

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* EN
CULTIVOS A ESCALA LABORATORIO EMPLEANDO NUTRIENTES DE
BAJO COSTO



Universidad
del Cauca®

Por:

YESICA JHOANA BENAVIDES ESCOBAR
JOHN ALEXANDER MUELAS CALAMBAS

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
POPAYÁN-CAUCA
2023

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* EN CULTIVOS A ESCALA LABORATORIO EMPLEANDO NUTRIENTES DE BAJO COSTO.

YESICA JHOANA BENAVIDES ESCOBAR
JOHN ALEXANDER MUELAS CALAMBAS

Trabajo de grado en la modalidad de investigación, para optar por el título de ingenieros agroindustriales

Directores:

M.Sc. JORGE LUIS SÁNCHEZ ORTEGA
PhD. JHON EDINSON NIETO CALVACHE

Asesor:

M.Sc. IVÁN DARÍO OTERO RAMÍREZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
POPAYÁN-CAUCA
2023

Nota de aceptación

Los directores y los jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del proyecto por sus autores y lo encuentran satisfactorio.

JORGE LUIS SÁNCHEZ ORTEGA M.Sc.
Director



JHON EDINSON NIETO CALVACHE Ph. D
Director

DIEGO FERNANDO ROA ACOSTA Ph. D
Jurado

JOSÉ FERNANDO SOLANILLA DUQUE Ph. D
Jurado

Popayán, 15 de diciembre 2023

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios y a nuestros padres por todo el apoyo incondicional, durante todo el periodo académico. Ya que, sin ellos, todo esto no habría sido posible. Su amor y sacrificio han sido la luz que guio nuestro camino a través de este viaje académico

Expresamos agradecimientos a nuestros directores, M.Sc. Jorge Luis Sánchez Ortega y Ph.D Jhon Edinson Nieto Calvache, por brindarnos su apoyo, su conocimiento, y su dedicación que contribuyeron a nuestra experiencia en este camino de la investigación.

Le agradecemos al M.Sc. Iván Darío Otero Ramírez, por todo el apoyo brindado en todo el tiempo de nuestra investigación, por su dedicación y compromiso, al adoptarnos como sus pupilos y por haber sido una guía importante tanto en el ámbito personal como en el académico.

Agradecemos a la profesora Karen Sofia Muñoz, por su amistad, su asesoría y por brindarnos su experiencia para realizar con éxito este trabajo.

También agradecer al profesor José Luis Hoyos Concha por su colaboración, tiempo y ser una inspiración desde cuarto semestre en este campo de la investigación.

Un sincero agradecimiento a todos nuestros amigos y compañeros que estuvieron con nosotros en los momentos de estrés y alegría durante este largo y retador camino. Su apoyo, confianza, soporte y cariño han sido invaluable. Cada uno de ustedes contribuyeron a nuestra fortaleza y ánimo de una manera u otra. Gracias por ser nuestro punto de apoyo, nuestro equipo de aliento y, lo más importante, la familia que elegimos.

Por último, agradecemos al personal que hace parte del Centro Internacional Biotecnológico Agroindustrial por habernos abierto las puertas, por al apoyo y colaboración de cada uno de sus integrantes durante el desarrollo de las actividades planeadas para el cumplimiento de nutro trabajo de investigación.

CONTENIDO

RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2.1. MARCO HISTORICO.....	17
2.2. LOCALIZACIÓN.....	19
2.3. MARCO TEORICO.....	19
2.3.1. Biorrefinería de microalgas.....	19
2.3.2 Microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	21
2.3.3. Producción de biomasa y condiciones de cultivo.....	23
2.3.4. Condiciones del cultivo.....	26
2.3.5. Nutrientes en la producción de microalgas.....	26
2.3.6. Aplicaciones de la biomasa.....	27
3. METODOLOGÍA.....	29
3.1. OBTENCIÓN, DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR Y ADAPTACIÓN DE <i>Chlorella vulgaris</i>	29
3.1.1. Microorganismo utilizado.....	30
3.1.2. Determinación de la concentración celular.....	30
3.1.3. Adaptación de la cepa.....	30
3.1.4. Siembra en medio sólido.....	30
3.1.5. Mantenimiento del cultivo microalgal.....	31
3.1.6. Activación y escalamiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en medio BG11.....	31
3.1.7. Evaluación de las fases de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en medio BG11.....	31
3.1.8. Cálculos cinéticos.....	31
3.1.9. Cosecha de la biomasa microalgal.....	32
3.2. INFLUENCIA DE LA RELACIÓN NITRÓGENO-FÓSFORO (N-P) EN CULTIVOS A ESCALA LABORATORIO DE <i>Chlorella vulgaris</i>	33
3.2.1 Adaptación de <i>Chlorella vulgaris</i> al medio NBC.....	33

3.2.2. Evaluación de las fases de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en NBC	33
3.2.3. Evaluación de la relación N-P	33
3.2.4. Cuantificación de Biomasa.....	34
3.2.5. Diseño experimental	34
3.2.6. Análisis preliminar de costos en función del suministro de nutrientes	34
3.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BIOMASA DE <i>Chlorella vulgaris</i> .	35
3.3.1. Proteínas.....	35
3.3.2. Extracto etéreo.....	35
3.3.3. Cenizas.	35
3.3.4. Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.....	35
3.3.5 Polifenoles totales.....	35
3.3.6. Compuestos fenólicos extraíbles (EPC).....	36
3.3.7. Determinación del contenido de carotenoides por método espectrofotométrico.	36
3.3.8. Caracterización bioquímica de la biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> en fase exponencial en medio de cultivo NBC.	37
3.4. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE ESCALAMIENTO Y PERIODICIDAD DE ALIMENTACIÓN SOBRE <i>Chlorella vulgaris</i> .	37
3.4.1. Escalamiento y periodicidad.	37
3.4.2. Diseño experimental	38
3.4.3. Caracterización bioquímica de la biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i>	38
3.4.4. Análisis preliminar de costos en función del suministro de nutrientes para el escalamiento.....	38
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	39
4.1 OBTENCIÓN DE LA CEPA DE <i>Chlorella vulgaris</i>	39
4.1.1 Microorganismo utilizado	39
4.1.2. Características morfológicas de <i>Chlorella vulgaris</i>	39
4.1.3. Pruebas preliminares.	40
4.1.4. Mantenimiento del cultivo microalgal.	42
4.1.5. Activación y escalamiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en medio BG11.....	43

4.1.6. Evaluación de las fases de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en medio BG11.	43
4.2. INFLUENCIA DE LA RELACIÓN NITRÓGENO-FÓSFORO (N-P) EN CULTIVOS A ESCALA LABORATORIO DE <i>Chlorella vulgaris</i>	45
4.2.1. Adaptación de <i>Chlorella vulgaris</i> al medio NBC.....	45
4.2.2. Evaluación de las fases de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en el medio alternativo (NBC).	46
4.2.3. Evaluación de la relación N-P en la producción de biomasa empleando NBC.	47
4.2.4. Evaluación de la relación N-P de <i>Chlorella vulgaris</i> en fase exponencial. Con	51
4.2.5. Análisis preliminar de costos en función del suministro de nutrientes.	52
4.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BIOMASA DE <i>Chlorella vulgaris</i>	53
4.3.1. Caracterización física de la biomasa microalgal.	53
4.3.2. Análisis químico de la biomasa microalgal.....	53
4.4. PROCESO DE ESCALAMIENTO Y PERIODICIDAD DE LA RELACIÓN MOLAR 20:1 N-P, Y SU EFECTO EN LA COMPOSICIÓN EN TÉRMINOS DE PROTEÍNAS Y ANTIOXIDANTES.	57
4.4.1. Escalamiento y periodicidad.	57
4.4.2. Caracterización bioquímica de la biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i>	58
4.4.3. Análisis preliminar de costos en función del suministro de nutrientes para el escalamiento.....	59
5. CONCLUSIONES	61
6. RECOMENDACIONES.....	62
7. BIBLIOGRAFÍA.....	63
8. ANEXOS.....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Investigación de producción de biomasa microalgal de <i>Chlorella vulgaris</i> en medio BG11 y medios alternativos NPK.	17
Tabla 2. Potenciales de bioproductos obtenidos de biorrefinerías de microalgas .	20
Tabla 3. Comparación de las características de diferentes condiciones de cultivo	21
Tabla 4. Composición proximal de diferentes microalgas	22
Tabla 5. Perspectivas y limitaciones de varios sistemas de cultivo	25
Tabla 6. Aplicaciones de la biomasa microalgal	28
Tabla 7 Diseño experimental	34
Tabla 8. Condiciones en etapa de adaptación de <i>Chlorella vulgaris</i>	40
Tabla 9. Determinación de velocidad y tiempo de duplicación.	48
Tabla 10. Costos a nivel de suministro de nutrientes.....	52
Tabla 11. Propiedades según CIELAB de la biomasa microalgal.....	53
Tabla 12. Composición química de biomasa microalgal en la fase latencia y fase exponencial.....	54
Tabla 13. Composición química de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en la fase latencia y exponencial.	56
Tabla 14 Composición química de biomasa microalgal	59
Tabla 15. Costo en función del suministro de nutrientes para el escalamiento.	59
Tabla 16. Composición medio BG11	89
Tabla 17. Características del fertilizante rico en Fosforó.	91
Tabla 18. Característica del fertilizante rico en Nitrógeno.....	92
Tabla 19. Determinación del porcentaje de fósforo en el fosfato.	92
Tabla 20. Cantidad de Nitrógeno y Fósforo en fertilizantes comerciantes	93
Tabla 21. Cálculos de la relación N-P.....	93
Tabla 22. Análisis estadístico de las relaciones molares N-P con respecto a la concentración celular (cel/mL).	93
Tabla 23. Análisis estadístico de las diferentes relaciones molar N-P con respecto a la concentración biomasa (g/L)	94
Tabla 24. Análisis estadístico de la relación molar N-P 20:1 con respecto al porcentaje de proteína.	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Chlorella vulgaris</i>	22
Figura 2. Sistemas de estanques de cultivos microalgales.....	23
Figura 3. Recipientes para producir microalgas en cámara.....	24
Figura 4. Diagrama metodológico	29
Figura 5. Esquema del escalamiento y alimentación sobre <i>Chlorella vulgaris</i>	38
Figura 6. Características morfológicas de <i>Chlorella vulgaris</i>	40
Figura 7. Fotobiorreactores a volumen de 1L aplicando las relaciones N-P del medio NBC.....	47
Figura 8. Fotobiorreactores a volúmenes de 5L de las relaciones N-P del medio NBC	52
Figura 9. Cepa <i>Chlorella vulgaris</i> en tubos falcon de 90 mL.....	71
Figura 10. Reconocimiento inicial de <i>Chlorella vulgaris</i>	71
Figura 11. Cultivos microalgales en medio BG11	72
Figura 12. Cultivos microalgales en medio sólido BG11	72
Figura 13. Ensayo 2 ajuste del sistema de aireación y temperatura.....	73
Figura 14. Mantenimiento de la cepa <i>Chlorella vulgaris</i> en medio de cultivo BG11	73
Figura 15. Siembra de <i>Chlorella vulgaris</i> en medio sólido BG11	74
Figura 16. Proceso para la activación de la cepa de <i>Chlorella vulgaris</i>	75
Figura 17. Escalamiento del cultivo en medio BG11.....	75
Figura 18. Evaluación de las fases de crecimiento en medio BG11	76
Figura 19. Cambios morfológicos durante la etapa de adaptación al medio NBC ..	77
Figura 20. Fotobiorreactores de cultivos microalgales.....	78
Figura 21. Escalamiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en medio de cultivo NBC.....	78
Figura 22. Evaluación de las fases de crecimiento en medio NBC.....	79
Figura 23. Cultivos microalgales evaluando relación N-P hasta la fase de latencia en medio de cultivo NBC	80
Figura 24. Cuantificación de biomasa microalgal (g/L) por gravimetría	81
Figura 25. Cultivos microalgales evaluando relación N-P hasta fase exponencial	82
Figura 26. Proceso de cosecha de biomasa microalgal en cultivos de fotobiorreactores de 1L y 5 L.	83
Figura 27. Biomasa microalgal seca en medio BG11 y NBC	84
Figura 28. Determinación de humedad.....	84
Figura 29. Determinación de cenizas.....	85
Figura 30. Determinación de lípidos	85

Figura 31. Determinación de proteína.....	86
Figura 32. Determinación de capacidad antioxidantes y compuestos fenólicos	86
Figura 33. Escalamiento y periodicidad en reactores de 20 L	87
Figura 34. Sales para la preparación de soluciones stock para el medio de cultivo BG11.....	90

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Cinéticas de crecimiento de cada uno de los ensayos.....	41
Gráfica 2. Cinéticas de crecimiento en fotobiorreactores en medio BG11	43
Gráfica 3. Fases de crecimiento en medio BG11.....	44
Gráfica 4. Fases de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en medio NBC.....	46
Gráfica 5. Cinéticas de crecimiento evaluando la relación molar N-P.....	47
Gráfica 6. Concentración en biomasa bajo las relaciones N-P en fase de latencia	49
Gráfica 7. Concentración en biomasa bajo las relaciones N-P en fase exponencial	51
Gráfica 8. Cuantificación de biomasa microalgal en etapa de escalamiento y periodicidad.....	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Registro fotográfico	71
Anexo B. Composición del medio de cultivo BG11	89
Anexo C. Preparación del medio de cultivo NBC.....	91
Anexo .D. Cotizaciones con respecto al suministro de nutrientes del BG11.....	96
Anexo E. Costo del suministro de los nutrientes.....	100
Anexo F. Participación en eventos internacionales.....	101

RESUMEN

Las microalgas son organismos fotosintéticos capaces de almacenar diferentes compuestos como proteína, carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos; lo cual ha despertado un interés en diferentes sectores como el científico, industrial y biotecnológico. El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* en cultivos a escala laboratorio empleando nutrientes de bajo costo. Para ello, se realizó el proceso de adaptación en medio BG11 en tres ensayos, a partir de los cuales se definieron las condiciones del cultivo microalgal así: agitación 1vvm, pH entre 8.0-8.5, temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, iluminación con lámparas Led de luz blanca de 2800 Lux. Posteriormente se evaluó el crecimiento celular; obteniendo concentraciones de 1.26×10^7 cel/mL en BG11; para el medio de bajo costo, inicialmente se realizó un proceso de adaptación y luego se evaluó la concentración, en la cual se obtuvo 6.6×10^6 cel/mL. Luego, se evaluó la relación N-P en tres niveles empleando como tratamiento control BG11. Con base a los resultados se obtuvo rendimientos en biomasa de 0.23 ± 0.01 , 0.23 ± 0.01 , 0.3 ± 0.015 y 0.32 ± 0.01 g/L para los tratamientos BG11, R 10:1, R 15:1 y R 20:1 respectivamente. Al realizar las pruebas para determinar la composición de la biomasa; para proteína se determinó que la R 20:1 presenta $53.9 \pm 1.43\%$; R15:1 $42.90 \pm 0.25\%$ y la R10:1 $24.13 \pm 0.78\%$, en fase exponencial. Desde el punto de vista estadístico no se evidenció diferencias significativas en relación al contenido de N-P de la muestra control.

Por último, se evaluó la influencia de la concentración de nutrientes respecto a la relación molar 20:1 al 50% y 100%, se estableció una periodicidad de alimentación constante de 5 días y se llevó a cabo el proceso de escalamiento hasta 18.5 L; el cual se realizó en un periodo de 25 días, obteniendo rendimientos de biomasa en el día 15 de 0.27 g/L para una alimentación con el 50% de los nutrientes.

Palabras claves. *Chlorella vulgaris*, nutrientes de bajo costo, biomasa, relación N-P, concentración celular, medio BG11.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic organisms capable of storing different compounds such as protein, carbohydrates, lipids, vitamins, minerals, and bioactive compounds, which has aroused interest in different sectors such as science, industry, and biotechnology. The objective of this work was to evaluate the biomass production of *Chlorella vulgaris* in laboratory-scale crops using low-cost nutrients. To do this, the adaptation process in BG11 medium was performed in three tests, from which the conditions of microalgal culture were defined as follows: 1vvm agitation, pH between 8.0-8.5, temperature of $28^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, illumination with white Led lamps of 2800 Lux. Subsequently, cell growth was evaluated; obtaining concentrations of 1.26×10^7 cells/mL in BG11; for the low-cost medium, initially an adaptation process was performed and then the concentration was evaluated, in which 6.6×10^6 cells/mL was obtained. Then, the N-P relationship was evaluated in three levels using BG11 as a control treatment. Based on the results, biomass yields of 0.23 0.01, 0.23 0.01, 0.3 0.015 and 0.32 0.01 g/L were obtained for treatments BG11, R 10:1, R 15:1 and R 20:1 respectively. When performing the tests to determine the composition of biomass; for protein it was determined that R 20:1 presents 53.9 1.43%; R15:1 42.90 0.25% and R10:1 24.13 0.78%, in exponential phase. From the statistical point of view, there were no significant differences in relation to the N-P content of the control sample.

Finally, we evaluated the influence of nutrient concentration on the molar ratio 20:1 to 50% and 100%, established a constant feeding frequency of 5 days and carried out the scaling process up to 18.5 L, which was carried out in a period of 25 days, obtaining biomass yields on day 15 of 0.27 g/L for a diet with 50% of nutrients.

Keywords. *Chlorella vulgaris*, low-cost nutrients, biomass, N-P ratio, cell concentration, BG11 medium.

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas han generado un interés global, están distribuidas en todo el planeta y los registros datan de cientos de miles de especies, las cuales han despertado un interés científico, industrial y comercial (Galarza, 2019).

En efecto, los cultivos microalgales representan una alternativa para contribuir al cumplimiento de algunos de los objetivos de desarrollo sostenible que las Naciones Unidas han incluido dentro de la agenda para el año 2030 (ONU, 2022), debido a su alto potencial en diferentes sectores como el energético, alimentario, farmacéutico y biotecnológico.

Una de las especies más estudiadas dentro de este grupo de microorganismos es *Chlorella vulgaris*, debido a que presenta características importantes como: altas tasas de reproducción, versatilidad metabólica, capacidad de adaptación a condiciones ambientales, ciclo biológico corto y eficiencia fotosintética (Jimenez, 2017).

