrifuga el extracto de lípidos, se procedió a retirar la fase superior y se tomó 1 mL de la fase que contenía los lípidos, para ser transferida a un tubo de ensayo de previamente seco con corriente de nitrógeno. Posteriormente, a la muestra se le adicionó diclorometano y se llevó a agitación en vortex durante 30 segundos y luego de homogenizar el contenido en vortex se inyectó 1 µL en el cromatógrafo de gases Shimadzu GC20A, donde la composición cuantitativa de lípidos se expresó como porcentaje en masa.

2.4 CUARTA FASE

Para la determinación de un costo estimativo del proceso a nivel laboratorio, se tuvieron en cuenta los costos comunes asociados a los materiales, materias y equipos, calculados por medio de las siguientes ecuaciones:

Ecuación 14. Costos comunes de materiales, materias y equipos

$$\text{Costo del elemento} = \text{Costo unitario} * \text{Cantidad utilizada}$$

$$\text{Total de los Costos comunes} = \sum \text{Costo del elemento}$$

Fuente: Murcia, L., Parra, M. (2017). Producción de proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* enriqueciendo el medio de cultivo con fuentes de nitrógeno. Universidad de América.

Igualmente, se calcularon los costos operativos o de servicios para los 29 días utilizados en los 3 medios o cultivos (Stock, Blanco y Salino) a lo largo de experimento final, realizado por medio de las siguientes ecuaciones:

¹¹⁶ DÍAZ, G. RESTREPO, T. y PARDO, S. Peces dulceacuícolas como alimento funcional: perfil de ácidos grasos en Tilapia y Bocachico criados en policultivo.

Ecuación 15. Costos de operación o servicios de electricidad y agua

$$\text{Consumo de energía} = \text{Consumo en KW} * \text{Horas de consumo} * \text{Costo} \left(\frac{\$}{\text{KWh}} \right)$$

$$\text{Consumo de agua} = \text{Costo} \left(\frac{\$}{\text{m}^3} \right) * \text{Consumo en m}^3$$

$$\begin{aligned} \text{Total de los Costos de operacion o servicios} \\ = \text{Consumo de energía} + \text{Consumo de agua} \end{aligned}$$

Fuente: Murcia, L., Parra, M. (2017). Producción de proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* enriqueciendo el medio de cultivo con fuentes de nitrógeno. Universidad de América.

Finalmente se agregó al costo total los servicios de procedimientos o análisis realizados con una entidad externa a la universidad, entre estos se encontraban la liofilización y el análisis cromatográfico de lípidos, realizados en la Universidad Nacional.

Con base en lo anterior, se estableció el costo de producción de la biomasa y el peso de carotenoides; con respecto a los resultados del análisis de la cuantificación y la productividad volumétrica de biomasa.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados y su correspondiente análisis, de cada una de las fases que constituyen el proyecto.

3.1 PRIMERA FASE

Con base en lo encontrado en varios artículos y/o tesis de los últimos 10 años, se elaboró la matriz de selección para el factor de estrés. Se tuvieron en cuenta estrategias nutricionales (como la limitación de compuestos presentes en el medio del cultivo e indispensables para el crecimiento celular) y físicas (como la temperatura de cultivo, agitación, salinidad, luz, entre otras), con la finalidad de determinar un factor que favoreciera la generación del producto de interés.

Los factores considerados para determinar las condiciones experimentales y la evaluación de cada factor se presentan en las Tablas 4 y 5. A partir del puntaje obtenido en la Tabla 5, se seleccionó como factor de estrés la Salinidad, por ende, se planteó una segunda matriz de selección con la finalidad de escoger el tipo de sal, obteniendo así la Tabla 6, con respecto a esta se realizó la correspondiente calificación de cada parámetro (Tabla 7), donde los tipos de sal de mayor puntaje fueron cloruro de sodio, nitrato de potasio y bicarbonato de sodio (NaCl , KNO_3 y NaHCO_3), los cuales fueron implementados en el pre-experimento etapa uno en diferentes concentraciones para inducir la generación del metabolito de interés (carotenoides).

Tabla 4. Parámetros para evaluar matriz de selección del factor de estrés

Factor	Viabilidad de aplicación	Tiempo	Costos	Semejanza con la especie	Productividad	Escala	Ref.
Luz	La iluminación usada fue tipo LED (75% roja y 25% azul) y para medir la intensidad de luz suministrada se utilizó un sensor cuántico.	5 días	Se usó sensor cuántico QUANTUM, Modelo LI-1400. Aproximadamente tiene un costo de \$360.000 COP ¹¹⁷ .	<i>Dunaliella salina</i> perteneciente a las algas verdes al igual que la <i>Scenedesmus</i> .	Los carotenoides obtenidos son: luteína (7,9 mg/g DCW) y betacaroteno (9,5 mg/g DCW)	Lab.	(Fu et al.,2013) (Wichuk et al.,2014)
Limitación nitrógeno	Se usó para la limitación de nitrógeno el medio f/2 de Guillard y Ryther a 1 litro de agua de mar filtrada. A nivel de medición de luz, se usó un fotómetro.	7- 10 días.	Se usó medidor de luz de la marca Extech Instruments. Tiene un valor de \$680.000 COP ¹¹⁸ . El medio f/2 de Guillard y Ryther, \$190.000 COP ¹¹⁹ .	<i>Dunaliella tertiolecta</i> es clase <i>Chlorophyceae</i> , al igual que <i>Scenedesmus dimorphus</i> .	Se obtuvo 0,03 mg/L de zeaxantina, 9,19 mg/L de luteína y 5,40 mg/L de β -caroteno.	Lab.	(López et al, 2013)

¹¹⁷AMAZON. Hydrofarm LGBQM Quantum PAR Meter Micromol Sensor. [En línea].

¹¹⁸MERCADO LIBRE. Extech Instruments Medidor De Luz. [En línea].

¹¹⁹MARINEBIOTECHNOLOGY. Medios de agua de mar. [En línea].

Tabla 4. (Continuación)

Factor	Viabilidad de aplicación	Tiempo	Costos	Semejanza con la especie	Productividad	Escala	Ref.
Limitación fosfato y azufre	Se usó un medio f/2 modificado; en cuanto a condiciones se tuvo una temperatura de 25°C, se burbujeó con aire que contenía 5% (v/v) de CO ₂ e iluminó continuamente con lámparas fluorescentes.	5 días.	El medio f/2 de Guillard y Ryther, tiene un costo de \$190.000 COP ¹²⁰ .	<i>Nannochloropsis</i> , no pertenece al grupo de algas verdes, el cual pertenece <i>Scenedesmus dimorphus</i> .	Los carotenoides totales obtenidos son 20 ng x 10 ⁻⁶ células.	Lab.	(Casal et al,2014)
pH	Los cultivos se incubaron a 25 ° C en una habitación controlada térmicamente, con un período de luz de 12:12 horas oscuro y luz.	5 semanas.	Se usó medio de agua de mar artificial, tiene un costo base de \$190.000 COP ¹²¹ .	<i>Dunaliella salina</i> perteneciente a las algas verdes al igual que la <i>Scenedesmus</i> .	Para un pH de 9 se produjo 5,206 µg/mL de carotenoides.	Lab.	(Dhaka y Pal, 2017)
Salinidad	Se utilizó diferentes concentraciones de salinidad (NaCl); se controló la temperatura y el pH.	23 días.	Se presentan costos menores, ya que su costo es \$20.000 COP ¹²² un kilogramo.	<i>Dunaliella salina</i> perteneciente a las algas verdes al igual que la <i>Scenedesmus</i> .	A una concentración salina de 300 UPS, la productividad de carotenoides fue de 6,1 mg/L.	Lab.	(López, 2008)

Fuente: elaboración propia. * (Lab: Laboratorio y Ref.: Referencia)

¹²⁰MARINEBIOTECHNOLOGY. Medios de agua de mar. [En línea].

¹²¹Ibid., [En línea]

¹²²MERCK. Cloruro de sodio. [En línea].

Tabla 5. Calificación parámetros para la matriz de selección del factor de estrés

Factor	Viabilidad de aplicación	Tiempo	Costos	Semejanza con la especie	Productividad	Escala	Total
Luz	1	5	0	3	5	5	19
Limitación nitrógeno	1	4	0	3	5	5	18
Limitación fosfato y azufre	3	5	2	1	1	5	17
pH	3	1	2	3	1	5	15
Salinidad	5	3	5	3	5	5	26

Fuente: elaboración propia

Tabla 6. Parámetros para evaluar matriz de selección del tipo de sal

Sal	Volumen experimento	Tiempo	Costo	Semejanza con la especie	Productividad	Escala	Referencia
Medio de agua de sales	Se usaron matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo.	7 días.	El medio de cultivo tiene un precio base de \$190.000 COP ¹²³ .	<i>Haloferax sp.</i> es una bacteria gram-negativa, no una microalga.	Se produjo 44,98 mg/L de carotenoides.	Lab.	(Arias,2014)
NaNO ₃ y NaCl	Se utilizaron botellas con capacidad para 500 mL, cada botella con 350 mL de agua destilada.	15 días.	El costo de cloruro de sodio (NaCl) es aproximadamente \$20.000 COP ¹²⁴ un kilogramo y de nitrato de sodio de \$260.000 COP ¹²⁵ .	<i>Haematococcus sp</i> esta es perteneciente a las algas verdes al igual que la <i>Scenedesmus</i> .	Con el tratamiento con 0,034 M de NaCl y 100% de NaNO ₃ , se obtuvo astaxantina (27,5 mg/g), luteína (28,3 mg/g), cantaxantina (3,5 mg/g) y β-caroteno (18 mg/g)	Lab.	(Nava, 2017)

¹²³MARINEBIOTECHNOLOGY. Medios de agua de mar. [En línea].

¹²⁴MERCK. Cloruro de sodio. [En línea].

¹²⁵MERCADO LIBRE. Nitrato de sodio. [En línea].

Tabla 6. (Continuación)

Sal	Volumen experimento	Tiempo	Costo	Semejanza con la especie	Productividad	Escala	Referencia
NaCl	El volumen inicial fue de 250 mL y los pigmentos fueron estimados obteniendo por triplicado alícuotas de 5 mL, en el último día de la fase exponencial.	18 días.	El costo de cloruro de sodio (NaCl) es aproximadamente \$20.000 COP ¹²⁶ un kilogramo.	<i>Dunaliella viridis</i> es alga verde al igual que la <i>Scenedesmus</i> .	Con una concentración de 0,5 M se obtuvo 4,10 µg/mL carotenoides totales.	Lab.	(García et al,2016)
KNO ₃	El reactor PBR se puso en marcha con un volumen de 150 Litros.	14 días.	El costo del nitrato de potasio es aproximadamente \$150.000 COP ¹²⁷ un kilogramo.	Mismo género de microalga (<i>Scenedesmus sp.</i>).	Con una concentración de 10 mM se generó 3,4%DW total de carotenoides o (0,33 µg mL ⁻¹).	Piloto.	(Přibyl et al,2016)
NaHCO ₃	Se inocularon células de <i>Dunaliella</i> en matraces de 250 mL que contenían 220 mL de medio con 5 g/L de sal.	17 días.	El costo del bicarbonato de sodio es aproximadamente \$54.000 COP ¹²⁸ un kilogramo.	<i>Dunaliella salina</i> esta es perteneciente a las algas verdes al igual que la <i>Scenedesmus</i> .	Con una concentración de 5 g/L de NaHCO ₃ se obtuvo un total de carotenoides igual a 20 µg/mL.	Lab.	(Kim et al,2017)

Fuente: elaboración propia

¹²⁶MERCK. Cloruro de sodio. [En línea].

¹²⁷ALIBABA. Nitrato de potasio. [En línea].

¹²⁸FARMALISTO. Bicarbonato de sodio. [En línea].

Tabla 7. Calificación parámetros para la matriz de selección del factor de estrés

Sal	Volumen	Tiempo	Costo	Semejanza con la especie	Productividad	Escala	Total
Medio de agua de sales	5	5	2	0	4	5	22
NaNO ₃ y NaCl	5	4	3	3	4	5	24
NaCl	5	4	5	3	3	5	25
KNO ₃	3	5	4	5	5	3	25
NaHCO ₃	5	4	5	3	3	5	25

Fuente: elaboración propia

3.2 SEGUNDA FASE

Los resultados y el análisis de los dos pre-experimentos, realizados con el fin de conocer mejor el comportamiento de la microalga *Scenedesmus dimorphus* al factor de estrés seleccionado, se muestran a continuación.

3.2.1 Pre-experimento de la etapa uno. Para el desarrollo del pre-experimento en la etapa uno, se utilizaron siete fotobiorreactores, de los cuales uno correspondía al blanco y los otros seis a las sales (NaCl, KNO₃ y NaHCO₃) cada uno con dos concentraciones (0,01 M y 0,4 M), conforme a lo establecido en la metodología (sección 2.2.3). A partir de esto, a cada uno de los fotobiorreactores se les realizó un seguimiento diario de forma cualitativa (cambios de color o morfológicos) y cuantitativa (conteos celulares por cámara de Neubauer).

3.2.1.1 Cultivos en los fotobiorreactores adaptados en la etapa uno del pre-experimento. Siguiendo lo planteado en la metodología (2.2.3) se pusieron en marcha los cultivos en los fotobiorreactores adaptados de 375 mL, observando un proceso de adaptación por parte del cultivo mediante el conteo celular por cámara de Neubauer. Además, se evidenció una deficiente distribución de la luz irradiante, debido a la ubicación espacial de los fotobiorreactores con respecto a la luz LED; lo que ocasionó que cultivos como KNO₃ 0,01M, KNO₃ 0,4M, NaHCO₃ 0,01M, (antes de agregar la respectiva sal), crecieran de forma acelerada y agotaran de una forma rápida los 100 mL de medio de cultivo agregados inicialmente, razón por la cual como se explica también en la metodología, se tomó la decisión de agregar 50 mL adicionales de medio de cultivo al finalizar el conteo del día 7, esto provocó una dilución en los cultivos como se explica en el análisis de la curva de crecimiento del pre-experimento etapa uno (3.2.1.2).

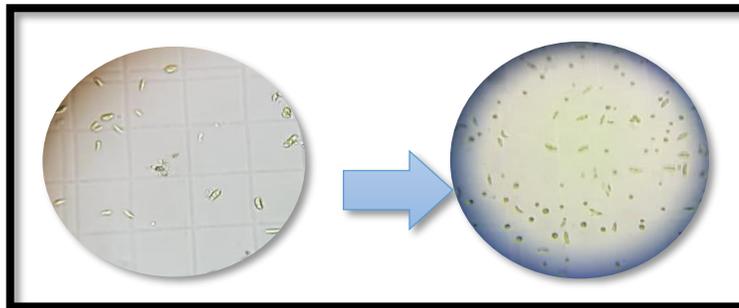
Al analizar el comportamiento de los cultivos durante los primeros 10 días se observó que debido a que estos aumentaban su concentración celular, la coloración de los cultivos macroscópicamente cambio de un color verde claro a verde oscuro, esto ocurrió con todos menos con el blanco el cual no tuvo una buena adaptación y no creció de la forma esperada, esto pudo ser debido a que el blanco no tuvo una buena incidencia de la luz, debido a su posición espacial con respecto a la luz LED y simplemente el inóculo de este no logro adaptarse al medio de cultivo, evidenciado a través de los conteos celulares realizados cada 24 horas por cámara de Neubauer; por ende el blanco fue repetido nuevamente en la segunda etapa del pre-experimento. Cabe resaltar que los fotobiorreactores adaptados usados presentan problemas en el control de variables, esto se debe a que por falta de presupuesto no se pudo implementar una mejor tecnología y sistemas de control.

Al finalizar el conteo celular del día 10 se agregaron las concentraciones correspondientes de sal, especificadas en la sección 2.2.3 de la metodología; por ende, durante los 3 días siguientes se analizó el comportamiento cuantitativamente, obteniendo los resultados descritos en la sección 3.2.1.2 de curva de crecimiento.

Por otro lado, se observaron los cambios cualitativos, consignados en el registro fotográfico en el Anexo D. Determinando que los cultivos donde se notó un viraje en la coloración fueron el KNO_3 0,4 M y NaCl 0,4 M; los cuales en el día 13 tuvieron una coloración amarillenta que podría indicar la presencia de carotenoides. No obstante, como el propósito de esta primera etapa era probar la tolerancia a la sal por parte de la microalga, en específico la resistencia de su pared celular frente a las dos concentraciones de las sales seleccionadas, no se realizó un análisis espectrofotométrico para comprobar o descartar la existencia de carotenoides en la microalga.

Al realizar los respectivos conteos en los tres últimos días del pre-experimento donde ya los cultivos estaban sometidos a un estrés salino y lumínico (LED azul), se pudo observar por medio de microscopio como las células cambiaban su apariencia delgada y alargada, por una morfología más ancha y casi circular, esto se evidenció en las concentraciones de KNO_3 y NaCl (0,4M). Dicho fenómeno se explica por medio de un experimento similar realizado por Acevedo y Ramírez (2003)¹²⁹, en el cual especifican que las altas concentraciones de nutrientes en el medio hacen que la microalga tienda a aumentar la esfericidad, como consecuencia de un aumento en la relación su superficie/volumen, lo que le permite a la célula una mayor captación de nutrientes y luz.

Figura 10. Cambio de la morfología de apariencia delgada y alargada a circular



Fuente: elaboración propia

3.2.1.2 Curva de crecimiento del pre-experimento de la etapa uno. Los cultivos evaluados en las diferentes salinidades durante 13 días, presentan la siguiente curva de crecimiento, la cual fue elaborada a través de la determinación de la concentración celular por medio de los conteos diarios con cámara de Neubauer, estos se encuentran de forma detallada en el Anexo E, para cada una de los fotobiorreactores y sus respectivas curvas de crecimiento.

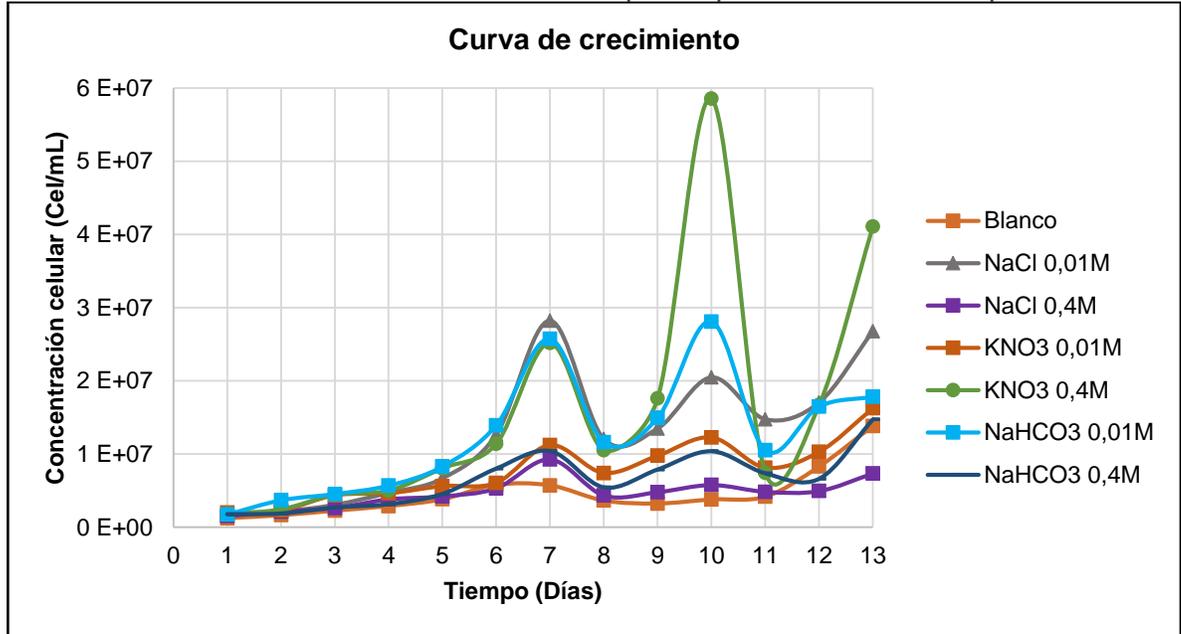
¹²⁹ACEVEDO, J. Y RAMÍREZ, J. Influencia de un gradiente cruzado de luz y temperatura en la morfología de *Scenedesmus acutus* meyen var. *Globosus* Hortobágyi y sus implicaciones taxonómicas.

Al observar la gráfica 1, se puede determinar que la fase de adaptación dura entre los días 1 al 5, siendo esta la fase en donde la microalga se adapta a las condiciones del medio de cultivo donde ha sido inoculado. En cuanto a la fase exponencial se presenta del día 5 al 7, en esta se presenta un aumento acelerado de la concentración celular a causa de que hay exceso de sustrato y no existe factor limitante, esto permite crecimiento constante porque se tienen las condiciones y energía adecuada para la generación de células. Sin embargo, en el día 7 se tomó la decisión de agregar 50 mL de medio de cultivo a causa de la reducción notable del volumen como se explicó anteriormente en la sección 2.2.3 de la metodología, razón por la cual se observa la caída del crecimiento del día 7 al 8, ya que se tuvo una dilución. Del día 8 al 10, se observa un crecimiento notorio (fase exponencial), porque las células necesitaban nutrientes y al tenerlos lo consumieron de forma acelerada, a causa de esto se volvió a presentar la situación de reducción de volumen, por ende se decidió agregar la salinidad en un solución de 50 mL (caída del crecimiento por dilución del medio, del día 10 al 11), a pesar de no haber llegado a fase estacionaria, pero como el objetivo de este pre-experimento era determinar la resistencia de la microalga a la salinidad, no afectaba esta decisión a los resultados.

Al analizar entre los días 11 al 13 se observó que todos los medios de cultivo siguieron creciendo, por ende, la microalga es resistente a todas las sales trabajadas en el rango de 0,01 a 0,4 M. Por ejemplo, KNO_3 a 0,4 M es el cultivo que se recuperó de forma óptima a pesar que bajó de forma considerable su crecimiento a causa de la solución salina agregada, pero en el día 13 tuvo una concentración celular de $4,11 \times 10^7$ cel/mL.

Por otro lado, al ver el comportamiento contrario se evidencia que NaCl a 0,4M fue el que tuvo menor crecimiento (en el día 13 la concentración celular fue de $7,35 \times 10^6$ cel/mL) y de forma estable, simulando una fase estacionaria, dando una mayor cercanía a las condiciones planteadas inicialmente en la metodología, ya que al ser los carotenoides metabolitos secundarios se generan en la fase estacionaria y son respuesta a una condición ambiental o nutricional.

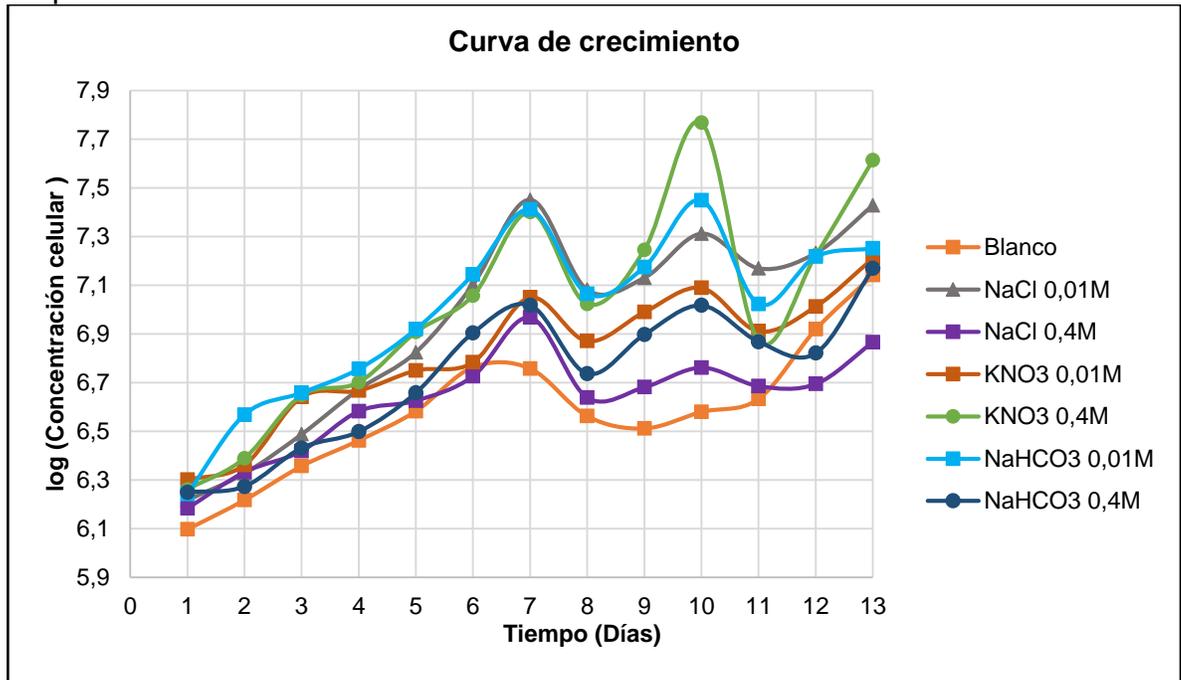
Gráfica 1. Curva de crecimiento celular del pre-experimento de la etapa uno



Fuente: elaboración propia

Para tener una mejor visualización del comportamiento, se grafica Log (Concentración celular) Vs Tiempo; obteniendo:

Gráfica 2. Curva linealizada del crecimiento celular del pre-experimento de la etapa uno



Fuente: elaboración propia

A causa de lo anterior, se puede especificar que la microalga es resistente a concentraciones mayores a 0,4 M, por ende, es adecuado realizar el pre-experimento etapa dos teniendo como concentración mínima 0,5 M. A pesar de, no se tiene total certeza si la generación de carotenoides está asociada o no al crecimiento celular, por ende, se seleccionaron las sales KNO₃ al 0,4 M y NaCl al 0,4 M, para evaluar los dos comportamientos contrarios. Es importante resaltar que esta selección tiene como fundamento teórico el artículo “Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal” realizado por Leonardo Garcia y Shirley Moncayo en el año 2016¹³⁰, en el cual concluyen que la producción de pigmentos se relacionó directamente con el crecimiento celular, siendo los tratamientos con mayor crecimiento los de 0,5 y 1 M de NaCl, los cuales registraron mayor producción de pigmentos por volumen de cultivo. No obstante, esto se presentó en una especie de microalga diferente, por eso es válido evaluar los dos comportamientos escogidos anteriormente.

Por último, para tener, una mejor visión del comportamiento de todas las sales en el último día de la curva de crecimiento, se obtiene la Tabla 8. En esta se logra observar que para todas las sales a la concentración de 0,01 M se presenta una magnitud de concentración celular del orden de 10⁷, por ende, esto es un indicativo de que esta concentración de sal sigue el crecimiento y no lo altera. Sin embargo, de igual forma ocurre a la concentración de 0,4 M, a excepción de NaCl que presenta un orden de 10⁶, siendo la que más alteró el crecimiento.

Tabla 8. Concentraciones celulares para las diferentes sales en el último día de cultivo en el pre-experimento de la etapa uno

Sal	Concentración (M)	Concentraciones celulares (Cel/mL)
NaCl	0,01	2,6775 x 10 ⁷
NaCl	0,4	7,3500 x 10 ⁶
KNO ₃	0,01	1,6250 x 10 ⁷
KNO ₃	0,4	4,1100 x 10 ⁷
NaHCO ₃	0,01	1,7825 x 10 ⁷
NaHCO ₃	0,4	1,4750 x 10 ⁷

Fuente: elaboración propia

¹³⁰ GARCIA, L. MONCAYO, S y PASTUZO, M. Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal.

3.2.1.3 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación para el pre-experimento de la etapa uno. Para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento se usó la ecuación 2 y para el tiempo de duplicación la ecuación 3 (sección 2.2.2.4) para así poder cuantificar el aumento del crecimiento celular en el tiempo. Por ende, a través de la Tabla 9, se obtienen las gráficas de la 3 a la 6.