Además, se destaca por su composición debido a que presenta un alto contenido de proteínas (45-60%), grasas (20%), carbohidratos (20%), minerales, sales y vitaminas (15%), los cuales pueden variar según las condiciones de cultivo, conjuntamente, la presencia de compuestos bioactivos y pigmentos como: betacarotenos, astaxantina, cantaxina, luteína, fucoxantina, los cuales se caracterizan por ser antioxidantes, convirtiendo esta biomasa en un producto de alto valor comercial (Pandey et al., 2014; Ru et al., 2020; Jimenez, 2017).

Con respecto a los cultivos de microalgas a escala semi-industrial o industrial, es importante una producción bajo sistemas rentables y sostenibles; los cuales involucran variables como pH, intensidad lumínica, temperatura y concentración de nutrientes suministrados (González & Ardila, 2017).

Cabe mencionar que una de las principales dificultades relacionadas con el sistema de producción microalgal están asociadas a: la operación, el escalamiento, la contaminación y el alto costo de los nutrientes utilizados en la implementación del cultivo (Castillo et al., 2017).

Por lo cual surge la necesidad de buscar alternativas económicamente viables para el cultivo de *Chlorella vulgaris*, siendo una de ellas el uso de nutrientes de bajo costo (NBC) como lo son los fertilizantes comerciales con alto contenido en NPK, ya que aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento de la biomasa y su costo es menor en comparación a las sales utilizadas en medios de cultivos como BG11, Jordan, Basal de Bold modificado, Watanabe, Bristol (Bernal, 2015; González et al., 2017; Sánchez et al., 2019; Silveira et al., 2018; Tran et al., 2023 & Mtaki et al., 2021)

En este contexto, el presente trabajo de investigación buscó contribuir con el establecimiento de una línea base en el grupo de investigación en ingeniería de producto y procesos agroindustriales (GIPA), evaluando la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* en cultivos a escala laboratorio empleando nutrientes de bajo costo y explorando factores como la relación de nitrógeno y fósforo en el suministro de nutrientes, al mismo tiempo que la periodicidad, escalamientos y su influencia en la acumulación de proteína en *Chlorella vulgaris*.

2.1. MARCO HISTORICO

Algunos autores han evaluado medios de cultivos con nutrientes de bajo costo para la producción de biomasa, a continuación, se presentan diferentes investigaciones relacionadas con la producción de biomasa.

Tabla 1. Investigación de producción de biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris* en medio BG11 y medios alternativos NPK.

Título del Artículo	Autor y Año	Tipo de nutriente	Condiciones y variables en cultivos	Conclusiones
Complementar las aguas residuales con fertilizante NPK como fuente barata de nutrientes en el cultivo de alimentos vivos (<i>Chlorella vulgaris</i>).	Mtaki et al., 2021	Fertilizante NPK	Aguas residuales de la acuicultura (AWW) suplementadas con fertilizante NPK	Indican que AWW + 0.1 NPK, AWW + 0.5 NPK y AWW + 1.0 NPK son medios de crecimiento potenciales para el cultivo de <i>C. vulgaris</i>
Explorando los efectos combinados de NaHCO ₃ , los fertilizantes NPK y la salinidad sobre el crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> .	Tran et al., 2023	NPK	Adición de NaHCO ₃ y NaCl, NPK, pH: 5.5 a 7.5, temperatura de 25 a 30°C, flujo de aire 1.5L/min e iluminación de 13000 lux	Determinaron el efecto positivo NaHCO ₃ y NaCl sobre la dinámica de crecimiento microalgal; el NPK cumple un papel importante en el equilibrio de nutrientes
Evaluación de las condiciones operativas en la producción y morfología de <i>Chlorella sp.</i>	Rendón-Castrillón et al., 2021	Fertilizante NPK	Agitación de 150 rpm, temperatura 25 °C, intensidad de luz de 1680 Lúmenes, pH sin control	Las concentraciones celulares para <i>Chlorella sp.</i> fue 3.72x10 ⁷ . Además, presenta una composición elemental del cultivo que se destaca por encima <i>Scenedesmus sp.</i> , <i>Nannochloris sp.</i> , <i>Tetraselmis sp.</i> and <i>Dunaliella salina</i> , carbono (60,65%) e hidrógeno (9,30%), nitrógeno (8,53%) y azufre (0,84%).

Producción de lípidos y reducción de costos en <i>Chlorella vulgaris</i> .	Lv et al., 2010	NA	Nivel de KNO ₃ , concentración de CO ₂ , temperatura a 25 °C	Mayor contenido de lípidos (40 mg/L) y productividad de biomasa en condiciones controladas: 1,0 mM de KNO ₃ , 1,0 % de CO ₂ , 60 μmol de fotones m ⁻² s ⁻¹ .
Extracción de proteínas de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Nannochloropsis gaditana</i> asistido por ultrasonido.	Bernal, 2015	Fertilizantes NPK	Periodicidad de alimentación, suministro de nutrientes, asistencia de ultrasonido	Incremento de proteínas solubles en un 20% para <i>C. vulgaris</i> y un 40% para <i>Nannochloropsis gaditana</i> , con propiedades funcionales.
Evaluación del crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en función de la irradiancia.	Schreiber et al., 2017	Medio BG11	Análisis en laboratorio y en módulos iluminados por el sol, efectos de la luz solar y densidad de cultivo	Crecimiento limitado debido al sombreado, limitación adicional de la productividad de biomasa por disminución de nitrógeno.
Producción de biomasa y proteína de <i>Chlorella vulgaris</i> en condiciones mixotróficas.	González et al., 2017	Mixotrófico	Variación de concentración de nitrógeno, fósforo, acetato de sodio y carbonato de amonio	Producción de biomasa de 3.72 g/L con acetato y 2,17 g/L con carbonato, máximos de proteína de 60% y 34% respectivamente.
Perspectivas de la combinación de biomasa y bioproductos de alto valor en <i>Chlorella vulgaris</i>	Jiménez & Castillo, 2021	NA	Condiciones favorables: temperatura (15-26°C), pH (7.5-8.0), luz (62.5 μmol fotones m ⁻² s ⁻¹)	Gran potencial económico y amplio campo de aplicaciones, condiciones óptimas especificadas.
Caracterización de la biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada con suplementación de agua diaria.	Silva et al., 2022	Medio BG11	Fotobiorreactores a escala de laboratorio, medio BG11, concentración inicial de inóculo de 0.3 g/L	Concentración de biomasa de 3,86 g/L, presencia predominante de carbohidratos, proteínas y lípidos.

2.2. LOCALIZACIÓN

La presente investigación se realizó en el Centro Internacional Biotecnología Agroindustrial (CBA) de la Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Vereda Las Guacas, Municipio de Popayán, Cauca, con coordenadas geográficas 2°27'0.000" latitud Norte, 76°37'0.000" latitud oeste del meridiano de Greenwich, temperatura promedio 18°C y precipitación promedio de 2000 mm/año.

2.3. MARCO TEORICO

2.3.1. Biorrefinería de microalgas. La biorrefinería es un proceso para obtener biocombustibles, energía y productos de alto valor a través de transformación de biomasa y equipos de proceso, este concepto surge como una forma de mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero, ya que las emisiones de combustibles fósiles contribuyen en gran medida al calentamiento global, es decir, que una biorrefinería se caracteriza por convertir biomasa en productos comercializables y energía mediante enfoques de procesamiento de varios pasos (Chew et al., 2017).

Por lo cual, existen estrategias para cultivar, procesar y valorizar la biomasa de microalgas, y se clasifican globalmente en cuatro categorías: (i) solo producción de biocombustibles (compuestos de bajo valor), (ii) productos de alto valor agregado (pigmentos, proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y antioxidantes), y biocombustibles, (iii) productos de valor agregado medio (compuesto a granel) más biocombustibles, y finalmente, (iv) acoplado a otros procesos en el contexto de la economía circular (Figura 1) (Jacob-Lopes et al., 2018).

Además, la biorrefinería se caracteriza por obtener varios productos de una misma materia prima (Tabla 2), siendo las microalgas candidatos potenciales en dicho proceso, con aplicaciones en las industrias cosmética, nutricional y farmacéutica, también la generación de biocombustibles de tercera generación (Okeke et al., 2022).

Tabla 2. Potenciales de bioproductos obtenidos de biorrefinerías de microalgas

Actividad	Aplicación
Nutracéutico, antimicrobiano, antiinflamatorio	Suplemento nutricional, anti-proliferativo, capacidad para combatir infecciones y enfermedades
Antioxidante, pigmentos	Suplemento e ingrediente alimentario para humanos, Alimentación de pescados y mariscos.
Biocombustibles	Producción de gas natural en fermentadores vía digestión de biomasa para obtener biodiesel
Fertilizantes	Uso de la biomasa como fuente de nitrógeno y fósforo en tierra cultivable
Compuestos de alto valor	Clorofila-a, ficocianina, β -caroteno, ácido linolénico, ácido eicosapentaenoico y estable isótopos bioquímicos
Contra el cáncer y antitumoral	Anti proliferativo. Inducir la inhibición de G1 en célula post carcinoma gástrico
Industria química	Compuestos orgánicos volátiles

Fuente: Adaptado de (Chew et al., 2017)

Las microalgas son organismos fotosintéticos que pueden ser procariotas (cianobacterias) o eucariotas (*chlorophytas*), son talofitas, es decir, que presentan deficiencias en raíces, tallos y hojas, además poseen clorofila para llevar a cabo la fotosíntesis, toleran condiciones adversas debido a su estructura multicelular o unicelular simple, requiriendo prácticamente solo luz solar y nutrientes inorgánicos simples, pueden crecer rápidamente en diferentes ambientes acuáticos y se caracterizan por una alta eficiencia fotosintética en comparación con plantas terrestres de mayor tamaño (Campo, 2021).

De acuerdo a sus requerimientos nutricionales las microalgas se pueden clasificar en tres grandes clases: autótrofas, heterótrofas y mixotróficas. En primer lugar, para

crecer autotróficamente las microalgas necesitan principalmente una fuente de carbono que normalmente sería CO₂, además de luz como fuente de energía. En este caso, dentro del proceso autotrófico, las células almacenan energía lumínica en sus fotosistemas durante la exposición a la luz (Gonzalez, 2010). En segunda instancia, para el crecimiento heterótrofo, éstas son privadas de la luz y son alimentadas con una fuente externa de carbono orgánico como: glicerol, acetato o glucosa que actúa como fuente de energía primaria para su metabolismo (Diaz & Diaz, 2012).

Aunque la producción de biomasa de microalgas depende de la cepa, los cultivos en condición heterotrófica pueden dar una mayor productividad en comparación con otras condiciones, sin embargo, presenta algunas condiciones desfavorables (ver tabla 3) (Gouveia, 2011).

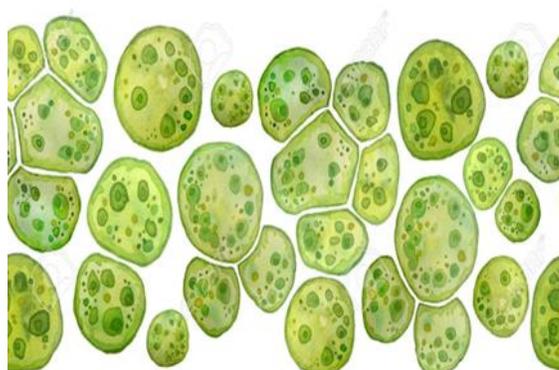
Tabla 3. Comparación de las características de diferentes condiciones de cultivo

Condición de cultivo	Fuente de energía	Fuente de carbono	Densidad celular	Reactor de escalamiento	Costo	Problemas de escalamiento
Fototrófico	Bajo	Inorgánico	Bajo	Estanque abierto o PBR	Bajo	Baja densidad celular
Heterotrófico	Orgánico	Orgánico	Alto	Fermentador convencional	Medio	Alta contaminación,
Mixotrófico	Bajo y orgánico	Inorgánico y orgánico	Medio	Cerrado PBR	Alto	Contaminación
Photo heterotrófico	- Bajo	Orgánico	Medio	Cerrado PBR	Alto	Alta contaminación

Fuente. (Gouveia, 2011)

2.3.2 Microalga *Chlorella vulgaris*. *Chlorella vulgaris* se caracteriza por que sus células son circulares, su tamaño oscila entre 5-10 micras, y sus cloroplastos se presentan como pigmentos fotosintéticos principales (clorofila a y b), los cuales tienen un pico de absorción máximo alrededor de 430 y 675 nm (Gonzalez, 2010), no contiene flagelos, se observan como células individuales y puede llegar a formar colonias de hasta 64 células, su reproducción se da por división celular (Figura 1) (Ru et al., 2020). Entre las principales características de esta especie se tiene:

Figura 1. *Chlorella vulgaris*



Clasificación taxonómica

Género: *Chlorella*

Familia: Chlorellaceae

Especie: *vulgaris*

Taxonomía: Chlorophyta

División: Chlorophyta

Clase: Trebouxiophyceae

* *Chlorella vulgaris* (NCBI, 2022)

Con respecto a la composición de esta especie, sobresale el porcentaje de proteína el cual puede llegar a representar el 60%, los demás componentes como los carbohidratos, lípidos y cenizas es de 23%, 9% y 5% respectivamente (ver tabla 4). Además, se destaca por la presencia de vitaminas como B12, A, D, K; y minerales como Ca, Mg, Zn, Na, Fe y Cu (Pandey et al., 2014)(Ru et al., 2020).

Tabla 4. Composición proximal de diferentes microalgas

Microalgas	% proteína	% grasa	% cenizas	% Humedad
<i>Scenedesmus obliquus</i>	31,07±0,09	15,13±0,12	15,07±0,09	2,57±0,06
<i>Chlorella vulgaris</i>	56,08 ±0,05	11,90±0,08	8,87±0,05	1,05±0,04
<i>Spirulina platensis</i>	53,30±0,22	12,83±0,17	10,30±0,08	2,03±0,08

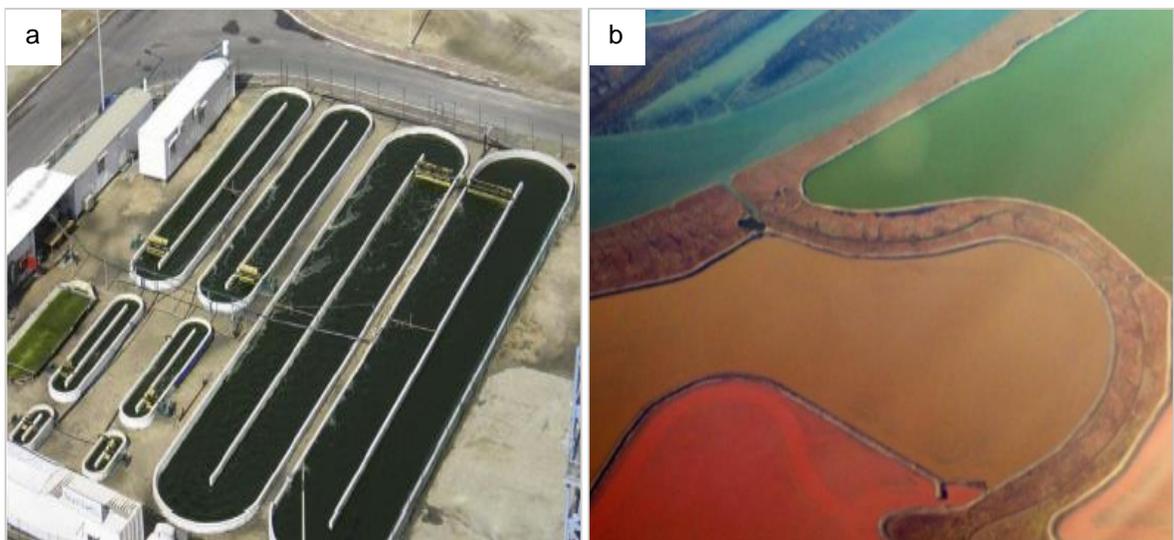
Fuente: El-Chaghaby et al., 2019

Además, se resalta en las microalgas la presencia de compuestos bioactivos con carácter antioxidante, además, contienen flavonoides como las isoflavonas, flavanonas, flavonoles y dihidrocalcona, como también aminoácidos esenciales (Chaghaby et al., 2019)

2.3.3. Producción de biomasa y condiciones de cultivo. Para la obtención de biomasa a partir de microalgas se encuentran dos sistemas de cultivo con características y mecanismos de operación diferentes, los cuales son:

2.3.3.1. Sistemas abiertos. Dentro de este tipo de sistema se encuentran aquellos que se realizan en aguas naturales como lagos, lagunas, estanques (simples y canaletas) y son adecuados para obtener biomasa para productos de bajo valor como los biocombustibles (Figura 2-a). Las características de este tipo de sistema se relacionan con facilidades de construcción, operación, poca profundidad (15 a 20 cm), simplicidad de operación, bajos costos, entre otras (Pandey et al., 2014).

Figura 2. Sistemas de estanques de cultivos microalgales



* a) Sistema abierto tipo raceway; b) Sistemas tipo lagos artificiales (Pandey et al., 2014)

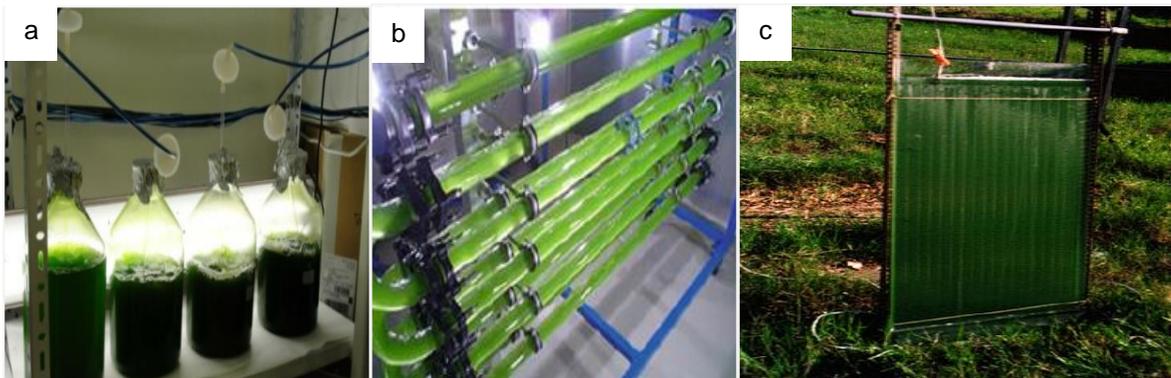
Por otra parte, se encuentran aquellas en piscinas de agua que pueden ser artificiales o naturales (ver figura 2-b), dónde están sometidos a las condiciones naturales y crecen sin ningún tipo de mezclado, por lo tanto, no son considerados fotobiorreactores (González, 2016).