Tabla 9. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación para la curva de crecimiento de la *Scenedesmus dimorphus* del pre-experimento de la etapa uno

Sal	Velocidad específica de crecimiento μ (1/Día)	Tiempo de duplicación (Día)
NaCl (0,01M)	0,17	4
NaCl (0,4 M)	0,07	10,02
KNO ₃ (0,01 M)	0,13	5,23
KNO ₃ (0,4 M)	0,20	3,41
NaHCO ₃ (0,01 M)	0,1	7,25
NaHCO ₃ (0,4 M)	0,15	4,71
Blanco	0,16	4,31

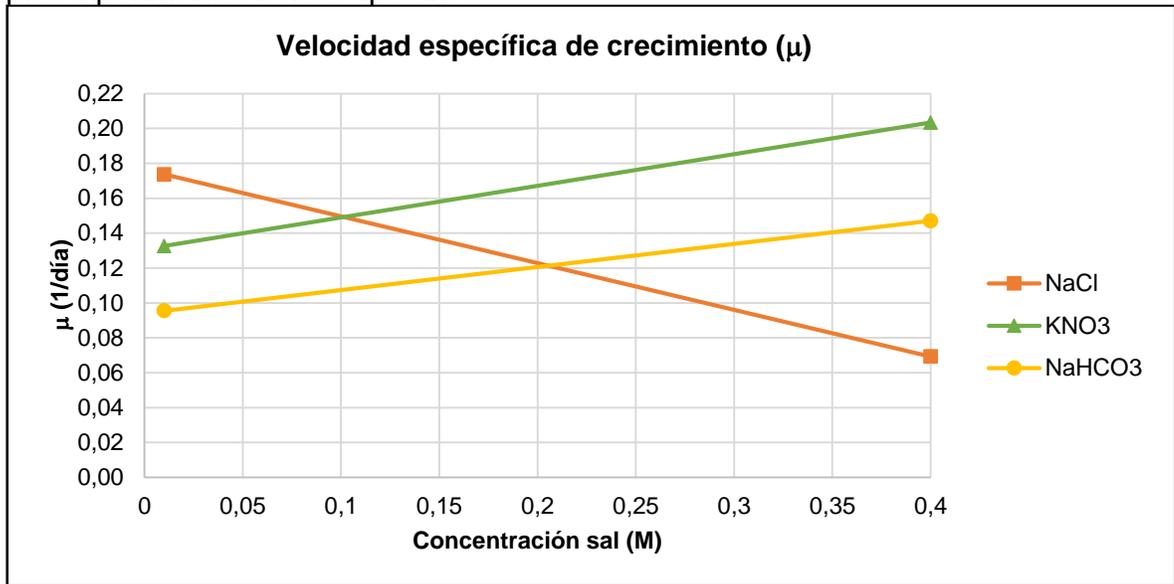
Fuente: elaboración propia

A partir de esto, al observar la gráfica 3, se muestra un comportamiento directamente proporcional entre la concentración de sal y la velocidad específica de crecimiento en las sales KNO₃ y NaHCO₃, ya que al presentar mayor concentración de sal (0,4 M) se incrementó la velocidad específica de crecimiento. En cambio, para el caso de NaCl a una concentración de 0,01 M se presentó el mayor crecimiento siendo inversamente proporcional a los comportamientos presentados por las otras sales, disminuyendo el crecimiento en NaCl a 0,4 M. De forma análoga, se puede observar en la gráfica 5, que el mayor tiempo de duplicación se presentó en NaCl a 0,4 M, corroborando así que fue lento el crecimiento. Este comportamiento se atribuye a que los fotobiorreactores adaptados no contaban con la misma incidencia de luz, a causa de la posición espacial de los mismos con la luz LED; por ende, esto repercute en el comportamiento de los cultivos a nivel de velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación.

Para analizar mejor los resultados, se observan las gráficas 4 y 6, evidenciando que el cultivo que presentó mayor velocidad específica de crecimiento fue KNO₃ (0,4 M) con 0,20 días⁻¹ y por ende presentó el menor tiempo de duplicación siendo 3,41 días. En cambio, el cultivo con NaCl (0,4 M) tuvo una velocidad específica de crecimiento de 0,17 días⁻¹ y un tiempo de duplicación de 10,02 días. Con base en lo anterior, a nivel de optimización de tiempos, los cuales repercuten de forma directa con los costos y la duración del proceso, lo ideal es obtener cultivos que presenten velocidades específicas de crecimiento altas y por ende tiempos de duplicación menores; sin embargo, surge la incógnita de si esto favorece o no la

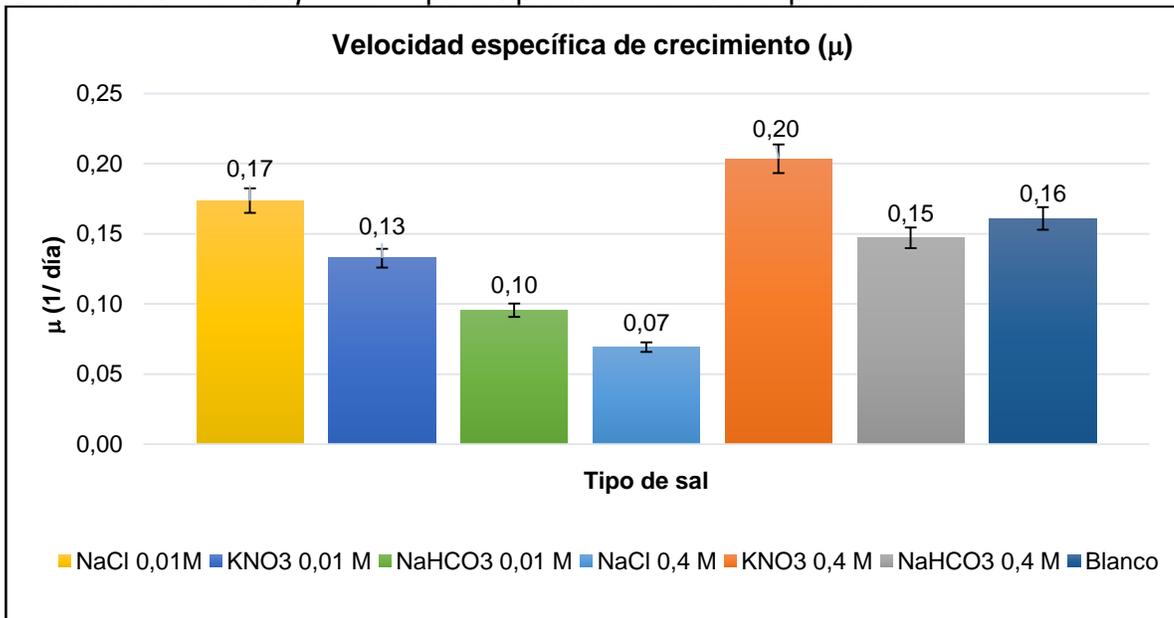
generación de carotenoides, es por esto que se corroboró que sal (KNO_3 o NaCl) genera una mayor obtención de carotenoides en el pre-experimento de la etapa dos.

Gráfica 3. Velocidad específica de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* del pre-experimento de la etapa uno



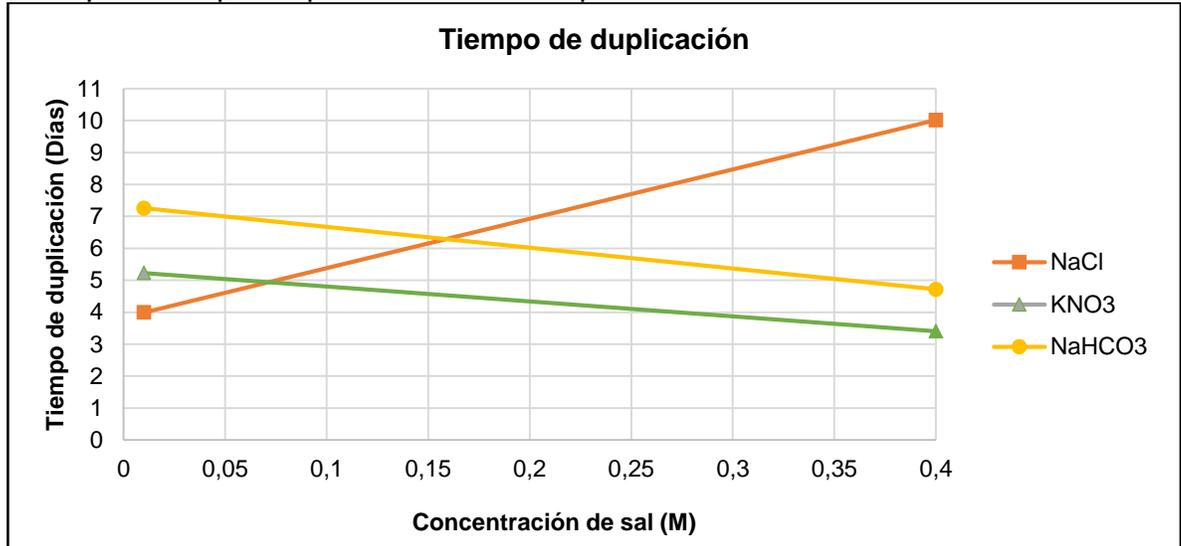
Fuente: elaboración propia

Gráfica 4. Diagrama de barras velocidad específica de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* del pre-experimento de la etapa uno



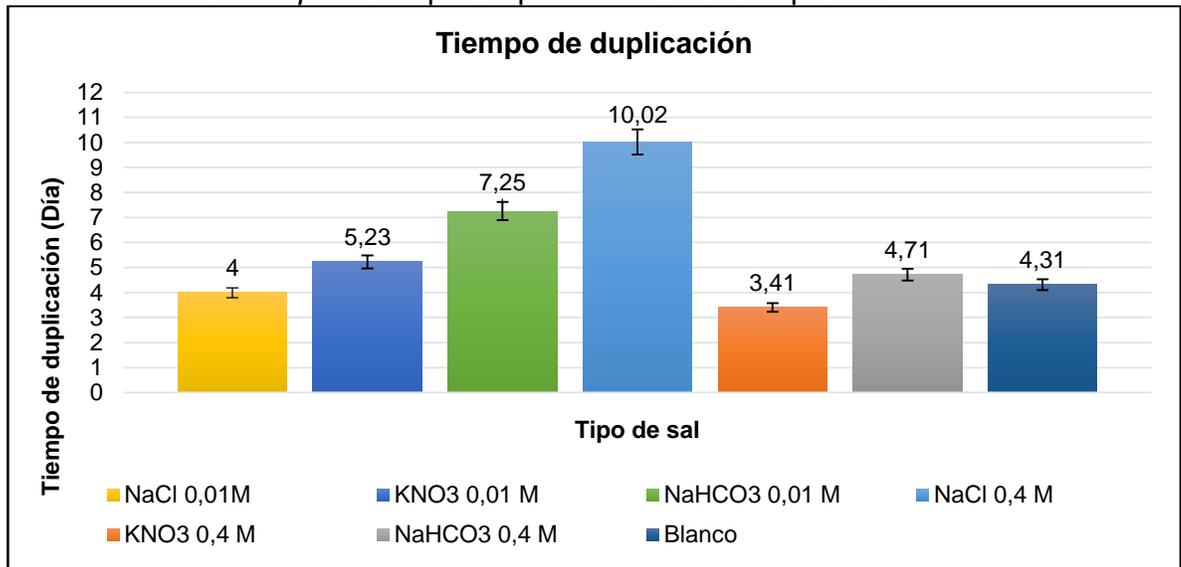
Fuente: elaboración propia

Gráfica 5. Tiempo de duplicación de la curva de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* del pre-experimento de la etapa uno



Fuente: elaboración propia

Gráfica 6. Diagrama de barras tiempo de duplicación curva de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* del pre-experimento de la etapa uno



Fuente: elaboración propia

3.2.1.4 Diseño factorial del pre-experimento de la etapa uno. Se realizó un análisis por diseño factorial, con el fin de saber si se presentaban diferencias significativas en el crecimiento celular al adicionar las respectivas concentraciones de KNO_3 , NaCl y NaHCO_3 , donde se planteó como variable independiente dos concentraciones de cada sal y como variable dependiente la diferencia entre concentración celular los tres días anteriores al estrés salino y los tres días posteriores de la aplicación del estrés. Al no haber repeticiones se planteó un diseño factorial con una única repetición, estableciendo como el factor A los tres tipos de sal ($a=3$) y como el factor B las concentraciones evaluadas de cada sal siendo 0,1M y 0,4M ($b=2$), siendo entonces un diseño factorial 3×2 .

Con base en las tablas del Anexo F, se elabora la Tabla 25, donde se muestran los datos de concentración celular que fueron evaluados, estos datos al ser restados darán la diferencia de concentración celular comparada entre día 10, siendo el último día sin salinidad y el día 13 con salinidad, referente al último día del pre-experimento etapa uno, la diferencia resultante son los datos que se evaluaron en el análisis de diseño factorial. Los resultados de la diferencia se muestran en la Tabla 26, con sus respectivas sumatorias, para la realización del análisis; igualmente se especifican los cuadrados de las diferencias con sus respectivas sumatorias, esto se encuentra consignado en la Tabla 27. Por último, se aplicaron las fórmulas del diseño factorial (ecuación 6), establecidas en la metodología, donde los resultados se muestran en la Tabla 28. Al analizar todos los resultados mediante el método se obtienen los siguientes resultados y conclusiones (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados y conclusiones finales del método de análisis por diseño factorial del pre-experimento de la etapa uno

Factores	Resultados del análisis	Mayor o menor que	F a α de 0,05 ¹³¹	v		Respuesta	Conclusión
				v1	v2		
FAB	1,8909	>	3,89	2	6	Falso	H ₀ =Verdadero
FA	0,4892	>	3,89	2	6	Falso	
FB	0,0262	>	4,75	1	6	Falso	

Fuente: elaboración propia

Teniendo en cuenta las hipótesis planteadas en la metodología sección 2.2.4.1 se descarta la hipótesis H_1 , de acuerdo con los resultados del diseño factorial y se acepta la hipótesis H_0 , la cual establece que la concentración celular final no se ve afectada por la concentración de sal, esto se ve corroborado con los análisis correspondientes a la sección 3.2.1.2 de curva de crecimiento, donde se muestra que sin importar la concentración de sal, las microalgas siguen creciendo de una forma normal, por ende, se podría pensar que incluso adoptan la sal como un

¹³¹W.H.BEYER. Handbook of tables for probability and statistics. The chemical Rubber Co, Cleveland. Tabla A.6.

sustrato con el fin de crecer y seguir reproduciéndose, pero de una forma menos acelerada que con el medio de cultivo tradicional compuesto por fertilizante Foliagro, esto podría deberse al metabolismo fotoautotrófico de las microalgas, el cual tiene como única fuente de carbono el CO_2 , razón por la cual la microalga pudo reducir metabólicamente el bicarbonato (NaHCO_3) mediante el ciclo de Calvin, para obtener así el CO_2 , igualmente el nitrógeno obtenido de la sal KNO_3 influye en gran medida en la composición de las proteínas y nucleótidos importantes para la generación de biomas, finalmente el cloruro y el sodio de la sal NaCl son importantes para mantener la presión osmótica y el equilibrio iónico¹³².

3.2.2 Pre-experimento de la etapa dos. Según lo planteado en la sección 2.2.4, los 9 fotobiorreactores contaban con un volumen de medio de cultivo de 250 mL y de microalga de 50 mL, este cambio de proporción de volumen se debió a que en el pre-experimento de la etapa uno, el volumen disminuyó de forma acelerada impidiendo tener un cultivo robusto para la adición de sal y limitando la observación detallada del comportamiento de la curva de crecimiento. Por ende, en el pre-experimento etapa dos, se puso en marcha 4 fotobiorreactores para agregar KNO_3 y otros 4 para adicionar NaCl , en concentraciones de 0,5, 0,6, 0,7 y 0,8 M. Con base en esto se realizó seguimiento diario de forma cualitativa y cuantitativa por 14 días.

3.2.2.1 Cultivos en los fotobiorreactores adaptados en la etapa dos del pre-experimento. Durante la primera semana se observó que la coloración de los cultivos era un verde claro y la disminución volumen fue de aproximadamente 30 mL, esto se debe a que el inóculo se estaba adaptando a las condiciones presentes a nivel de temperatura, luz y agitación. Posteriormente, en la segunda semana, se observó una coloración de un verde más oscuro, a causa de que el cultivo tiene las condiciones óptimas y al estar adaptado puede presentar una mayor generación de células, estando en la fase exponencial. Es importante resaltar que de forma general el volumen de los fotobiorreactores redujo en un rango de 65 a 35 mL, con respecto al volumen del día 10 en el cual se aplicó la concentración de la sal; por ende, los cultivos empezaron a presenciar cambios cualitativos notorios (Ver Figura 11), como:

- Con respecto a KNO_3 en la concentración de 0,5M se presentó el verde más oscuro a comparación de las otras molaridades y su volumen disminuyó notoriamente debido a acelerada multiplicación de la cepa; en cuanto al cultivo con 0,6M se observó un viraje de coloración a amarillo claro notorio desde el día 13, en cambio a una concentración de 0,7M en el día 15 el color fue un amarillo más oscuro y el viraje de coloración se presentó desde el día 12. Por último, a 0,8M en el día 15 se evidenció una coloración amarilla y el viraje se dio ese mismo día, pero en este caso la concentración celular fue la menor con respecto a las otras.

¹³²FERNANDEZ, J. Nutrientes y medios de cultivo de microalgas.

- En cuanto al comportamiento de los cultivos con NaCl, en concentraciones de 0,5 M y 0,6 M se presentó un color verde oscuro; sin embargo, no presentaron viraje y fueron los que redujeron más el volumen, debido a que las muestras estaban bastante concentradas y sus crecimientos fueron los mayores a nivel global de pre-experimento etapa dos. Con respecto a las concentraciones de 0,7M se presentó un viraje desde el día 14 y en el día 15 se observó como color final un amarillo oscuro; en cambio el cultivo con 0,8M el ultimo día presentó una coloración amarillenta casi transparente, evidenciando la muerte notoria del cultivo, a causa de que la concentración de sal era elevada generando una presión osmótica superior a la que la pared celular podía soportar.

A nivel de morfología (Figura 10), se presentó de forma análoga lo descrito en la sección 3.2.1.1 del pre-experimento etapa uno, en donde las células cambiaban su apariencia delgada y alargada, por una morfología más ancha y casi circular; sin embargo, en los cultivos con concentración de 0,8M, al realizar los conteos con cámara de Neubauer, se presencié una pérdida de color en las células, siendo a causa de que los cultivos estaban en fase de muerte. Esto da un estimativo de que el rango de resistencia a la salinidad para la especie *Scenedesmus dimorphus* está entre 0,01 M a 0,8 M, con base en las condiciones presentadas en el pre-experimento etapa dos.

Figura 11. Registro fotográfico del pre-experimento de la etapa dos

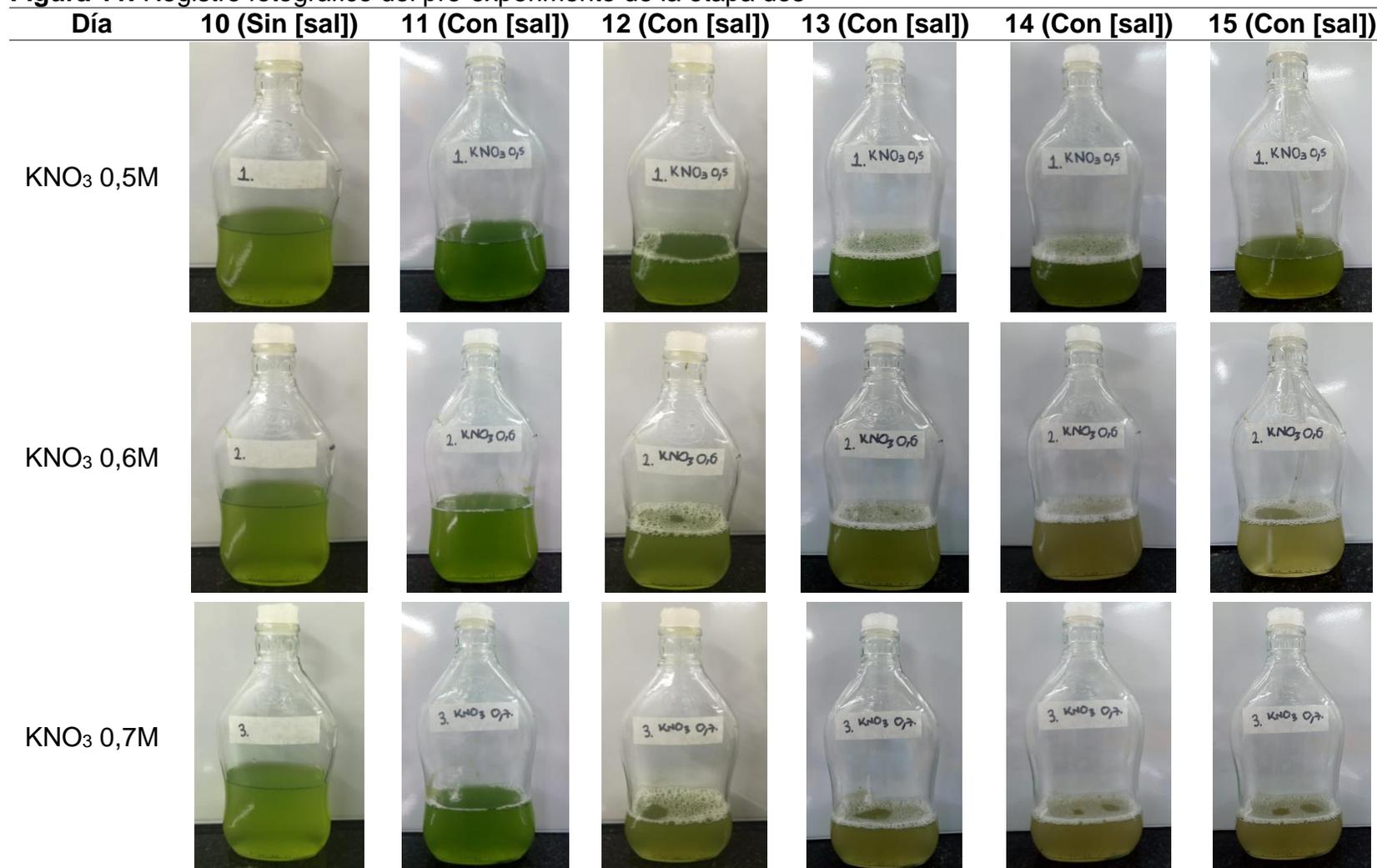


Figura 11. (Continuación)

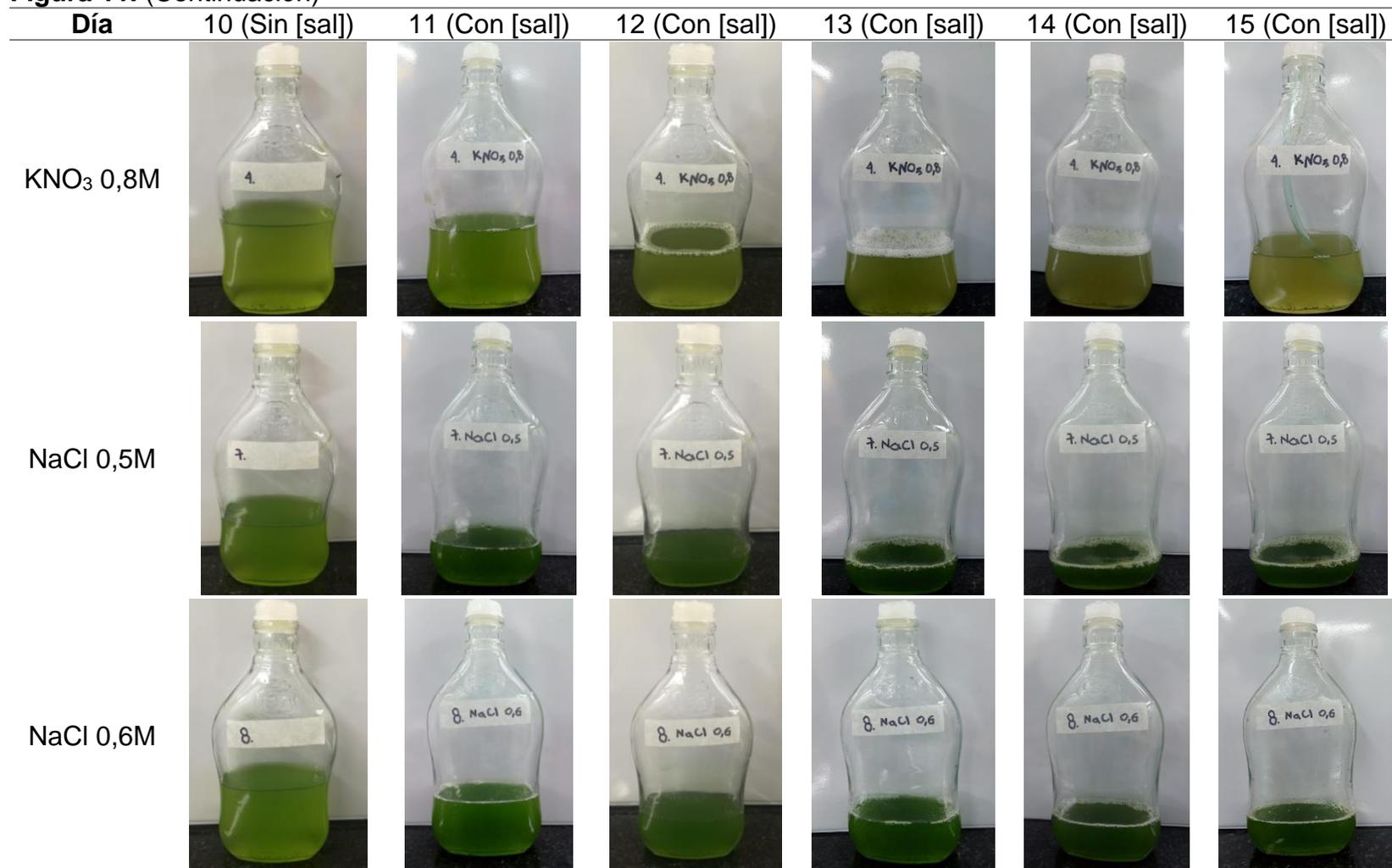
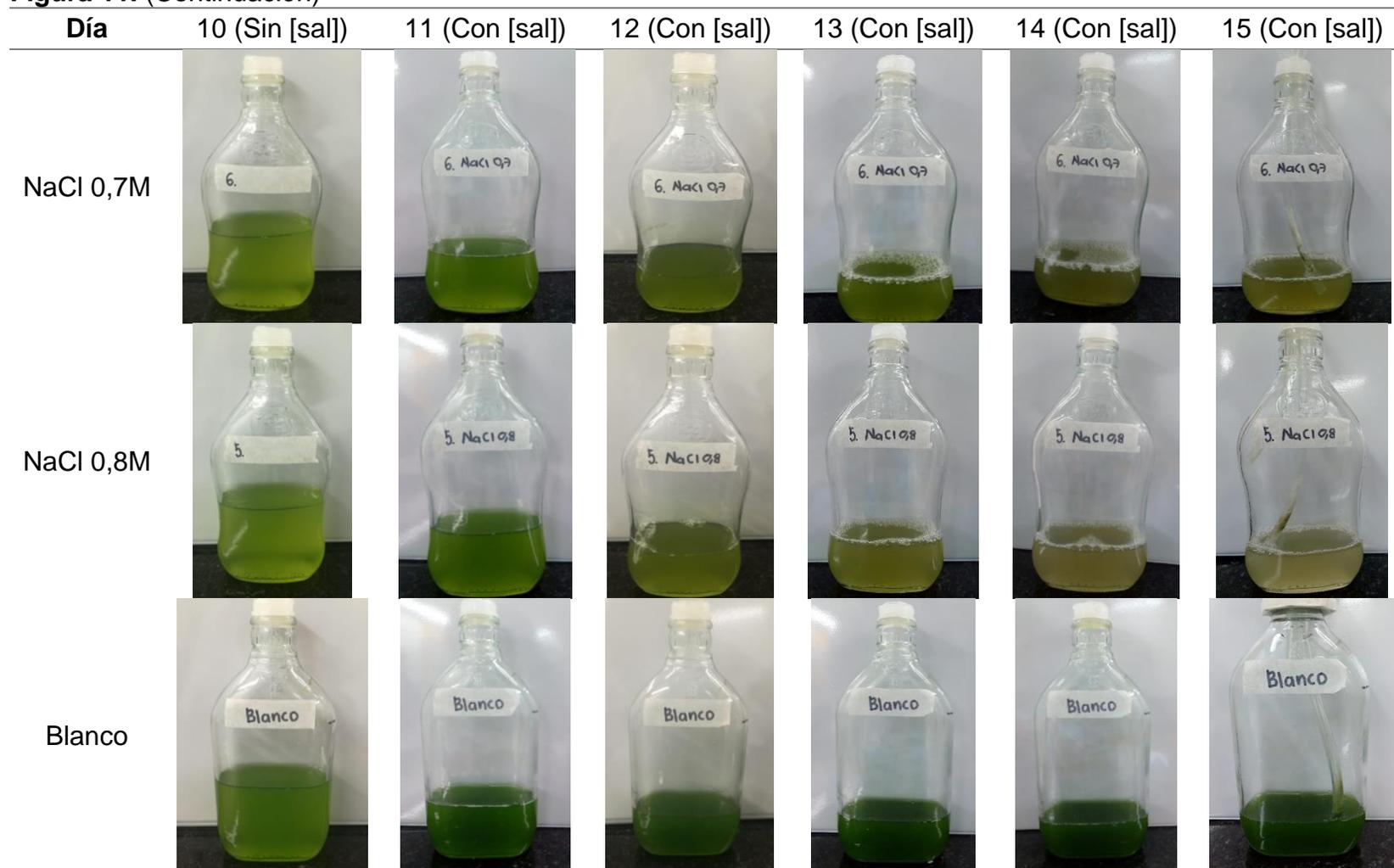


Figura 11. (Continuación)



Fuente: elaboración propia

3.2.2.2 Curva de crecimiento del pre-experimento de la etapa dos. Los nueve cultivos fueron evaluados durante 14 días, de los cuales 10 días se dejaron crecer bajo las mismas condiciones descritas en la sección 2.2.4, y al finalizar el conteo del día 10 se realizó la respectiva aplicación de las concentraciones de sal, el conjunto de todos los días de esta etapa de experimentación presenta la siguiente curva de crecimiento, la cual fue elaborada a través de la determinación de la concentración celular por medio de los conteos diarios con cámara de Neubauer, estos se encuentran de forma detallada en el Anexo G, para cada uno de los fotobiorreactores y sus respectivas curvas de crecimiento.

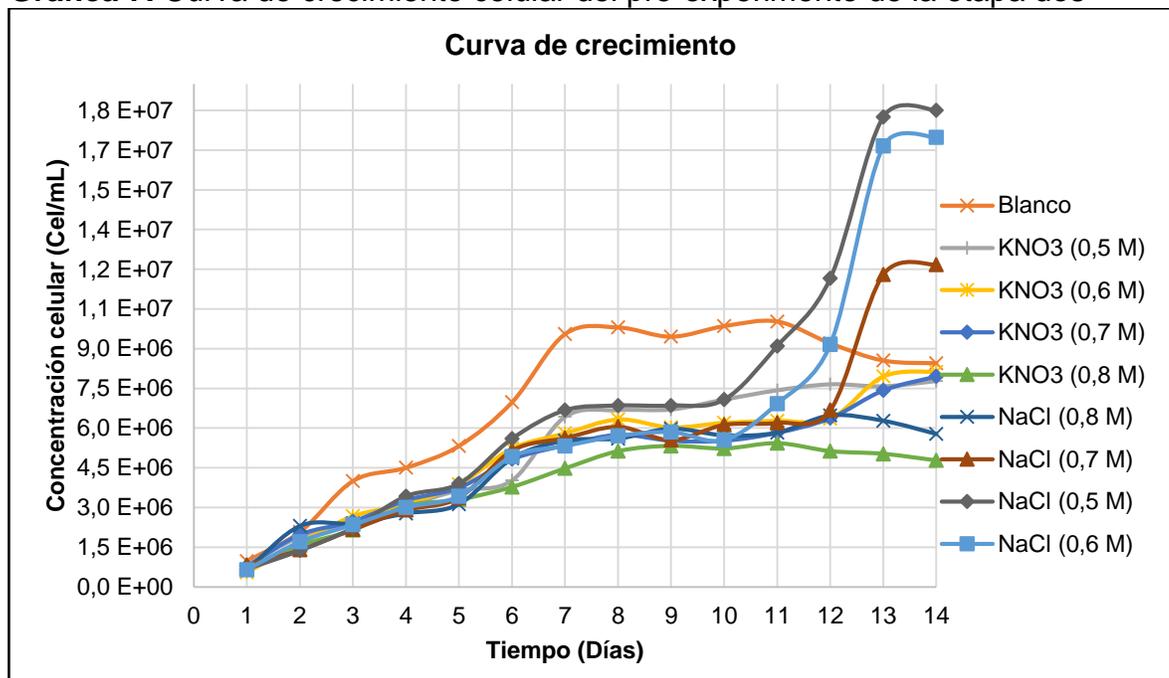
Al observar la gráfica 7, se puede ver que en este pre-experimento la fase de adaptación fue del día 1 al 3, por ende la fase exponencial fue del día 3 al 7, alcanzando la fase estacionaria en el día 7, este resultado difiere del pre-experimento de la etapa uno, ya que en esta segunda etapa no fue necesario la aplicación de más medio de cultivo debido a que se corrigieron los factores que afectaron en el pre-experimento etapa uno, como la ubicación espacial de los fotobiorreactores con respecto a la luz LED y el volumen inicial del cultivo. Esto permitió que el cultivo llegara a la fase estacionaria de una forma más estable, donde se agregó la concentración de sal respectiva sin realizar ninguna disolución, aplicando directamente la cantidad de sal respectiva según el volumen del cultivo del fotobiorreactor.

Con el fin de tener certeza de que todos los cultivos llegaron a fase estacionaria se dejaron sin sal por tres días más hasta llegar al día diez donde se aplicaron las concentraciones de sal, obteniendo los resultados presentados en la gráfica del día once al catorce. Al analizar la concentración celular de estos días se puede observar la diferencia que presenta en el crecimiento la aplicación de diferentes sales y concentraciones, por ejemplo el NaCl en concentraciones 0,5 M, 0,6 M y 0,7 M, no afectó en nada la concentración celular, antes el cultivo de estas concentraciones usaron la sal como un nuevo sustrato para volver a crecer y de una forma rápida, sin embargo, a la concentración de NaCl 0,8M el cultivo intentó hacer lo mismo de los cultivos anteriores sin tener éxito, ya que la concentración fue demasiado alta para el cultivo y al cabo de unos días las células empezaron a morir. Por otro lado el KNO₃ de concentraciones 0,5 M, 0,6 M y 0,7 M, no favoreció el crecimiento de los cultivos, al comparar las mismas concentraciones con el NaCl, observable en la gráfica 7, por lo que se puede analizar que la sal KNO₃ mantuvo estable el crecimiento celular a lo largo de este periodo de tiempo, sin embargo, se notó un cambio de coloración como se explicó anteriormente, lo que reafirma la teoría de que estas concentraciones estresaron a las células de forma que estas produjera carotenoides a fin de protegerse. Lo anterior no ocurrió con la concentración de KNO₃ 0,8M donde se evidencia un decrecimiento en la concentración, lo que indica que el cultivo no resistió la alta concentración de la sal.

En resumen, con base en la curva de crecimiento del pre-experimento etapa dos, se analizó que aunque la mayoría de las concentraciones de NaCl permitieron un

mayor crecimiento y adaptación del cultivo microalgal, no era realmente el objetivo, debido a que se buscaba estresar las células a tal punto que utilizaran los recursos presentes en el medio de cultivo para generar una mayor cantidad de carotenoides como un mecanismo de defensa para sobrevivir a las condiciones aplicadas, y por consecuencia mantener la concentración celular estable sin grandes incrementos. Por ende, esto si se logró con la mayoría de las concentraciones de KNO_3 , siendo considerada hasta el momento la mejor opción para la siguiente fase experimental. Finalmente, el blanco presenta la finalización de la fase estacionaria en el día once, por lo cual en los siguientes tres días se ve como esta empieza con la fase de muerte, ya que el cultivo estaba agotando los recursos y no pudo reproducirse con la misma velocidad con la que se muere.

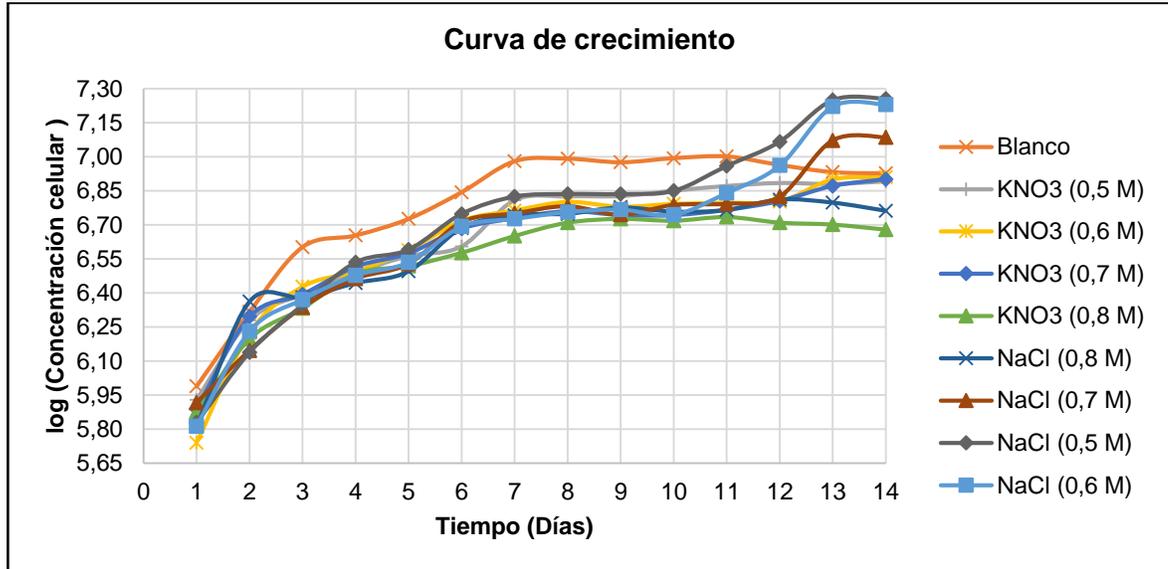
Gráfica 7. Curva de crecimiento celular del pre-experimento de la etapa dos



Fuente: elaboración propia

Para tener una mejor visualización del comportamiento, se grafica Log (Concentración celular) Vs Tiempo; obteniendo:

Gráfica 8. Curva linealizada del crecimiento celular del pre-experimento de la etapa dos



Fuente: elaboración propia

3.2.2.3 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación del pre-experimento de la etapa dos. Para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento se usó la ecuación 2 y para el tiempo de duplicación la ecuación 3, ambas de la sección 2.2.2.4, durante la fase exponencial de los cultivos que se presentaba desde el día tres hasta el día siete, para así poder cuantificar el aumento del crecimiento celular en el tiempo. Por medio de la Tabla 11, se obtienen las gráficas 9 a la 12.

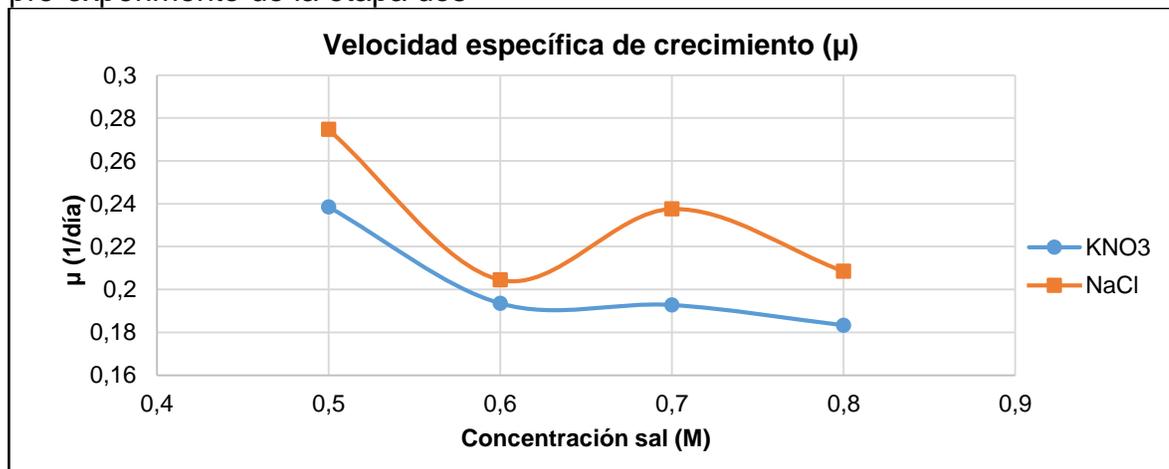
Tabla 11. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de la curva de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* del pre-experimento de la etapa dos

Sal	Velocidad específica de crecimiento μ (1/Día)	Tiempo de duplicación (Día)
KNO ₃ (0,5 M)	0,24	2,91
KNO ₃ (0,6 M)	0,1935	3,58
KNO ₃ (0,7 M)	0,19	3,6
KNO ₃ (0,8 M)	0,18	3,78
NaCl (0,5 M)	0,27	2,52
NaCl (0,6 M)	0,20	3,39
NaCl (0,7 M)	0,24	2,92
NaCl (0,8 M)	0,21	3,33
Blanco	0,22	3,12

Fuente: elaboración propia

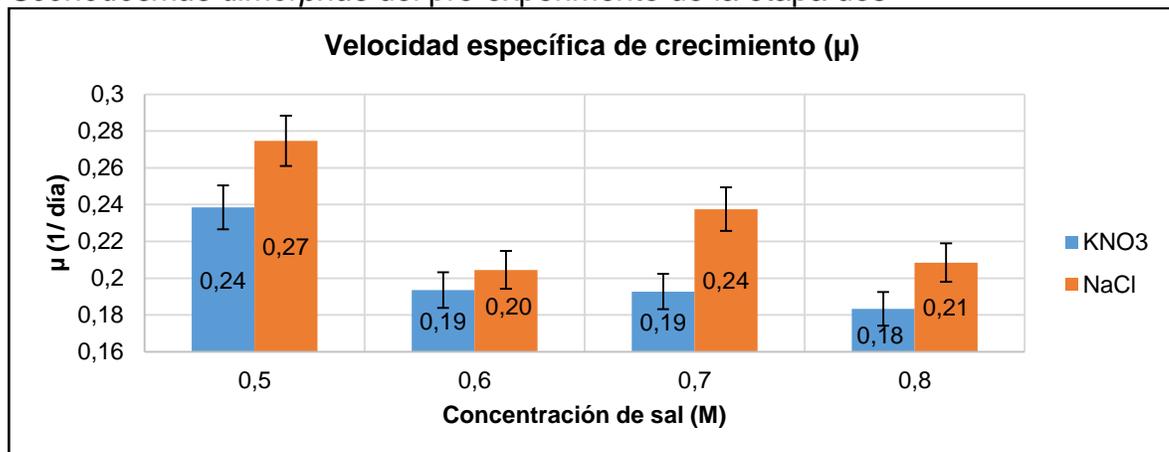
Como se puede observar en las gráficas 9 y 10. Los cultivos que tuvieron una mayor velocidad específica de crecimiento fueron los nombrados de concentración 0,5M de KNO_3 y NaCl , este comportamiento se debió a que estos cultivos obtuvieron una mejor incidencia de la luz, ya que si bien no hubo un gradiente significativo de la incidencia de la luz en los fotobiorreactores, por las condiciones en las que se trabajó y el poco control de los factores pudo ser causante de que unos cultivos se desarrollaran rápidamente que otros, sin embargo, como se observa la diferencia no es potencialmente significativa. Por otro lado, el mayor tiempo de generación lo obtuvieron la concentración nombrada 0,8M para KNO_3 y 0,6M para NaCl , esto se puede explicar por los diversos factores que no se pudieron controlar del ambiente como se mencionó antes e igualmente estas diferencias.

Gráfica 9. Velocidad específica de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* del pre-experimento de la etapa dos



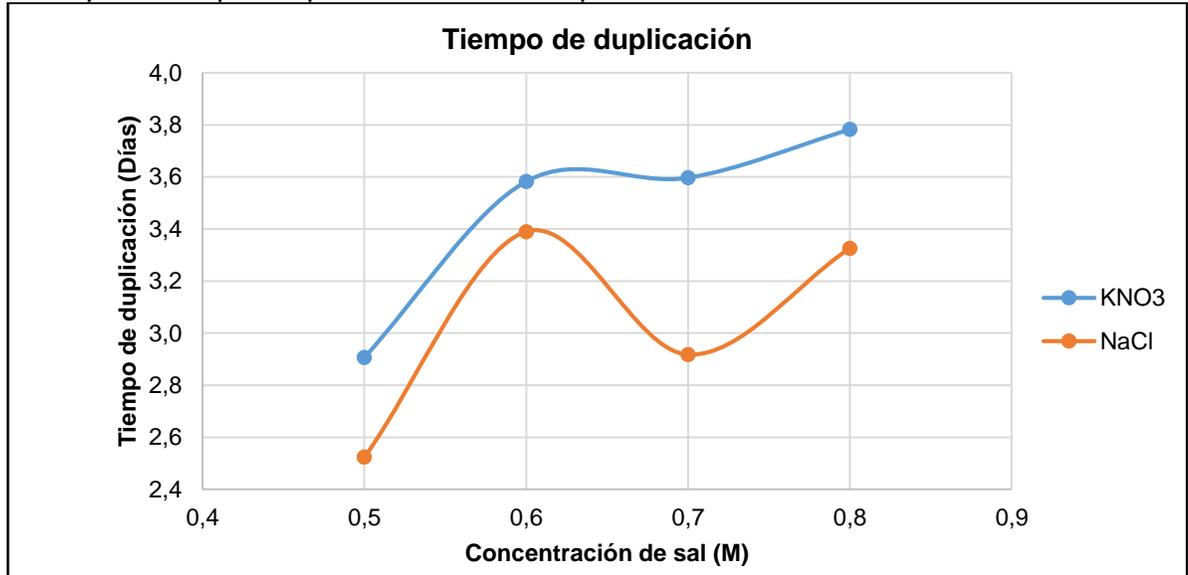
Fuente: elaboración propia

Gráfica 10. Diagrama de barras velocidad específica de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* del pre-experimento de la etapa dos



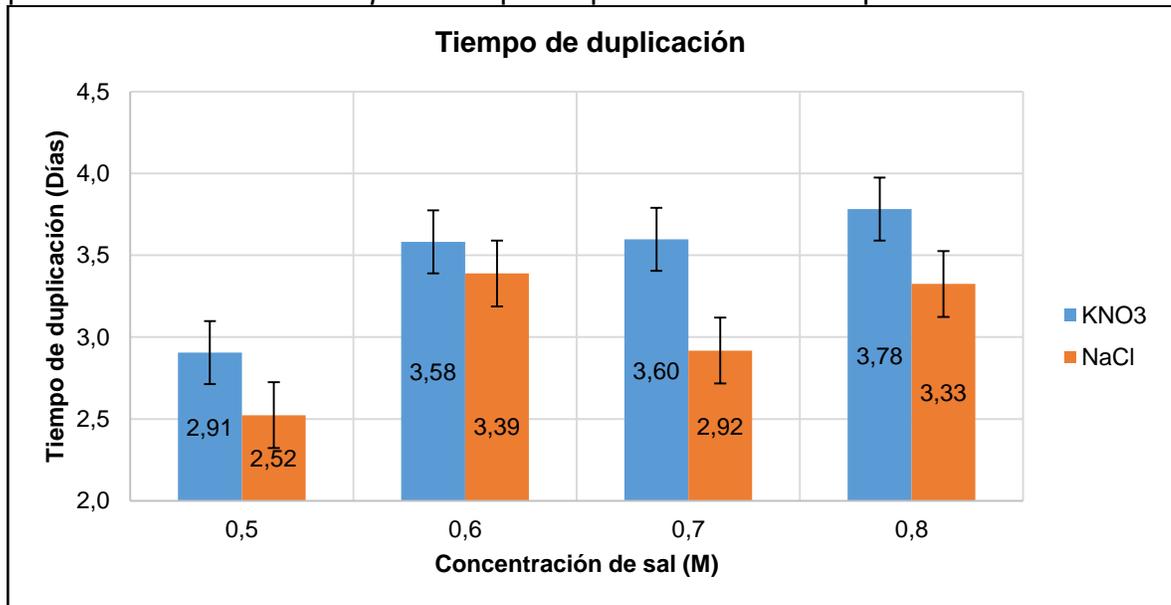
Fuente: elaboración propia

Gráfica 11. Tiempo de duplicación de la curva de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* del pre-experimento de la etapa dos



Fuente: (elaboración propia)

Gráfica 12. Diagrama de barras tiempo de duplicación de la curva de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* del pre-experimento de la etapa dos



Fuente: elaboración propia

3.2.2.4 Extracción - cuantificación de los pigmentos y clorofilas del pre-experimento de la etapa dos. Después de llevar a cabo el protocolo para la extracción de pigmentos liposolubles, especificado en la sección 2.2.5.1. Se obtuvieron las absorbancias a las diferentes longitudes de onda (Tabla 38), se determinó el volumen del cultivo total del fotobiorreactor, de la muestra después de primera centrifugación, muestra después centrifuga con acetona y del extracto (Tabla 39); a partir de esto, se usaron las ecuaciones 8 y 9, especificadas en la metodología, para así cuantificar clorofilas y carotenoides totales y poder calcular las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ con base en el volumen de extracto y muestra (Tabla 40 y 41). Es importante resaltar que se realizó repetición de muestra y se calculó un valor promedio entre los dos resultados de clorofilas y carotenoides totales; todas estas tablas se encuentran en el Anexo H.

A nivel cualitativo a través de la Figura 12, se observa como las muestras con NaCl no presentan viraje a 0,5 y 0,6M, permaneciendo en un color verde; en cambio con KNO_3 la única que no presentó viraje fue la de 0,5 M. Sin embargo, es necesario realizar la cuantificación para tener un resultado veraz.

Figura 12. Registro fotográfico de la extracción de pigmentos liposolubles del pre-experimento de la etapa dos

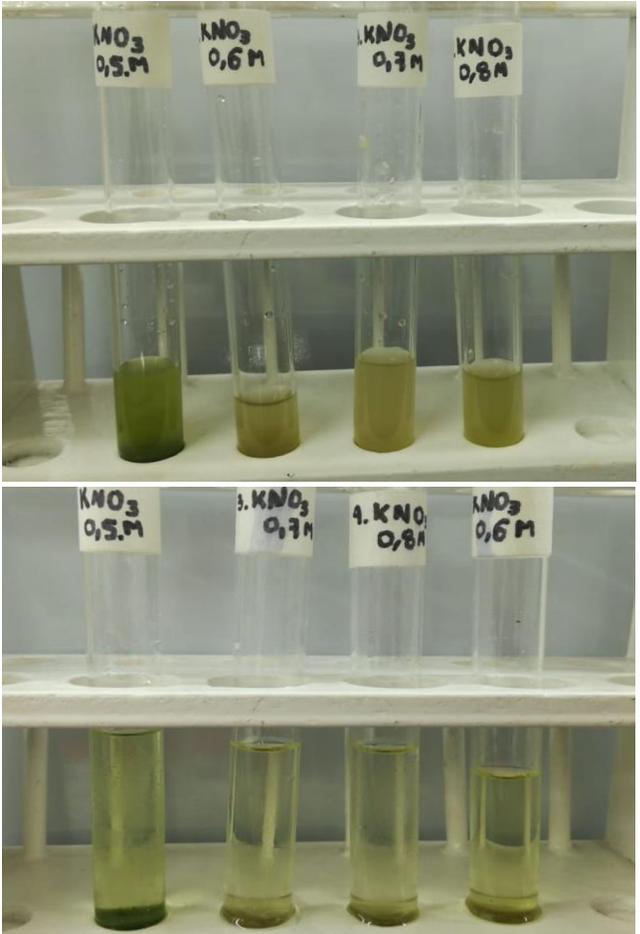
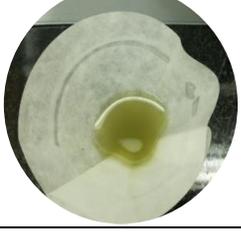
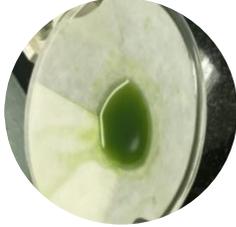
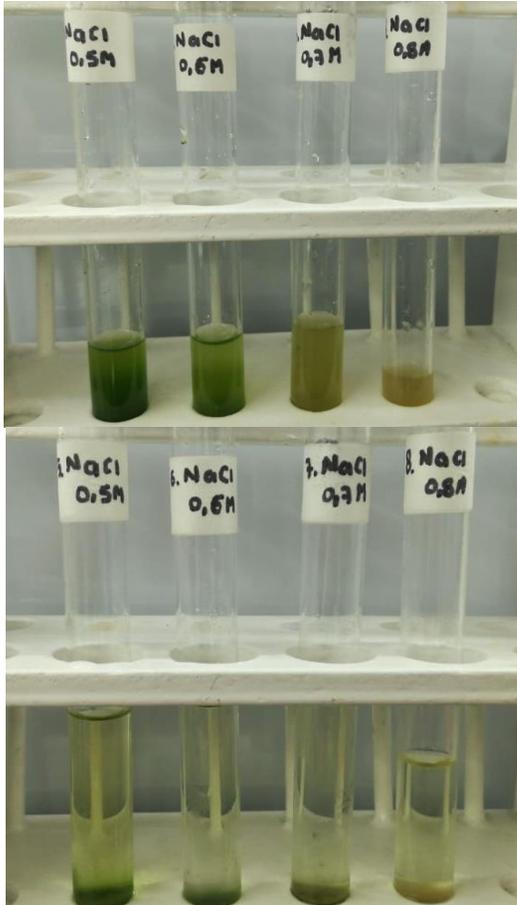
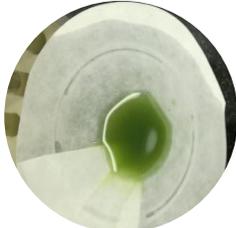
Sal	Muestra filtrada	Comparación coloración muestras filtradas y extraídos los pigmentos
KNO_3 0,5M		
KNO_3 0,6M		
KNO_3 0,7M		
KNO_3 0,8M		

Figura 12. (Continuación)

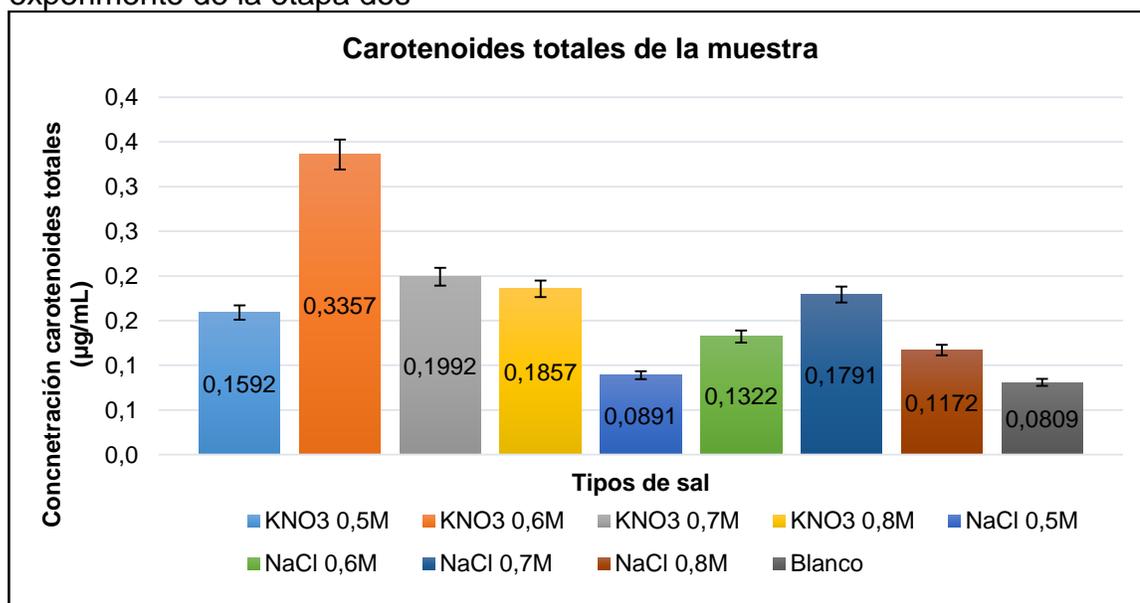
Sal	Muestra filtrada	Comparación coloración muestras filtradas y extraídos los pigmentos
NaCl 0,5M		
NaCl 0,6M		
NaCl 0,7M		
NaCl 0,8M		

Fuente: elaboración propia

Por ende, para poder analizar los datos se realizó la gráfica 13 (carotenoides totales de la muestra Vs tipo de sal). En esta, se determina que KNO_3 a 0,6M, fue el cultivo que más generó carotenoides totales, siendo de 0,3357 $\mu\text{g/mL}$ muestra; evidenciando que los cultivos con presencia de KNO_3 fueron de forma general los que más generaron el metabolito de interés y esto se refuerza con el viraje de color. En cambio, con NaCl , el cultivo que más presentó carotenoides totales fue el de NaCl 0,7M, con 0,1791 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, al compararlos con los de KNO_3 , solo logró superar en proporción a KNO_3 de 0,5M (0,1592 $\mu\text{g/mL}$), ya que KNO_3 de 0,7M reportó 0,1992 $\mu\text{g/mL}$ y a 0,8M 0,1857 $\mu\text{g/mL}$ de la muestra tomada. Con respecto al blanco, reportó un valor de 0,0809 $\mu\text{g/mL}$, estando de forma pareja con NaCl 0,5M con un valor de 0,0891 $\mu\text{g/mL}$, por ende, fueron los que menos generaron; seguido de NaCl 0,8M con 0,1172 $\mu\text{g/mL}$, esto se debe a que el cultivo presentó fase de muerte y una coloración amarilla-transparente.

Se puede analizar que el cultivo del blanco reportó presencia de carotenoides totales, porque posiblemente hay presencia de carotenoides primarios, pero en una proporción menor ya que estaba en fase estacionaria y estos se generan en mayor proporción en la fase de crecimiento. En lo concerniente a los otros cultivos, como el factor de estrés se aplicó en la fase estacionaria, se benefició la generación de metabolitos secundarios, dependiendo de la concentración de sal; sin embargo, para tener mayor certeza de lo analizado es recomendable realizar cromatografía para así determinar que metabolitos están presentes en la muestra.

Gráfica 13. Carotenoides totales de la muestra del cultivo con KNO_3 y NaCl del pre-experimento de la etapa dos



Fuente: elaboración propia

Por medio de la técnica de espectrofotometría, se logra de igual forma determinar la presencia de clorofila a y b, obteniendo la gráfica 14, 15 y 16. Con respecto a la gráfica 14, específica para la sal KNO_3 , se muestra que a la concentración de 0,5 M la presencia de clorofilas a y b son mucho mayores que en los otros cultivos. Por otro lado, se observa que la que menos reportó presencia de clorofilas son la de concentración de 0,6M, ya que esta fue la que más generó carotenoides, por ende, su coloración fue amarilla, no verde que indica una mayor presencia de clorofilas. En cuanto a la gráfica 15, con respecto a NaCl se observa de forma notoria mayor proporción de clorofilas a y b comparadas con la de carotenoides, siendo la de 0,5 y 0,6M que mayor concentración presentaban. Por último, con respecto al blanco en la gráfica 16, la concentración de carotenoides es poco comparable con la de clorofila a y b, siendo su coloración verde oscuro. Por ende, se analiza que, a mayor presencia de carotenoides totales, la concentración de clorofilas totales decrece, una explicación adicional de la presencia de carotenoides en el cultivo blanco es debida a que los carotenoides siempre acompañan a la clorofila en una relación de tres a cuatro partes de clorofila por una parte de carotenoides¹³³.