Estos sistemas de cultivos pueden ser utilizado en el tratamiento de aguas residuales, disminuyendo costos por requerimiento nutricional del cultivo y logrando alcanzar concentraciones hasta de 0.7 g/L y productividades por hectárea de hasta 50 ton/año, por esta razón estos sistemas son los más rentables en términos de producción versus costo (Hernández, 2014 & Rawat et al., 2011)

Sin embargo, las limitaciones de los sistemas abiertos radican en la mala utilización de luz por las células, pérdidas de agua por evaporación, difusión de CO₂ al medio, requerimiento de grandes extensiones de tierra, control de variables, contaminación del medio y restricción del crecimiento por proliferación de otro tipo de microorganismo (Pandey et al., 2014).

2.3.3.2. Sistemas cerrados. También conocidos como fotobiorreactores, se encuentran diferentes modelos como: cámara de microalgas (escala laboratorio), es un sistema que lo que hace es escalar una microalga para aumentar su volumen, existen recipientes de tamaños y formas muy diversas, manteniendo controladas todas las variables, mientras que a escala industrial se encuentran platos delgados, columnas, tubular (horizontal y vertical), tanques como se observa en la figura 3, (González, 2016 & Gouveia, 2011).

Figura 3. Recipientes para producir microalgas en cámara



* a) Fotobiorreactores escala laboratorio; b) Platos delgados; c) Tubular (Gouveia, 2011)

Las características de estos sistemas permiten el control de variables (temperatura, pH, concentración de CO₂, iluminación), aumentan la concentración de células, minimizan la contaminación, evita pérdidas de CO₂ y la evaporación de agua; la desventaja principal está relacionada con los costos de instalación y operación que estos requieren (Pandey et al., 2014; González, 2016).

Generalmente los sistemas cerrados y abiertos pueden presentar perspectivas y limitaciones (ver tabla 4).

Tabla 5. Perspectivas y limitaciones de varios sistemas de cultivo

Sistema de cultivo		Perspectivas	Limitaciones
Abierto	Estanques	Relativamente económicos, fáciles de limpiar después del cultivo, buena producción de algas en masa.	Poco control de las condiciones de cultivo, dificultad para cultivar algas en periodos largos, poca productividad, ocupan gran masa de tierra, los cultivos se contaminan
	Raceway	Se puede operar en un modo continuo.	Alta relación de área/volumen, Alta potencia en el sistema de agitación y evitar la precipitación.
Cerrado	Columna vertical	Alta transferencia de masa, buena mezcla con bajo esfuerzo cortante, bajo consumo de energía, alto potencial de escalabilidad, fácil de esterilizar, fotoinhibición y foto-oxidación reducida.	La construcción requiere de materiales sofisticados, estrés a los cultivos de algas, disminución de la superficie de iluminación al realizar escalamiento
	Placa plana	Gran área de superficie de iluminación, adecuada para cultivos al aire libre, buena productividad de biomasa, relativamente barato, fácil de limpiar, baja acumulación de oxígeno.	La ampliación requiere muchos compartimentos y materiales de apoyo, dificultad para controlar la temperatura del cultivo, estrés hidrodinámico en algunas algas.
	Tubular horizontal	Gran área de superficie de iluminación, adecuada para cultivos al aire libre, buena producción de biomasa relativamente barato	Gradientes de pH, oxígeno disuelto y CO ₂ a lo largo de los tubos, incrustaciones.

Fuente: (González, 2016).

2.3.4. Condiciones del cultivo. Las condiciones de cultivo dependen mucho de la molécula de interés del estudio.

Temperatura. Es uno de los principales factores que regulan la morfología y la fisiología celular, así como los subproductos de la biomasa de microalgas, el rango de variación de temperatura está entre 25 °C y 45 °C. Una temperatura de cultivo adecuada podría promover las microalgas el crecimiento, mientras que, a alta temperatura, la producción de biomasa de microalgas disminuiría, debido principalmente a la desnaturalización de las proteínas/enzimas esenciales, así como a los efectos inhibitorios sobre fisiología celular (Pandey et al., 2014).

Luminosidad. Se considera un factor crítico ya que influye directamente sobre el crecimiento y composición de microalgas debido al rango de su longitud de onda, También es necesario mencionar que el tipo de iluminación y la intensidad influyen directamente sobre la producción de biomasa. Obtener una buena producción requiere de una correcta distribución de la luz sobre los sistemas, sin embargo, esta disminuye significativamente, bien sea por la distancia o por una alta concentración de células en el medio (Pandey et al., 2014).

pH. Otro de los parámetros con incidencia directa sobre la producción de biomasa es el pH, debido a que afecta la reacción bioquímica de las microalgas, pudiendo llegar a generar un colapso total en el medio de cultivo, la variación de este factor se asocia en algunos casos con la inyección de CO₂, el cual al disolverse produce HCO. El rango de pH oscila entre 7 y 9 para *Chlorella vulgaris*, sin embargo, puede tolerar pH de 4, es importante resaltar que este intervalo varía para otras especies y puede alcanzar valores de 10 (Pandey et al., 2014).

Salinidad. Las microalgas han desarrollado la capacidad de sobrevivir a ambientes marinos, por lo que desarrollaron mecanismos de protección contra daños y las tensiones osmóticas del medio. Si bien concentraciones del 35% o superiores afectan el crecimiento y la eficiencia fotosintética, en algunos casos la condición de salinidad puede llegar a estimular la producción de determinados componentes como los carotenoides (Pandey et al., 2014).

2.3.5. Nutrientes en la producción de microalgas. De acuerdo con estudios de las condiciones de crecimiento de microalgas, los nutrientes más importantes son: carbono, nitrógeno y fósforo (Lopes et al., 2018).

Carbono. Generalmente se utilizan diferentes fuentes de carbono como el dióxido de carbono, metanol, acetato, glucosa entre otros. Sin embargo, el CO₂ sigue siendo la fuente de carbono más utilizada debido a su costo en comparación con los de fuentes orgánicas (Lopes et al., 2018). De acuerdo como las microalgas asimilen este elemento, se puede definir la condición del cultivo como fotoautotrófico y heterotrófico, en el primer caso, la fuente se obtiene origen inorgánico (CO₂-

bicarbonatos), para el segundo caso, lo obtiene de fuentes orgánicas y pueden o no llegar a requerir iluminación (Lopes et al., 2018).

Nitrógeno. Este elemento desempeña un papel importante para la formación de proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas y pigmentos. La manera como se suministra este nutriente es en forma de nitrito y en algunas veces como amonio, el mecanismo de asimilación es transporte activo (Lopes et al., 2018).

La disminución de N en el medio cultivo puede llegar a generar un estrés, aspecto que estimula la producción de lípidos, el cual puede llegar a ser 10% o 20% superior al obtenido en condiciones normales, esto se relaciona con la descomposición de proteínas y producción de compuestos de alto valor energético (Pandey et al., 2014).

Fósforo. El mecanismo de asimilación se da por transporte activo al igual que el nitrógeno; es fundamental en el crecimiento, cumple funciones metabólicas celulares como la transferencia de energía, síntesis de ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico, entre otros. Se suministra el medio de cultivo en forma de ortofosfato (PO_4^{3-}) e influye sobre la composición de la biomasa producida. Cabe resaltar, que la relación N-P es importante a nivel de producción, donde se mencionan algunas para *Chlorella vulgaris*: 8:1; 16:1 (relación de Redfield), 24:1 (Jacob-Lopes et al., 2018).

Micronutrientes. Es importante mencionar que la adición de micronutrientes desempeña un papel importante en el crecimiento celular, entre los que se mencionan: azufre (S), potasio (K), sodio (Na), hierro (Fe), magnesio (Mg), calcio (Ca), boro (B), el cobre (Cu), el manganeso (Mn), zinc (Zn), molibdeno (Mo), cobalto (Co), vanadio (V) y selenio (Se) (Lopes et al., 2018).

2.3.6. Aplicaciones de la biomasa. Las microalgas tienen un amplio campo de aplicación en diferentes campos del sector energético, alimentario, farmacéutico y biotecnológico, a continuación, se presenta una breve descripción.

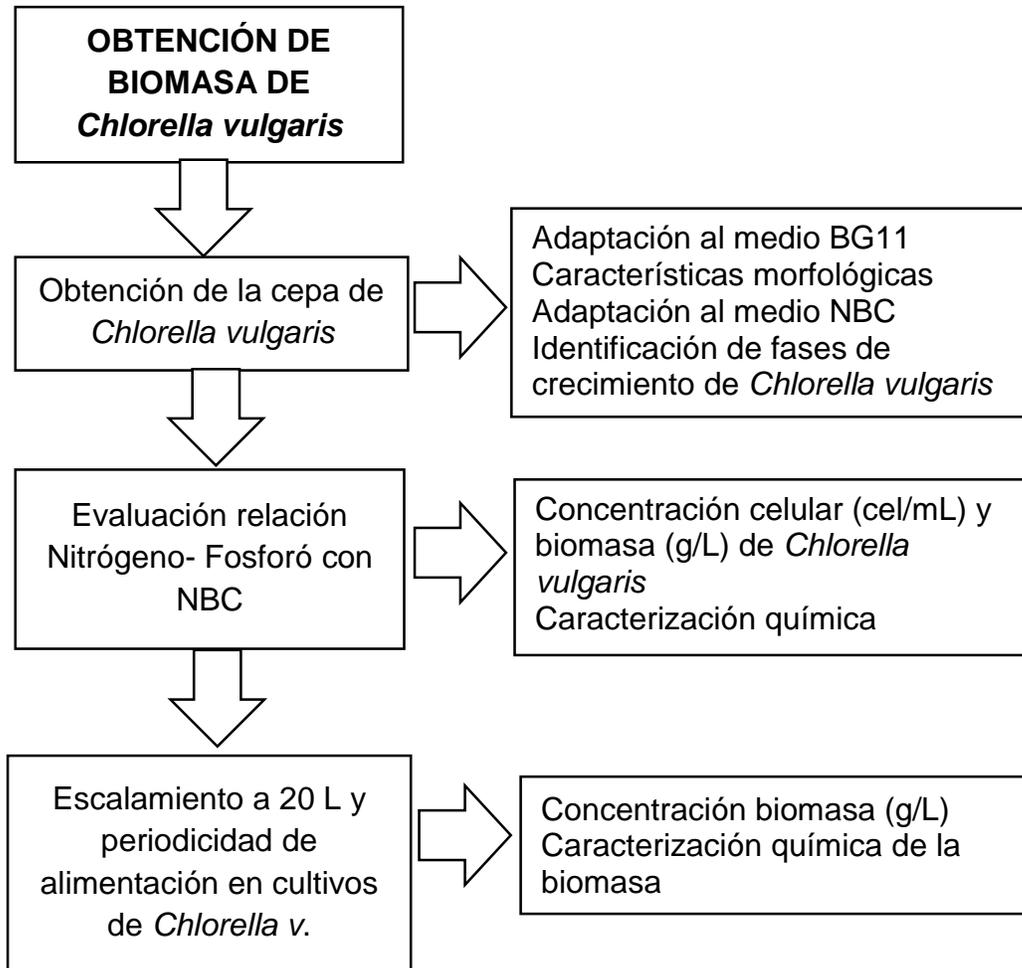
Tabla 6. Aplicaciones de la biomasa microalgal

Aplicaciones	Descripción
Alimentario	Desarrollo de productos funcionales (antioxidantes), vitaminas, proteínas de alta digestibilidad y ácidos grasos esenciales. Utilización en tabletas, cápsulas, pastas, galletas, alimentos y como suplementos
Farmacéutico	Producción de antibióticos como el ácido acrílico y la ficocianina con propiedades antioxidantes.
Pigmentos	Uso de pigmentos como clorofila, carotenoides y ficobilinas en la industria alimentaria, sustituyendo colorantes artificiales prohibidos. El b-caroteno (carotenoide) se utiliza como colorante y provitamina A.
Biocombustibles	Biomasa como fuente potencial para la obtención de etanol mediante procesos de fermentación. Presencia de ácidos grasos para la producción de biodiesel, un combustible más amigable con el medio ambiente
Biomateriales	Producción de biomateriales a partir de las tres fracciones principales de la biomasa (lípidos, proteínas y carbohidratos). Las proteínas son utilizadas en la fabricación de termoplásticos, espumas, adhesivos, biocompuestos y bioplásticos.
Captura de CO2	Eficiente fijación de dióxido de carbono de diferentes fuentes (atmósfera, gases industriales, sales de carbono solubles). Capacidad hasta 50 veces superior a las plantas.

3. METODOLOGÍA

En la figura 4 se describe de manera general la metodología propuesta para dar cumplimiento a los objetivos planteados.

Figura 4. Diagrama metodológico



3.1. OBTECCIÓN, DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR Y ADAPTACIÓN DE *Chlorella vulgaris*

A continuación se detalla el proceso de empleando inicialmente para el desarrollo de la investigación.

3.1.1. Microorganismo utilizado. La cepa de *Chlorella vulgaris* para el desarrollo del trabajo se obtuvo mediante actividades de cooperación, con el “Grupo de Investigación en Biocombustibles y Biorrefinerías – GRUBIOC” de la Universidad del Valle, quienes adquirieron la cepa del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE).

Se obtuvo 90 mL de inóculo de *Chlorella vulgaris* en dos tubos falcon de 50 mL, los cuales fueron transportados hasta el Centro Internacional de Biotecnología Agroindustrial (CBA), de la Universidad del Cauca.

Inicialmente se realizó un reconocimiento a nivel microscópico de *Chlorella vulgaris*, para lo cual se tomó una alícuota de 20 µL de cada muestra; luego se observó en el microscopio óptico lográndose ver la pigmentación, estructura general (zeiss axio lab A1, China), en los objetivos de 40X y 100X respectivamente.

3.1.2. Determinación de la concentración celular. Para realizar el seguimiento en los medios de cultivo líquido se empleó la técnica de conteo en cámara de Neubauer, tomando 1 mL de cada tratamiento realizando una agitación previa del reactor. De ese eppendor se tomaron 20 µL y se observó en el microscopio con ayuda de la cámara de Neubauer. Los resultados se expresaron en cel/mL mediante la ecuación 1 (Ma'mun et al., 2022).

$$\text{Concentración } \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right) = \left(\frac{\text{Número de celular} * \text{inverso de la dilución}}{(\text{area} * \text{profundidad} * \text{volumen}) * \left(\frac{\# \text{cuadros leídos}}{25}\right)} \right) * \left(\frac{\text{mm}^3}{0.001 \text{ mL}}\right) \text{ Ec. 1}$$

3.1.3. Adaptación de la cepa. Se definieron las siguientes condiciones aireación 1 vvm empleando bombas “SOBO aquarium SB-648A air pump”; iluminación con fotoperiodo 12:12 h luz oscuridad empleando lámparas fluorescentes de 2880 Lux; temperatura de 28°C ± 3°C controlada con calefactores y pH con un rango entre 8.0 y 8.6. Variables como la temperatura, pH, ppm, y conductividad se midieron empleando multiparamétrico “WATER QUALITY TESTER”, tomando 15 mL del medio de cultivo

La inoculación al medio de cultivo tanto líquido se realizó en cabina de flujo de laminar. Para medio líquido, se tomó 25 mL del inóculo y se agregó en 250 mL del medio de cultivo BG11.

3.1.4. Siembra en medio sólido. En medio sólido, se realizó con asa de siembra utilizando la técnica por agotamiento y siembra con perlas, en ambos casos se trabajó por duplicado. Para obtener un cultivo microalgal axénico y suficiente se empleó la técnica de siembra en placa de agar con el medio de cultivo BG11, así mismo, se utilizó el medio líquido, el cual se preparó de acuerdo al ANEXO B-Tabla 16. Luego se llevó los medios a esterilización en autoclave tipo olla a 121°C por 20 minutos, y los fotobiorreactores fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 3%.

3.1.5. Mantenimiento del cultivo microalgal. Para lograr la viabilidad de, la cepa y garantizar el crecimiento del mismo, se requirió un mantenimiento constante del cultivo, partiendo de un fotobiorreactor de 250 mL, renovando el cultivo con medio fresco BG11, hasta alcanzar un volumen de 1L, teniendo como principio que para la viabilidad del cultivo se tuviera una concentración celular adecuada

Por otra parte, mismo tiempo, se realizó la siembra en medio sólido como segundo mecanismo de mantenimiento de la cepa conservando por periodos de aproximadamente 10 a 15 días.

3.1.6. Activación y escalamiento de *Chlorella vulgaris* en medio BG11. Para activar la cepa conservada en medio sólido, se realizó un raspado de la caja de petri, y se transfirió en 10 mL de medio BG11 estéril en un tubo de ensayo, bajo las condiciones descritas anteriormente en el numeral 3.1.3 por un periodo de 1 días, luego se llevó a medio líquido estéril en una relación del 10% de inóculo, iniciando en un volumen de 250 mL, en crecimiento durante 5 días; cuando la concentración celular llegó a la fase exponencial se realizó una segunda alimentación, incrementando hasta un volumen de 500 mL.

Con el fin de conservar la cepa en medio líquido se realizó un escalamiento en esta etapa, donde se llevó a volúmenes de 1 L, 3 L, 10 L y 18 L de manera escalonada agregando medio fresco al reactor para incrementar el inóculo. Una vez alcanzado los 18 L, se realizó la cosecha del 50% del volumen del reactor de acuerdo con lo descrito en literal 3.1.9; posteriormente se realizó reposición del volumen retirado con medio fresco BG11 para continuar con el proceso del mantenimiento del cultivo.

3.1.7. Evaluación de las fases de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en medio BG11. Para evaluar la cinética de crecimiento en medio de cultivo BG11, se realizaron montajes por triplicado en fotobiorreactores de 1 L, bajo las condiciones establecidas en el numeral 3.1.4.