Por otro lado, las clorofilas poseen la capacidad de recibir la mayor cantidad de luz que incide en el microorganismo, compuesta por varias longitudes de onda y distintas propiedades de absorción, asegurando que un mayor porcentaje de fotones incidentes estimule la fotosíntesis¹³⁴; estas se dividen en clorofilas a que se encuentran en todos los microorganismos fotosintéticos, en cambio la clorofila b, en algas verdes; estas dos se diferencian en que la clorofila a es el único pigmento que está directamente implicado en las reacciones luminosas, en cambio la clorofila b permite transmitir la energía absorbida a las moléculas de clorofila a implicadas en el proceso¹³⁵.

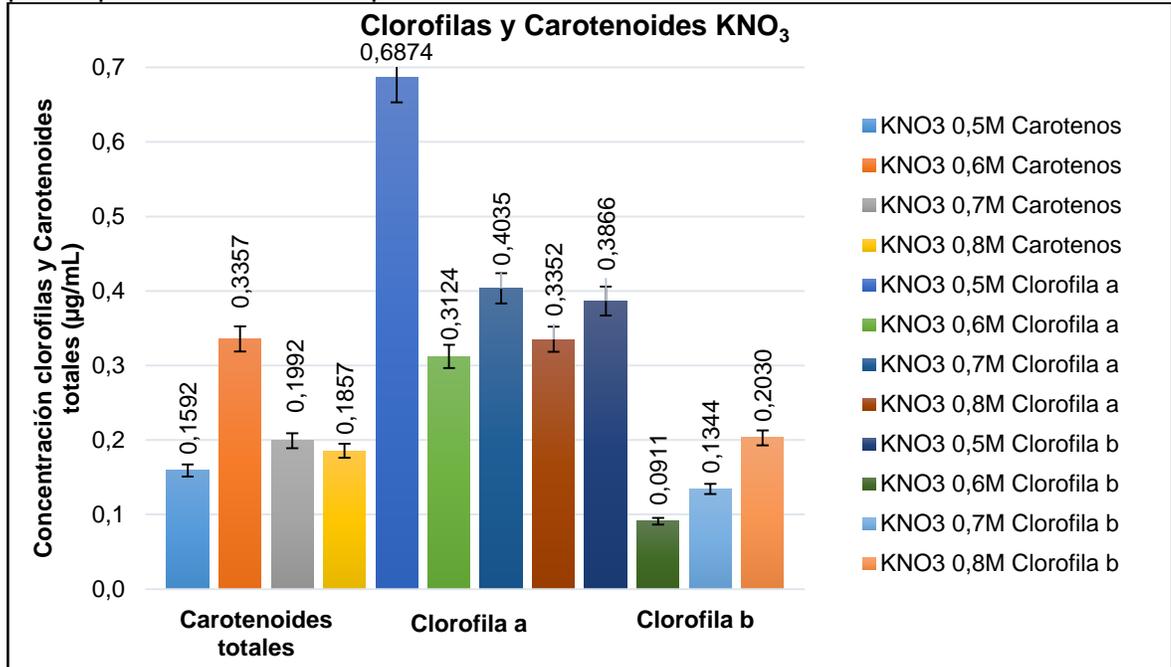
A partir de lo anterior, la clorofila b se presenta en menor proporción según lo observado en las gráficas, donde para KNO_3 a 0,6M la concentración de clorofila b fue la menor de todas las muestras (0,0911 $\mu\text{g/mL}$), siendo un pigmento accesorio, mientras que la clorofila a se presenta siempre en mayor proporción que la clorofila b ya que es la directamente implicada en las reacciones lumínicas de las microalgas. Con base en esto, otro pigmento accesorio son los carotenoides, los cuales son visibles hasta que la clorofila está en menor proporción, generando una coloración amarilla-anaranjada y absorben luz azul-verde.

¹³³ MELENDEZ, A. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides.

¹³⁴ LEMUS, Ximena. Obtención de carotenoides con la microalga *Scenedesmus incarssatulus* en un biorreactor tipo airlift.

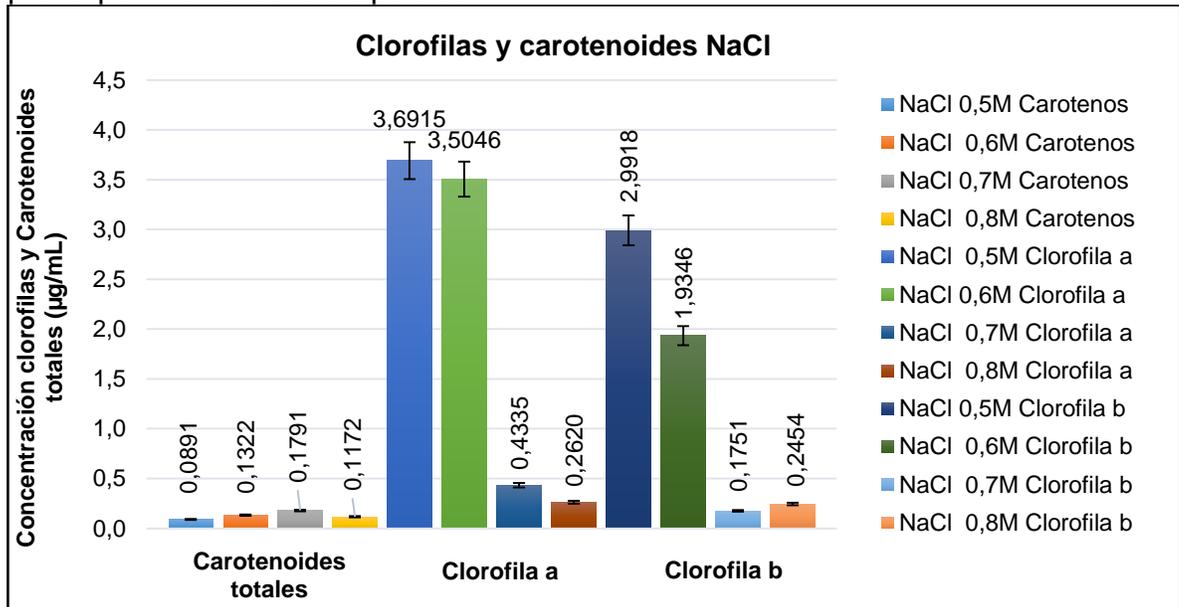
¹³⁵ MURRAY W. Nabors. Introducción a la Botánica.

Gráfica 14. Clorofilas y Carotenoides totales de la muestra del cultivo con KNO₃ del pre-experimento de la etapa dos



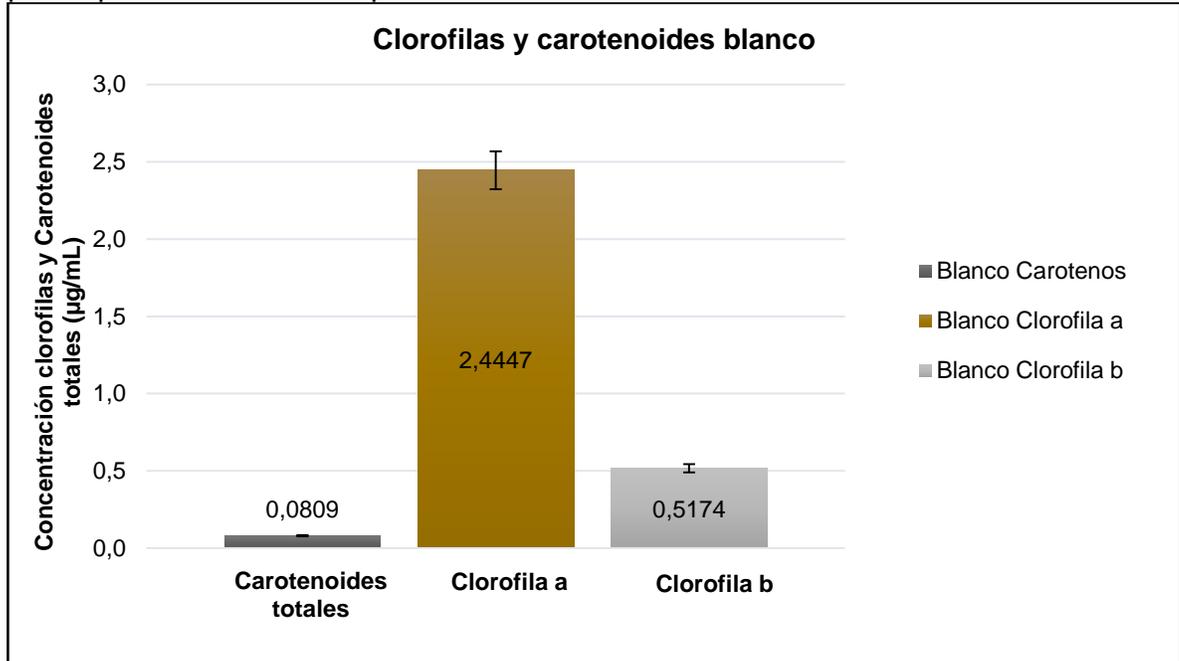
Fuente: elaboración propia

Gráfica 15. Clorofilas y Carotenoides totales de la muestra del cultivo con NaCl del pre-experimento de la etapa dos



Fuente: elaboración propia

Gráfica 16. Clorofilas y Carotenoides totales de la muestra del cultivo blanco del pre-experimento de la etapa dos



Fuente: elaboración propia

Por último, con base en lo planteado en el artículo de referencia, “Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal”¹³⁶, en el cual planteaban que la producción de pigmentos se relacionó directamente con el crecimiento celular, se llega a analizar que en este caso esto no fue cierto, ya que en el pre-experimento etapa dos se tiene como objetivo la obtención de metabolitos secundarios, en cambio en el artículo la aplicación de sal se presentó desde el primer día de puesta en marcha del experimento, dando a entender que su objetivo era la obtención de metabolitos primarios. A partir de esto, se observa que en el pre-experimento etapa dos realizado con *Scenedesmus dimorphus*, los cultivos que mayor concentración de carotenoides totales tenían eran los de KNO_3 y según su la gráfica 7, en la curva de crecimiento celular su comportamiento siguió en fase estacionaria, favoreciendo la generación de metabolitos secundarios, siendo el objetivo planteado en el proyecto de grado.

Al comparar los resultados obtenidos con los trabajos de otros autores que sirvieron como base teórica del presente trabajo, se puede observar como el valor de carotenoides totales obtenidos por ambas sales, fueron bajos, por ejemplo, en el artículo titulado “The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation

¹³⁶ GARCIA, L. MONCAYO, S y PASTUZO, M. Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal.

in *Scenedesmus sp.*¹³⁷, los autores obtuvieron 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mediante la aplicación combinada de un medio de 1M de KNO_3 , una luz incidente de 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, una temperatura de entre 25-36°C y un fotobiorreactor de capa fina al aire libre con 150 L de cultivo; mientras que el resultado obtenido por el presente trabajo, fue de 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de carotenoides, utilizando una concentración de 0,6 M de KNO_3 , siendo esta la concentración que obtuvo la mayor concentración de carotenoides totales, por lo que evidencia una diferencia de 33,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ entre los dos trabajos. Esto puede explicarse debido a varios factores claves que fueron diferentes a lo largo del crecimiento del cultivo y acumulación de pigmentos, uno de estos es la intensidad o incidencia lumínica en el cultivo, ya que como explica Lemus, X¹³⁸, estos pigmentos actúan como protectores de la irradiación, razón por la cual una de las posibles causas de la baja concentración de carotenoides obtenida en este trabajo, es la baja irradiación proporcionada por la tiras LED de luz azul, así mismo se no se presentó un control de condiciones como la temperatura y la agitación, ya que no se contaba con equipos que proporcionaran un continuo control y ajuste de estas condiciones con el fin de mantenerlas constantes y uniformes en el fotobiorreactor adaptado, adicionalmente hay que recordar que las especies aunque son del mismo género son diferentes, por lo que pueden presentar comportamientos desiguales, debido al metabolismo y al uso que la especie le dé a los recursos del medio en el que se encuentra.

Por otro lado al comparar los resultados obtenidos por la sal NaCl , con el artículo titulado “Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal”, se puede observar el mismo comportamiento antes descrito, ya que los autores obtuvieron una concentración de carotenoides totales igual a 4,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando una concentración de 0,5 M de NaCl , una luz incidente de 284 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una temperatura de 24°C y 250 mL de cultivo; en tanto que el resultado obtenido por el presente trabajo, fue de 0,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de carotenoides, utilizando una concentración de 0,7 M de NaCl , siendo esta la concentración que obtuvo la mayor concentración de carotenoides totales, este comportamiento se atribuye a la falta de control de algunas condiciones, la diferencias de operación de los cultivos, y la diferencias entre las especies de microalgas, como se mencionó anteriormente.

A pesar de que los resultados varían drásticamente entre los trabajos experimentales y el presente se puede decir que tienen el mismo resultado, en cuanto a que la sal KNO_3 tiene el mejor resultado de los tres trabajos comparados obteniendo una productividad alta y siendo posiblemente rentable con la especie *Scenedesmus dimorphus*, solo si se utilizan volúmenes muy grandes de cultivo, lo que aumentaría los costos de operación.

¹³⁷PŘIBYL, P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus sp.*

¹³⁸LEMUS, X. Obtención de carotenoides con la microalga *Scenedesmus incarssatulus* en un biorreactor tipo airlift.

3.2.2.5 Diseño factorial del pre-experimento de la etapa dos. Con base en las hipótesis planteadas en la sección de la metodología 2.2.4.1, siendo estas, H_0 : La concentración de sal no genera un cambio significativo en la concentración de carotenoides totales y en H_1 : La concentración de sal genera un cambio significativo en la concentración de carotenoides totales; se planteó un diseño factorial con una única repetición, donde se tiene como factor A los tipos de sal (KNO_3 y $NaCl$), y como factor B las concentraciones de sal (0,5, 0,6, 0,7 y 0,8 M), siendo entonces un diseño factorial 2x4. De forma específica se presenta como variable dependiente la concentración de carotenoides totales promedio, obtenido de la muestra extraída analizada por espectrofotometría y como independiente las cuatro concentraciones de cada sal.

Con respecto a lo anterior, en el Anexo I se encuentra la Tabla 42, donde se muestran las respectivas sumatorias de las concentraciones de carotenoides totales de la muestra a las distintas concentraciones de sal, según el tipo de sal; posteriormente en la Tabla 43 se muestran los cuadrados de las diferencias con sus respectivas sumatorias. A partir de esto, se usó la ecuación 6 encontrada en la metodología, teniendo como resultados los valores de la Tabla 44; las tablas mencionadas anteriormente se encuentran en el Anexo J. Por medio de los resultados especificados en las tablas mencionadas anteriormente, se concluye (Tabla 12):

Tabla 12. Resultados y conclusiones finales del método de análisis por diseño factorial del pre-experimento de la etapa dos

Factores	Resultados del análisis	Mayor o menor que	F a α de 0,05 ¹³⁹	v1	v2	Respuesta	Conclusión
FAB	2,6667	>	4,07	3	8	Falso	H_0 =Verdadero
FA	14,0811	>	5,32	1	8	Verdadero	H_1 =Verdadero
FB	3,9045	>	4,07	3	8	Falso	H_0 =Verdadero

Fuente: elaboración propia

Se observa que no existe interacción entre el factor a y b, es decir los tipos de sales y la concentración de las mismas; en cuanto al FA (media cuadrática de KNO_3) se determina que la hipótesis alternativa es verdadera, es decir la concentración de sal genera un cambio significativo en la concentración de carotenoides totales, sin embargo, para FB (media cuadrática de $NaCl$) la hipótesis nula es verdadera por ende la concentración de sal no genera un cambio significativo en la concentración de carotenoides totales. Lo obtenido se puede verificar a través de la gráfica 13 (Carotenoides totales Vs Tipo de sal), ya que se observa que la generación del

¹³⁹ W.H.BEYER. Hanbook of tables for probability and statics. The chemical Rubber Co,Cleveland. Tabla A.6.

producto de interés fue mucho mayor al usar la sal KNO_3 que NaCl ; dando como respuesta que la generación de carotenoides con KNO_3 fue factible a comparación del blanco, observando un viraje más notable de coloración en estas muestras, por ende, la presencia de clorofilas fue menor en comparación con NaCl y el blanco.

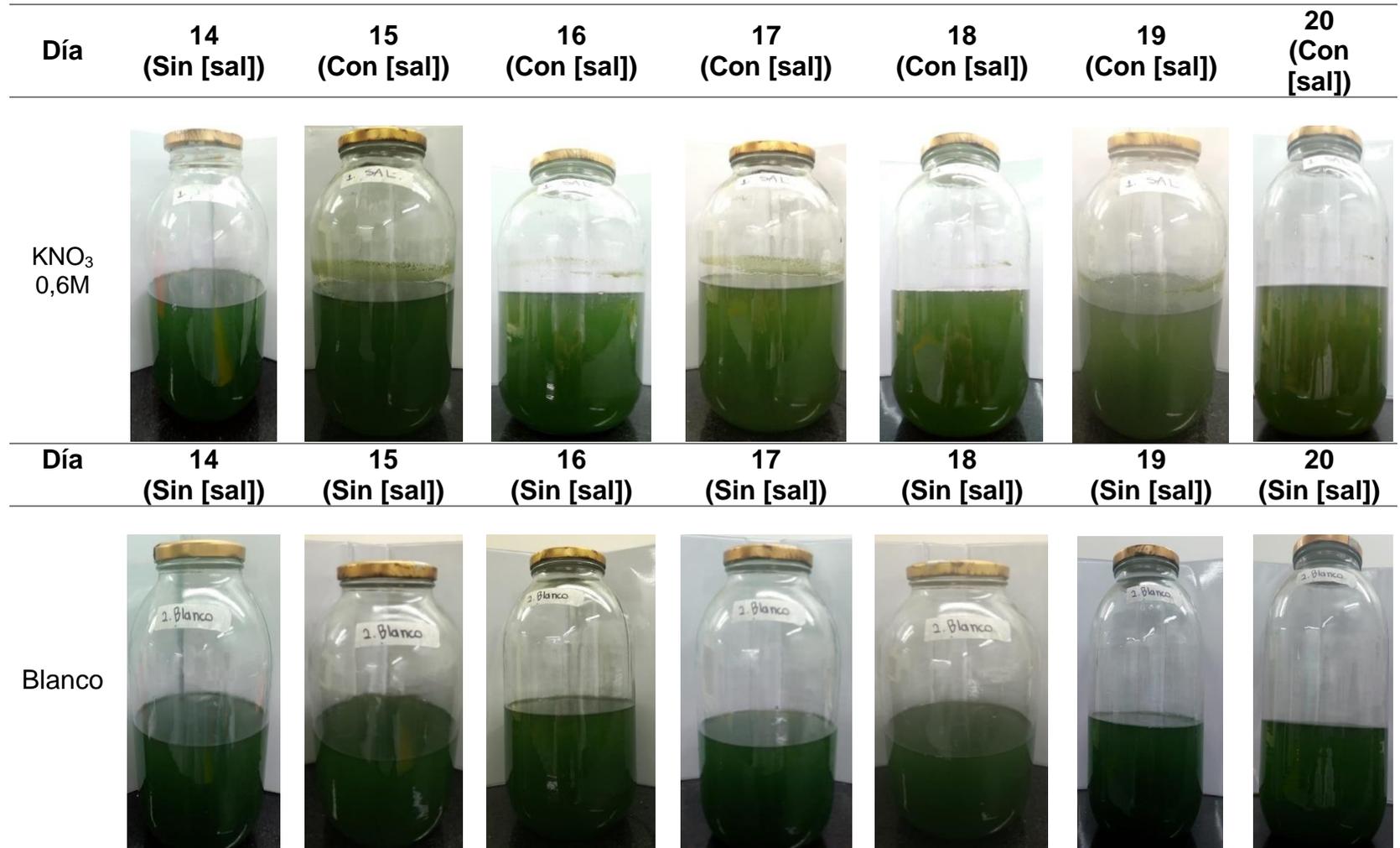
3.3 TERCERA FASE

En esta fase, se llevó a cabo el desarrollo del experimento, en el cual se usaron dos fotobiorreactores adaptados de 4L, de los cuales uno correspondía al blanco y el otro al de la sal seleccionada en el pre-experimento etapa dos, siendo KNO_3 a 0,6M.

Por ende, se realizó el correspondiente escalamiento de las condiciones seleccionadas en el pre-experimento etapa dos, según lo planteado en la metodología (sección 2.3) y se obtuvieron resultados por seguimiento diario de forma cualitativa (cambios de color o morfológicos) y cuantitativa (conteos celulares por cámara de Neubauer) durante los 20 días de conteo.

3.3.1 Cultivo en el fotobiorreactor adaptado del experimento. En la primera semana de puesta en marcha del experimento se observó una coloración verde claro, debido a que el cultivo se encuentra en la fase de adaptación, por ende, la microalga con el pasar de los días logró generar mayor contenido de biomasa usando los nutrientes del medio de cultivo, verificando esto con una coloración verde oscuro al tener una mayor concentración celular y a través de los conteos de la cámara de Neubauer en donde se evidencia una mayor generación de células. En la tercera semana de conteo, se determinó una disminución aproximadamente del 50% de volumen inicial y posteriormente en el día 12 se presencié la fase estacionaria, por ende, se esperaron tres días y se procedió a aplicar la sal (KNO_3 a 0,6M), obteniendo cambios cualitativos.

Figura 13. Registró fotográfico experimento



Fuente: elaboración propia

Con base en la Figura 13, se observa el comportamiento de coloración del día 14, donde el medio no tiene concentración de sal para el estrés, al día 20. De manera específica, del día 17 al 20 hubo un viraje de coloración de un verde oscuro a un verde de una tonalidad más clara, este cambio pudo ser debido a la disminución de clorofilas y el aumento de los carotenoides¹⁴⁰ lo cual no se evidenció en el mismo transcurso de tiempo en el cultivo denominado blanco.

A partir de esto, se observó que entre más días permaneciera el cultivo con la concentración de sal, se presentaba una variación de coloración. Sin embargo, al comparar los resultados con la Figura 11, se observa que en el pre-experimento etapa dos para KNO_3 a 0,6 M el viraje de coloración fue más notorio, hasta llegar a un amarillo claro, esto se debe a que a pesar de que se realizó un escalamiento en las condiciones seleccionadas en el pre-experimento etapa dos, no se logran controlar variables como temperatura, pH, agitación y otros; además la geometría del fotobiorreactor adaptado difiere con la del usado en el pre-experimento etapa dos, siendo un factor primordial para la penetración de luz, ya que en el experimento la geometría fue cilíndrica, conllevando a que en el centro del volumen del reactor la luz incidente fuera menor, en cambio en el pre-experimento etapa dos se tenía una geometría de un espesor menor y esto favoreció una homogeneidad de incidencia de luz.

Por otro lado, en el día 20 se evidenció una reducción notable del volumen en el cultivo denominado blanco, ya que en el día 14 contenía 2090 mL y en el último día 1650 mL, teniendo una reducción de 440 mL; en cambio en el que contenía la sal, la variación fue de 2290 mL a 2050 mL reduciendo 240 mL, esto es un indicativo de que la salinidad conlleva a una condición de estrés en la fase estacionaria. Por último, a nivel de morfología, se presentó de forma análoga al pre-experimento etapa dos, el cambio de las células de una apariencia delgada y alargada a una circular.

3.3.2 Curva de crecimiento del experimento. Para la elaboración de la curva de crecimiento, se realizaron conteos por cámara de Neubauer durante 20 días, a los dos cultivos presentes en los fotobiorreactores adaptados, uno perteneciente al blanco y otro al de la sal, los cuales crecieron bajo las mismas condiciones estipuladas en el pre-experimento etapa dos, donde en la fase exponencial se aplicó luz LED roja y en la estacionaria azul. Con base en esto, se determinó a través de los conteos diarios la concentración celular (Anexo K).

A través de la gráfica 17, se observa el comportamiento de la curva de crecimiento, el cual permite determinar que del día 1 a 4 se presencia la fase de adaptación, es decir la microalga se acondiciona a factores de temperatura, luz, agitación y demás. Posteriormente, del día 5 al 12 se observa la fase exponencial, donde la microalga

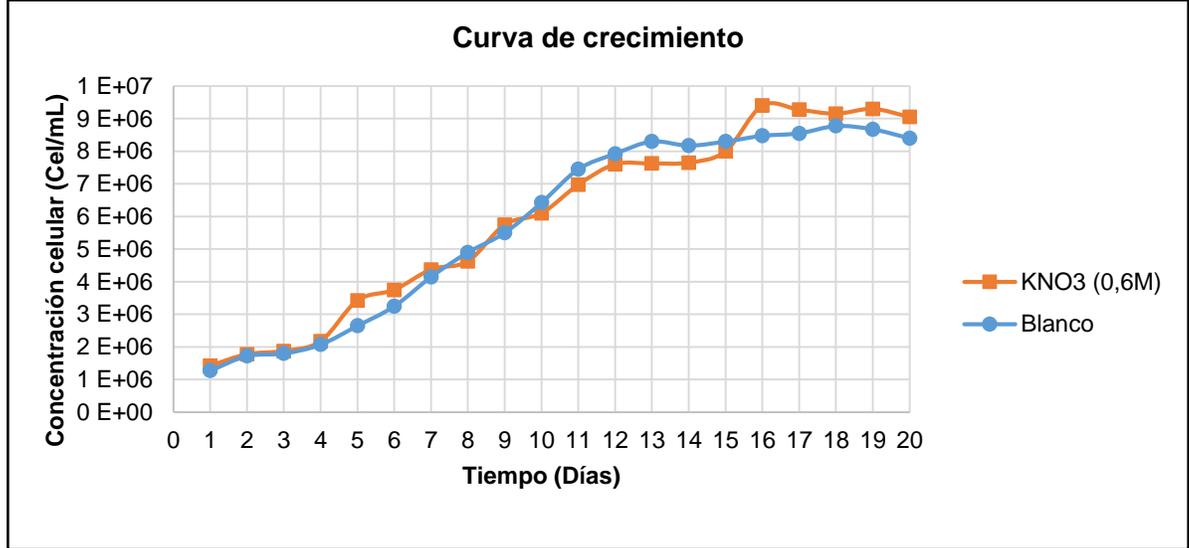
¹⁴⁰LEMUS, X. Obtención de carotenoides con la microalga *Scenedesmus incarssatulus* en un biorreactor tipo airlift.

tiene las condiciones adecuadas que favorecieron el crecimiento y la generación de biomasa. Del día 12 al 14 se evidencia un comportamiento de fase estacionaria, por ende, el crecimiento cesa debido a condiciones limitantes. En cuanto a los días del 14 al 20, el comportamiento del fotobiorreactor denominado blanco, presencia una continuidad en fase estacionaria, pero con respecto al comportamiento del fotobiorreactor con sal, se observa que del día 14 al 16, se generó crecimiento. Esto se debe a que en día 14 se adicionó la concentración de KNO_3 a 0,6 M, donde la microalga tomo como sustrato la sal y beneficio el crecimiento, comportamiento análogo a lo observado en el pre-experimento etapa dos. Sin embargo, de los días 16 al 20, se presenta un comportamiento estacionario, en el cual lo que se busca obtener es condiciones de estrés para la acumulación del metabolito de interés.

Al comparar, el comportamiento de la gráfica 17 (curva de crecimiento experimento) con la 7 (curva de crecimiento experimento-etapa dos), se identifican diferencias como que en el pre-experimento etapa dos se llegó a fase estacionaria en el día 7, en cambio en el experimento hasta el día 12; esto se debe a que el manejo de las condiciones externas e internas es limitado (como temperatura, pH y otras), conllevando a variaciones en la adaptación y crecimiento, ya que lo ideal hubiera sido llegar en el mismo día a la fase estacionaria, ya que debido a que se realizó un escalamiento de condiciones volumétricas, con respecto a los resultados del pre-experimento de la etapa dos, debieron tener comportamientos similares, sin embargo no fue así, lo cual puede deberse a varios factores como diferentes condiciones de operación, en cuanto a la geometría del fotobiorreactor, temperatura y agitación, o igualmente pudo ser debido a un inóculo inicial diferente.

Por consiguiente, en la gráfica 17, se presentan 20 días de conteo, a causa de que los cultivos se demoraron más días en llegar a fase estacionaria y además no presentó un viraje de color considerable, conllevando a dejar al cultivo con la presencia de sal hasta el día 20 de conteo en comparación al pre-experimento etapa dos que se presencié viraje en el día 14.

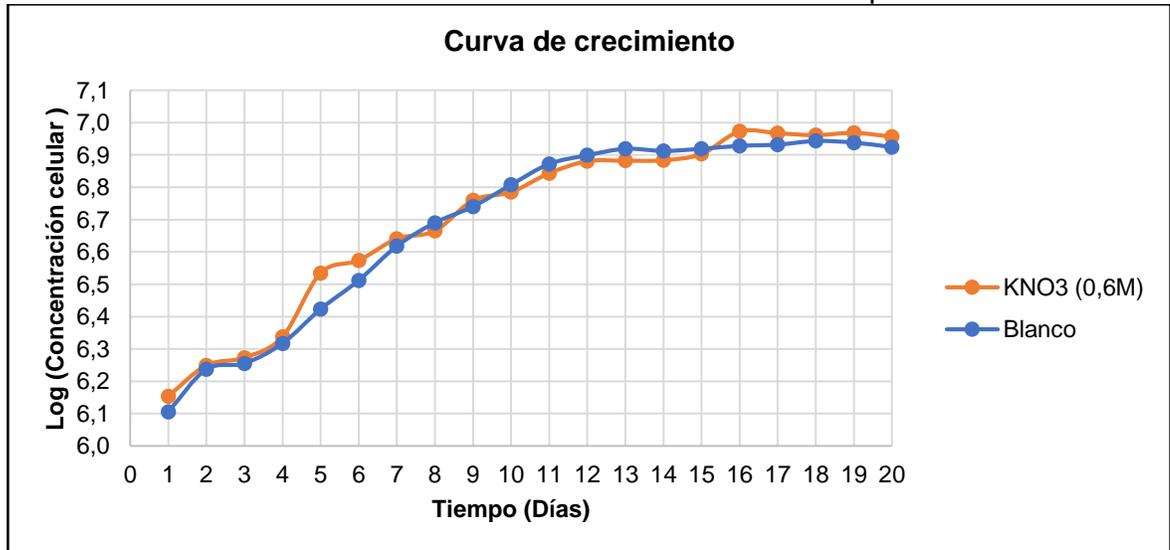
Gráfica 17. Curva de crecimiento celular del experimento



Fuente: elaboración propia

Para tener una mejor visualización del comportamiento, se grafica Log (Concentración celular) Vs Tiempo, obteniendo la gráfica 18, donde se podría decir que el comportamiento de ambas curvas es similar, sin embargo esto no significa que el KNO_3 no haya causado ningún efecto en el cultivo, ya que si bien no aumentó o disminuyó de forma significativa la concentración celular, si produjo un efecto en el aumento de carotenoides como se observa más adelante en la sección 3.3.4 e igualmente un aumento en los ácidos grasos, explicado en la sección 3.3.5.