A partir del reactor de volumen de 18 L, se tomó un inóculo del 10%, con el propósito de obtener un cultivo nuevo en volumen de 1L ya adaptado. Este cultivo se dejó crecer durante un periodo de 6-7 días, alcanzando así su fase exponencial máxima, y fue el insumo para iniciar los ensayos para identificar las fases de crecimiento.

De acuerdo a lo anterior, los ensayos de identificación de fase de crecimiento tuvieron una duración de 10 días, durante los cuales se realizó conteo celular diario según lo descrito en el literal 3.1.2.

3.1.8. Cálculos cinéticos. La velocidad de crecimiento y tiempo de generación se calculó en base a las ecuaciones 2 y 3:

$$\mu = \frac{[\ln(Nt) - \ln(NO)]}{(t - t_0)} \text{ Ec. 2}$$

Dónde:

t: tiempo transcurrido entre el inicio y fin de la prueba.

t₀: tiempo inicial.

N₀: densidad celular inicial.

N_t: densidad celular final.

El tiempo de generación se calculó con la fórmula:

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu} \text{ Ec. 3}$$

Tasa de crecimiento específica (día⁻¹):

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right)}{t_2 - t_1} \text{ Ec. 4}$$

Productividad volumétrica:

$$r_x = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} \text{ Ec. 5}$$

Donde X₁ y X₂ son la concentración de biomasa (gL⁻¹) en días t₁ y t₂ respectivamente.

3.1.9. Cosecha de la biomasa microalgal. La cosecha de biomasa microalgal se realizó empleando una centrífuga Hermle Z326K a 4500 rpm por 20 min. Para fotobiorreactores de mayor volumen se empleó el método de precipitación durante 12 horas, y luego se centrifugó. La biomasa se llevó a ultra congelación a -80°C, posteriormente se llevó al liofilizador (freeze dryers. USA) durante 24 horas a 10 Pa, la muestra liofilizada se trituró en mortero y se almacenó en un desecador, para su posterior análisis.

3.2. INFLUENCIA DE LA RELACIÓN NITRÓGENO-FÓSFORO (N-P) EN CULTIVOS A ESCALA LABORATORIO DE *Chlorella vulgaris*.

Para evaluar la influencia N-P, se utilizó como medio de cultivo los fertilizantes comerciales, mediante las siguientes etapas: 2

3.2.1 Adaptación de *Chlorella vulgaris* al medio NBC. El procedimiento para adaptar *Chlorella vulgaris* al medio alternativo se llevó a cabo de siguiente manera: En primer lugar, se determinaron los requerimientos de nitrógeno (N) y fósforo (P) para la alimentación de la microalga, mediante cálculos estequiométricos, teniendo en cuenta el aporte de estos macronutrientes en los fertilizantes empleados según el ANEXO C. Se utilizó como base de cálculo la información del medio BG11 para un litro de cultivo NBC (ver ANEXO C-Tablas 17 y 18), determinando una relación molar 15:1 Nitrógeno-Fósforo (N-P).

En segundo lugar, se dio inicio a la etapa de adaptación, en el cual se trabajó en volúmenes de 250 mL, conservando la proporción del 10% de inóculo de acuerdo a las condiciones establecidas en el literal 3.1.4, y realizando seguimiento de la concentración celular.

Finalmente, se inició un proceso de escalamiento de cultivo microalgal para obtener la cantidad de inóculo necesario para las pruebas de determinación relación N-P, periodicidad y escalamiento, y se garantizó concentración celular inicial alrededor de 1.0×10^7 cel/mL a 2.01×10^7 cel/mL. Por último, se realizó un escalamiento partiendo de un volumen de 500 mL, 1 L, 3 L, 10 L y 18 L, según lo descrito en la metodología 3.1.8.

3.2.2. Evaluación de las fases de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en NBC. Se evaluó mediante seguimiento de concentración celular (cel/mL), determinada por conteo en cámara de Neubauer, las fuentes de nitrógeno y fósforo requeridas, se aportan a través de los fertilizantes líquidos comerciales de bajo costo y se trabajó como blanco un fotobiorreactor en medio de cultivo BG11.

3.2.3. Evaluación de la relación N-P. Con el propósito de evaluar la influencia de la relación N-P sobre la composición química y determinar el comportamiento de *Chlorella vulgaris* respecto a la concentración de biomasa (g/L), se realizaron montajes por triplicado en reactores a volúmenes de trabajo de 1L, llevando un seguimiento de la concentración celular y biomasa (g/L) por un periodo de 12 días momento en el cual alcanzó la fase de latencia.

3.2.4. Cuantificación de Biomasa. Para cuantificar la biomasa se tomó 5 mL de muestra por triplicado de cada reactor en tubos falcon de 15 mL, se centrifugaron a 4500 rpm por 15 min, se eliminó parte del del sobrenadante y se llevó a un eppendorf aforando a 1 mL se centrifugó a 13000 rpm por 20 min. Por último, se retiró el sobrenadante y la biomasa se llevó a una temperatura de 45 °C hasta peso constante en horno de convección forzada Lab Companion OF-01E (USA).

Para determinar la cantidad de biomasa, se realizó por diferencia de peso, teniendo en cuenta el volumen tomado del reactor se realizó la extrapolación para determinar la cantidad de biomasa por litro de cultivo.

3.2.5. Diseño experimental. Se realizó un diseño experimental aleatorio completamente al azar unifactorial, evaluando la relación N-P en tres niveles y una muestra control (ver tabla 7); el periodo de evaluación fue de 10 días hasta que exhibió un comportamiento de latencia.

Tabla 7 Diseño experimental

Factor	Niveles				Variable de respuesta
	Bajo	Centra I	Alto	Blanco BG11	
Relación N-P (mol/mol)	10	15	20	15	Concentración biomasa (g/L)

Los resultados obtenidos para cada una de las variables se analizaron estadísticamente empleando un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el software Minitab.

La cosecha de la biomasa de cada uno de los reactores se realizó de acuerdo con lo descrito en literal 3.1.9.

3.2.6. Análisis preliminar de costos en función del suministro de nutrientes. Se realizó un análisis preliminar de los costos incurridos en cuanto al suministro de nutrientes, para lo cual se tuvo en cuenta las cantidades empleadas en la preparación de los medios de cultivo convencional y alternativo, para tal efecto se realizó una comparación en la concentración de biomasa (g/L) y el costo de producir 1g en las condiciones establecidas en el procedimiento descrito en el literal 3.1.4.

3.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BIOMASA DE *Chlorella vulgaris*.

Se describe la metodología para la evaluación de las propiedades químicas de la biomasa microalgal.

3.3.1. Proteínas. Se empleó el método establecido por Lowry (Lowry et al., 1951 & Calvache & Edinson, 2013) se tomaron 5 mg de la biomasa, se adiciono 250 μL TCA 24%, luego se incubó a 25°C por 15 minutos, adicionalmente se agregaron 600 μL de agua destilada, llevando a centrifugación 13000 rpm por 15 min a 4°C, separando en eppendorf el pellet y sobrenadante. Luego se llevó a cabo la metodología descrita en el KIT (Pierce, 2020), agregando 0,5 μL reactivo A, llevando a incubación 55°C por 3 horas, luego se centrifugo a 13000 rpm por 20 min. Se tomó 25 μL del sobrenadante y 200 μL BCA se incubó a 37°C por 30 min a 120 rpm (Phong et al., 2018).

Después se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV 562 nm. Los valores fueron transformados de una curva patrón elaborada a partir de albúmina sérica bovina (BSA).

3.3.2. Extracto etéreo. Para cuantificación de extracto etéreo se siguió la norma (AOAC, 2023), donde se pesó 1,0 g de muestra dentro de cartuchos de extracción micro soxhlet y se procesó en un sistema de extracción SOXHLET RAYPA (España), en éter etílico con reflujo durante 8 horas. Después del tiempo de extracción las muestras se colocaron en una estufa a 60 °C durante 1 hora para eliminar el éter restante.

3.3.3. Cenizas. El contenido de cenizas se determinó siguiendo norma (AOAC, 2023); se pesó 0,5 g de muestra seca en crisol de porcelana y se llevó a mufla Thermolyne Fumace 1400 (USA) a 550 °C por 22 horas.

3.3.4. Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. La presencia de polifenoles se determinó empleando la metodología de Folin Ciocalteu. La capacidad antioxidante se midió utilizando los métodos ABTS, DPPH Y FRAP.

3.3.5 Polifenoles totales. Se realizó bajo la metodología (Nieto et al., 2016) , se pesó 0.1 g de biomasa y se adicionó 6 mL de NaOH 2M y se dejó reaccionando por 18 h a 25°C, luego se agregaron 1.14 mL de HCl puro, se centrifugó a 3800 rpm por 15 min. Luego se tomó 40 μL del sobrenadante y 1800 μL de reactivo Folin, aplicando vortex por 15 segundos, dejando en reposo por 15 min, se agregó NHCO_3 al 7,5%, se agitó nuevamente y se llevó a reacción por 1h a condiciones ambientales, al final se midió con absorbancia de 765 nm, usando un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV 1800) (Acosta et al., 2022).

3.3.6. Compuestos fenólicos extraíbles (EPC). La extracción y el análisis de EPC se basaron en el método descrito en la (Pico et al., 2019), con ligeras modificaciones. Se pesaron aproximadamente $0.1 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$ de muestra. Se realizaron dos extracciones, la primera con etanol/H₂O (80/20) y la segunda con acetona/H₂O (70/30) se dejaron en incubación a 30°C por 24 horas en el micro shaker. El sobrenadante de ambas extracciones se combinó y se llevó a un volumen final de 1 ml con agua desionizada. El extracto se mantuvo a -80°C para determinación colorimétrica mediante la reacción de Folin-Ciocalteu o evaluación de la capacidad antioxidante. Para realizar la lectura de cada una de EPC se realizó una dilución 1:10 extracto/H₂O (Nieto et al., 2016).

3.3.6.1. ABTS. Se tomó 135 µL del extracto más 4 mL de la solución ABTS y se cubrió completamente con papel de aluminio. Se realizó vortex por 15 seg, luego se dejó en reacción por 30 minutos bajo oscuridad; el blanco se preparó con 4 mL de tampón acetato y 135 µL de etanol. Se tomó 300 µL y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 729,7 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV 1800) (Nieto et al., 2016).

3.3.6.2. DPPH. Se tomó 3.9 mL de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) y 100 µL de extracto, la reacción se inició con agitación en vortex durante 5 s. El etanol se utilizó como blanco (100 µL de etanol + 3.9 mL de DPPH). Las muestras se cubrieron con papel aluminio y se dejaron reaccionar por 30 minutos, luego se midió la absorbancia a 517 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV 1800) (Nieto et al., 2016).

4.3.6.3. FRAP. Se tomó 1.8 ml de solución que contiene (2.5 ml de TPTZ 0,01 M, 2.5 ml de FeCl₃ 0.02 M y 25 ml de tampón de acetato de sodio 0.3 M, pH 3.6), 180 ml de agua destilada y 60 µL del extracto, se agitaron durante 15 s, posteriormente se incubaron a 37 °C por 30 min. El blanco se realizó con agua destilada; luego se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV 1800) (Nieto et al., 2016).

3.3.7. Determinación del contenido de carotenoides por método espectrofotométrico. La extracción de pigmentos carotenoides se realizó siguiendo la metodología descrita por las Refs. 25–27 con modificaciones, en dos etapas: extracción sólido-líquido y extracción líquido-líquido, de las cuales se ajustó la primera etapa de extracción (Nieto Et Al., 2016).

Se disolvió 1 g de muestra con 5 mL de acetona, se agitó en vórtex por 30 s y se dejó en reposo por 10 min. Luego se agregó 5 mL de éter de petróleo (98 %) y 0.1 % p/p de butilhidroxitolueno (BHT) y se agitó por 1 minuto. Posteriormente se adiciono 2.5 mL de agua destilada y vórtex por 15 s. La muestra se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 5 °C. Se tomó la fase orgánica con una pipeta graduada y se transfirió a un tubo falcón limpio y seco recubierto con papel aluminio. La fase acuosa se centrifuga nuevamente con 2.5 mL de acetona, 2.5 mL de éter de

petróleo, 0.1 % de antioxidante BHT y 1.25 mL de agua destilada. La identificación y cuantificación de los β -carotenos se realizó mediante un barrido espectral a longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV 1800) (Acosta et al., 2022).

3.3.8. Caracterización bioquímica de la biomasa de *Chlorella vulgaris* en fase exponencial en medio de cultivo NBC. Teniendo en cuenta que la biomasa microalgal en el diseño experimental del literal 3.2.5, fue cosechada en fase de latencia, se realizó una réplica de las relaciones N-P 10:1; 15:1; 20; mol/mol, en fotobiorreactores de 5 L, determinando concentración celular (cel/mL) y de biomasa (g/L); al llegar a su máxima fase exponencial se cosechó la biomasa por centrifugación y se secó su respectiva caracterización química.

3.4. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE ESCALAMIENTO Y PERIODICIDAD DE ALIMENTACIÓN SOBRE *Chlorella vulgaris*.

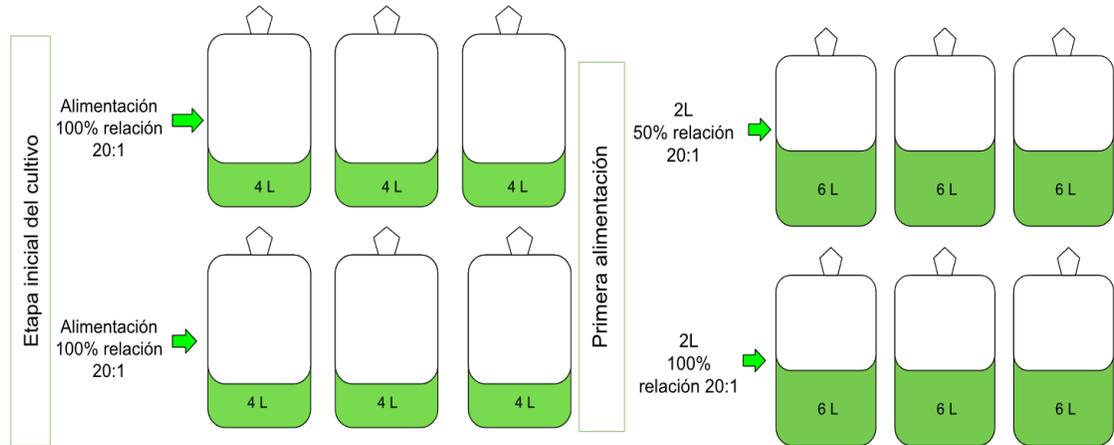
3.4.1. Escalamiento y periodicidad. Para realizar el escalamiento se seleccionó la relación 20:1 (N-P mol/mol) como la mejor; con base en los resultados obtenidos en la fase anterior, teniendo en cuenta la concentración de biomasa (g/L) y porcentaje de proteína.

Para evaluar el tiempo de alimentación se estableció un periodo de 5 días, tomando como soporte los ensayos preliminares realizados para crecimiento celular en NBC.

Definidas estas condiciones se procedió a realizar 2 montajes por triplicado a volúmenes de 4L, una vez se llegó al quinto día se realizó la primera alimentación como se muestra en la figura 5.

Se iniciaron los cultivos en fotobiorreactores con capacidad de 20L empleando la relación 20:1 N-P con base a los fertilizantes comerciales líquidos, en un volumen de 4 L; a partir de la primera alimentación se manejó una proporción del 50 (T50) y 100 (T100%) de la concentración de nutrientes aportados por el medio NBC.

Figura 5. Esquema del escalamiento y alimentación sobre *Chlorella vulgaris*.



Para las demás alimentaciones se agregó la mitad del volumen presente en el reactor, manejando las proporciones de la relación 20:1 empleadas en la primera alimentación, hasta alcanzar un volumen de 18.5 L.

3.4.2. Diseño experimental. Se aplicó un diseño aleatorio completamente al azar unifactorial, teniendo como factor la concentración de nutrientes en dos niveles 50 y 100%, siendo la variable de respuesta la concentración de biomasa (g/L) será evaluado bajo lo establecido en el literal 3.1.10. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente empleando un análisis t-student.

3.4.3. Caracterización bioquímica de la biomasa de *Chlorella vulgaris*. Las propiedades químicas de la biomasa microalgal fueron determinadas según lo descrito en el literal 3.3.

3.4.4. Análisis preliminar de costos en función del suministro de nutrientes para el escalamiento. Se realizó un análisis preliminar de los costos incurridos en cuanto al suministro de nutrientes, para lo cual se tuvo en cuenta la cantidad empleada en el medio de cultivo NBC para la relación molar 20:1 N-P, para ello se realizó una comparación en la concentración de biomasa (g/L) y el costo de producir 1g de biomasa microalgal.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 OBTENCIÓN DE LA CEPA DE *Chlorella vulgaris*

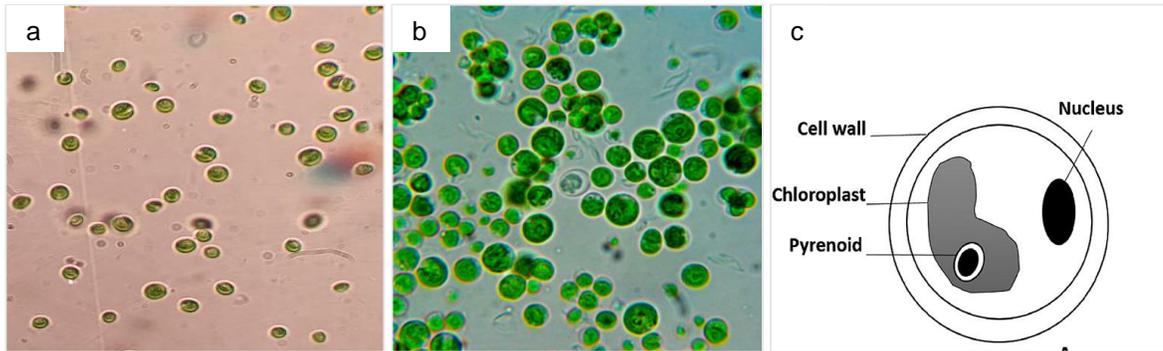
4.1.1 Microorganismo utilizado. En el ANEXO A-Figura 7 se muestra la cepa de *Chlorella vulgaris*, cantidad y color que presentaba al momento de llegar al laboratorio CBA. De igual manera, es importante mencionar que la cepa *Chlorella vulgaris* se obtuvo mediante el grupo GRUBIOC de la Universidad del Valle.

Se realizó un reconocimiento a nivel microscópico de *Chlorella vulgaris*, en el cual se pudo observar las características más representativas de esta especie como forma, tamaño y color (ANEXO A-Figura 8). El conteo por cámara de Neubauer permitió determinar una concentración inicial del inóculo de 8.85×10^6 cel/mL (Méndez et al., 2020)

4.1.2. Características morfológicas de *Chlorella vulgaris*. Teniendo en cuenta lo descrito por Ru et al.,(2020); Safi et al., (2014); Angulo, (2017); Li et al., (2016) & Coronado et al., (2022), Se identificaron las características morfológicas más representativas, a nivel microscópico (Figura 12), de la siguiente manera:

- Forma: Circular y ovalado
- Tamaño: No hay uniformidad entre células
- Color: verde (Presencia de Clorofila)
- Células unicelulares
- Superficie celular lisa, sin presencia de flagelos,
- Partes:
 - Cloroplasto
 - Núcleo

Figura 6. Características morfológicas de *Chlorella vulgaris*



* a) imagen de *Chlorella vulgaris* a nivel laboratorio, objetivo 100x; b) Imagen literatura de *Chlorella vulgaris* objetivo 100x; c) Estructura *Chlorella vulgaris* (Algaebank, 2022 & Ru et al.,(2020)

Las características microscópicas mencionadas coinciden con lo reportado para este especie por autores como Champenois et al., (2015); Ru et al., (2020) & Safi et al., (2014) Al observar al microscopio no es necesario realizar una tinción previa a las células, ya que la cantidad de clorofila y pigmentos permite observar de manera clara al microscopio. (Kanstrup & Balsby, 2018 & Coronado et al., 2022).

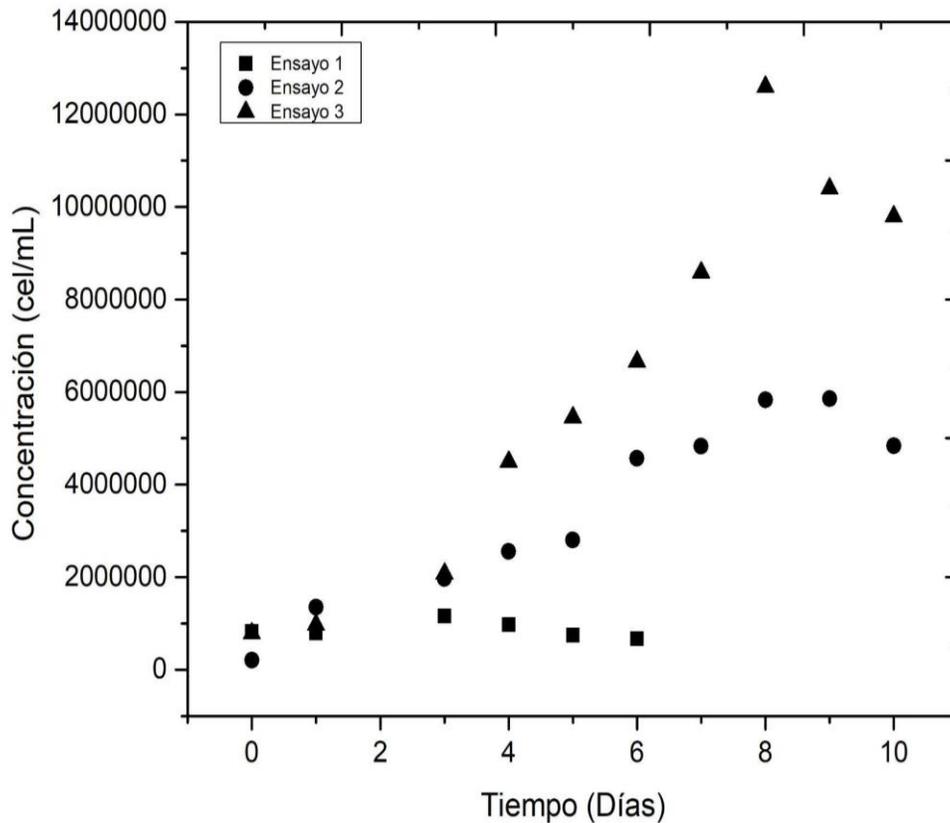
4.1.3. Pruebas preliminares. En la tabla 8 se presenta la adaptación de la cepa *Chlorella vulgaris* la cual llevó un periodo de 3 meses, debido a que se realizó un ajuste progresivo de las condiciones de cultivo como pH, temperatura y aireación.

Tabla 8. Condiciones en etapa de adaptación de *Chlorella vulgaris*

Condiciones de cultivo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
pH	7.0 - 7.5	7.0 - 7.5	8.0 - 8.5
Aireación	2 vvm	1 vvm	1 vmm
Temperatura	Temperatura ambiente	28 ± 3°C	28 ± 3°C
Iluminación	2800 lux	2800 lux	2800 lux

En la gráfica 1 se presentan las cinéticas de crecimiento para los diferentes ensayos que se llevaron a cabo en esta etapa.

Gráfica 1. Cinéticas de crecimiento de cada uno de los ensayos.



Para el ensayo 1 se trabajó bajo las condiciones según reportes encontrados en literatura (ANEXO A - Figura 9) (Pandey et al., 2014; Cheng et al., 2022 & Beigbeder et al., 2019). Este primer ensayo presentó una concentración celular de 1.16×10^6 células/mL, siendo baja en comparación con lo que reporta Wang et al., (2019) donde alcanzaron una densidad celular de $2.133 \pm 0.45 \times 10^7$ células/mL.

Por tal motivo, se modificaron inicialmente variables de temperatura y aireación, a fin de evaluar el efecto en el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, dado que estas variables tienen influencia en el mismo. Según Garcia et al., (2020) la agitación es una variable necesaria para permitir que las células permanezcan en movimiento, tengan acceso a luz y nutrientes. Para el caso de la temperatura, reportes de literatura señalan que los valores óptimos se encuentran en un rango de 25 a 30 °C (González Muñoz et al., 2019).

Para los cultivos realizados en cajas de petri, se observó la dificultad para crecer bajo las condiciones iniciales; logrando observar al día 12 las primeras pigmentaciones, sin embargo, no fue sino hasta el día 21 en el que visualmente fue representativo su crecimiento como se puede observar en el ANEXO A-Figura 10.

En el ensayo 2, se ajustó la aireación a 1 vvm empleando un macrogotero. Además, se evaluó dos mecanismos de agitación (ANEXO A- Figura 11-a,b), uno con difusores y el otro de manguera con orificios con el fin de obtener un flujo homogéneo. De lo anterior, se seleccionó el sistema con difusores.

Para ajustar la temperatura se instalaron 2 calefactores ambientales marca “HANDY HEATER 400W”, debido a que la temperatura registrada en la noche era de alrededor de $14\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (ANEXO A-Figura 11c); además, fue necesario cerrar parte del estante. Sin embargo, se tuvo que realizar un cambio por calefactores de mayor potencia, para garantizar una temperatura estable las 24 horas.

De acuerdo con la gráfica 1, se llegó a una concentración celular en el ensayo 2 de 5.86×10^6 cel/mL. Sin embargo, al realizar la comparación con Wang et al., (2019) reporta densidades de 3.34×10^7 cel/mL. Razón por la cual, se tomó la decisión de aumentar el pH teniendo en cuenta lo mencionado en literatura, por diferentes autores en los que reportan un rango entre 8 a 10 adecuado para *Chlorella vulgaris* para la producción de biomasa (Pereira et al., 2020) & González Muñoz et al., 2019)

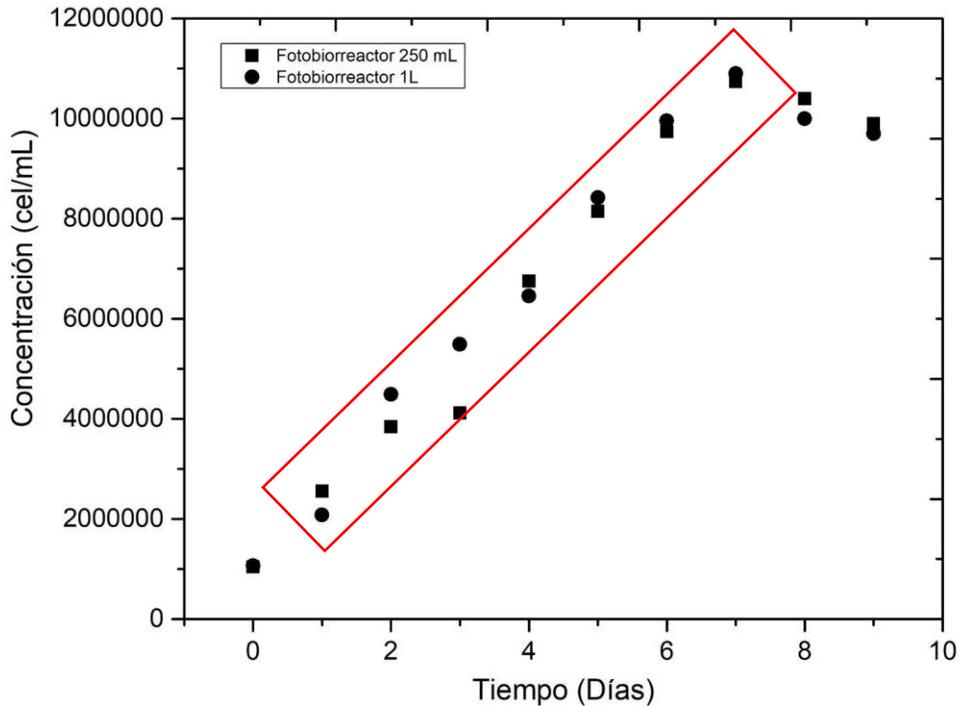
Para el ensayo 3 se emplearon 2 calefactores marca “UNIVERSAL L66351” de mayor potencia, con los cuales se tuvieron registros de $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Con base a los datos de seguimiento se determinó la concentración celular, llegando a 1.26×10^7 cel/mL, esta densidad se consideró adecuada, debido a que está cercana con algunos valores ya mencionados en literatura; por lo cual, en el desarrollo del ensayo 3 se definieron las condiciones de cultivo para *Chlorella vulgaris* así: aireación de 1 vvm, temperatura de $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$, pH 8.0 -8.5, fotoperiodo 12-12 h luz- oscuridad con lámparas led blanca de 2800 Lux.

4.1.4. Mantenimiento del cultivo microalgal. En el ANEXO A-Figura 12, se puede observar el cultivo microalgal en medio líquido, llegando a un volumen final de 1L. El cambio visual más notorio fue cambio de color, el cual es representativo de esta especie (Wang et al., 2019 & Miao et al., 2016). Siendo la clorofila un pigmento de color verde soluble en agua responsable del proceso fotosintético en las microalgas y se asocia con el cambio de coloración en el medio.

Con base a los seguimientos se determinó una concentración celular de 1.1×10^7 cel/mL alcanzada en el día 7 de la fase exponencial (grafica 2); este valor se aproxima a los reportados por Miao et al., (2016 & Wang et al., (2019) . Donde se obtuvo concentraciones de 1.7×10^7 cel/mL y 1.8×10^7 cel/mL respectivamente, las cuales están cercanas a los valores obtenidos en esta fase.

Gráfica 2. Cinéticas de crecimiento en fotobiorreactores en medio BG11



Además, en esta etapa se realizó la siembra en medio sólido nuevamente, observando mayor pigmentación sobre la superficie del agar al día 5 (ANEXO A-Figura 13), por lo que el ajuste de variables como pH y temperatura tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento celular. Además, es importante mencionar que la conservación en medio sólido fue una alternativa que se escogió debido a que logró mantener vivas las células en periodos de hasta 25 días, requirió menor espacio y resultó un mecanismo efectivo de purificación de los cultivos (Kanstrup & Balsby, 2018)

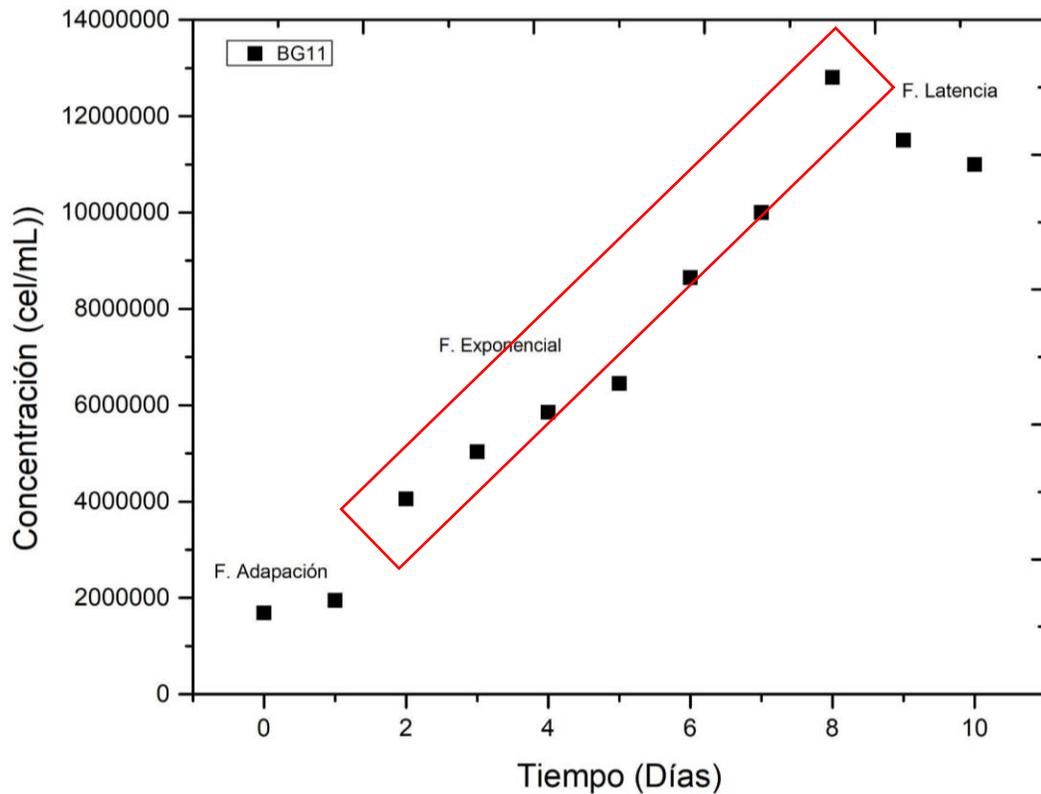
4.1.5. Activación y escalamiento de *Chlorella vulgaris* en medio BG11. En el ANEXO A-Figura 14, se representa el mecanismo de activación de la de *Chlorella vulgaris*, como estrategia para la renovación del cultivo.

El conteo celular determinó una concentración de 1.38×10^7 cel/mL, en el fotobiorreactor de 250 mL. En el ANEXO A-Figura 15 se observa el escalamiento del cultivo hasta 18L, donde se obtuvo concentraciones de 1.58×10^7 cel/mL al día 8; entre las características visuales más representativas se destaca el cambio de color, lo cual se asocia y corrobora con el incremento en la densidad celular.

4.1.6. Evaluación de las fases de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en medio BG11. Se realizó el conteo celular por 10 días con cámara de Neubauer, los datos

permitieron graficar la curva de crecimiento poblacional correspondiente al medio de cultivo BG11. Se identificó la fase de adaptación durante las primeras 24 horas, la fase exponencial hasta el día 8 luego de este periodo llegó a su fase de latencia, lo cual está asociado con el consumo de nutrientes y aumento de las células en el fotobiorreactor (Fazal et al., 2021).

Gráfica 3. Fases de crecimiento en medio BG11



* Medio de cultivo BG11 (BG11), Fase de adaptación (F. Adaptación), Fase exponencial (F. Exponencial), Fase de latencia (F. Latencia).

En el ANEXO A-Figura 16, se puede observar los medios de cultivos en el día inicial y final del tratamiento, observando un cambio en la coloración asociado al aumento de la densidad celular, de igual manera se aprecia el incremento celular observando a través del microscopio. Además se determinó la velocidad de crecimiento siendo de $0.269 \text{ células día}^{-1}$ con un tiempo de duplicación de 2.579 día^{-1} , se ajusta a lo reportado por (Astocondor et al., (2017); Doncel & Moreno, (2020)

4.2. INFLUENCIA DE LA RELACIÓN NITRÓGENO-FÓSFORO (N-P) EN CULTIVOS A ESCALA LABORATORIO DE *Chlorella vulgaris*.

4.2.1. Adaptación de *Chlorella vulgaris* al medio NBC. Durante esta etapa se realizó el respectivo seguimiento a nivel microscópico, se observaron cambios a nivel celular, pérdida de color, cambio de tamaño y forma. Además, fue notable una disminución de la concentración celular debido a que en esta fase hubo muerte celular, donde se observó lisis de la pared celular y partículas de biomasa dispersa (ANEXO A-Figura 17) (Coronado et al., 2022)

El cambio de tamaño en la célula puede estar asociado al estrés por el hecho de recibir una fuente diferente de nitrógeno y fósforo, además, de los diferentes micronutrientes presentes en el medio, lo que en un principio da como resultado el hinchamiento de la célula y posteriormente se traduce en ruptura de la pared celular y liberación del contenido citoplasmático, lográndose evidenciar partes de biomasa al realizar la observación en el microscopio (Coronado et al., 2022)

Es importante mencionar que la concentración celular desempeña un papel importante en las diferentes fases de crecimiento, por lo que una densidad alta permite una mejor evolución de los cultivos en períodos más cortos de tiempo (Méndez et al., 2020b & Rodas et al., 2012).

Culminada la etapa de adaptación la cual tomó alrededor de 1 mes, se escaló hasta volumen de 18L, el cambio de color fue más notorio en este reactor en comparación con el BG11 (ANEXO A-Figura 18), tomando una tonalidad verde claro, a razón de que el crecimiento celular fue menor en comparación a fotobiorreactores de menor volumen (ANEXO A-Figura 19), lo cual se corroboró en el conteo celular con valores de 10^6 cel/mL.