Gráfica 18. Curva linealizada del crecimiento celular en el experimento

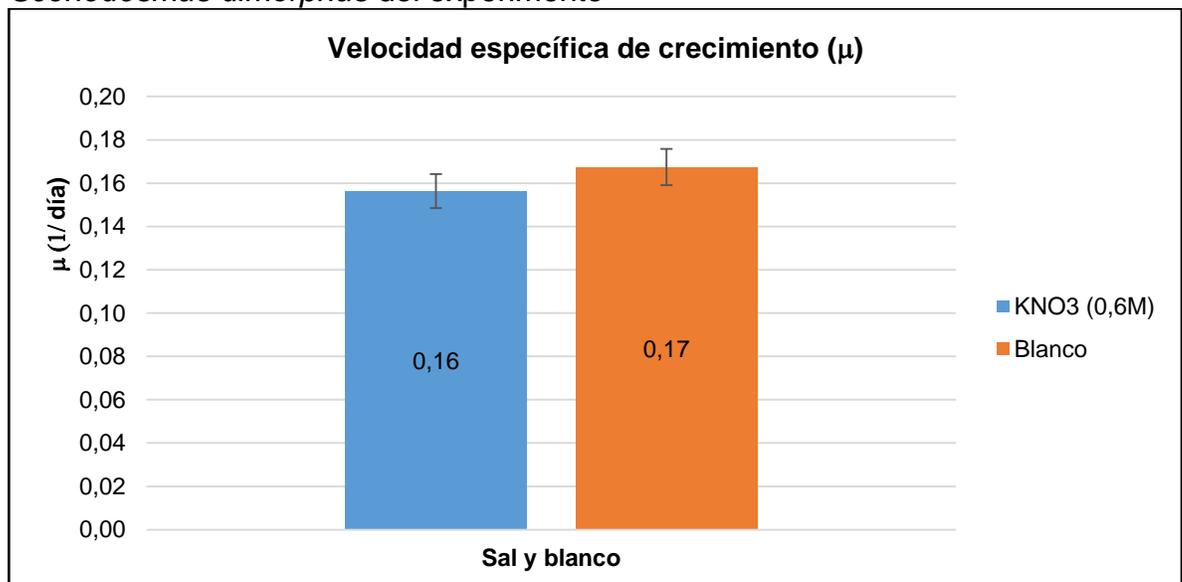


Fuente: elaboración propia

3.3.3 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación del experimento. En lo correspondiente al cálculo de la velocidad específica de crecimiento se usó la ecuación 2 y para el tiempo de duplicación la ecuación 3, ambas de la sección 2.2.2.4, durante la fase exponencial de los cultivos, evidenciada en la gráfica 17 desde el día 4 al 12, para así poder cuantificar el aumento del crecimiento celular en el tiempo.

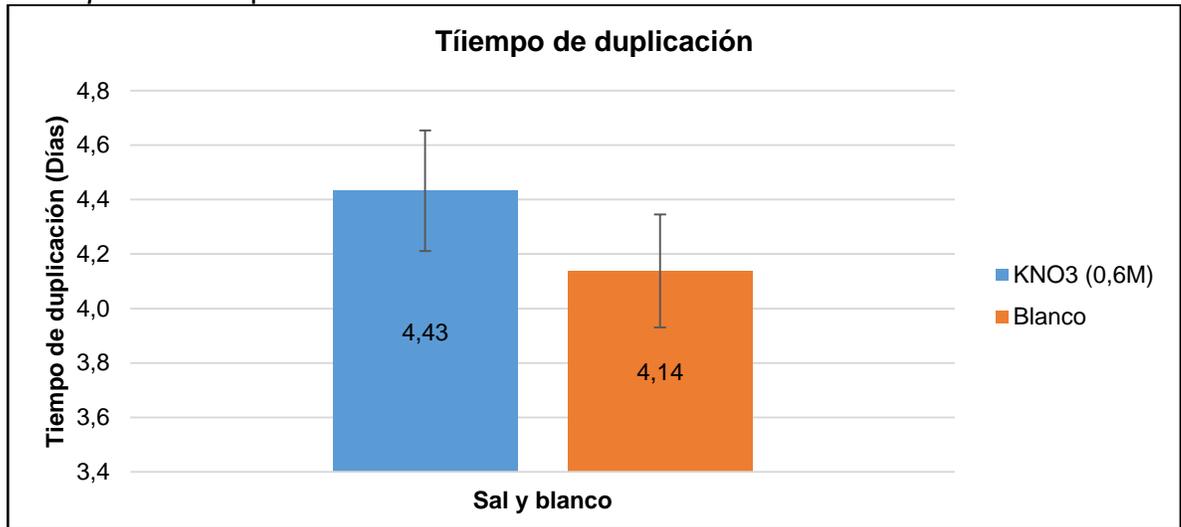
Con respecto a la velocidad de crecimiento, en la gráfica 19, se observa que para ambos cultivos se presentó un valor similar; sin embargo, el blanco presentó una velocidad de crecimiento mayor ($0,17 \text{ días}^{-1}$) que la del fotobiorreactor adaptado con KNO_3 a $0,6\text{M}$, siendo esta de $0,1564 \text{ días}^{-1}$. Por ende, en la gráfica 20, correspondiente al tiempo de duplicación, se evidenció un menor tiempo de duplicación para el blanco (4,14 días) que para el fotobiorreactor con la sal (4,43 días). Estos resultados, demuestran un mejor control de las condiciones que favorecieron de forma equivalente el crecimiento, debido a que estos cultivos obtuvieron una mejor incidencia de la luz más proporcional, reduciendo el gradiente en los fotobiorreactores al manejar mejor la distribución de los mismos en la incubadora y al poner la cinta LED en una mejor posición alrededor de los fotobiorreactores.

Gráfica 19. Diagrama de barras de velocidad específica de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* del experimento



Fuente: elaboración propia

Gráfica 20. Diagrama de barras del tiempo de duplicación para *Scenedesmus dimorphus* del experimento



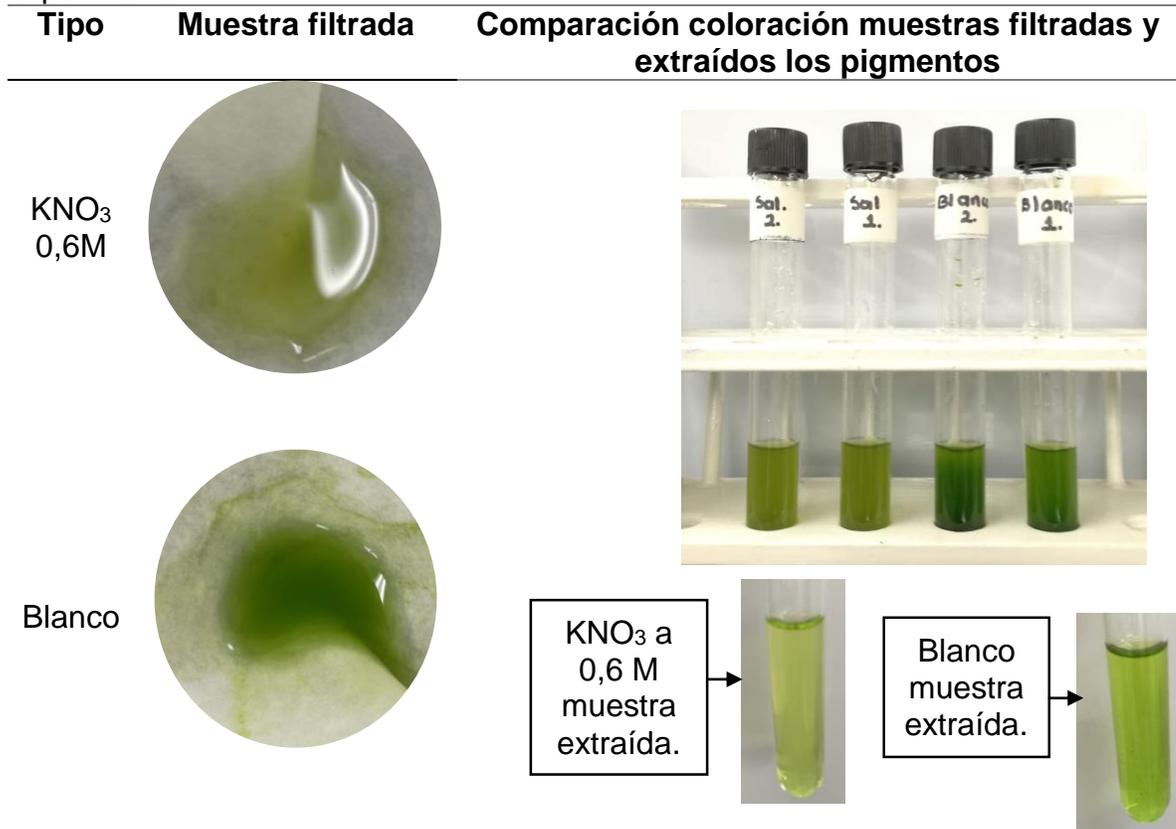
Fuente: elaboración propia

3.3.4 Extracción - cuantificación de pigmentos y clorofilas del experimento.

Para la extracción de pigmentos liposolubles se aplicó la metodología especificada en la sección 2.2.5.1. A partir de esto, se obtuvieron como resultados (Anexo K) las absorbancias (Tabla 47) y el volumen total, el de centrifugación y de extracción (Tabla 48); con base en esto, se determinaron los carotenoides totales y las clorofilas al aplicar las ecuaciones 8 y 9 dando la cuantificación en $\mu\text{g/mL}$ tanto para el extracto (Tabla 49) y para la muestra (Tabla 50); por ende en la Tabla 51, se muestra el valor promedio de carotenoides totales y clorofila a y b, encontrados en la muestra de KNO_3 a 0,6M y en el blanco, las cuales se les realizó repetición en la cuantificación para obtener datos exactos.

Por otro lado, en la Figura 14, se encuentra el registro fotográfico de la extracción pigmentos liposolubles, donde se observa que la coloración de la muestra extraída con sal tiene una coloración amarillo claro, en cambio el blanco presenta un color verde.

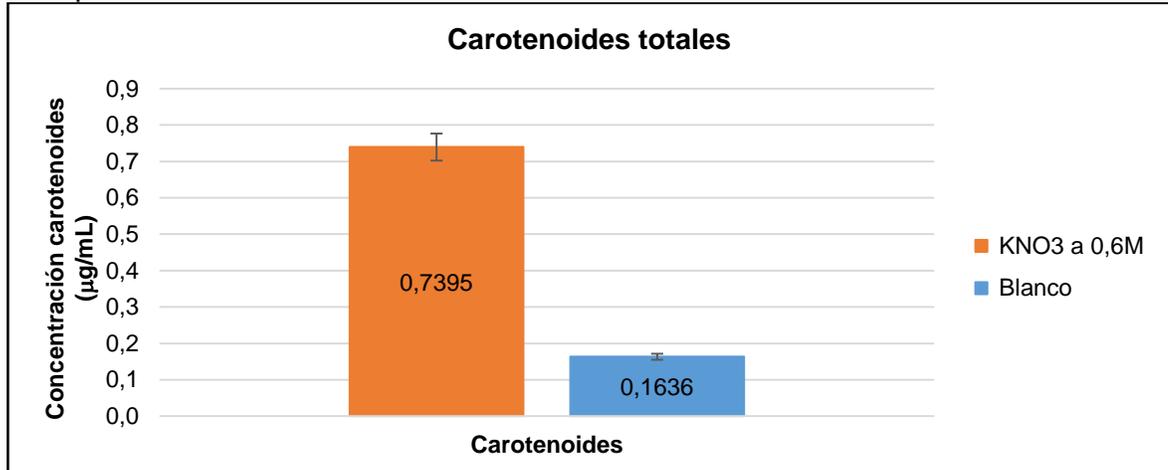
Figura 14. Registro fotográfico de la extracción de pigmentos liposolubles del experimento



Fuente: elaboración propia

Sin embargo, es necesario la cuantificación para corroborar lo presenciado en el análisis cualitativo. Al observar la gráfica 21, se determina que KNO₃ a 0,6M fue el cultivo que más generó carotenoides totales, siendo de 0,7395 µg/mL de la muestra, con respecto al blanco que reportó un valor de 0,1636 µg/mL. Con base en los resultados se presenta un comportamiento análogo al especificado en el pre-experimento de la etapa dos, ya que el cultivo del blanco reportó presencia de carotenoides, porque posiblemente hay metabolitos primarios, presentándose en bajo proporción, debido a que estos se generan en mayor cantidad en la fase de crecimiento y la cuantificación se realizó cuando la mezcla estaba en fase estacionaria. En cuanto a la muestra que contenía el factor de estrés en la fase estacionaria, siendo salinidad (KNO₃ a 0,6M), se favoreció la generación de metabolitos secundarios; sin embargo, para tener mayor certeza de lo analizado es recomendable realizar una cromatografía para así determinar qué metabolitos están presentes en la muestra.

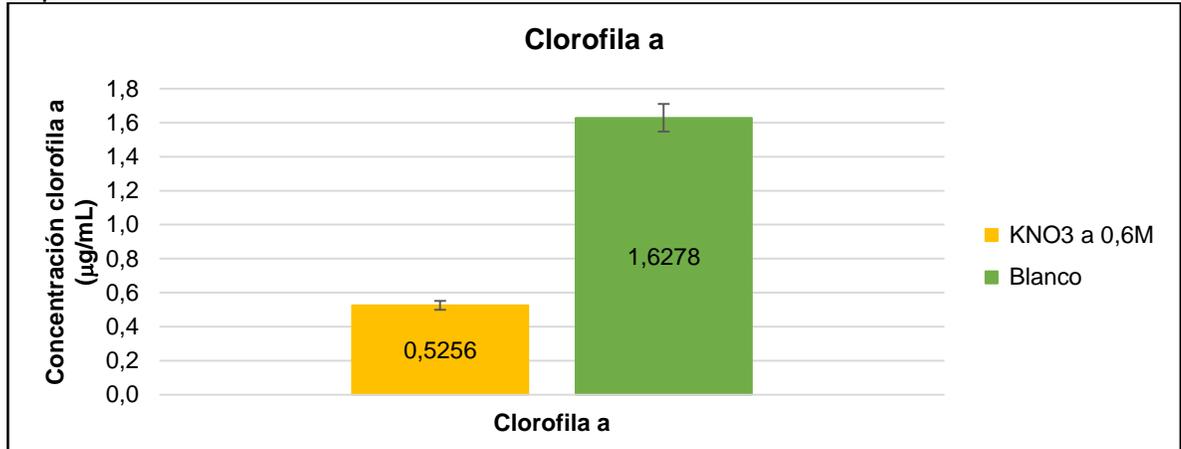
Gráfica 21. Carotenoides totales de la muestra del cultivo con KNO_3 y el Blanco en el experimento



Fuente: elaboración propia

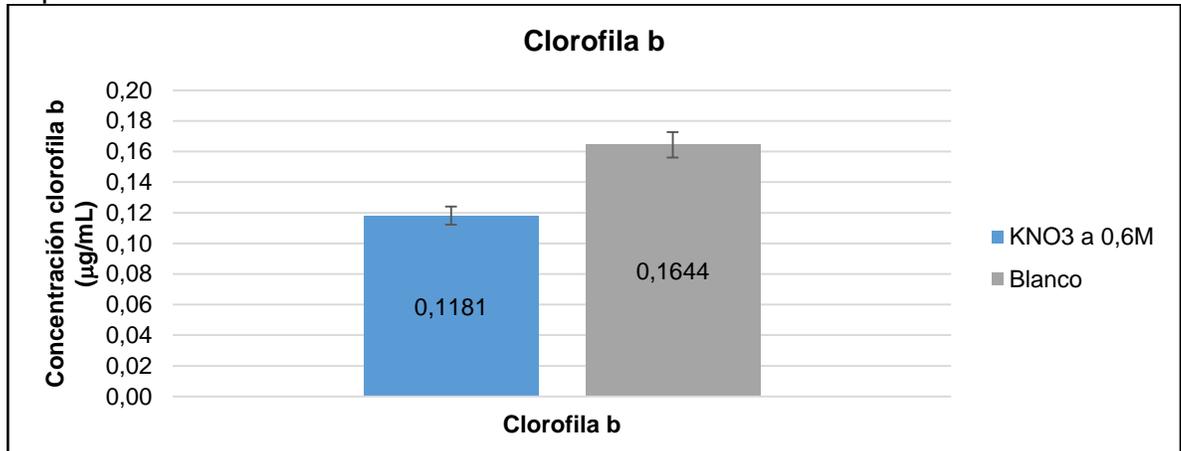
Por otro lado, por la técnica de espectrofotometría se cuantificaron la clorofila a y b, obteniendo las gráficas 22 y 23. En la gráfica 22, se observa que el blanco reporta una concentración de 1,6278 µg/mL muestra de clorofila a, mayor que la reportada por la muestra que contenía sal (0,5256 µg/mL muestra); esto se debe a que la clorofila se presencia a través de una coloración verde, por ende, al tener el blanco una coloración verde oscuro, la proporción de clorofila es mayor que la muestra con KNO_3 que presentó una coloración amarilla verdosa. En cuanto a la gráfica 23, en el blanco presentó 0,1644 µg/mL de clorofila b y en la muestra con sal de 0,1181 µg/mL. Se evidencia que al presentarse menor concentración de clorofila b, se reduce la de la clorofila a, ya que la clorofila b permite transmitir la energía absorbida a las moléculas de clorofila a implicadas en el proceso. Por consiguiente, si está en menor proporción este pigmento accesorio no se transmitirá la energía necesaria para la generación de la clorofila a la cual está implicada en las reacciones luminosas; además al haber mayor presencia de carotenoides se presenta menor concentración de clorofilas.

Gráfica 22. Clorofila a total de la muestra del cultivo con KNO₃ y el Blanco en el experimento



Fuente: elaboración propia

Gráfica 23. Clorofila b total de la muestra del cultivo con KNO₃ y el Blanco en el experimento



Fuente: elaboración propia

Al comparar los resultados obtenidos con el trabajo de Přebyl del 2016 donde obtuvieron $34 \mu\text{g mL}^{-1}$, se puede observar una gran diferencia en los carotenoides totales, ya que tanto las condiciones de operación como la especie de microalga usadas en ambos trabajos son diferentes, como se explicó previamente en la sección 3.2.2.4; sin embargo, comparando los resultados obtenidos en el pre-experimento de la etapa dos con los obtenidos en el experimento, se observó mayor generación de carotenoides al escalar el proceso en el fotobiorreactor adaptado de 4 L que en el de 375 mL, obteniendo en el experimento $0,7395 \mu\text{g/mL}$ y en pre-experimento etapa dos $0,3357 \mu\text{g/mL}$, presentando una diferencia de $0,4038 \mu\text{g/mL}$. Con base en esto, se evidencia que es adecuado escalar el proceso, sin embargo, al escalar el proceso no se logró manejar las variables externas y la de concentración de inóculo inicial, debido a que en el experimento fue de $2 \times 10^6 \text{ cel/mL}$,

en cambio en el pre-experimento etapa dos de $4,03 \times 10^5$ cel/mL, por ende, esto genera que se presente variabilidades en el proceso de generación ya que inicialmente se tiene una mayor concentración celular, teniendo una diferencia con el pre-experimento etapa dos de $1,597 \times 10^6$ cel/mL, conllevando a que posiblemente fuera una variable que hizo presentar una mayor concentración del metabolito de interés, favoreciendo así la productividad del proceso.

Finalmente, se logra analizar que para la especie de microalga *Scenedesmus dimorphus* la máxima concentración de carotenoides obtenida según las variables planteadas en la metodología fue de $0,7395 \mu\text{g/mL}$. Sin embargo, al compararlo con lo reportado en el artículo "The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus sp.*"¹⁴¹, en el cual se obtuvo $34 \mu\text{g/mL}$, se presenta una diferencia de $33,2605 \mu\text{g/mL}$ con lo obtenido, siendo un indicativo de que a nivel de generación del metabolito de interés se presentó una baja productividad, esto se debe a que en el artículo se usaron variables diferentes al poner en marcha el proceso (especificadas en la sección 3.2.2.5), donde las más relevantes son el uso de la misma especie de microalga pero con una modificación genética, el volumen fue a escala piloto (150 Litros) y entre otros factores que conllevan a presenciar variación en los resultados.

Con base en esto, de forma análoga a lo analizado en el pre-experimento etapa dos, se identifica que la incidencia lumínica es un factor primordial para la generación de carotenoides y a lo largo del desarrollo de la parte pre y experimental, este factor presentó un gradiente en cada cultivo al igual que puntos muertos de luz por la geometría del fotobiorreactor, además la falta de equipos de control para las variables de temperatura, luz, agitación, entre otros, generan afectación en los resultados.

3.3.5 Liofilización de la muestra y extracción-cuantificación de los lípidos del experimento. De manera inicial se llevó a cabo la liofilización de la biomasa proveniente del cultivo que contenía el factor de estrés (KNO_3 a $0,6\text{M}$), este proceso se realizó de acuerdo a lo planteado en la sección 2.3.5 de la metodología según lo especificado por el "Laboratorio de nutrición animal" de la Universidad Nacional de Colombia en el cual se efectuó el servicio. Siendo importante resaltar que la muestra se entregó concentrada (100 mL), logrando esto por sedimentación del cultivo y una posterior centrifugación; para así obtener la muestra liofilizada, como se observa a través del registro fotográfico presente en la Figura 15.

¹⁴¹PŘIBYL, P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus sp.*

Figura 15. Registro fotográfico muestra concentrada y liofilizada de cultivo con KNO_3 a 0,6M



Fuente: elaboración propia

Por otro lado, como se reporta en el Anexo M, el porcentaje de materia seca en base húmeda fue de 8,8 y esto corresponde a 5,7 gramos de muestra seca.

Posteriormente, la extracción se hizo por el método Folch y la cuantificación por cromatografía HPLC, ambos procedimientos realizados por el “Laboratorio de Toxicología” de la Universidad Nacional de Colombia, esto se realizó según lo descrito en el numeral 2.3.6 de la metodología, los resultados que se obtuvieron reportan en el Anexo M.

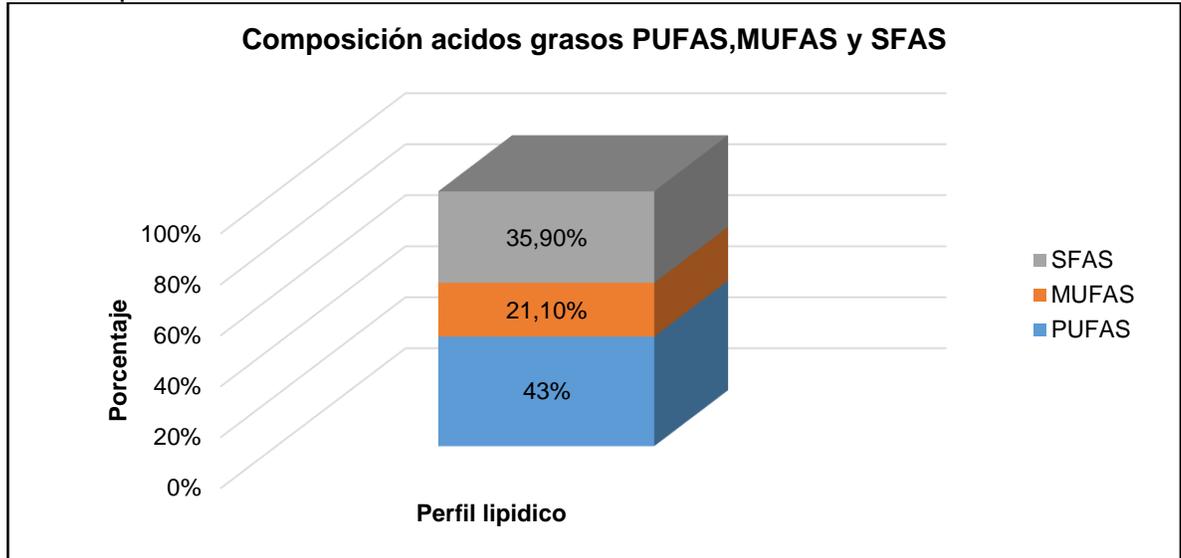
A nivel general, por medio de la gráfica 24, se observa que el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAS) es de 21,1%, poliinsaturados (PUFAS) de 43% y saturados (SFAS) de 35,9%. Con base en lo anterior, el mayor porcentaje corresponde a los ácidos grasos poliinsaturados, los cuales poseen uno o más dobles enlaces, estos se clasifican en omega-3 y omega-6; seguido de estos se encuentran los ácidos grasos saturados, que cuentan con enlaces sencillos, y por último los ácidos grasos monoinsaturados, con un solo enlace doble. A nivel nutricional, los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados son esenciales a nivel nutricional, esto se debe a que no pueden ser sintetizados por los seres humanos en cantidades suficientes, por ende, deben ser aportados por los alimentos o suplementos; dentro de sus características se resalta que poseen efecto preventivo para enfermedades¹⁴². En cambio, con respecto a los ácidos grasos saturados, el consumo elevado de estos conlleva al aumento del colesterol denominado malo (LDL) y aumenta la probabilidad del desarrollo de obesidad, enfermedades neurodegenerativas, diabetes entre otras¹⁴³. En la gráfica 25, se observa el porcentaje presente de omega 3 y 6 en los ácidos grasos poliinsaturado, donde en mayor proporción se encuentra el omega-6 (34%) y omega-3 (8,9%), dando un total de PUFAS de 43%; de forma general los omegas son ácidos grasos esenciales y su consumo complementario benefician la salud¹⁴⁴.

¹⁴² FAO. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana.

¹⁴³ CABEZAS, C. HERNANDEZ, B y VARGAS, M. Aceites y grasas: efectos en la salud y regulación mundial.

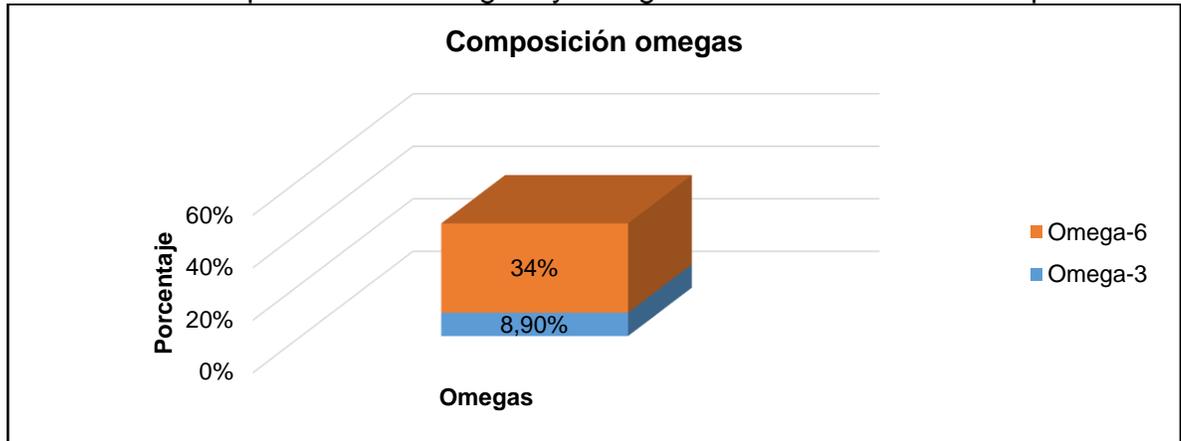
¹⁴⁴ ACEITES OMEGA 9. ¿Cómo se complementan los omega-3, 6 y 9?. [En línea].