El cambio de color, puede estar asociado a la fuente de nitrógeno presente en el medio, ya que como lo reporta Ayatollahi et al., (2021) & Brown & Blackburn, (2014)

Chlorella vulgaris asimila más rápidamente el amonio y el nitrito; por lo que al emplear fertilizantes los cuales aportan nitrógeno en su mayoría como nitrógeno ureico (NH_2), este requirió un tiempo mayor para asimilarlo y mecanismo diferente; teniendo en cuenta que en el medio BG11 la fuente es el KNO_3 (Janezza, 2011).

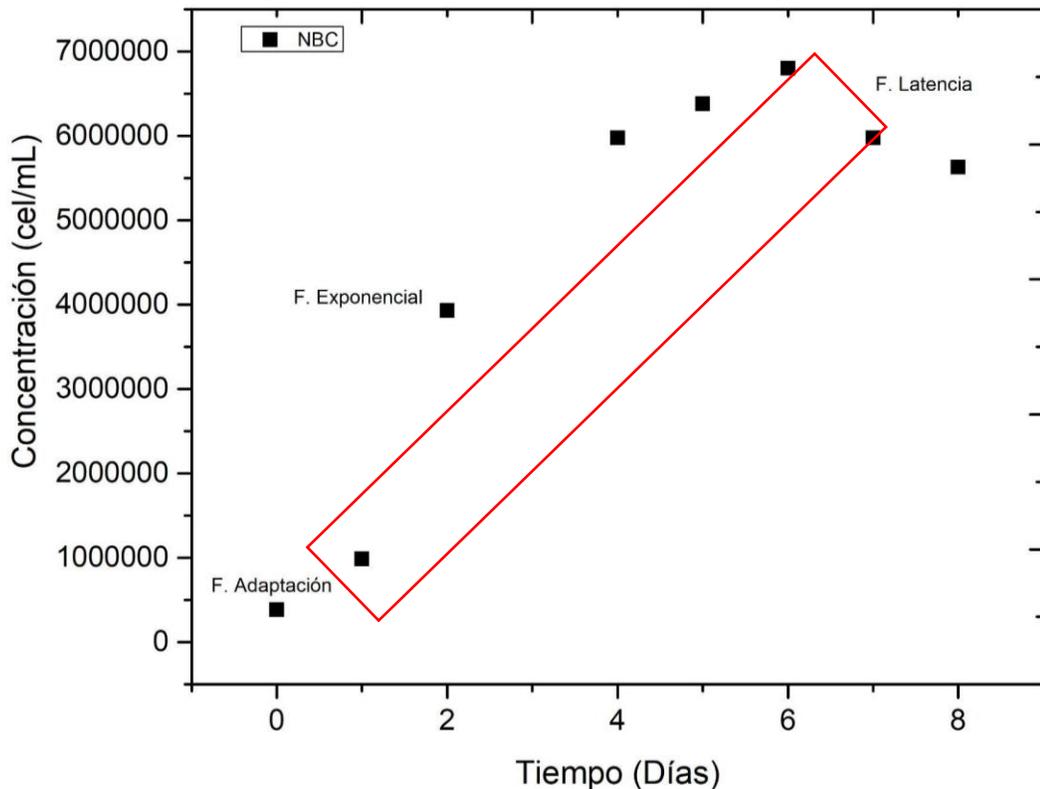
El nitrógeno es suministrado al medio normalmente en la forma de sales de amonio o nitratos, ya que son estas las principales formas de nitrógeno que usan las microalgas, aunque en muchos casos, también pueden utilizar nitratos, urea y otras formas de nitrógeno orgánico. El nitrógeno es aceptado en las vías metabólicas de las microalgas en forma de amonio, mientras que la asimilación de nitrato requiere de la transformación de nitrato a nitrito y luego a amonio mediante cuatro pasos de

reducción que requieren energía, por lo que es más favorable usar el amonio cuando éste está disponible (González, 2010).

4.2.2. Evaluación de las fases de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en el medio alternativo (NBC). Al realizar el respectivo seguimiento en esta etapa, se logró observar el aumento de la concentración celular; a nivel visual presentó un verde más claro (ANEXO A-Figura 20). Para las cinéticas, se determinó que la velocidad de crecimiento fue de $0.386 \text{ células día}^{-1}$ con un tiempo de duplicación de 1.794 día^{-1} , por lo que en comparación al BG11 presenta mayor velocidad de crecimiento y en consecuencia menor tiempo de duplicación.

Se construyó gráfico curvo de crecimiento celular (gráfico 4). Se observó que la fase de adaptación corresponde a un periodo de 24 horas, luego de ello hay presente una fase exponencial hasta el sexto día, y después un tiempo estacionario y muerte. La concentración celular máxima fue de $6.60 \times 10^6 \text{ cel/mL}$, representando alrededor del 52% de la obtenida en BG11.

Gráfica 4. Fases de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en medio NBC



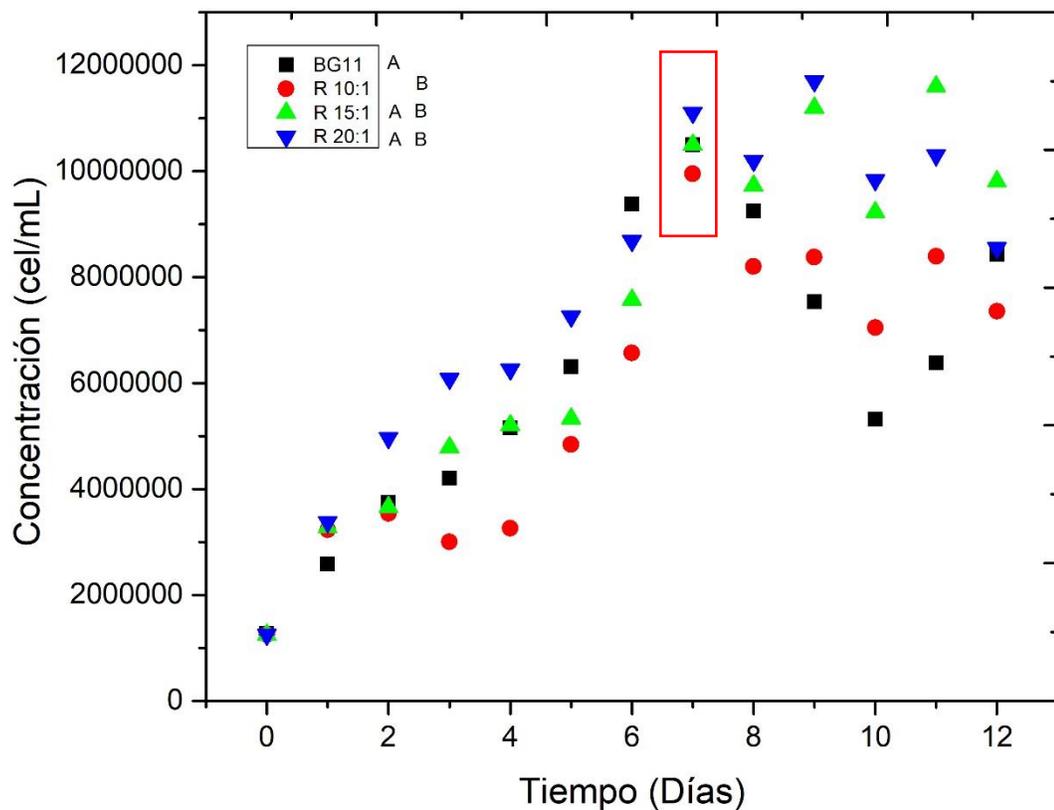
* Medio de cultivo con nutrientes de bajo costo (NBC), Fase de adaptación (F. Adaptación), Fase exponencial (F. Exponencial), Fase de latencia (F. Latencia).

4.2.3. Evaluación de la relación N-P en la producción de biomasa empleando NBC. Durante esta etapa se realizó el respectivo seguimiento celular, evaluando los diferentes niveles de la relación N-P, obteniendo los datos para construir la gráfica de crecimiento (gráfica 5).

Figura 7. Fotobiorreactores a volumen de 1L aplicando las relaciones N-P del medio NBC



Gráfica 5. Cinéticas de crecimiento evaluando la relación molar N-P



*Medio BG11 (BG11), Relación N-P mol/mol en medio NBC (R 10:1), Relación N-P mol/mol en medio NBC (R 15:1), Relación N-P mol/mol en medio NBC (R 20:1).

Se elaboró la curva de crecimiento para los 4 tratamientos evaluados (medio BG11 y relaciones molares N-P 10:1, 15:1 y 20:1), se evidenció crecimiento desde el primer día, después de 24 horas inició la fase exponencial y se extendió hasta el día 7, luego de este periodo, los tratamientos BG11 y relación N-P 10:1 exhibieron un comportamiento de latencia. Por otra parte, los tratamientos de las relaciones 15:1 y 20:1 presentaron un comportamiento fluctuante en el crecimiento después del día 7, sin embargo, se mantiene en concentraciones de 10^7 cel/mL similares a lo reportado por Wang et al., (2019) con densidades de 3.34×10^7 cel/mL.

La velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación se determinó de acuerdo a la ecuación 2 y 3, expresados en la tabla 9. Al comparar estos parámetros, se observa que el tiempo de duplicación aumenta en la medida en que la velocidad de crecimiento se hace menor (Doncel Núñez & Moreno Saboyá, 2020 & Astocondor et al., 2017).

Tabla 9. Determinación de velocidad y tiempo de duplicación.

Tratamientos	Velocidad de crecimiento (cel día ⁻¹)	Tiempo de duplicación (día ⁻¹)
BG11	0.23	2.96
R 10:1	0.37	1.86
R 15:1	0.21	3.29
R 20:1	0.20	3.49

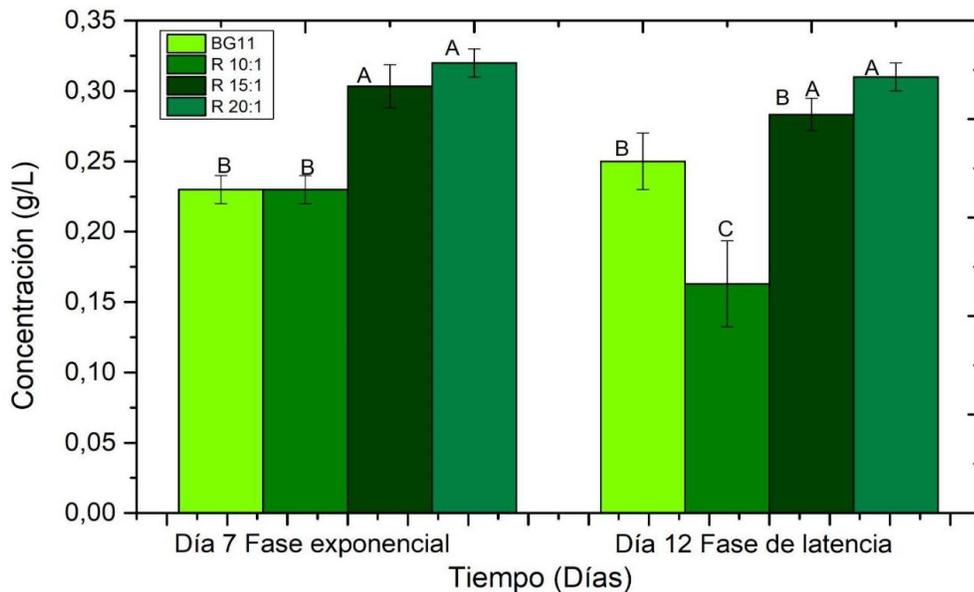
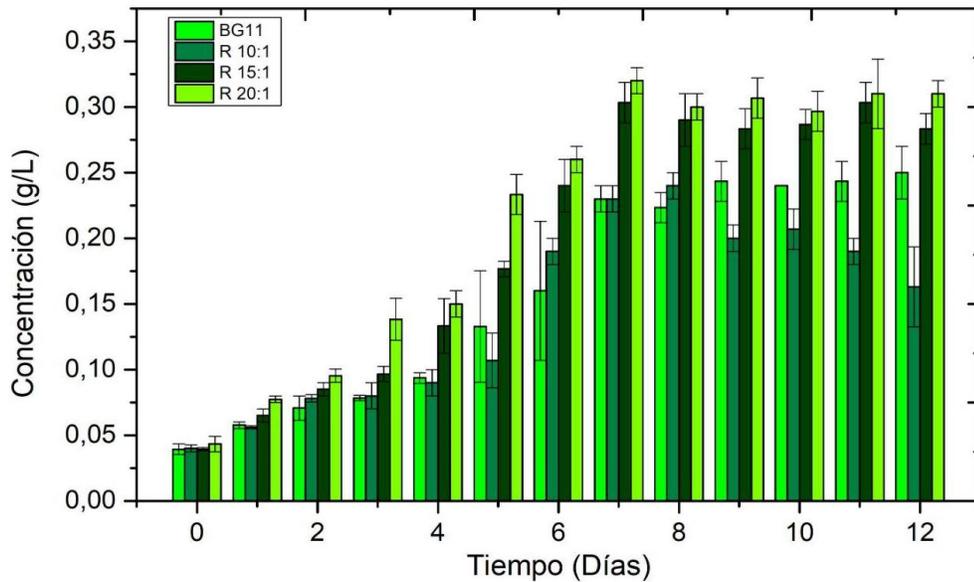
* Relación molar N-P (R 10:1), Relación molar N-P (R 15:1), Relación molar N-P (R 20:1).

Las concentraciones celulares obtenida para todos los tratamientos en el día 7, fueron $1.05 \times 10^7 \pm 0.013$, $9.95 \times 10^6 \pm 0.002$, $1.05 \times 10^7 \pm 0.027$ y $1.11 \times 10^7 \pm 0.025$ cel/mL para BG11, R 10:1, R 15:1 y R 20:1 respectivamente. Al compararlo con lo reportado por Wang et al., (2019), en función del tratamiento de agua residuales empleando lodos se tiene valores finales después al día 10 en el orden de magnitud de 1.10×10^7 cel/mL, por lo tanto estos valores están acordes obtenido en el presente trabajo.

Al realizar el análisis de varianza, se obtuvo un p valor de 0.024 menor al coeficiente de significancia 0.05, por lo que se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, se concluye que al menos uno de los tratamientos presenta diferencias significativas entre los tratamientos. Además, se aplicó una prueba Tukey determinando que, si hay diferencias entre las medias de las muestras ya que se conforman dos grupos A y B.

En las siguientes gráficas se presenta el comportamiento de la biomasa en función del tiempo en días de seguimiento; y los rendimientos en g/L que se alcanzaron al día 7 y 12 en fase exponencial y de latencia respectivamente.

Gráfica 6. Concentración en biomasa bajo las relaciones N-P en fase de latencia



*Medio BG11 (BG11), Relación molar N-P en medio NBC (R 10:1), Relación molar N-P en medio NBC (R 15:1), Relación molar N-P en medio NBC (R 20:1).

De acuerdo a la gráfica 6, se logró determinar que tanto para el medio BG11 como la relación molar N-P R10:1, R15:1, R20:1 en medio NBC llegaron a una productividad volumétrica de 0.665, 0.719, 0.778, 0.690 g L⁻¹ día⁻¹ y una tasa de crecimiento de 0.231, 0.264, 0.257, 0.286 día⁻¹ respectivamente, presentó una tasa de crecimiento del 88% mayor acorde a lo reportado por Rodas et al., (2012) que indicó una productividad volumétrica de biomasa de 0.30 g L⁻¹ día⁻¹ con una tasa de

crecimiento específica de 0.167 y 0.27 día^{-1} para *Chlorella vulgaris*. P (Baldiris et al., 2022)

Por otra parte, con los datos obtenidos de la medición de biomasa por peso seco se obtuvo un rendimiento de 0.23 ± 0.01 , 0.23 ± 0.01 , 0.3 ± 0.015 y $0.32 \pm 0.01 \text{ g/L}$ para los tratamientos BG11, R 10:1, R 15:1 y R 20:1 respectivamente. Al realizar el ANOVA (nivel de confianza del 95%) se obtiene un p valor de 0.000 por lo que al evaluar los datos en el día 7, se determinó que si hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Al aplicar la prueba de Tukey, en el día 7 de la fase exponencial se observa que R 20:1 y R 15: 1 presentan los mismos rendimientos agrupándose en (A), a diferencia del BG11 y R 10:1 quienes mediante este análisis obtienen la misma cantidad de biomasa asociados en la letra B.

Al analizar los datos de la biomasa en el día 12, en la cual se observa una leve disminución en la concentración de biomasa, excepto la relación 10:1, la cual bajó hasta $0.17 \pm 0.1 \text{ g/L}$, este comportamiento puede estar asociado a un error en la medición. Razón por la cual en la prueba de Tukey resulta diferente de los demás tratamientos en este punto, agrupándose en la letra C.

Realizando una comparación con datos en literatura en los cuales se reportan valores 1.36 g/L (Tran et al., 2023) y $2.8 \pm 0.015 \text{ g/L}$ (Mtaki et al., 2021b) los rendimientos obtenidos resultan menores. Cabe resaltar que en ambos estudios reportados manejan variables adicionales como inclusión de una fuente de carbono, adición de vitaminas, la mezcla de un medio convencional suplementado con una fuente rica en NPK y manejo de periodos más largos de iluminación.

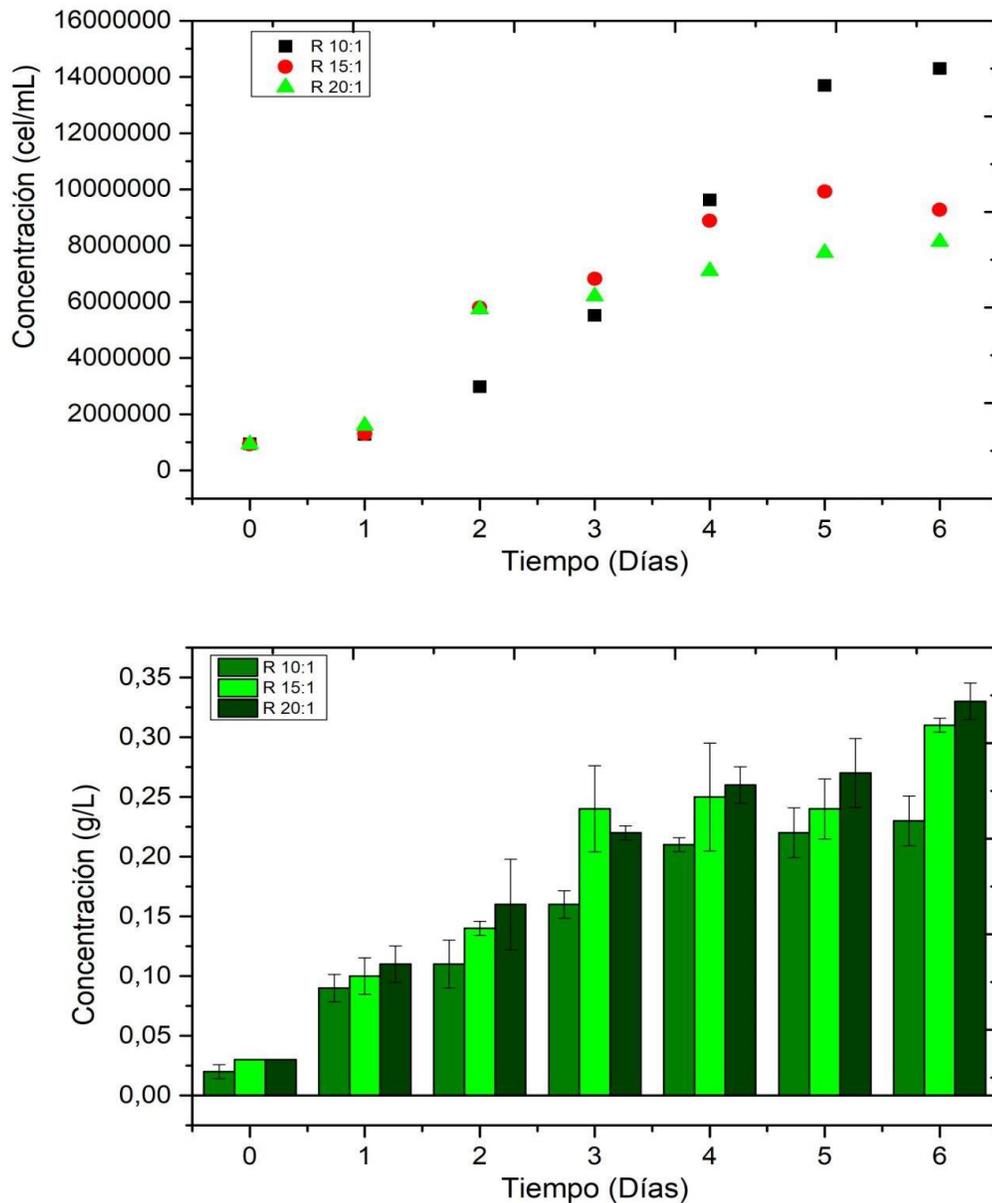
La iluminación desempeña un papel importante en el crecimiento celular de *Chlorella vulgaris*, si bien en un principio se definió una cantidad de 2800 lux, teniendo en cuenta que tuvo resultados factibles dentro de los ensayos preliminares, algunos autores como Xing et al., (2022), reportan valores promedio de 5000 lux, los cuales favorecen el desarrollo celular. Aunque, es necesario tener presente que es una variable que en exceso puede producir fotoinhibición, además, las condiciones de luz natural son diferentes respecto a la ubicación de cada estudio.

Además, la incorporación de una fuente de carbono juega un papel importante en el crecimiento de *Chlorella vulgaris*. Una de esas fuentes es el CO_2 de igual manera se reporta el uso de bicarbonato, glucosa, entre otros. Para el caso del CO_2 se reportan porcentajes de 10% adecuados para el incremento de biomasa; (Rendón, 2013; Gong et al., 2022); Lam & Lee, 2013); Yu et al., 2020); Sheng et al., 2022) En este estudio no se realizó como tal el suministro de una fuente de carbono directa.

4.2.4. Evaluación de la relación N-P de *Chlorella vulgaris* en fase exponencial.

Con el fin de evaluar la biomasa y comparar los posibles cambios en la composición química, así como la variación de los compuestos bioactivos, se realizó el montaje de los tratamientos con fotobiorreactores de 5L; realizando la cosecha en el día 6 en el cual llegó a la máxima fase exponencial.

Gráfica 7. Concentración en biomasa bajo las relaciones N-P en fase exponencial



* Relación molar 10:1 N-P en medio NBC (R 10:1), Relación molar 15:1 N-P en medio NBC (R 15:1), Relación molar 20:1 I N-P en medio NBC (R 20:1).

Se obtuvieron concentraciones celulares de 1.4×10^7 cel/mL (R 20:1) en un periodo de 6 días, el rendimiento de biomasa llegó a valores máximos en la relación 20:1 de 0.33 g/L.

Al comparar los datos de biomasa y densidad celular, entre la relación de menor y mayor concentración de nitrógeno, se observa que la relación 10:1 tuvo mayor concentración celular pero menor biomasa caso contrario tuvo la relación 20:1, en la cual se obtuvo mayor biomasa, pero menor crecimiento celular. Este comportamiento está asociado a que el tratamiento 20:1 presentaba mayor aglomeración de células, lo que dificulta su conteo, de igual manera se observó un comportamiento de lisis celular, lo que influyó directamente en la disminución en los conteos celulares (Borrás, 2016).

Las variaciones del peso de la biomasa con respecto de la concentración celular, puede estar asociada a la concentración de proteína, debido a que estas moléculas tienen un alto peso molecular, por lo que el tratamiento 20:1 que tiene mayor fuente de N y tiene la facultad de sintetizar y almacenar compuestos proteicos.

Figura 8. Fotobiorreactores a volúmenes de 5L de las relaciones N-P del medio NBC



4.2.5. Análisis preliminar de costos en función del suministro de nutrientes.

En la tabla 10 se presentan los costos de producir un gramo de biomasa teniendo en cuenta la concentración de biomasa obtenida en el diseño experimental.

Tabla 10. Costos a nivel de suministro de nutrientes

Medio de cultivo	Rendimiento (g/L)	Costo/L de cultivo	Costo/g de biomasa (COP)
BG11	0.23	\$1,033	\$4,491.3
R (10:1)	0.23	\$16.9	\$73.5
R (15:1)	0.30	\$24.0	\$80
(20:1)	0.32	\$34.6	\$108.2

*Medio BG11, Relación molar N-P (R)

Al observar los costos teniendo en cuenta la cantidad de nutriente suministrada al medio de cultivo tanto del BG11 como NBC en sus 3 relaciones N-P, es posible evidenciar el costo elevado para producir 1 g de biomasa utilizando el medio convencional. Por lo anterior, se puede decir que resulta más favorable en términos económicos utilizar el medio de a partir de los fertilizantes comerciales como fuente de nutrientes para la producción de biomasa.

4.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BIOMASA DE *Chlorella vulgaris*.

4.3.1. Caracterización física de la biomasa microalgal. En la tabla 11 se describen las pruebas de color realizadas a la biomasa microalgal en el medio BG11 y medio NBC (ANEXO A-Figura 25)

Tabla 11. Propiedades según CIELAB de la biomasa microalgal

Tratamientos	L*	a*	b*	Chroma	Angulo de Hue
Color biomasa en medio BG11	43.06 ± 0.11	-5.91 ± 0.05	9.70 ± 0.09	12.86 ± 0.05	-1,02 ± 0.00
Color biomasa en medio NBC R 15:1	65.62 ± 0.55	-8.05 ± 0.05	10.03 ± 0.28	11,36 ± 0.10	-0,98 ± 0.01

Los parámetros de color CIELAB fueron el promedio de 3 lecturas, obteniendo como resultado que el BG11 presenta una mayor luminosidad en comparación con el NBC, el chroma indica un valor de 12,86 siendo superior en un 0,88% con respecto al NBC. Esto indicó que la biomasa microalgal en el medio NBC tiende a ser más claro, con un componente verde más pronunciado en comparación con el medio BG11, lo cual se puede asociar con un mayor actividad fotosintética y, por ende, mayor concentración de clorofila (Marzec et al., 2023) (Xie et al., 2017)

4.3.2. Análisis químico de la biomasa microalgal. El análisis químico de la biomasa microalgal se reporta en la tabla 12, donde se empleó la biomasa obtenida de la evaluación de la relación N-P, tanto en fase exponencial como de latencia.

Tabla 12. Composición química de biomasa microalgal en la fase latencia y fase exponencial

	Fase latencia				Fase exponencial			
	BG11	R 10:1	R15:1	R 20:1	BG11	R 10:1	R 15:1	R 20:1
Humedad (%)	10.42 ± 0.02	10.45 ± 0.16	10.45 ± 0.16	10.45 ± 0.16	10.42 ± 0.02	10.45 ± 0.16	10.45 ± 0.16	10.45 ± 0.16
Extracto etéreo (%)	1.57 ± 0.07 ^A	1.48 ± 0.01 ^A	1.24 ± 0.01 ^B	1.16 ± 0.01 ^B	1.09 ± 0.01 ^A	1.01 ± 0.01 ^{AB}	0.95 ± 0.0631 ^B	0.90 ± 0.00 ^B
Proteína (%)	32.31 ± 0.31 ^A	24.13 ± 0.78 ^B	26.35 ± 0.35 ^C	28.33 ± 0.80 ^D	56.49 ± 0.12 ^A	42.90 ± 0.25 ^B	44.02 ± 0.39 ^B	53.90 ± 1.43 ^A
Carbohidratos (%)	46.9	55.4	53.16	51.26	24.1	37.74	35.67	26.85

*Relación molar N-P 10:1 (R 10:1), Relación molar N-P R15:1 (R 15:1), Relación molar N-P R 20:1 (R 20:1).

Teniendo en cuenta la relación molar 20:1, siendo el tratamiento de mayor acumulación de proteínas en fase exponencial; es posible afirmar que la concentración de nitrógeno es directamente proporcional a la cantidad de proteína. Sin embargo, se debe tener en cuenta el tiempo en el cual se cosecha la biomasa, debido a que en fase de latencia esta cantidad puede disminuir alrededor del 50%, como se observa en la tabla 12.

Al realizar comparación del medio BG11 y las diferentes relaciones respecto al porcentaje de proteína, los tratamientos de las relaciones 10:1 y 20:1 N-P estuvieron entre un 15 a 20% por debajo de la muestra control. La relación 20:1 fue la más cercana al BG11, solo estuvo un 6% por debajo en fase exponencial.

Al realizar el análisis estadístico respecto de la proteína, con un nivel de significancia del 0.05 se obtuvo que hay diferencias significativas entre los tratamientos. Al aplicar la prueba Tukey, en el caso de los datos en fase exponencial, se determinó que la relación 20:1 y BG11 no presentan diferencias significativas debido a que se encuentran en un mismo grupo (ver tabla 12); pero si existen diferencias con los tratamientos de las relaciones 10:1 y 15:1, los cuales se agrupan con la letra B.

Realizando la comparación con autores como Xie et al., (2017) obtuvieron 44% de proteína y determinan rangos entre 33 y 44% para *Chlorella vulgaris*. Para el caso de la producción de biomasa obtenida con suplementación de NPK; determinaron el contenido de proteína entre 44 y 56% (Mtaki et al., 2021a), siendo acorde con los resultados obtenidos en este estudio.

Respecto al contenido de lípidos se obtuvo una baja acumulación de este componente, si bien en algunos reportes de literatura afirman que puede estar entre 14 al 20%, en el desarrollo de este estudio se encontraron con valores entre 1.2% y 1.5%. De acuerdo con la literatura, la acumulación de lípidos se da por la disminución de la fuente de nitrógeno en el medio o por la variación de diferentes condiciones de cultivo (Mtaki et al., 2021^a; Converti et al., 2009; Mujtaba et al., 2012), por lo que al contar con la cantidad suficiente de este macronutriente, favoreció la producción y acumulación de otros compuestos, principalmente proteína, realizando un ANOVA si hay diferencia significa un p valor de 0.01 y 0.017 en fase de latencia y exponencial respectivamente.

Los carbohidratos se determinaron por diferencia, siendo el segundo componente de mayor presencia en este tipo de biomasa alcanzando valores de hasta 50% en fase de latencia para tratamientos de la R 10:1 y R 15:1. En este caso, a mayor relación N-P menor acumulación de carbohidratos. Al revisar la literatura estos porcentajes coinciden con lo reportado por Ho et al., (2013) & Y. Wang et al., (2015). , en los cuales encontraron porcentajes de 51.3% y 58% respectivamente.

El porcentaje de cenizas para el medio BG11 y NBC está entre 7.90 y 10.13%, correspondiente al porcentaje de materia no volátil, teniendo en cuenta que componentes principales como proteínas, lípidos y carbohidratos se descomponen a temperatura en un rango de 130-480 °C, según Almeida et al., (2017) *Chlorella vulgaris* presenta un 18% en cenizas.

En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos en fase de latencia y exponencial para determinar polifenoles libres y capacidad antioxidante.

Tabla 13. Composición química de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en la fase latencia y exponencial.

PRUEBAS	Fase latencia				Fase exponencial			
	BG11	R 10:1	R15:1	R 20:1	BG11	R 10:1	R 15:1	R 20:1
DPPH (mg AA/g)	16.19 ± 0.10 ^A	15.22 ± 0.20 ^B	18.17 ± 0.08 ^C	17.31 ± 0.02 ^D	8.42 ± 0.05 ^C	14.71 ± 0.05 ^A	8.07 ± 0.00 ^B	9.78 ± 0.03 ^C
FRAP (mg AA/g)	44.72 ± 0.50 ^C	59.72 ± 0.62 ^A	58.98 ± 0.34 ^A	50.15 ± 0.93 ^B	4.07 ± 0.05 ^A	9.93 ± 0.05 ^B	6.32 ± 0.01 ^C	5.10 ± 0.04 ^D
ABTS (mg AA/g)	40.68 ± 0.07 ^A	64.30 ± 0.01 ^B	61.60 ± 0.27 ^C	52.55 ± 0.01 ^D	24.82 ± 0.25 ^B	35.56 ± 1.78 ^A	27.44 ± 0.02 ^B	25.74 ± 0.18 ^B
FENOLES LIBRES mg AG / g	143.26 ± 0.13 ^A	317.04 ± 0.02	304.18 ± 0.4 ^C	242.27 ± 0.20 ^D	11.60 ± 0.61 ^B	7.77 ± 0.08 ^C	11.94 ± 0.09 ^B	14.17 ± 0.26 ^A
CAROTENOIDE S (mg β-caroteno/g)	3.77 ± 0.01 ^A	1.92 ± 0.01 ^B	2.07 ± 0.01 ^B	3.68 ± 0.02 ^A	2.96 ± 0.01 ^A	1.12 ± 0.01 ^C	1.13 ± 0.01 ^C	2.91 ± 0.01 ^B

El contenido de compuestos fenólicos en la fase exponencial es menor en comparación con la cantidad en fase latencia. Una de las razones por las cuales se presentan mayor acumulación en fase de muerte, se debe a que se producen más especies reactivas de oxígeno por liberación del contenido citoplasmático una vez se rompe la pared celular, por lo que como mecanismos de defensa incrementa la acumulación de estos compuestos (Dahmen-Ben et al., 2023). Otro factor puede estar asociado con el tema de pH, oxígeno disuelto e iluminación, esta última variable favorece la producción de polifenoles y disminuye la actividad de la peroxidasa (Gomez et al., 2010; Mtaki et al., 2020; Zimermann et al., 2020)

Al realizar la comparación con de los datos obtenidos con reportes de literatura en los que han determinado contenido de polifenoles entre 217 ± 43 - 109 ± 30 mg AG/g; (Matos et al., 2020; Matos et al., 2020) menciona que para *Chlorella vulgaris* obtuvo 23.97 mg AG/g y 35.5 mg AG/g (Díaz Trujillo, 2016). Cabe resaltar que las condiciones de cultivo influyen directamente sobre la capacidad de almacenar este tipo de compuesto, además del método de extracción puede influir en cantidad de compuestos fenólicos (Choochote et al., 2014 & H.-M. Wang et al., 2010).

Respecto a la capacidad antioxidante, la biomasa obtenida en fase de latencia es mayor a la biomasa cosechada en fase exponencial. Esto se relaciona directamente con el contenido de compuestos fenólicos, ya que a mayor contenido de polifenoles mayor poder reductor. Cabe resaltar que los mecanismos de acción de DPPH y ABTS se da por la capacidad de neutralizar radicales libres, mientras que FRAP se enfatiza en la capacidad reductora por transferencia de electrones. (Parra Huertas, 2010; Milledge & Heaven, 2013).

El contenido de carotenoides de *Chlorella vulgaris* cultivado en medio BG11 y la relación 20:1 presentan diferencias significativas en comparación a los tratamientos R 10:1 y R1 5:1, ya que el p-valor es mayor al nivel de significancia (0,05) (Agustina et al., 2021).

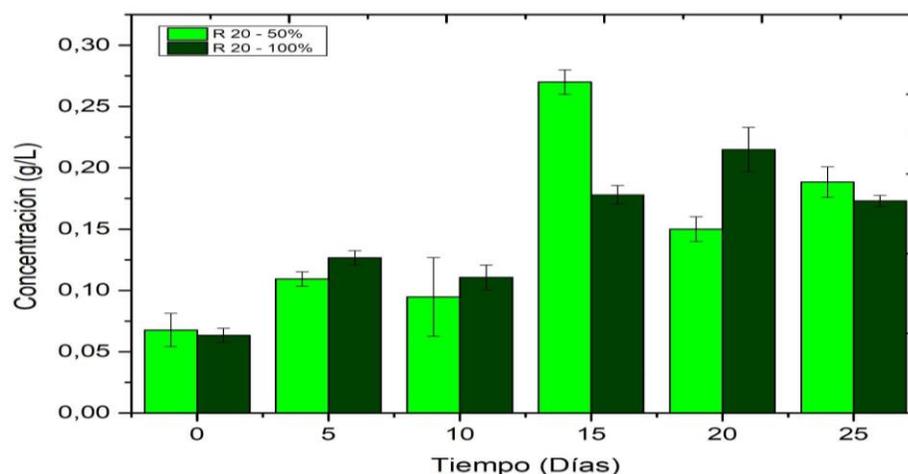
De acuerdo con lo anterior, se puede asociar que una limitación del nitrógeno puede afectar negativamente la producción de β -caroteno, mientras que un exceso en la concentración de salinidad, puede favorecer el aumento de este compuesto (García Morales et al., 2020).