Gráfica 24. Composición de ácidos monoinsaturados, poliinsaturados y saturados en el experimento



Fuente: elaboración propia

Gráfica 25. Composición de omega-3 y omega-6 en los PUFAS en el experimento



Fuente: elaboración propia

Al comparar los resultados obtenidos con los encontrados en los trabajos de grado de la línea de investigación de microalgas del grupo BIOTECFUA, se evidencia lo siguiente: En la tesis titulada “Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio” elaborada por Gina Chaparro en el 2017, donde se usó como medio de cultivo suero lácteo, obteniendo 34,6% de PUFAS, MUFAS de 33,6%, SFAS de 31,8%, omega-3 de 3,4% y omega-6 de 31,2%; se encontró que al usar como factor de estrés la salinidad (KNO_3 a 0,6M) se incrementó el porcentaje de PUFAS en un 8,4%, en MUFAS se encontró un porcentaje menor (21,1%), SFAS se aumentó en 4,1%, omega-3 incremento en 5,5% y en omega-6 en 2,8%. De forma análoga, en la tesis “Evaluación de las incidencias de salinidad y pH sobre la biomasa, productividad y

acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana” de Gregorio Hernández en el 2014, para un pH de 7 en el cual se presentó la máxima productividad y el mejor comportamiento en el crecimiento, se obtuvo de PUFAS 12%, MUFAS de 26,5%, SFAS de 52,3%, omega-3 de 12% y omega-6 de 9,2%; por ende al compararlo con lo obtenido en la presente experimentación, se incrementó en 31% los PUFAS, en MUFAS se disminuyó en 5,4%, en SFAS redujo en 16,4%, en omega-3 disminuyó un 3,1% y en omega-6 aumentó en 24,8%. Con base en lo anterior, se puede evidenciar que el estrés por salinidad favoreció la generación de ácidos grasos poliinsaturados; sin embargo, hay una presencia considerable de ácidos grasos saturados, además se trabajó con una especie distinta, identificando un potencial de producción de lípidos en *Scenedesmus dimorphus*.

Con respecto a lo encontrado en las investigaciones realizadas, por medio del artículo titulado “Efecto del estrés inducido por deficiencia de sales nutritivas en un sistema de cultivo Raceway Awl de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* en la obtención de aceite” elaborado por Manrique, Torres, Silva y Salas, en el 2014, donde a un 15% de sales nutritivas en el medio de cultivo de *Scenedesmus dimorphus*, se obtiene 10 gramos por 10 Litros de cultivo, generando 3 gramos de lípidos, siendo 31% de peso seco, los cuales se encuentran dentro del rango normal reportado en la literatura (16-40%); en cambio reportan que para *Chlorella vulgaris*, obtuvieron 8,9 gramos en 10 Litros, lo que corresponde a 1,9 gramos de lípidos (21% de peso seco), encontrándose en el rango reportado para esa especie de 14-22%. Al comparar esto, con lo obtenido en el presente trabajo de grado, se evidencia que en 2,05 Litros, por medio de liofilización se obtuvieron 5,7 gramos, de los cuales se extrajeron 3 gramos de lípidos, siendo 1,29 g de PUFAS, 0,633 g de MUFAS y 1,077 de SFAS; esto corresponde a 52,63% en peso seco, siendo superior a lo reportado en el artículo, con respecto a la misma especie usada (*Scenedesmus dimorphus*); además se rectifica que esta especie posee un potencial de generación de lípidos superior que para *Chlorella vulgaris*.

Es importante tener en cuenta que la generación de lípidos se ve alterada por las condiciones del cultivo, ya que las microalgas al presentar una condición de estrés presentan una alteración en el metabolismo, ocasionando que las células redireccionen la energía usada para su división en el almacenaje de lípidos, dando como resultado el incremento del volumen final extraído. No obstante, para la extracción de estos se requiere la ruptura de la pared celular, originando un incremento en costo del proceso, específicamente en la generación de biocombustibles, por ende lo que se propone es aprovechar dicho residuo de la extracción, ya que es rico en carbohidratos y proteínas¹⁴⁵. A partir de esto, una de las aplicaciones como se mencionó anteriormente son los biocombustibles, los cuales poseen un rendimiento de conversión menor al ser generados por medio de

¹⁴⁵ EOIS. Las microalgas “trabajan” mejor estresadas. [En línea].

lípidos polares, lo cuales se producen el crecimiento activo celularmente; por consiguiente, cuando la microalga se somete a condición de estrés (salinidad), la tasa de crecimiento disminuye o se estanca, favoreciendo compuestos como carbohidratos y lípidos neutros (abundantes en triglicéridos), que favorece la calidad del biodiesel¹⁴⁶. Otras de las aplicaciones de los lípidos obtenidos a través de la microalgas, son enriquecimiento de alimento para peces, fuente de ácidos grasos esenciales en la dieta humana, suplemento para alimentos, otras¹⁴⁷.

Posteriormente, según lo obtenido en la cromatografía, la caracterización de lípidos se especifica en la Tabla 13, siendo:

Tabla 13. Perfil lipídico del cultivo con KNO₃ a 0,6M en el experimento

Nombre	% Ácidos grasos
Ácido mirístico (C14:0)	2,10%
Ácido miristoleato (C14:1)	0%
Ácido pentadecanoato (C15:0)	0%
Ácido pentadecenoato (C15:1)	0%
Ácido palmitico (C16:0)	22,50%
Ácido palmitoleico (C16:1)	1,73%
Ácido margarico (C17:0)	1,67%
Ácido heptadecenoico (C17:1)	1,15%
Ácido estearico (C18:0)	9,60%
Ácido elaidico (C18:1n-9t)	0%
Ácido oleico (C18:1n-9c)	17,80%
Ácido cis-vaccenico (C18:1n-7)	0,40%
Ácido linoleico (C18:2n-6c)	34%
Ácido g-linoleico (C18:3n-6)	0%
Ácido linolenico (C18:3n-3)	8,90%
Total	100%

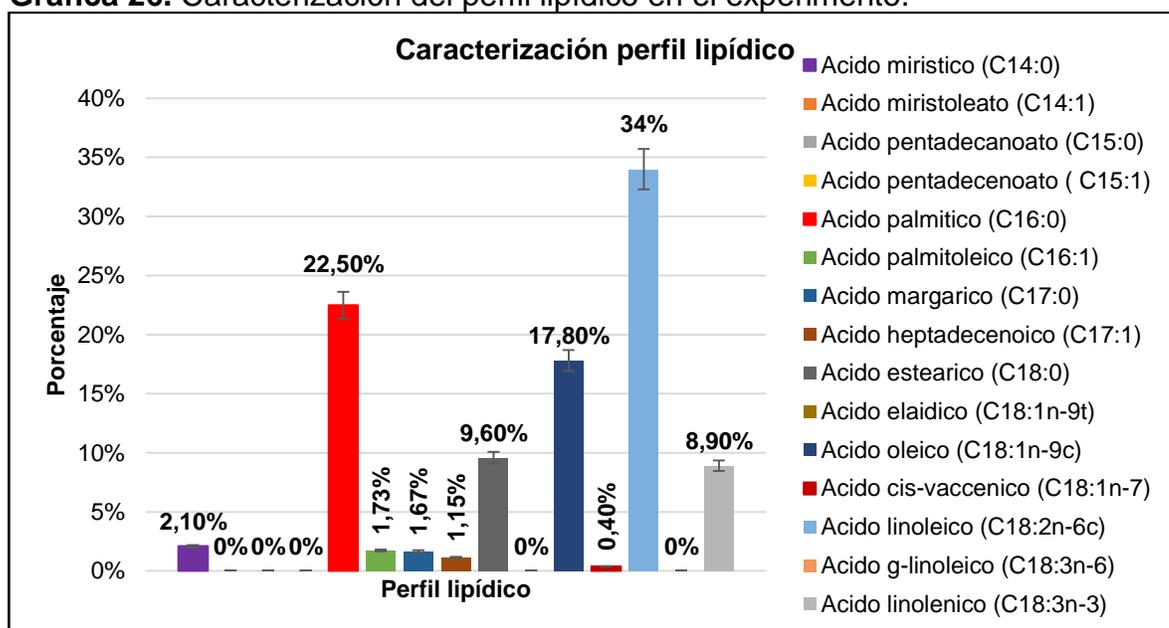
Fuente: elaboración propia

¹⁴⁶ Ibid., [En línea].

¹⁴⁷ MANRIQUE, J. TORRES, M. SILVA, D y SALAS, J. Efecto del estrés inducido por deficiencia de sales nutritivas en un sistema de cultivo Raceway Awl de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* en la obtención de aceite.

Por medio de la gráfica 26, se observa que no hay presencia de ácido miristoleato, pentadecanoato, pentadecenoato, elaidico y g-linoleico. Con respecto a los ácidos grasos poliinsaturados están el linoleico (34%) y linolenico (8,9%), los monoinsaturados son palmitoleico (1,73%), oleico (17,8%), cis-vaccenico (0,4%) y heptadecenoico (1,15%); y los saturados son ácido palmítico (22,50%), esteárico (9,6%), mirístico (2,10%), margárico (1,67%). Para los poliinsaturados el ácido linoleico (omega 6), está en mayor proporción, el cual se encuentra en suplementos alimenticios, bebidas lácteas, alimentos para perros y otros, este incrementa las defensas y es un potente antioxidante; en los monoinsaturados el palmitoleico (omega 7), cuenta con el porcentaje más alto, este se encuentra en la leche materna y aceites vegetales, estos son útiles para evitar la obesidad; y por último en los saturados el de mayor porcentaje fue el palmítico, el cual se encuentra en la cera de abejas, se usa para la elaboración de jabones y cosméticos¹⁴⁸.

Gráfica 26. Caracterización del perfil lipídico en el experimento.



Fuente: elaboración propia

Al comparar los resultados con las tesis dichas anteriormente, se observa que en la titulada “Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio” elaborada por Gina Chaparro en el 2017, se obtuvo mayor variedad de ácidos grasos, obteniendo en mayor proporción el ácido linoleico en un 25,67%; en cuanto a la tesis titulada “Evaluación de las incidencias de salinidad y pH sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana” de Gregorio Hernández en el 2014, el máximo porcentaje fue de 33,4% para el ácido palmítico.

¹⁴⁸ FAO. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana.

Comparando con los resultados de la Tabla 13, el que mayor presentó porcentaje fue el ácido linoleico con un 34%; a partir de esto, se analiza que en el presente trabajo se superó lo obtenido en dichos trabajos y además perteneciente a la clasificación de ácidos esenciales (poliinsaturado), dando un indicativo de que el factor de estrés de salinidad en la especie *Scenedesmus dimorphus* a las condiciones trabajadas, favoreció de forma adecuada y considerable la generación de lípidos. Por ende, se puede especificar que para el cultivo con salinidad se obtuvieron 0.0012 gramos en peso seco de carotenoides y 3 gramos en peso seco de lípidos; por ende, la proporción es 1:2500 de carotenoides y lípidos respectivamente.

3.3.6 Peso seco y productividad del experimento. En primera instancia se realizó la centrifugación de 1,65 L que correspondían al cultivo microalgal denominado blanco, seguidamente se desechó el sobrenadante y la pastilla microalgal se recolectó en moldes de aluminio. Posteriormente se secó la biomasa siguiendo la metodología del numeral 2.3; evidenciado en la Figura 16.

Figura 16. Registro fotográfico del peso seco del blanco del experimento

**Molde con biomasa
Húmeda**



Molde con biomasa seca



Biomasa seca



Fuente: elaboración propia

El peso de la biomasa seca se determinó por medio de la ecuación 10, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 52 del Anexo N, cada uno de estos pesos se sumó obteniendo un total de 2,6633 g de biomasa seca; sabiendo que el cultivo se mantuvo por un total de 30 días, se aplicó la ecuación 11 de la siguiente forma:

$$\text{Productividad del blanco} \left[\frac{g}{L * \text{Día}} \right] = \frac{2,6633g}{1,65L * 30 \text{ Días}} = 0,0538$$

De igual forma para los 2,05 L del cultivo de KNO₃, se siguió la descripción de la sección 3.3.5, donde se realizó una separación inicial del medio de cultivo por medio de centrifugación y posteriormente se liofilizo en el “Laboratorio de nutrición animal” de la Universidad Nacional de Colombia, en donde se obtuvo un total de 5,7 gramos de biomasa seca. Con el peso seco obtenido se calcula la productividad de la siguiente manera:

$$\text{Productividad del cultivo KNO}_3 \left[\frac{g}{L * \text{Día}} \right] = \frac{5,7g}{2,05L * 30 \text{ Días}} = 0,0927$$

Como se puede observar la productividad obtenida por el cultivo de KNO₃ fue aproximadamente el doble que la obtenida por el cultivo denominado blanco, esto se debió a los diferentes métodos con los que obtuvo el peso seco. Por el lado del blanco, el secado se realizó con un horno, lo que pudo haber degradado algo de la biomasa, mientras que el secado por liofilización realizado para el cultivo de KNO₃, fue un tratamiento menos agresivo que mantenía la integridad del cultivo para su posterior análisis por cromatografía, igualmente el volumen obtenido al finalizar el experimento fue mayor en el cultivo de KNO₃ lo que fue otro factor importante para la diferencia en productividades.

Comparando la productividad obtenida por ambos cultivos con otros trabajos como el titulado “Evaluación de la remoción de cromo con cultivos de microalgas en un fotobiorreactor de panel plano”¹⁴⁹ donde la productividad obtenida en 14 días de cultivo fue de 0,372 gL⁻¹Día⁻¹, se puede observar como la productividad obtenida por el presente trabajo, fue significativamente inferior, aun siendo la misma especie en ambos trabajos. Esto se puede explicar a la influencia de la luz en el crecimiento del cultivo, ya que el fotobiorreactor de panel plano, utilizado por los autores, permitía una mejor incidencia de la luz en todo el cultivo; mientras que en el presente trabajado no se contaba con un fotobiorreactor de estas características, siendo necesaria la adaptación de uno. Sin embargo, presentaba la desventaja de que posiblemente había puntos en el cultivo, donde le luz no tenía una buena incidencia, lo que se mejoraba con la agitación, pero aun así no se igualaba a la eficiencia que produce un fotobiorreactor de panel plano.

3.4 CUARTA FASE

Actualmente existe una creciente demanda de pigmentos producidos naturalmente, ya que se ha evidenciado que los pigmentos sintéticos representan un peligro para la salud humana. En el 2014 la producción natural de pigmentos no supera el 1%

¹⁴⁹ FONSECA, L. GUARÍN, M. Evaluación de la remoción de cromo con cultivos de microalgas en un fotobiorreactor de panel plano.

del total de pigmentos comercializados mientras que los pigmentos sintéticos ocupan más del 90% de este mercado¹⁵⁰, estudios revelan que la producción de pigmentos naturales tiene un costo aproximado de \$1000 dólares/kg¹⁵¹, sin embargo, los precios en el mercado son muy atractivos para la industria ya que estos van desde \$2,500 a 7,000 dólares kg⁻¹ y en algunos casos hasta \$15,000 dólares kg⁻¹ debido al alto grado de pureza¹⁵².

Los costos comunes mostrados en la Tabla 14, están asociados a los materiales, materias y equipos, estos hacen parte de los activos necesarios para la producción de la biomasa microalgal. Sin embargo, no es oportuno que sean analizados, ya que no se presentó variación de estos a lo largo del experimento y sí incrementan de manera significativa el costo por gramo de biomasa producida y carotenoides producidos, pero es adecuado que sean mencionados porque hacen parte de los costos necesarios del proceso de producción. A continuación, se muestran los resultados obtenidos de aplicar la ecuación 14, de la sección 2.4 de la metodología:

Tabla 14. Costos comunes asociado a materias, materiales y equipos experimento

Costos comunes			
Elementos utilizados para los cultivos	Costo unitario	Cantidad	Subtotal
Cinta LED	\$12.000	2	\$24.000
Temporizador	\$18.500	1	\$18.500
Toallas desechables adsorbentes	\$4.000	1	\$4.000
Adaptador	\$18.000	1	\$18.000
Bomba	\$12.000	4	\$48.000
Cava de icopor	\$21.000	1	\$21.000
Beaker 250 mL	\$11.500	3	\$34.500
Pipeta (10 mL)	\$30.000	1	\$30.000
Manguera 3/16 (m)	\$1.800	4	\$7.200
Recipientes de vidrio (4L)	\$4.000	4	\$16.000
Papel filtro	\$775	3	\$2.325
Cámara de Neubauer	\$81.813	1	\$81.813
Centrifuga	\$6.600.000	1	\$6.600.000
Espectrofotómetro	\$5.823.000	1	\$5.823.000
Celda de espectrofotómetro	\$5.188	3	\$15.563
Microscopio	\$2.082.000	1	\$2.082.000
Tubos de ensayo tipo rosca	\$1.200	8	\$9.600

¹⁵⁰BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae - their development and commercialization.

¹⁵¹LI, J. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*.

¹⁵²KOLLER, M. Microalgae as versatile cellular factories for valued products.

Tabla 14. (Continuación)
Elementos utilizados para los cultivos

	Costo unitario	Cantidad	Subtotal
Embudo vidrio	\$45.000	2	\$90.000
Horno	\$6.989.000	1	\$6.989.000
Termómetro	\$63.000	1	\$63.000
Pipeta Pasteur (3mL)	\$104	2	\$207
Acetona al 90 % (mL)	\$34	15	\$513
Cepa de microalga <i>Scenedesmus dimorphus</i>	\$400.000	1	\$400.000
Fertilizante Foliagro (mL)	\$12	18	\$216
Sal KNO ₃ (g)	\$150	139	\$20.838
Total			\$22.378.437

Fuente: elaboración propia

La cepa de microalga *Scenedesmus dimorphus*, hace parte del medio de cultivo y es la que genera el metabolito de interés, por lo cual es considerada como la materia prima más importante, y el costo de la cepa hace parte de una inversión inicial, por ende, no es necesario volver a adquirirla, esto se debe a que si la microalga cuenta con las condiciones necesarias para su crecimiento y reproducción, se puede utilizar para todos los procesos de producción siguientes¹⁵³.

Por otro lado los costos de operación o servicios fueron calculados con la ecuación 15, de la sección 2.4 de la metodología, consultando las tarifas de agua y energía de las respectivas entidades que prestan el servicio, suponiendo un sector comercial de estrato 3, la tarifa del agua corresponde a \$ 2444 COP¹⁵⁴ por m³, y la tarifa de energía eléctrica corresponde a \$479 COP¹⁵⁵, obteniendo los resultados presentados en la Tabla 15, la cual se muestra a continuación:

¹⁵³MURCIA, L. y PARRA, M. Producción de proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* enriqueciendo el medio de cultivo con fuentes de nitrógeno.

¹⁵⁴ ACUEDUCTO DE BOGOTÁ. Tarifas de cargo fijo y consumo del agua 2018.

¹⁵⁵ CODENSA. Tarifario septiembre 2018.

Tabla 15. Costos operativos o de servicios asociados al consumo de agua y energía eléctrica en el experimento

Costos operativos o de servicios					
Costos de operación (OPEX)	Consumo	Horas	Medio stock	Medio control o blanco	Medio salino
Consumo de energía Cinta LED (kW)	0,0144	348	\$2.400	\$2.400	\$2.400
Balanza analítica (kW)	0,008	0,3	-	\$1	\$1
Centrifuga (kW)	1,5	1	-	\$719	\$719
Espectrofotómetro (kW)	1	0,5	-	\$240	\$240
Microscopio (kW)	0,007	348	-	\$1.167	\$1.167
Horno de secado (kW)	3	18	-	\$25.866	\$25.866
Bomba (kW)	0,005	696	\$1.667	\$3.334	\$3.334
Agua potable	Costo unitario	Cantidad	Medio stock	Medio control	Medio salino
Consumo fijo (m ³)	\$2.444	0,003	\$7	\$7	\$7
Consumo de servicio (m ³)	\$2.444	0,008	-	\$20	\$20
Hielo (g)	\$1,20	200	-	\$240	\$240
Subtotal			\$4.075	\$33.993	\$33.993
Total				\$72.061	

Fuente: elaboración propia

Igualmente se tuvo en cuenta el costo de los procedimientos o análisis realizados con una entidad externa a la universidad, entre estos se encuentra la liofilización y el análisis cromatográfico de lípidos, realizados por el “Laboratorio de Toxicología” de la Universidad Nacional. Los resultados estos se muestran a continuación:

Tabla 16. Costos de la liofilización de la biomasa y la cromatografía de lípidos en el experimento

Costos por procedimientos o análisis externos	
Procedimiento o análisis externos	Costo
Procedimiento de liofilización (100g)	\$38.000
Cromatografía de lípidos	\$353.900
Total	\$391.900

Fuente: elaboración propia

Finalmente se sumaron los costos parciales de todos los recursos utilizados para la producción de Biomasa, carotenoides y el análisis de los resultados, obteniendo la Tabla 17 mostrada a continuación:

Tabla 17. Costos totales del proceso experimental y el análisis de resultados en el experimento

Costos totales del experimento	
Costos comunes para el proceso de producción asociado a materias, materiales y equipos	\$22.378.437
Costos operativos	\$72.061
Costos por procedimientos o análisis externos	\$391.900
Total	\$22.842.398

Fuente: elaboración propia

Para lograr comparar los costos aproximados invertidos en materiales con los carotenoides totales obtenidos en el experimento, y hacer un análisis al respecto fue necesario hallar la productividad volumétrica, la cual fue de $0,0927 \text{ g L}^{-1} \text{ Dia}^{-1}$, y el total de carotenoides, siendo de $0,7395 \mu\text{g/mL}$. Sabiendo que el volumen final fue de 2,05L, el total de carotenoides obtenido fue de 0.0012 g.

Sin embargo, al comparar estos resultados con los costos manejados en el mercado para la biomasa y los carotenoides de microalga, los resultados por gramo presentados en el presente trabajo siguen siendo bajos comparados con los costos. No obstante, los costos y los rendimientos pueden mejorarse al implementar procesos a mayor escala, con innovaciones tecnológicas, condiciones estrictamente controladas o inclusive modificaciones genéticas a la especie.

4. CONCLUSIONES

- Se seleccionó como factor de estrés para favorecer la generación de carotenoides en la especie de microalga *Scenedesmus dimorphus*, a la salinidad debido a la alta puntuación obtenida en la matriz de selección; de esta forma en la matriz de selección del tipo de sal se eligieron NaCl, KNO₃, NaHCO₃, ya que tuvieron la misma puntuación. Siendo clave resaltar que la selección del factor tiene dependencia con base a tecnología presente en el Laboratorio de investigación de la Fundación Universidad de América, ya que por falta de sistemas de control no se logró implementar otro tipo de factor de estrés.
- El rango de concentración de 0,01M a 0,4M para NaCl, KNO₃ y NaHCO₃, no generó una disminución significativa en la concentración celular de los cultivos lo que indicó que la resistencia o tolerancia a la sal era superior a estos valores por lo que en el pre-experimento etapa dos se analizaron concentraciones mayores con el fin de generar un estrés significativo en las células y que beneficiará la generación de carotenoides por parte de la microalga.
- La concentración de 0,6 M de KNO₃ fue la que más generó carotenoides (0,3357 µg/mL) por parte de la microalga *Scenedesmus dimorphus*; con base a lo reportado por el análisis espectrofotométrico realizado en el laboratorio de investigación de la Universidad de América para el pre-experimento etapa dos. Sin embargo, el control de la temperatura especificado en el protocolo de extracción de pigmentos liposolubles no fue adecuado por falta de equipos de control; lo cual interfirió en los resultados obtenidos.
- Al escalar el proceso con respecto a las condiciones especificadas en el pre-experimento etapa dos y KNO₃ (0.6M), se obtuvo un total de carotenoides de 0,7395µg /mL, el cual demuestra un notorio aumento con respecto a la concentración del blanco, la cual fue de 0,1636 µg /mL; sin embargo, la concentración obtenida por el cultivo de KNO₃ es un indicativo de la baja concentración del metabolito al compararlo con otros artículos, lo que pudo ser debido a la presencia de un gradiente de luz (con respecto a la posición espacial de los fotobiorreactores adaptados con la cinta LED), igualmente afectado por la falta de equipos de control para las variables de temperatura, luz, agitación, entre otros.
- El perfil lipídico tuvo como resultado que el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAS) fue de 21,1%, poliinsaturados (PUFAS) de 43% y saturados (SFAS) de 35,9%, omega-6 (34%) y omega-3 (8,9%); siendo resultados favorables y rectifica que esta especie *Scenedesmus dimorphus*, posee un potencial de generación de lípidos, favorecido al aplicar el factor de estrés de salinidad.

- En el cultivo con salinidad se obtuvo 0.0012 gramos en peso seco de carotenoides y 3 gramos en peso seco de lípidos, por ende, la proporción es 1:2500 carotenoides y lípidos respectivamente; por lo cual la salinidad generó carotenoides, pero no en una proporción mayor a los lípidos, siendo un factor poco factible para la producción a gran escalar de carotenoides naturales, pero podría ser factible para una producción a gran escala de lípidos, sobre todo de omega 6.
- En cuanto a la productividad de biomasa, fue relativamente baja en comparación con otros trabajos, siendo mayor la productividad obtenida por el cultivo de KNO_3 a 0,6 M de $0.0927 \text{ gL}^{-1}\text{Dia}^{-1}$. Esto puede deberse a dos factores principales, el número de días totales del experimento y el tipo de fotobiorreactor, el cual no permitió un óptimo crecimiento de la microalga por el gradiente de luz.
- El total de carotenoides por gramo presentados en el presente trabajo siguen siendo muy bajos comparados con los costos de servicios necesarios para todo el proceso de cultivo, no obstante, esto puede ser mejorado al implementar procesos a mayor escala, con innovaciones tecnológicas, condiciones estrictamente controladas o inclusive modificaciones genéticas a la especie.

5. RECOMENDACIONES

- El proceso de liofilización es un método de secado costoso para grandes proporciones de biomasa, ya que dependiendo del contenido de humedad que tenga la muestra se incrementa el costo, por ende, se recomienda determinar las condiciones adecuadas para la realización del secado en horno, analizando como variable principal la temperatura, ya que se corre el riesgo de que los lípidos se desnaturalicen.
- El uso de centrifugación genera el rompimiento de la pared celular por la velocidad del sistema y esto genera una desventaja para la cuantificación de los compuestos de interés con respecto a lo obtenido en la siembra, por esto, se recomienda la sedimentación del cultivo en el fotobiorreactor durante 3 días, por lo cual se retirará el sistema de aireación; posteriormente, se sacará cuidadosamente el sobrenadante para así obtener la biomasa que se acumulara al fondo del equipo.
- Monitorear y controlar las condiciones de cultivo como temperatura, luz (incidencia y fotoperiodo), agitación, pH y otros, que influyen en la división celular y en la acumulación de carotenoides y lípidos.
- Para la acumulación de carotenoides, la geometría cilíndrica del fotobiorreactor adaptado de 4 Litros, no es la adecuada, ya que se presentan puntos muertos de luz, se recomienda una geometría plana para que se presente de forma equitativa la incidencia de luz. Además, se recomienda realizarle mantenimiento al reactor de panel plano del grupo de investigación BIOTECFUA, ya que se encuentra con fugas.
- Aplicar la condición de estrés desde el primer día de puesta en marcha para evaluar la generación de carotenoides primarios y determinar la influencia de producción sobre los carotenoides secundarios, los cuales se generan en fase estacionaria.
- Analizar y evaluar la influencia de estrés nutricional y lumínico en la generación de carotenoides totales en la especie *Scenedesmus dimorphus*.
- Evaluar de forma detallada la salinidad y tipos de sales para la generación de lípidos, planteando un diseño de experimento enfocado solo en esto, ya que según lo obtenido el factor potencializo la generación de forma considerable.
- Realizar la técnica de cuantificación de pigmentos liposolubles por espectrofotometría bajo enfriamiento de 4°C durante 16 horas con total oscuridad; además complementar con técnica cromatografica para determinar qué tipos de carotenoides se presentan en el cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

ACACIO, Noel., et al. Desarrollo de un procedimiento para la extracción de β -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.* en la salina Las Cumaraguas. Revista cubana de química. 2013. p 3

ACEITES OMEGA 9. ¿Cómo se complementan los omega-3, 6 y 9?. [En línea]. (2018). [Consultado: 1 de Noviembre de 2018]. Disponible en: <http://www.omega-9oils.com/la/arg/es/omega369.htm>

ACEVEDO, J. y RAMÍREZ, J. Influencia de un gradiente cruzado de luz y temperatura en la morfología de *Scenedesmus acutus* meyen var. *Globosus* Hortobágyi y sus implicaciones taxonómicas. Revista Actual Biol. Vol. 25, No. 79, 2003. p. 141-145.

ACOSTA, A. Crecimiento de *Scenedesmus sp* en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Vol. 15, No. 1, 2008. p. 25-31.

ACUEDUCTO DE BOGOTÁ. Tarifas de cargo fijo y consumo del agua 2018. [En línea]. (2018). [Consultado: 5 de Julio de 2018]. Disponible en: https://www.acueducto.com.co/.../2018/tarifas2018/Tarifas_BOGOTA_2018_Revisad

AGUILARA, C. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in *Chlorophyceae* species. Revista Biotechnology Reports. Vol. 10, 2016. p. 117-125.

ALBERTO, Juan. Fotoperiodo. [En línea]. (2009). [Consultado: 23 de Julio de 2018]. Disponible en: http://hum.unne.edu.ar/academica/departamentos/dptogeog/catedras/biogeografia/fac_eco_luz.pdf

ALCALDÍA MAYOR DE BOGOTÁ. El clima de Bogotá. [En línea]. (2018). [Consultado: 30 de Julio de 2018]. Disponible en: <http://www.bogota.gov.co/ciudad/clima>

ALIBABA. Nitrato de potasio. [En línea]. (2018). [Consultado: 27 de Julio de 2018]. Disponible en: <https://spanish.alibaba.com/g/potassium-nitrate-price.html>

AMAZON. Hydrofarm LGBQM Quantum PAR Meter Micromol Sensor. [En línea]. (2018). [Consultado: 28 de Julio de 2018]. Disponible en: <https://www.amazon.com/Hydrofarm-LGBQM-Quantum-Micromol-Sensor/dp/B0055F59LA>

ANDERSEN, R. Algal Culturing Techniques. Editorial Elsevier and Phycological Society of America. San Diego, California. 2005.

ANGEL, María 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.

ARENAS, Iván y LÓPEZ, José. Espectrofotometría de absorción. Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México.2004. p.2.

ARGUEDAS, Patricia; MORA, Jesús; SANABRIA, Junior. Comparación del contenido de carotenoides en productos nutracéuticos elaborados a partir de dos variedades de camote y yuca. Tecnología en Marcha. Vol. 28, No. 4, Octubre-Diciembre. p. 42-53.

ARIAS, Alvaro. Optimización de la producción de carotenoides por *Haloferax sp.* utilizando el método de superficie de respuesta. Universidad Nacional de San Marcos.2014.

ARIAS, Trinidad. CAÑIZARES, Olivia. MARTÍNEZ, Alfredo. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Acta biol. Colomb. Vol. 18, No. 1, 2013. ISSN electrónico 1900-1649. ISSN impreso 0120-548X. p. 43-68.

ARNÁIZ, C., ISAC, L., LEBARTO, J. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Grupo de tratamiento de aguas residuales. Escuela Universitaria Politécnica Sevilla. 2000. p. 45.

ARREDONDO, B y VOLTOLINA, D. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la Biomasa Microalgal. Capítulo 2: Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. 2007.

ARREDONDO, B. y VOLTOLINA, D. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la Biomasa Microalgal. Capítulo 3: Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. 2007. ISBN: 968-5715--51-3. p.24.

ARREDONDO, B. y VOLTOLINA, D. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la Biomasa Microalgal. Capítulo 7: Determinación de pigmentos por espectrofotometría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. 2007.

BENAVENTE, J. Tecnología de Cultivo de Microalgas en fotobiorreactores. Facultad de Ciencias Químicas. México. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila Vol. 4 No. 7, 2012.

BENINTENDE, S., SANCHEZ, C. Crecimiento bacteriano. [En línea]. (s.f.). [Consultado: 28 de Junio de 2018]. Disponible en: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf

BERENGUEL, M. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. Revista Journal of Process Control. Vol. 14, 2004. p. 377-387.

BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. Revista Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 63 No. 4, 2004. p. 351-361.

BLANCO, L. Lípidos no relacionados con ácidos grasos. Terpenoides, carotenoides, esteroides. [En línea]. (2016). [Consultado: 28 de Noviembre de 2018]. Disponible en: <https://slideplayer.es/slide/11399020/>

BOROWITZKA, M. High-value products from microalgae - their development and commercialization. Revista J. Appl. Phycol. Vol. 25, 2013. p. 743-756.

BRAND. Cámaras de recuento. [En línea]. (s.f.). [Consultado: 23 de Julio de 2018]. Disponible en: https://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkaammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkaammern_s.pdf

BRENNAN, L. Biofuels from Microalgae- A Review Technologies for Production, Processing and Extractions of Biofuels and Co-productos. Revista Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 14 No. 2, 2010. p. 557-577.

CABEZAS, Claudia. HERNANDEZ, Blanca y VARGAS, Meiler. Aceites y grasas: efectos en la salud y regulación mundial. Rev. Fac. Med. 2016 Vol. 64 No. 4: 761-8.2016.

CAMACHO, F. Influencia pH en el crecimiento Heterotrófico de la *Chrorella pyrenoidosa*. Revista Afinidad. Vol. 411, 1988. p. 395-399.

CARVALHO, A. Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. Revista Biotechnol. 2006.

CASAL, Carlos; FORJAN, Eduardo; VÍLCHEZ, Carlos. Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation. Applied Microbiology A. Méndez-Vilas (Ed.). 2014.

CASTRO, Norma y PEDRIQUE, Magaly. Reproducción y crecimiento microbiano. UCV. 2008. p.4.

CEBALLOS, A. Estudio comparativo de tres sistemas de secado para la producción de un polvo deshidratado de fruta. 2008. p. 35.

CETZ, Arely. Conceptos básicos de cromatografía. Instituto tecnológico de merida. 2017. p.3.

CHAPARRO, G. Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de Laboratorio. Fundación Universidad de América. 2017.

CODENSA. Tarifario septiembre 2018. [En línea]. (2018). [Consultado: 11 de Octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.codensa.com.co/hogar/tarifas>

CONDE, Claudia. Escalamiento: el arte de la ingeniería química. [En línea]. (s.f.). [Consultado: 23 de Julio de 2018]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/serendipia030516/home>

CONTRERAS, Coral, et al. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Redalyc Rev. Cient. América Lat., Vol. 28, No. 8, 2003. p. 8.

CRUZ, M. Cultivo masivo de la microalga *Haematococcus sp.* en fotobiorreactores planos para la producción de astaxantina bajo diferentes condiciones de estrés. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 2017.

DEL CAMPO, J. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. Revista Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 74, 2007. p. 1163-1174.

DÍAZ, G. RESTREPO, T. y PARDO, S. Peces dulceacuícolas como alimento funcional: perfil de ácidos grasos en Tilapia y Bocachico criados en policultivo. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol. 10, No. 2 (44 - 53). 2012.

DHAKA, Priyank y PAL, Gajendra. Effect of pH on growth and biopigment accumulation of green alga *Dunaliella salina*. Dhaka and Singh, IJPSR, 2018; Vol. 9(1): 271-276.

ECURED. Ácidos grasos poliinsaturados. [En línea]. (2018). [Consultado: 28 de Noviembre de 2018]. Disponible en: https://www.ecured.cu/%C3%81cidos_grasos_poliinsaturados

ELENA, J. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. Revista Nova. Vol. 11 No. 19, 2013. p. 94-104.

EOIS. Las microalgas “trabajan” mejor estresadas. [En línea]. (2018). [Consultado: 04 de Noviembre de 2018]. Disponible en: <http://www.eoi.es/blogs/merme/las-microalgas-trabajan-mejor-estresadas/>

EONSEON, J. Xanthophylls in Microalgae from biosynthesis to biotechnological mass production and application. Revista Microbiol Biotechnol. Vol. 13 No. 2, 2003. p. 165-174.

FAO. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT). ISSN 1014-2916.FAO ISBN 978-92-5-3067336.2012.

FARMALISTO. Bicarbonato de sodio. [En línea]. (2018). [Consultado: 27 de Julio de 2018]. Disponible en: <https://www.farmalisto.com.co/droga-blanca/7001-comprar-bicarbonato-de-sodio-bolsa-x-500-g-precio-7703166001289.html>

FERNANDEZ, Baldomero. Producción de carotenoides por microalgas y caracterización de la ruta carotenogénica en *Chlorella zofingiensis*. Universidad de Sevilla. 2013.

FERNÁNDEZ, F. Airlift-Driven External-Loop tubular Photobioreactors for Outdoor Production of Microalgae: Assessment of Design and Performance. Revista Chemical Engineering Science. Vol. 56, 2001. p. 2721-2732.

FERNANDEZ, J. Nutrientes y medios de cultivo de microalgas. Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas. [En línea]. (2014). [Consultado: 30 de Julio de 2018]. Disponible en: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-3-nutrientes.html>

FERNÁNDEZ, Miguel. Diseño, montaje y caracterización de fotobiorreactores airlift para el cultivo de la microalga *Chlorella sorokiniana*. Universidad EAFIT.2013. p.11.

FONSECA, L. GUARÍN, M. Evaluación de la remoción de cromo con cultivos de microalgas en un fotobiorreactor de panel plano. Fundación Universidad de América. 2018.

FU, Weiqi., et al. Mejora de la biosíntesis de carotenoides en la microalga verde *Dunaliella salina* con diodos emisores de luz y evolución adaptativa de laboratorio. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97 : 2395-403. doi: 10.1007 / s00253-012-4502-5.

FUNDACIÓN CANNA. Los terpenos. [En línea]. (s.f.). [Consultado: 23 de Julio de 2018]. Disponible en: <https://www.fundacion-canna.es/los-terpenos>

GARCÍA, C. Growth and Biochemical Characterization of Microalgal Biomass Produced in Bubble Column and Airlift Photobioreactor Studies in Fed-Batch Culture. *Revista Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 31, 2002. p. 1015-1023.

GARCIA, L. MONCAYO, S y PASTUZO, M. Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal. Universidad de Guayaquil. 2016.

GÓMEZ, L. Microalgas: Aspectos Ecológicos y Biotecnológicos. *Revista Cubana De Química*. 2015. p. 3-4.

GROBBELAAR, J. Algal nutrition: mineral nutrition. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. 2004. p. 97-115.

GUILLARD, R. Counting cells in cultures with the light microscope. *Algal Culturing Techniques*. Editorial Andersen, R.A. Elsevier Academic Press. 2005. p. 239-252.

HEASMAN, M. Development of Extended Shelf-life Microalgae Concentrate Diets Harvested by Centrifugation for Bivale Molluscs-A Summary. *Revista Aquaculture Research*. Vol. 31 No. 8, 2000. p. 637-659.

HEINRICH, Josué. Producción de microalgas con fines alimenticios y energéticos. Tesis magister en ciencia y tecnología de alimentos, en el campo de diseño y optimización de reactores y procesos. 2016. p. 3.

HERGUEDAS, Ana y TARANCO, Carlos. Biomasa, biocombustible y sostenibilidad. Centro Tecnológico Agrario y Agroalimentario. Graficolor-Palencia S.L, 2012. ISBN: 978-84-931891-5-0. p.4.

HERNÁNDEZ, A. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 49 No. 2, 2014. p. 157-173.

HERNÁNDEZ, A. Microbiología industrial. Euned. 2003. p. 6-7.

HERNANDEZ, Gregorio. Evaluación de las incidencias de salinidad y pH sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana. Fundación universidad de américa. 2014. p.55.

HORNERO, D. MÍNGUEZ, M y PÉREZ, A. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples “colorantes” naturales. [En línea]. (s.f.). [Consultado: 28 de Noviembre de 2018]. Recuperado de http://digital.csic.es/bitstream/10261/5754/1/IG_AGROCSIC_4.pdf

INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS, Instituto tecnológico superior de Calkiní. Deshidratación: secado y liofilización. 2011. p. 22.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC-1486- 6166. Bogotá D.C.:El instituto, 2018. ISBN 9789588585673 153 p.

INSTITUTO INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS. Colorantes Naturales. [En línea]. (s.f.). [Consultado: 23 de Junio de 2018]. Recuperado de <http://www.inia.cl/alimentos/productos/>.

KOBAYASHI, M. Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. Revista Journal of Fermentation and Bioengineering. Vol. 74 No, 1, 1992. p. 61–63.

KOBYLEWSKI, S. Food Dyes-A Rainbow of Risks. Center for Science in the Public Interest. 2010.

KOLLER, M., Muhr, A. y Braunegg, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. Revista Algal Res. Vol. 6, 2014. p. 52–63.

KRICHNAVARUK, S. Enhanced Productivity of *Chaetoceros calcitrans* in Airlift Photobioreactors. Revista Bioresource Technology. Vol. 98, No. 11, 2007. p. 2123-2130.

LARA, A. Diseño estadístico de experimentos, análisis de la varianza y temas relacionados: tratamiento informático mediante SPSS. Proyecto sur de ediciones. [En línea]. (2000). [Consultado: 23 de Junio de 2018]. Recuperado de <http://wpd.ugr.es/~bioestad/wp-content/uploads/Factorial-dos-factores.pdf>

LEE, I. Photobioreactor Engineering: Design and Performance. Revista Biotechnology and bioprocess Engineering. Vol. 8, 2003. p. 313-321.

LEMUS, Ximena. Obtención de carotenoides con la microalga *Scenedesmus incarssatulus* en un biorreactor tipo airlift. Instituto politécnico nacional- unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología.2009.

LI, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S. y Wang, G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. Revista Biotechnol. Vol. 29, 2011. p. 568-574.

LÓPEZ, Elías. Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. Fundación Rómulo Raggio. Revista internacional de botánica experimental. (2013). ISSN 0031 9457 82: 23-30.

LOPÉZ, Yamilka. Caracterización genética y de metabolitos secundarios de diferentes aislamientos de *Dunaliella salina* bajo condiciones de estrés salino. Instituto politécnico nacional centro de biotecnología genómica. 2008.

MANRIQUE, J. TORRES, M. SILVA, D y SALAS, J. Efecto del estrés inducido por deficiencia de sales nutritivas en un sistema de cultivo Raceway Awl de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* en la obtención de aceite. Enciclopedia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, Vol.10, No.19. 2014.

MANUAL DE LUMBRICULTURA. Inóculo. [En línea]. (s.f.). [Consultado: 23 de Julio de 2018]. Disponible en: <http://www.manualdelombricultura.com/glosario/pal/183.html>

MARINEBIOTECHNOLOGY. Medios de agua de mar. [En línea]. (2018). [Consultado: 28 de Julio de 2018]. Disponible en: <http://marinebiotechnology.org/es/component/virtuemart/medios-de-cultivo/medios-de-agua-de-mar/f-2-detail?Itemid=0>

MARKETSANDMARKETS. Food Colors Market by Type (Natural, Synthetic, and Nature-Identical), Application (Beverages, Bakery & Confectionery, and Meat Products), Form (Liquid, Liquid Gel, Gel Paste, and Powder), Solubility (Dyes and Lakes) - Global Forecast to 2022. 2016.

MARTIN, F. Optimization of Photobioreactor for Astaxanthin Production in *Chlorella Zofingiensis*. Tesis de doctorado de la Universidad Nacional de Singapur. 2010.

MARTÍNEZ, L. Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. Tesis Doctoral, Instituto de Recursos Naturales, Universidad de León, León. 2018. p. 226.

MATA, T., Martins, A. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 4, No. 1, 2010. p. 217-232.

MAY, E. Cultivo de microalga *Scenedesmus* en un fotobiorreactor acoplado a un sistema de recuperación de biomasa. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 2015.

MCCANN, D. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2007.

MEHLITZ, T. Temperature Influence and Heat Management Requirements of Microalgae Cultivation in Photobioreactors. Tesis de doctorado de la Facultad Politécnica de la Universidad del Estado de California. 2009.

MELENDEZ, A. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 54, No. 2, 2004.

MERCADO LIBRE. Extech Instruments Medidor De Luz. [En línea]. (2018). [Consultado: 28 de Julio de 2018]. Disponible en: https://articulo.mercadolibre.com.co/MCO-455734887-extech-instruments-medidor-de-luz-_JM

MERCADO LIBRE. Extech Instruments Medidor De Luz. [En línea]. (2018). [Consultado: 28 de Julio de 2018]. Disponible en: https://articulo.mercadolibre.com.co/MCO-455734887-extech-instruments-medidor-de-luz-_JM

MERCADO LIBRE. Nitrato de sodio. [En línea]. (2018). [Consultado: 28 de Julio de 2018]. Disponible en: <https://listado.mercadolibre.com.mx/nitrato-de-sodio#>

MERCADO, Estefanía. Cultivo de la microalga *Scenedesmus Obliquus var. Dimorphus* (TURPIN) para la obtención de biomasa y lípidos. Universidad Ricardo palma. 2016. p.31.

MERCK. Cloruro de sodio. [En línea]. (2018). [Consultado: 28 de Julio de 2018]. Disponible en: http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Sodium-chloride,MDA_CHEM-106404#anchor_orderingcomp

MMEGIAS. La célula. 5- Membrana celular-Lípidos. Atlas de Histología Vegetal y Animal. [En línea]. (2018). [Consultado: 28 de Junio de 2018]. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/3-lipidos-c.php>.

MONTHIEU, C. Estudio técnico económico de la extracción de los lípidos de las microalgas para la producción de biodiesel (tesis de pregrado). Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universidad Pontificia Comillas, Madrid, España. 2010.

MORA, R. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella sp.* aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. Laboratorio de Bioquímica y Microorganismos Fotosintéticos. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. Revista Ciencia completa Vol. 12, 2005.

MURCIA, L., PARRA, M. Producción de proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* enriqueciendo el medio de cultivo con fuentes de nitrógeno. Universidad de América. 2017.

MURO, E. Fertilizantes. [En línea]. (s.f.). [Consultado: 23 de Julio de 2018]. Disponible en: <https://www.mendoza-conicet.gov.ar/portal/enciclopedia/terminos/Fertilizant.htm>

MURRAY W. Nabors. Introducción a la Botánica. Editorial ADDISON-WESLEY. ISBN 9788478290734. 2006.

NAVA, Betriz. Optimización del crecimiento y producción del carotenoide astaxantina por la microalga *Haematococcus sp.* en diferentes condiciones de cultivo. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 2017.

OROSA, M. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. Revista Biotechnology Letters Vol. 23, 2001. p. 373–378.

PARES, R. Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverte, S.A. 1997.

PARK, J. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Revista Bioresource Technology Vol. 102, 2011. p. 35-42.

PÉREZ, Elena. Fotosíntesis: Aspectos básicos. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. 2009. ISSN: 1989-3620. p.1.

PETRUSEVSKI, B. Tangential Flow Filtration: A Method to Concentrate freshwater algae. Revista Water Research. Vol. 29 No. 5, 1995. p. 1419-1424.

PORTO, A. Lípidos. [En línea]. (s.f.). [Consultado: 28 de Noviembre de 2018]. Disponible en: <http://www.bionova.org.es/biocast/tema06.htm>

POSTEN, Clemens. Microalgal Biotechnology: Potential And Production. DE GRUYTER. 2012. p.14.

PŘIBYL, P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus sp.* Revista Algal research. 2016.

PŘIBYL, P. Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus sp.* Revista Algal research. 2015.

PULZ, O. Photobioreactors: Production Systems for Phototrophic Microorganisms. Revista Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 57, 2001. p. 287-293.

RANGA, R. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. Revista Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2018.

RAOUF, A. Microalgae and wastewater treatment. Revista Saudi Journal of Biological Sciences. Vol. 19, 2012. p. 257-275.

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology. Iowa State: Blackwell Science. 2004.

RIVERA, L. Lípidos y Membrana. [En línea]. (2016). [Consultado: 23 de Junio de 2018]. Disponible en: <http://blogyanerthbioquimica.blogspot.com.co/2016/06/lipidos-y-membrana.html>.

RIVERÓN, E., RAMIREZ, N., HERRERA, D., BARRERAS, G., ZAYAS, A., REQUEIRO, A. Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 43, No. 2, 2012. p. 2.

ROJAS, Fabiola. Cepas: Material de referencia, manejo y aplicaciones en área de microbiología. Instituto de salud pública, gobierno de Chile. (s.f.).

ROUSSOS, S. Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. E. Galirido (Ed.), Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería, 1996. p. 341 -348.

RUBIO, D. Aspectos teóricos de la extracción de carotenoides a partir de microalgas. Revista Semilleros Fundación Universidad de América. 2016.

RUBIO, D. Evaluación de las incidencias de salinidad y pH sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana. Revista TECKNE. Vol. 13, No. 1, 2016. p. 44-56.

RUIJUAN, M. LED power efficiency of biomass, fatty acid, and carotenoid production in *Nannochloropsis* microalgae. Revista Bioresource Technology. 2018.

RUIZ, A. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróticamente (tesis de maestría). Maestría en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. 2011.

SALAZAR, L. Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de Biodiesel. Universidad de Piura. 2012.

SÁNCHEZ, L. Carotenoides: estructura, función, biosíntesis y regulación. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 41, No. 3, 1991. p. 175-192.

SERRANO, L. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Universidad Nacional de Colombia. (2012). p. 29.

SIALVE, B. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Revista Biotechnology Advances*. Vol. 27, No. 4, 2009. p. 409-416.

SUH, I. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *Revista Journal of biotechnology*. Vol. 125, No. 4, 2006. p. 540-546.

TEJEDA, L. Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería (Fac. Ing.)*. Vol. 24 No. 39, 2015. p. 43-54.

TJAHJONO, A. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Revista Biotechnology Letters*. Vol. 16, No. 2, 1994. p. 133-138.

TORRES, Carola y LÓPEZ, Leonor. Medios de cultivo. Universidad Nacional del Nordeste. 2006. p.1.

TORRES, Priscila Bezerra et al. Estandarización de un protocolo para extraer y analizar la clorofila a y los carotenoides en *Gracilaria tenuistipitata* Var. Liui. Zhang y Xia (Rhodophyta). *Braz. j. oceanogr.* 2014, Vol.62, No.1, p.57-63.

TORZILLO, G. Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Revista E ur. J. Phycol* Vol. 40, 2005. p. 233–240.

UDUMAN, N. Dewatering of Microalgal Cultures: A major Bottleneck to Algae-Based Fuels. *Revista Journal of Renewable and Sustainable Energy*. Vol. 2, 2010. p. 12701-12715.

UGWU, C. Photobioreactors for Mass Cultivation of Algae. *Bioresource Technology*. Vol. 99, 2008. p. 4021-4028.

UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO. Ingeniería de Biorreactores II. [Consultado: 27 de Junio de 2018]. Disponible en: https://issuu.com/jazinaruizhernandez/docs/unidad_2._biorreactores_especificos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO. Bioquímica interactiva. [En línea]. (2008). [Consultado: 23 de Julio de 2018]. Disponible en: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~3dmolvis/lipido/index.html>

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Glosario de microbiología y parasitología. [En línea]. 2016. [Consultado: 23 de Julio de 2018]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html>

VARGAS, I. Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida. Manual I: Teoría. Lima: Organización Panamericana de la Salud. 2004.

VELÁZQUEZ, Joaquín. Problemas de salud ocasionados por los aditivos, preservativos, colorantes y sabores artificiales, hormonas y antibióticos en la alimentación industrial del mundo moderno. Universidad Interamericana de Puerto Rico. (s.f.). p.6.

VILLAMOR, P. Enfermería-Anatomo Fisiología. Tomo I. Ediciones científicas y técnicas, S.A. 1993. p. 22-24.

W.H.Beyer. Handbook of tables for probability and statistics. The chemical Rubber Co, Cleveland.1966.

WICHUK, Kristine. BRYNJÓLFSSON, Sigurður y FU, Weiqi. Producción Biotecnológica de Carotenoides de Valor Agregado a partir de Microalgas: Nuevas Tecnologías y Perspectivas. Bioengineered Vol.5, No.3, 2014.p. 204-208.

ANEXOS

ANEXO A
PROTOCOLO PARA PUESTA EN MARCHA DEL FOTOBIORREACTOR
ADPATADO

- Agregar inicialmente una solución de agua con hipoclorito de sodio al fotobiorreactor y dejar en funcionamiento durante dos días aproximadamente, para así lograr la desinfección y que no queden trazas.
- Retirar la solución y lavar el equipo hasta que no se observe biopelículas en las paredes y partes del fotobiorreactor; dado el caso que no sea posible su eliminación usar agitación.
- Repetir el proceso de desinfección solo con agua durante un día.
- Encender el equipo y verificar que se cuente con un equipo axénico, de no ser así repetir el numeral 2.

ANEXO B
COMPOSICIÓN FERTILIZANTE AGRÍCOLA FOLIAGRO

Cuadro 3. Composición del fertilizante Foliagro

Nombre compuesto	Concentración (g/L)
Nitrógeno total (N)	100
Nitrógeno Amoniacal (N)	72
Nitrógeno Nítrico (N)	3,2
Nitrógeno Ureico (N)	24,8
Fósforo Asimilable (P ₂ O ₃)	300
Potasio soluble en agua (K ₂ O)	100
Calcio (CaO)	0,2
Magnesio (MgO)	0,2
Azufre total (S)	0,8
Boro (B)	0,2
Cobre (Cu)	0,2
Hierro (Fe)	0,4
Manganeso (Mn)	0,4
Molibdeno (Mo)	0,03
Zinc (Zn)	0,5
pH en solución al 10%	6,5
Densidad a 20°C	1,3 g/mL
Quelatados con EDTA y ácido cítrico	

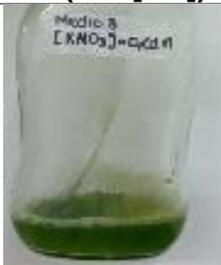
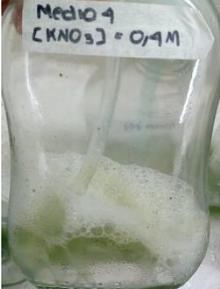
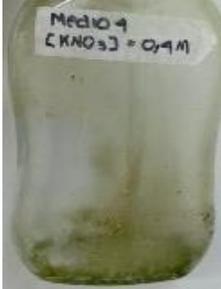
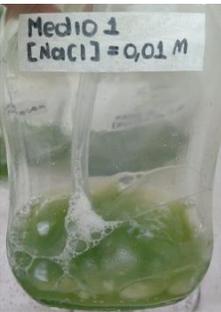
Fuente: Agro fertilizantes de Colombia

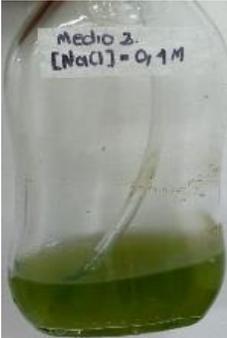
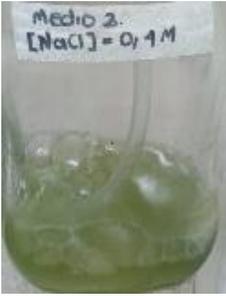
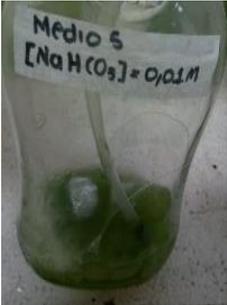
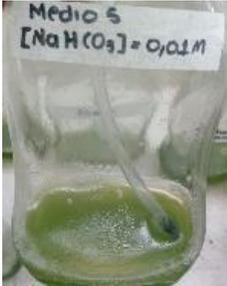
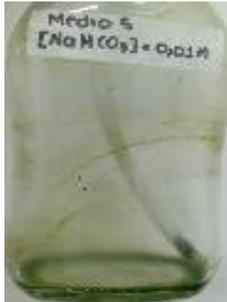
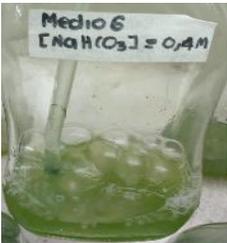
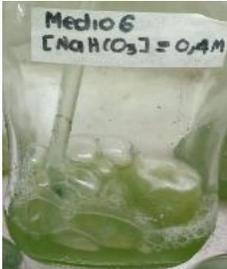
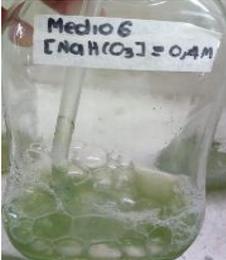
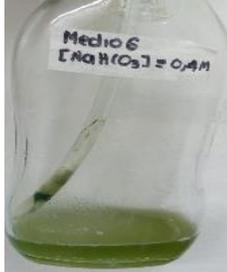
ANEXO C

RECOMENDACIONES PARA APLICAR TÉCNICA ASÉPTICA

- Para la realización de alguna actividad durante el desarrollo del experimento, estar al lado de una llama de calor, con la finalidad de tener un medio axénico; además se recomienda limpiar los mesones del laboratorio con alcohol.
- Al usar cualquier instrumento o material pasarlo de forma cuidadosa sobre la llama para su esterilización y después de utilizarlos realizar la misma acción para no contaminarlos.
- Para la toma de muestras de microorganismos, usar asas que hayan sido esterilizadas y enfriadas, ya que, si se usan de forma directa después de ser flameadas, causaran la muerte del organismo. Depositar estas sobre zonas estériles del material de vidrio para ser enfriadas y después de su uso volverlas a flamear.
- La boca y tapas de tubos o recipientes, debe ser flameada ligeramente al ser destapados y al cerrarse.
- En el proceso de inoculación, sujetar los tapones por la parte que no entra en contacto con tubos y matraces.
- Al abrir un tubo mantenerlo en posición inclinada para reducir el riesgo de contaminación.

**ANEXO D
REGISTRO FOTOGRÁFICO PRE-EXPERIMENTO ETAPA UNO**

Día	10 (Sin [sal])	11 (Con [sal])	12 (Con [sal])	13 (Con [sal])
KNO ₃ 0,01M				
KNO ₃ 0,4M				
NaCl 0,01M				

Día	10 (Sin [sal])	11 (Con [sal])	12 (Con [sal])	13 (Con [sal])
NaCl 0,4M				
NaHCO ₃ 0,01M				
NaHCO ₃ 0,4M				

Fuente: elaboración propia

ANEXO E
CONCENTRACIÓN CELULAR PARA REALIZACIÓN DE CURVA DE
CRECIMIENTO DEL PRE-EXPERIMENTO ETAPA UNO

Tabla 18. Crecimiento celular promedio Blanco pre-experimento etapa uno
Blanco

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	Log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	25	1,25E+06	6,0969
2	33	1,65E+06	6,2175
3	46	2,28E+06	6,3570
4	58	2,90E+06	6,4624
5	77	3,83E+06	6,5826
6	116	5,80E+06	6,7634
7	115	5,73E+06	6,7578
8	73	3,65E+06	6,5623
9	65	3,25E+06	6,5119
10	76	3,80E+06	6,5798
11	84	4,18E+06	6,6207
12	166	8,30E+06	6,9191
13	277	1,39E+07	7,1414

Fuente: elaboración propia

Tabla 19. Crecimiento celular promedio NaCl (0,01 M) pre-experimento etapa uno
NaCl (0,01 M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	Log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	33	1,65E+06	6,2175
2	43	2,13E+06	6,3274
3	62	3,08E+06	6,4878
4	94	4,70E+06	6,6721
5	134	6,68E+06	6,8245
6	253	1,27E+07	7,1021
7	565	2,82E+07	7,4506
8	241	1,21E+07	7,0810
9	270	1,35E+07	7,1303
10	410	2,05E+07	7,3112
11	295	1,48E+07	7,1688
12	341	1,71E+07	7,2317
13	536	2,68E+07	7,4277

Fuente: elaboración propia

Tabla 20. Crecimiento celular promedio NaCl (0,4 M) pre-experimento etapa uno
NaCl (0,4M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	31	1,53E+06	6,1833
2	43	2,15E+06	6,3324
3	53	2,63E+06	6,4191
4	77	3,83E+06	6,5826
5	85	4,23E+06	6,6258
6	107	5,33E+06	6,7263
7	186	9,28E+06	6,9673
8	87	4,35E+06	6,6385
9	96	4,80E+06	6,6812
10	116	5,78E+06	6,7616
11	97	4,85E+06	6,6857
12	99	4,95E+06	6,6946
13	147	7,35E+06	6,8663

Fuente: elaboración propia

Tabla 21. Crecimiento celular promedio KNO₃ (0,01 M) pre-experimento etapa uno
KNO₃ (0,01 M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	40	2,00E+06	6,3010
2	46	2,30E+06	6,3617
3	88	4,38E+06	6,6410
4	93	4,65E+06	6,6675
5	113	5,63E+06	6,7501
6	122	6,08E+06	6,7835
7	225	1,12E+07	7,0502
8	149	7,43E+06	6,8707
9	196	9,78E+06	6,9901
10	246	1,23E+07	7,0890
11	163	8,15E+06	6,9112
12	206	1,03E+07	7,0128
13	325	1,63E+07	7,2109

Fuente: elaboración propia

Tabla 22. Crecimiento celular promedio KNO_3 (0,4 M) pre-experimento etapa uno
 KNO_3 (0,4 M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	37	1,83E+06	6,2613
2	49	2,45E+06	6,3892
3	89	4,45E+06	6,6484
4	101	5,03E+06	6,7011
5	162	8,08E+06	6,9071
6	228	1,14E+07	7,0569
7	504	2,52E+07	7,4010
8	211	1,05E+07	7,0222
9	352	1,76E+07	7,2455
10	1171	5,86E+07	7,7675
11	149	7,45E+06	6,8722
12	334	1,67E+07	7,2227
13	822	4,11E+07	7,6138

Fuente: elaboración propia

Tabla 23. Crecimiento celular promedio NaHCO_3 (0,01 M) pre-experimento etapa uno

NaHCO_3 (0,01 M)			
Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	35	1,75E+06	6,2430
2	74	3,70E+06	6,5682
3	91	4,55E+06	6,6580
4	114	5,70E+06	6,7559
5	166	8,30E+06	6,9191
6	279	1,39E+07	7,1438
7	515	2,57E+07	7,4104
8	232	1,16E+07	7,0645
9	299	1,50E+07	7,1746
10	562	2,81E+07	7,4487
11	211	1,05E+07	7,0222
12	330	1,65E+07	7,2168
13	357	1,78E+07	7,2510

Fuente: elaboración propia

Tabla 24. Crecimiento celular promedio NaHCO_3 (0,4 M) pre-experimento etapa uno NaHCO_3 (0,4M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	36	1,78E+06	6,2492
2	38	1,88E+06	6,2730
3	54	2,70E+06	6,4314
4	63	3,15E+06	6,4983
5	91	4,55E+06	6,6580
6	161	8,03E+06	6,9044
7	209	1,04E+07	7,0181
8	109	5,45E+06	6,7364
9	158	7,90E+06	6,8976
10	208	1,04E+07	7,0170
11	148	7,38E+06	6,8678
12	133	6,63E+06	6,8212
13	295	1,48E+07	7,1688

Fuente: elaboración propia

ANEXO F
TABLAS DE DATOS Y RESULTADOS PARCIALES DEL ANÁLISIS POR
DISEÑO FACTORIAL PRE-EXPERIMENTO ETAPA UNO

Tabla 25. Concentración celular inicial y final de las microalgas pre-experimento etapa uno

[] inicial de microalgas antes de salinidad				[] final de microalgas en salinidad			
Sal	Día	0,01M (Cel/mL)	0,4M (Cel/mL)	Sal	Día	0,01M (Cel/mL)	0,4M (Cel/mL)
NaCl	10	2,05E+07	5,78E+06	NaCl	13	2,68E+07	7,35E+06
KNO ₃	10	1,23E+07	5,86E+07	KNO ₃	13	1,63E+07	4,11E+07
NaHCO ₃	10	2,81E+07	1,04E+07	NaHCO ₃	13	1,78E+07	1,48E+07

Fuente: elaboración propia

Tabla 26. Diferencia de las concentraciones celulares (antes y después de la salinidad) pre-experimento etapa uno

Sal	Días	0,01M (Cel/mL)	0,4M (Cel/mL)	Suma ($\sum_i \sum_j \sum_k Y_{ijk}$)
NaCl	13-10	6,30E+06	1,58E+06	7,88E+06
KNO ₃	13-10	3,98E+06	1,75E+07	2,14E+07
NaHCO ₃	13-10	1,03E+07	4,35E+06	1,46E+07
Suma ($\sum_i \sum_j \sum_k Y_{ijk}$)		2,06E+07	2,34E+07	

Fuente: elaboración propia

Tabla 27. Diferencia de las concentraciones celulares al cuadrado (antes y después de la salinidad) pre-experimento etapa uno

Sal	Días	0,01M (Cel/mL)	0,4M (Cel/mL)
NaCl	13-10	3,97E+13	2,48E+12
KNO ₃	13-10	1,58E+13	3,05E+14
NaHCO ₃	13-10	1,06E+14	1,89E+13
Suma ($\sum_i \sum_j \sum_k (Y_{ijk})^2$)		1,61E+14	3,26E+14

Fuente: elaboración propia

Tabla 28. Resultados de los cálculos del diseño factorial pre-experimento etapa uno

C	3,22E+14		
SCT	1,65E+14		
SCA	4,59E+13	MCA	2,30E+13
SCB	1,33E+12	MCB	1,33E+12
SCAB	1,18E+14	MCAB	5,91E+13
SCE	1,18E+14	MCE	1,97E+13

Fuente: elaboración propia

ANEXO G
CONCENTRACIÓN CELULAR PARA REALIZACIÓN DE CURVA DE
CRECIMIENTO DEL PRE-EXPERIMENTO ETAPA DOS

Tabla 29. Crecimiento celular promedio Blanco pre-experimento etapa dos
Blanco

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	Log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	20	9,75E+05	5,9890
2	42	2,08E+06	6,3170
3	80	4,00E+06	6,6021
4	90	4,50E+06	6,6532
5	107	5,33E+06	6,7263
6	140	6,98E+06	6,8435
7	191	9,55E+06	6,9800
8	196	9,80E+06	6,9912
9	189	9,45E+06	6,9754
10	197	9,85E+06	6,9934
11	201	1,00E+07	7,0011
12	184	9,20E+06	6,9638
13	171	8,55E+06	6,9320
14	169	8,45E+06	6,9269

Fuente: elaboración propia

Tabla 30. Crecimiento celular promedio KNO₃ (0,5 M) pre-experimento etapa dos
KNO₃ (0,5 M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	17	8,50E+05	5,9294
2	38	1,90E+06	6,2788
3	50	2,48E+06	6,3936
4	62	3,08E+06	6,4878
5	73	3,65E+06	6,5623
6	81	4,03E+06	6,6048
7	129	6,43E+06	6,8079
8	134	6,68E+06	6,8245
9	134	6,70E+06	6,8261
10	142	7,08E+06	6,8497
11	149	7,43E+06	6,8707
12	153	7,65E+06	6,8837
13	152	7,58E+06	6,8794
14	156	7,77E+06	6,8907

Fuente: elaboración propia

Tabla 31. Crecimiento celular promedio KNO₃ (0,6 M) pre-experimento etapa dos
KNO₃ (0,6 M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	11	5,50E+05	5,7404
2	32	1,68E+06	6,2240
3	54	2,68E+06	6,4273
4	63	3,13E+06	6,4949
5	78	3,88E+06	6,5883
6	105	5,23E+06	6,7181
7	116	5,80E+06	6,7634
8	127	6,33E+06	6,8011
9	121	6,03E+06	6,7800
10	124	6,20E+06	6,7924
11	126	6,28E+06	6,7976
12	127	6,35E+06	6,8028
13	159	7,95E+06	6,9004
14	163	8,13E+06	6,9098

Fuente: elaboración propia

Tabla 32. Crecimiento celular promedio KNO₃ (0,7 M) pre-experimento etapa dos
KNO₃ (0,7 M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	16	7,75E+05	5,8893
2	40	1,98E+06	6,2956
3	50	2,48E+06	6,3936
4	66	3,28E+06	6,5152
5	75	3,75E+06	6,5740
6	97	4,83E+06	6,6835
7	107	5,35E+06	6,7284
8	115	5,75E+06	6,7597
9	111	5,53E+06	6,7423
10	111	5,53E+06	6,7423
11	117	5,83E+06	6,7653
12	128	6,38E+06	6,8045
13	149	7,43E+06	6,8707
14	159	7,95E+06	6,9004

Fuente: elaboración propia

Tabla 33. Crecimiento celular promedio KNO₃ (0,8 M) pre-experimento etapa dos
KNO₃ (0,8 M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	15	7,50E+05	5,8751
2	32	1,58E+06	6,1973
3	43	2,15E+06	6,3324
4	61	3,05E+06	6,4843
5	66	3,30E+06	6,5185
6	76	3,78E+06	6,5769
7	90	4,48E+06	6,6508
8	103	5,13E+06	6,7097
9	107	5,33E+06	6,7263
10	105	5,23E+06	6,7181
11	109	5,43E+06	6,7344
12	103	5,13E+06	6,7097
13	101	5,03E+06	6,7011
14	96	4,78E+06	6,6790

Fuente: elaboración propia

Tabla 34. Crecimiento celular promedio NaCl (0,5 M) pre-experimento etapa dos
NaCl (0,5 M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	14	6,75E+05	5,8293
2	28	1,38E+06	6,1383
3	45	2,23E+06	6,3473
4	69	3,43E+06	6,5347
5	78	3,90E+06	6,5911
6	112	5,60E+06	6,7482
7	134	6,68E+06	6,8245
8	137	6,85E+06	6,8357
9	137	6,85E+06	6,8357
10	142	7,08E+06	6,8497
11	182	9,10E+06	6,9590
12	233	1,17E+07	7,0663
13	355	1,78E+07	7,2492
14	360	1,80E+07	7,2553

Fuente: elaboración propia

Tabla 35. Crecimiento celular promedio NaCl (0,6 M) pre-experimento etapa dos
NaCl (0,6 M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	13	6,50E+05	5,8129
2	34	1,70E+06	6,2304
3	47	2,35E+06	6,3711
4	60	3,00,E+06	6,4771
5	67	3,43E+06	6,5347
6	99	4,93E+06	6,6924
7	107	5,33E+06	6,7263
8	114	5,70E+06	6,7559
9	117	5,85E+06	6,7672
10	111	5,55E+06	6,7443
11	139	6,93E+06	6,8404
12	183	9,15E+06	6,9614
13	333	1,67E+07	7,2214
14	340	1,69E+07	7,2298

Fuente: elaboración propia

Tabla 36. Crecimiento celular promedio NaCl (0,7 M) pre-experimento etapa dos
NaCl (0,7 M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	17	8,25E+05	5,9165
2	28	1,40E+06	6,1461
3	44	2,18E+06	6,3375
4	58	2,90E+06	6,4624
5	68	3,38E+06	6,5283
6	103	5,15E+06	6,7118
7	113	5,63E+06	6,7501
8	121	6,05E+06	6,7818
9	111	5,55E+06	6,7443
10	123	6,13E+06	6,7871
11	124	6,20E+06	6,7924
12	134	6,68E+06	6,8245
13	236	1,18E+07	7,0719
14	244	1,21E+07	7,0855

Fuente: elaboración propia

Tabla 37. Crecimiento celular promedio NaCl (0,8 M) pre-experimento etapa dos
NaCl (0,8 M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	13	6,50E+05	5,8129
2	46	2,30E+06	6,3617
3	48	2,40E+06	6,3802
4	56	2,78E+06	6,4433
5	63	3,13E+06	6,4949
6	97	4,85E+06	6,6857
7	111	5,53E+06	6,7423
8	112	5,60E+06	6,7482
9	120	5,98E+06	6,7763
10	115	5,73E+06	6,7578
11	117	5,83E+06	6,7653
12	130	6,48E+06	6,8112
13	126	6,28E+06	6,7976
14	116	5,77E+06	6,7616

Fuente: elaboración propia

ANEXO H
CUANTIFICACIÓN CLOROFILAS Y CAROTENOIDES TOTALES POR
ESPECTROFOTOMETRÍA EN EL PRE-EXPERIMENTO ETAPA DOS

Tabla 38. Resultados absorbancias por espectrofotometría a distintas longitudes de onda para el pre-experimento etapa dos

Sal	[Sal] (M)	Absorbancias			
		480 nm	510 nm	647 nm	664 nm
KNO ₃	0,5	0,132	0,053	0,083	0,16
		0,136	0,058	0,095	0,151
	0,6	0,163	0,014	0,035	0,089
		0,157	0,011	0,042	0,091
	0,7	0,15	0,054	0,045	0,096
		0,148	0,051	0,044	0,101
	0,8	0,132	0,052	0,048	0,086
		0,146	0,045	0,052	0,083
NaCl	0,5	0,084	0,044	0,23	0,332
		0,082	0,052	0,246	0,356
	0,6	0,095	0,056	0,176	0,32
		0,087	0,043	0,184	0,318
	0,7	0,131	0,044	0,049	0,104
		0,128	0,046	0,053	0,105
	0,8	0,115	0,022	0,078	0,099
		0,259	0,153	0,061	0,086
Blanco		0,075	0,039	0,135	0,332
		0,054	0,025	0,132	0,356

Fuente: elaboración propia

Tabla 39. Resultados volúmenes obtenidos durante procedimiento de extracción de clorofilas y carotenoides totales en el pre-experimento etapa dos

Sal	[Sal] (M)	Volumen día 15 (mL)	Muestra	Muestra antes de centrifugar (mL)	Muestra después centrifuga con acetona (mL)	Volumen Extracto (mL)
KNO ₃	0,5	95	1	20	9,3	8,6
			2	20	9	7,7
	0,6	110	1	20	11,1	6
			2	20	7,4	6,5
	0,7	79	1	20	8,9	7,1
			2	20	9,4	7,7
0,8	120	1	20	8,8	7,5	
		2	20	8,5	7,2	
NaCl	0,5	30	1	7,5	9,1	7,7
			2	7,5	10	7,5
	0,6	70	1	7,5	9,2	7,7
			2	7,5	8,7	7,5
	0,7	70	1	20	9,7	7,5
			2	20	8,7	7,6
	0,8	85	1	20	7,1	5,5
			2	20	7,6	5,3
Blanco	65	1	7,5	6,8	4,3	
		2	7,5	7,1	5,2	

Fuente: elaboración propia

Tabla 40. Resultados concentración de metabolito del extracto en µg/mL en el pre-experimento etapa dos

Sal	[] (M)	#	[] de metabolito del extracto µg/mL			[] de metabolito del extracto promedio de repeticiones µg/mL			
			Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides totales	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides totales	
KNO ₃	0,5	1	1,7486	0,8099	0,4030	1,6833	0,9568	0,3899	
		2	1,6181	1,1037	0,3768				
	0,6	1	0,9942	0,2231	1,0803	0,9994	0,2889	1,0745	
		2	1,0046	0,3546	1,0686				
	0,7	1	1,0584	0,3882	0,5285	1,0892	0,3643	0,5379	
		2	1,1200	0,3403	0,5473				
0,8	1	0,9333	0,5043	0,4144	0,9116	0,5533	0,5072		
	2	0,8898	0,6022	0,6000					
NaCl	0,5	1	3,5169	2,8568	0,1401	3,6446	2,9537	0,0872	
		2	3,7723	3,0506	0,0344				
	0,6	1	3,4779	1,8234	0,0879	3,4583	1,9103	0,1311	
		2	3,4386	1,9972	0,1743				
	0,7	1	1,1462	0,4256	0,4973	1,1483	0,4636	0,4746	
		2	1,1504	0,5016	0,4519				
	0,8	1	1,0305	1,0436	0,6249	0,9694	0,9063	0,4304	
		2	0,9083	0,7690	0,2358				
	Blanco		1	3,7002	0,9226	0,1284	3,8463	0,8261	0,1278
			2	3,9923	0,7295	0,1273			

Fuente: elaboración propia

Tabla 41. Resultados concentración de metabolito de la muestra en $\mu\text{g/mL}$ en el pre-experimento etapa dos

Sal	[] (M)	#	[] de metabolito de la muestra $\mu\text{g/mL}$			[] de metabolito de la muestra Promedio de repeticiones $\mu\text{g/mL}$		
			Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides totales	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides totales
KNO ₃	0,5	1	0,7519	0,3482	0,1733	0,6874	0,3866	0,1592
		2	0,6230	0,4249	0,1451			
	0,6	1	0,2983	0,0669	0,3241	0,3124	0,0911	0,3357
		2	0,3265	0,1153	0,3473			
	0,7	1	0,3757	0,1378	0,1876	0,4035	0,1344	0,1992
		2	0,4312	0,1310	0,2107			
0,8	1	0,3500	0,1891	0,1554	0,3352	0,2030	0,1857	
	2	0,3203	0,2168	0,2160				
NaCl	0,5	1	3,6106	2,9330	0,1439	3,6915	2,9918	0,0891
		2	3,7723	3,0506	0,0344			
	0,6	1	3,5707	1,8720	0,0902	3,5046	1,9346	0,1322
		2	3,4386	1,9972	0,1743			
	0,7	1	0,4298	0,1596	0,1865	0,4335	0,1751	0,1791
		2	0,4371	0,1906	0,1717			
	0,8	1	0,2834	0,2870	0,1718	0,2620	0,2454	0,1172
		2	0,2407	0,2038	0,0625			
Blanco		1	2,1215	0,5290	0,0736	2,4447	0,5174	0,0809
		2	2,7680	0,5058	0,0883			

Fuente: elaboración propia

ANEXO I
TABLAS DE DATOS Y RESULTADOS PARCIALES DEL ANÁLISIS POR
DISEÑO FACTORIAL PRE-EXPERIMENTO ETAPA DOS

Tabla 42. Concentración carotenoides totales pre-experimento etapa dos

Sal	0,5M (µg/mL)	0,6M (µg/mL)	0,7M (µg/mL)	0,8M (µg/mL)	Suma ($\sum_i \sum_j \sum_k Y_{ijk}$)
KNO ₃	0,1592	0,3357	0,1992	0,1857	0,8797
NaCl	0,0891	0,1322	0,1791	0,1172	0,5176
Suma ($\sum_i \sum_j \sum_k Y_{ijk}$)	0,2483	0,4679	0,3783	0,3029	

Fuente: elaboración propia

Tabla 43. Concentración carotenoides totales al cuadrado pre-experimento etapa dos

Sal	0,5M (µg/mL)	0,6M (µg/mL)	0,7M (µg/mL)	0,8M (µg/mL)
KNO ₃	0,0253	0,1127	0,0397	0,0345
NaCl	0,0079	0,0175	0,0321	0,0137
Suma ($\sum_i \sum_j \sum_k (Y_{ijk})^2$)	0,0333	0,1302	0,0717	0,0482

Fuente: elaboración propia

Tabla 44. Resultados de los cálculos del diseño factorial pre-experimento etapa dos

C	0,2441		
SCT	0,0393		
SCA	0,0164	MCA	0,01639
SCB	0,0136	MCB	0,00454
SCAB	0,0093	MCAB	0,00310
SCE	0,0093	MCE	0,00116

Fuente: elaboración propia

ANEXO J
CONCENTRACIÓN CELULAR PARA REALIZACIÓN DE CURVA DE
CRECIMIENTO DEL EXPERIMENTO

Tabla 45. Crecimiento celular promedio KNO₃ (0,6M) Experimento
KNO₃ (0,6M)

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	29	1,43E+06	6,1538
2	36	1,78E+06	6,2492
3	38	1,88E+06	6,2730
4	44	2,18E+06	6,3375
5	69	3,43E+06	6,5347
6	75	3,75E+06	6,5740
7	88	4,38E+06	6,6410
8	93	4,63E+06	6,6651
9	115	5,75E+06	6,7597
10	122	6,10E+06	6,7853
11	140	6,98E+06	6,8435
12	152	7,60E+06	6,8808
13	153	7,63E+06	6,8822
14	153	7,65E+06	6,8837
15	160	8,00E+06	6,9031
16	188	9,40E+06	6,9731
17	186	9,28E+06	6,9673
18	183	9,15,E+06	6,9614
19	186	9,30,E+06	6,9685
20	181	9,05,E+06	6,9566

Fuente: elaboración propia

Tabla 46. Crecimiento celular promedio Blanco Experimento
Blanco

Tiempo (Días)	# Células	Concentración Celular (Cel/mL)	log (Concentración Celular (Cel/mL))
1	26	1,28E+06	6,1055
2	35	1,73E+06	6,2368
3	36	1,80E+06	6,2553
4	42	2,08E+06	6,3170
5	53	2,65E+06	6,4232
6	65	3,25E+06	6,5119
7	83	4,15E+06	6,6180
8	98	4,90E+06	6,6902
9	110	5,50E+06	6,7404
10	129	6,43E+06	6,8079
11	149	7,45E+06	6,8722
12	159	7,93E+06	6,8990
13	166	8,30E+06	6,9191
14	164	8,18E+06	6,9125
15	166	8,30,E+06	6,9191
16	170	8,48,E+06	6,9281
17	171	8,55,E+06	6,9320
18	176	8,78,E+06	6,9432
19	174	8,68,E+06	6,9383
20	168	8,40,E+06	6,9243

Fuente: elaboración propia

ANEXO K
CUANTIFICACIÓN CLOROFILAS Y CAROTENOIDES TOTALES POR
ESPECTROFOTOMETRÍA EN EL EXPERIMENTO

Tabla 47. Resultados absorbancias por espectrofotometría a distintas longitudes de onda para el experimento

Tipo	Muestra	Absorbancias			
		480 nm	510 nm	647 nm	664 nm
Blanco	1	0,175	0,059	0,235	0,732
	1	0,182	0,051	0,232	0,756
	2	0,194	0,046	0,249	0,722
	2	0,197	0,051	0,242	0,726
KNO ₃ a 0,6 M	1	0,682	0,160	0,082	0,197
	1	0,570	0,103	0,089	0,193
	2	0,588	0,107	0,076	0,235
	2	0,652	0,147	0,079	0,211

Fuente: elaboración propia

Tabla 48. Resultados volúmenes obtenidos durante procedimiento de extracción de clorofilas y carotenoides totales en el experimento

Tipo	Volumen día 20 (mL)	Muestra	Muestra antes de centrifugar (mL)	Volumen Extracto (mL)
Blanco	1650	1		4
		1	20	3,9
		2		3,8
		2	20	4
KNO ₃ a 0,6 M	2050	1		4,5
		1	20	5
		2		4,1
		2	20	4,5

Fuente: elaboración propia

Tabla 49. Resultados concentración de metabolito del extracto en $\mu\text{g/mL}$ en el experimento

Tipo	#	[] de metabolito del extracto ($\mu\text{g/mL}$)			[] de metabolito del extracto promedio de repeticiones ($\mu\text{g/mL}$)		
		Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides totales	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides totales
Blanco	1	8,2792	0,7586	0,6619	8,4253	0,6621	0,7338
	1	8,5713	0,5655	0,8057			
	2	8,1329	1,0986	0,9535			
	2	8,1941	0,9341	0,9197			
KNO ₃ a 0,6 M	1	2,1920	0,5860	3,3714	2,1613	0,6683	3,2685
	1	2,1307	0,7505	3,1656			
	2	2,6569	0,2549	3,2571			
	2	2,3648	0,4479	3,2906			

Fuente: elaboración propia

Tabla 50. Resultados concentración de metabolito de la muestra en $\mu\text{g/mL}$ en el experimento

Tipo	Muestra	[] de metabolito de la muestra ($\mu\text{g/mL}$)			[] de metabolito de la muestra promedio de repeticiones ($\mu\text{g/mL}$)		
		Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides totales	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides totales
Blanco	1	1,6558	0,1517	0,1324	1,6636	0,1310	0,1447
	1	1,6714	0,1103	0,1571			
	2	1,5452	0,2087	0,1812			
	2	1,6388	0,1868	0,1839			
KNO ₃ a 0,6 M	1	0,4932	0,1319	0,7586	0,5129	0,1597	0,7750
	1	0,5327	0,1876	0,7914			
	2	0,5447	0,0522	0,6677			
	2	0,5321	0,1008	0,7404			

Fuente: elaboración propia

Tabla 51. Resultados promedio de la concentración de metabolito en la muestra ($\mu\text{g/mL}$) en el experimento

Promedio total de las muestras	KNO ₃ a 0,6M	Blanco
Carotenoides ($\mu\text{g/mL}$)	0,7395	0,1636
Clorofila a ($\mu\text{g/mL}$)	0,5256	1,6278
clorofila b ($\mu\text{g/mL}$)	0,1181	0,1644

Fuente: elaboración propia

ANEXO L

RESULTADOS LIOFILIZACIÓN DEL CULTIVO CON KNO₃ A 0,6M



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL
LABORATORIO DE NUTRICIÓN ANIMAL

INFORME DE ANALISIS No. 173
FECHA DE EXPEDICION Octubre 25 de 2018
ANALISIS REPORTADOS¹

INFORMACION DEL USUARIO
NOMBRE Ingrid Manrique

INFORMACION DE LA MUESTRA
TIPO Microalgas
IDENTIFICACION 180517

FECHA DE RECEPCION Octubre 19 de 2018

ANALISIS	REPORTE	REPORTE	ANALISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
MATERIA SECA (%)¹	8,8		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) ⁴		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) ¹			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) ²			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0,2 (%)		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) ²			CALCIO (% CZ) ¹		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) ²			FÓSFORO (%) ¹		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) ²			POTASIO (%) ¹		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) ²			MAGNESIO (%) ¹		
FIBRA CRUDA (%) ¹			SODIO (%) ¹		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) ³			MANGANESO (mg/kg) ¹		
FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%) ³			CROMO (%) ¹		
LIGNINA (%) ³			ZINC (%) ¹		
HEMICELULOSA (%) ³			COBRE (mg/Kg) ^{1LD 0,010}		
EXTRACTO ETHEREO (%) ¹			COBALTO (mg/Kg) ^{1LD 0,01}		
CENIZAS (%) ¹			HIERRRO (mg/Kg) ¹		
pH			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		

REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14th ed)
 - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
 - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597
 - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
 - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

APROBADO POR
GLORIA AMPARO CASAS
Director de Laboratorio

ELABORADO POR
LUISA FERNANDA SEGURA
Coordinadora de Laboratorio

Este informe expresa fielmente el resultado de los análisis realizados sobre la muestra recibida. No podrá ser reproducido parcial ni totalmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso escrito por parte del laboratorio que lo emite. Los resultados contenidos en la presente informen, se refieren al momento y condiciones en que se realizaron los análisis El laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los resultados entregados. Universidad Nacional de Colombia - Carrera 30 No. 45 - 04 Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia - Postgrado Edificio 561B (Antiguo Vecol) Teléfono 3165000 Ext. 19460-19451 Fax. 3165401.

ANEXO M
RESULTADOS CROMATOGRAFÍA DE LÍPIDOS DEL CULTIVO CON KNO₃ A
0,6M

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS

Remitente: Ingrid Geraldin Manrique Ruiz Resultado: 163/2018
 Personadecontacto: Ingrid Geraldin Manrique Ruiz Fecha de procesamiento 2018-10-24
 Fecha de recepción de muestras: 2018-10-24 Fecha reporte: 2018-10-09

% <i>Acidos grasos</i>		
No.	FAMES	Microalga cepa <i>Scenedesmus dimorphus</i>
1	C14:0	2,1
2	C14:1	0,0
3	C15:0	0,0
4	C15:1	0,0
5	C16:0	22,5
6	C16:1	1,73
7	C17:0	1,67
8	C17:1	1,15
9	C18:0	9,6
10	C18:1n-9t	0,0
11	C18:1n-9c	17,8
12	C18:1n-7	0,4
13	C18:2n-6c	34,0
14	C18:3n-6	0,0
15	C18:3n-3	8,9
Total		100,0
PUFAS		43,0
MUFAS		21,1
SFAS		35,9
n-3		8,9
n-6		34,0
n6/n-3		3,8

OBSERVACIONES:

PUFAS: Ácidos grasos poliinsaturados

MUFAS: Ácidos grasos monoinsaturados

SFAS: Ácidos grasos saturados

n-3: Ácidos grasos Omega 3

n-6: Ácidos grasos Omega 6

n6/n-3: Relación omega3 – omega6

N.D.: No detectable

Elaborado por: Milena Cepeda (Analista) Aprobado por: Prof. Gonzalo J. Díaz, MV, MSc, PhD (Director)

Dirección CII 45 No 30-01, Edificio 561 B piso 1 Laboratorio de Toxicología
 Conmutador: 316 5000 – extensión 19465 Telefax: 316 5000 – extensión 19467
 Correo electrónico: labtoxv_fmzbog@unal.edu.co Bogotá Colombia, Sur América

ANEXO N
PESO SECO Y PRODUCTIVIDAD DEL CULTIVO BLANCO

Tabla 52. Peso seco de la biomasa

Recipiente No.	Peso molde vacío (g)	Peso molde con biomasa seca (g)	Peso seco de la biomasa (g)
1	6,4235	7,0986	0,6751
2	6,4158	7,0946	0,6788
3	6,4319	7,0882	0,6563
4	6,4241	25,6902	19,2661
5	6,4069	7,06	0,6531
6	6,4087	59,9997	53,591

Fuente: elaboración propia