4.4. PROCESO DE ESCALAMIENTO Y PERIODICIDAD DE LA RELACIÓN MOLAR 20:1 N-P, Y SU EFECTO EN LA COMPOSICIÓN EN TÉRMINOS DE PROTEÍNAS Y ANTIOXIDANTES.

Para el desarrollo de esta última etapa de investigación, se seleccionó la relación molar 20:1, ya que en términos de biomasa seca se logró obtener 0,32 g/L con un incremento del 29% con respecto al BG11, teniendo un costo \$108.2 pesos/g biomasa, y un porcentaje de proteína del 53 % sin diferencias significativas con respecto al BG11.

4.4.1. Escalamiento y periodicidad. En la gráfica 8 se presenta el comportamiento de la biomasa en esta etapa, los datos se obtuvieron hasta el día 25 tiempo en el cual finalizó el seguimiento, obteniendo un rendimiento final para T50 y T100 de 3.7506 y 2.9703 g de biomasa seca respectivamente, con una concentración celular máxima al día 6 de 8.85×10^6 y 8.06×10^6 cel/mL, luego del día 6 en adelante con la alimentación no se superó concentraciones de 5.58×10^6 cel/mL, afectando directamente la densidad poblacional.

Gráfica 8. Cuantificación de biomasa microalgal en etapa de escalamiento y periodicidad.



* Relación molar 20:1 N-P con suministro de nutrientes al 100% a partir del 5 día (R 20:1-100%), Relación molar 20:1 N-P con suministro de nutrientes al 50% a partir del 5 día (R 20:1-50%).

De acuerdo con la gráfica 8, se observa que al día 15 logró la mayor concentración en biomasa el tratamiento alimentado con el 50% de nutrientes de la relación molar 20:1 (0.27 g/L), a diferencia del tratamiento con el 100% de los nutrientes, el cual solo llegó a los 0.18 g/L. Por lo tanto, se determina que el escalamiento y la periodicidad no presentaron un efecto positivo sobre la concentración de la biomasa; debido a que en un periodo de 7 días se obtuvo un 16% más de biomasa.

Al aplicar una prueba t-student al día 15 y comparar las medias, si existen diferencias significativas entre los tratamientos, con un valor $P > 0.05$. Al aplicar una prueba t-student al 95% de confianza para los dos tratamientos de la relación 20:1 al 100 y 50% del suministro de nutrientes, se rechaza la hipótesis alternativa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, debido a que el p-valor (0.349) es mayor a 0,05. Por lo que la cantidad de compuestos fenólicos se ve afectada por la concentración de nutrientes.

4.4.2. Caracterización bioquímica de la biomasa de *Chlorella vulgaris*.

Se presenta la composición química de la biomasa *Chlorella vulgaris* en términos de cenizas, proteína, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.

Tabla 14 Composición química de biomasa microalgal

Tratamientos	Humedad (%)	Proteína (%)	DDPH (mg AA / g)	Fenoles (mg AG / g)
Alimentación con 50%	10,45 ± 0.16	11.75	8.893 ± 0.106	2.568 ± 0.558
Alimentación con 100%	10,45 ± 0.16	18.81	12.109 ± 0.121	1.9201 ± 0.016

De acuerdo a lo reportado en la tabla 14 tanto los compuestos fenólicos como la capacidad antioxidante en la fase de latencia se ven afectados con una disminución alrededor 95%, se puede asociar al estrés por la cantidad de nutrientes y su capacidad de almacenar estos compuestos (Choochote et al., 2014, Wang et al., 2010).

Respecto al porcentaje de proteína, es correcto afirmar que a mayor contenido de N en el medio se estimula la producción de este compuesto, sin embargo, a revisar la cantidad de proteínas. En los dos tratamientos no se observa un aumento. Por lo que se concluye que el tiempo de cosecha si presenta un efecto sobre la composición de la biomasa.

4.4.3. Análisis preliminar de costos en función del suministro de nutrientes para el escalamiento. En la siguiente tabla se presentan los costos solo de la cantidad de nutrientes suministrados hasta el día 15, donde los tratamientos evaluados presentaron mayor cantidad de biomasa.

Tabla 15. Costo en función del suministro de nutrientes para el escalamiento.

Medio de cultivo (R20:1)	(g/L)	Costo inicial /L cultivo)	Costo de la alimentación	Costo / L de cultivo	Costo total
100%	0.18	\$34.6	\$34.6	\$328.7	\$363.3
50%	0.27	\$34.6	\$17.3	\$164.35	\$198.5

De acuerdo con la tabla 15, al comparar los 2 tratamientos evaluados se obtuvo un 40% más de biomasa con la relación 20:1 al 50%, esto quiere decir que en términos de costos, se disminuyen a la mitad lo que resulta atractivo desde este punto de vista (Silva-Benavides, 2016)

Estadísticamente presentaron diferencias significativas entre los dos tratamientos, debido a que el nivel de significancia fue mayor a p.valor (0.05). Sin embargo, no hubo un incremento en la obtención de biomasa con respecto al ensayo inicial de la relación 20:1 donde se logró una concentración de 0.32 g/L en un periodo de 7 días.

Finalmente, se puede inferir que para sistemas de cultivo continuo, los cuales se caracterizan por la extracción periódica de biomasa. Por lo tanto, la periodicidad de alimentación se presenta como una alternativa para reponer la cantidad de nutrientes que se pueden adherir a la biomasa en el momento

5. CONCLUSIONES

Se determinó que las relaciones molares 15:1 y 20:1 de N-P alcanzaron una concentración de 0.30 y 0.32 g/L respectivamente, siendo los resultados más altos de la experimentación a volúmenes de 5L. Los valores de concentración de biomasa para estas relaciones molares de suministro de nitrógeno y fósforo se estiman en un 14% mayores con respecto al BG11.

El contenido de proteína almacenado por *Chlorella vulgaris* es directamente proporcional a la relación N-P suministrada como fuente de nutrientes en los cultivos, ya que la relación molar 20:1 presentó un 47% más de acumulación de proteína con respecto a R10:1 en fase exponencial. Por lo cual, se concluye que la cantidad de nitrógeno influye en la producción de proteína de *Chlorella vulgaris*.

Se identificó que la fase exponencial y de latencia presentó influencia directa sobre la composición química de la biomasa, detectando principalmente cambios en el porcentaje de proteína y la presencia de compuestos bioactivos. Para los ensayos con una relación molar N-P 20:1, la biomasa cosechada en fase exponencial alcanzó 53 % de proteína en base seca, y bajó a 28 % cuando la biomasa alcanzó la fase de latencia

Las tasas de crecimiento en medio NBC lograron alcanzar valores en el orden de 0,21 día⁻¹, las cuales son acordes a los valores reportados en literatura por Rodas et al., (2012) empleando nutrientes ricos en NPK.

La relación molar 20:1 en un periodo de 6 días, con un costo en términos de suministro de nutrientes, aproximadamente de 40 veces menor a lo requerido en el medio BG11, para la obtención de 1g de biomasa.

Se determinó que la periodicidad de alimentación durante el escalamiento no incrementó la producción de biomasa en un periodo de 25 días, siendo el día 15 el de máxima concentración con un valor de 0,27 g/L. Mientras que al realizar una sola alimentación y cosechando en el día de la máxima fase exponencial, se obtuvo un 16% más de biomasa; en un periodo de 7 días.

En términos de costos resultó de gran interés realizar la inoculación con el 100% de nutrientes en la relación molar 20:1 N-P, se puede inferir que la periodicidad puede mejorar la fase de crecimiento de cultivo, incrementando la obtención de biomasa con una adición de nutrientes controlada y programada de adición de nutrientes permite reducir efectos de inhibición por carencia de estos prolongando la fase exponencial de crecimiento.

6. RECOMENDACIONES

Evaluar el efecto de la temperatura y pH sobre el crecimiento y producción de biomasa a partir de *Chlorella vulgaris*.

Analizar la influencia del fotoperiodo y el efecto del color de la luz sobre la producción de biomasa y su composición química *Chlorella vulgaris*.

Evaluar el aprovechamiento de nutrientes en términos de la concentración remanente en términos de fuentes de nitrógeno y fosforo suministradas en función del tiempo.

Determinar la influencia del CO₂ y otras fuentes de carbono sobre la concentración celular de *Chlorella vulgaris* en medio BG11 y NBC.

Evaluar la influencia del suministro de nitrógeno, la temperatura y la iluminación en la producción de lípidos a escala laboratorio.

Evaluar el potencial nutracéutico de la biomasa de *Chlorella vulgaris* como parte de la elaboración o formulación de productos destinado al consumo humano o animal.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, D. F. R., Gómez, J. E. B., Duque, J. F. S., Galindez, J. Z. Z., & Cruz, J. A. M. (2022). Antioxidant potential of extruded snacks enriched with hyper-protein quinoa flour and vegetable extracts. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.74621>
- Agustina, S., Aidha, N. N., & Oktarina, E. (2021). The extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris* for cosmetics. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1011(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1011/1/012057>
- Algaebank. (2022). *Ficha técnica Chlorella vulgaris CCAB 90/41*. <https://algaebank.com.mx/tienda/chlorella-vulgaris/?v=0b98720dcb2c>
- Almeida, H. N., Calixto, G. Q., Chagas, B. M. E., Melo, D. M. A., Resende, F. M., Melo, M. A. F., & Braga, R. M. (2017). Characterization and pyrolysis of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*: potential of bio-oil and chemical production by Py-GC/MS analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(16), 14142–14150. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9009-2>
- ANGULO, R. A. L. (2017). Efecto de la pureza de la miel diluida “B” y tiempo de proceso de cristalización, en el rendimiento y tamaño de cristales en la masa cocida “C”, durante la elaboración de azúcar rubia. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 135, Issue January). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.012> <http://www.capsulae.com/media/Microencapsulation-Capsulae.pdf> <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2019.05.001>
- AOAC. (2023). *Official Methods of Analysis, 22nd Edition (2023)*. <https://docs.google.com/forms/u/0/>
- Astocondor, M. M., Huatuco, E. M., Terreros, H. M., & Delgado, R. T. (2017). Population growth and productivity of the native microalga *Chlorella Peruviana* under different salinities. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 28(4), 976–986. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13004>
- Ayatollahi, S. Z., Esmaeilzadeh, F., & Mowla, D. (2021). Integrated CO2 capture, nutrients removal and biodiesel production using *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), 104763. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104763>
- Baldiris, Idelfonso Baldiris, Pere, Manuel; Cafiel Alianys; Fajardo Juan; Correa, Rafael & Castro, I. (2022). *Producción de lípidos totales de la microalga Chlorella sp. y Chlorella vulgaris en condiciones mixotróficas de cultivo*. 22–30.
- Beigbeder, J.-B., Boboescu, I.-Z., & Lavoie, J.-M. (2019). Thin stillage treatment and co-production of bio-commodities through finely tuned *Chlorella vulgaris* cultivation. *Journal of Cleaner Production*, 216, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.111>
- Bernal, C. (2015). Extracción de proteínas de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana* asistido por ultrasonido. In *Angewandte Chemie International Edition*,

6(11), 951–952.

- Borrás-Sandoval, L. M., & Torres-Vidales, G. (2016). Producción de alimentos para animales a través de fermentación en estado sólido – FES Producción de alimentos para animales a través de fermentación en estado sólido – FES Animal feed production by solid state fermentation – SSF Produção De Alimentos Para. *Orinoquia*, 20:2, 8. <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v20n2/v20n2a07.pdf>
- Brown, M. R., & Blackburn, S. I. (2014). Biofuels from microalgae. *Sustainable Energy Solutions in Agriculture*, 277–321. <https://doi.org/10.1201/b16643>
- Calvache, N., & Edinson, J. (2013). Fibra dietaria de durazno (*Prunus persica* L .): influencia de la técnica de obtención en las propiedades químicas , físicas y funcionales. *Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Buenos Aires*, 100.
- Campo Chicangana, Y. X. (2021). *Evaluación de la reducción de Nitrógeno, Fósforo y DQO del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca por medio de un sistema algal* [Universidad del valle]. <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>
- Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., & Rodríguez-Núñez, J. R. (2017). Biodiesel production from microalgae: Progress and biotechnological prospects. *Hidrobiologica*, 27(3), 337–352. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2017v27n3/Rodriguez>
- Champenois, J., Marfaing, H., & Pierre, R. (2015). Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1845–1851. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0431-2>
- Cheng, C.-L., Lo, Y.-C., Huang, K.-L., Nagarajan, D., Chen, C.-Y., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2022). Effect of pH on biomass production and carbohydrate accumulation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 under autotrophic, mixotrophic, and photoheterotrophic cultivation. *Bioresource Technology*, 351, 127021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127021>
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>
- Choochote, W., Suklampoo, L., & Ochaikul, D. (2014). Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 43–48. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0084-6>
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146–1151. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>
- Coronado-Reyes, J. A., Salazar-Torres, J. A., Juárez-Campos, B., & González-Hernández, J. C. (2022). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.37320>

- CORONADO-REYES, J. A., SALAZAR-TORRES, J. A., JUÁREZ-CAMPOS, B., & GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C. (2022). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.37320>
- Dahmen-Ben Moussa, I., Masmoudi, M. A., Choura, S., Chamkha, M., & Sayadi, S. (2023). Extraction optimization using response surface methodology and evaluation of the antioxidant and antimicrobial potential of polyphenols in *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(8), 7185–7198. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01850-x>
- Díaz Trujillo, L. A. (2016). Modelos cinético de tipo evento simple para la síntesis de Fisher Tropsch sobre catalizadores de cobalto. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 152(3), 28. file:///Users/andreataquez/Downloads/guia-plan-de-mejora-institucional.pdf%0Ahttp://salud.tabasco.gob.mx/content/revista%0Ahttp://www.revistaalad.com/pdfs/Guias_ALAD_11_Nov_2013.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v66n3.60060.%0Ahttp://www.cenetec
- Doncel Núñez, J. L., & Moreno Saboyá, H. L. (2020). Evaluación de la influencia de la agitación para la producción de biomasa microalgal en un fotobiorreactor panel plano a escala laboratorio. *Revista Mutis*, 10(1), 46–56. <https://doi.org/10.21789/22561498.1606>
- El-Chaghaby, G. A., Rashad, S., Abdel-Kader, S. F., Rawash, E. S. A., & Moneem, M. A. (2019). Assessment of phytochemical components, proximate composition and antioxidant properties of *scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* and *spirulina platensis* algae extracts. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23(4), 521–526. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2019.57884>
- Fazal, T., Rehman, M. S. U., Javed, F., Akhtar, M., Mushtaq, A., Hafeez, A., Alaud Din, A., Iqbal, J., Rashid, N., & Rehman, F. (2021). Integrating bioremediation of textile wastewater with biodiesel production using microalgae (*Chlorella vulgaris*). *Chemosphere*, 281, 130758. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130758>
- Galarza, V. O. (2019). Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, 1–12. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.04319>
- García Morales, J., López Elías, J. A., Medina Félix, D., García Lagunas, N., & Fimbres Olivarría, D. (2020). Efecto del estrés por nitrógeno y salinidad en el contenido de b-caroteno de la microalga *Dunaliella tertiolecta*//Effect of nitrogen and salinity stress on the β -carotene content of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Biotecnia*, 22(2), 13–19. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1241>
- García, P., Heredia, R., Ruiz, M. A., Narváez, G. A., Lopez, C., Reda, L. J. P., & Gallegos, O. (2020). Efecto De Las Condiciones De Iluminacion-Aireacion De Fotobiorreactores De Columna En Cultivos De *Chlorella Vulgaris*. Effect of Lighting-Aeration Conditions of Photobiorreactors of Column in *Chlorella vulgaris* Crops. *Pérez García A. J.* 1 *, 4(1), 2020–2049.

- <https://doi.org/10.19136/Jeeos.a4n1.3475>
- Gomez, A. L., Lopez, J. A., Rodriguez, A., Fortiz, J., Martinez, L. R., Apolinar, A., & Enriquez, L. F. (2016). Produccion de compuestos fenolicos por cuatro especies de microalgas marinas sometidas a diferentes condiciones de iluminacion. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(1), 137–143. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue1-fulltext-14>
- Gong, G., Wu, B., Liu, L., Li, J., He, M., & Hu, G. (2022). Enhanced biomass and lipid production by light exposure with mixed culture of *Rhodotorula glutinis* and *Chlorella vulgaris* using acetate as sole carbon source. *Bioresource Technology*, 364, 128139. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128139>
- González, A. (2016). Cultivos De Microalgas a Gran Escala: Sistemas De Producción 1. Introducción. In *ADNAgro*. <https://www.cajamar.es/pdf/bd/agroalimentario/innovacion/formacion/actividades-de-transferencia/018-microalgas2-1467367279.pdf>
- González Delgado, Ángel Darío; Barajas-Solano, A. F., & Ardila Álvarez, A. M. (2017). Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (*Chlorellales: Chlorellaceae*) a través del diseño de medios de cultivo selectivos. 18(3), 451–461. <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v18n3/0122-8706-ccta-18-03-00451.pdf>
- Gonzalez, L. M. (2010). Influencia de la deficiencia de Nitrógeno y Fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus acutus*. 65. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/8664/linamariagonzalezgonzalez.2010.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- González Muñoz, N., Alfaro Vives, O. G., Crespo Sariol, H., Pérez Silva, R. M., & Jover Capote, A. (2019). Temperatura del cultivo mixto de *Chlorella vulgaris* a cielo abierto: incidencia en la concentración de biomasa. *Tecnología Química*, 39(3), 580–591. <http://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v39n3/2224-6185-rtq-39-03-580.pdf>
- Gouveia, L. (2011). Microalgae as a Feedstock fo Biofuels. In *Micoralgae as Feedstock for Biofuels*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17997-6> Springer
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J.-S. (2013). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresource Technology*, 135, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100>
- Jacob-Lopes, E., Zekpa, L. Q., & Queiroz, M. I. (2018). Energy from Microalgae. In *Green Energy and Technology*. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-69093-3>
- Janezza, T. (2011). *Progress in Biomass and Bioenergy Production*. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=JlqfDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA273&dq=Chlorella+vulgaris+%2B+NH2+%2B+assimilation&ots=rXwYTJgZiO&sig=dCZDKIP0ZFAAtN2_Ks3a2riGjyB0#v=onepage&q&f=false
- Jimenez Tafur, J. D. (2017). *Estudio de la producción de biomasa de Chlorella*

- vulgaris* crecida heterotróficamente sobre vinazas de la caña de azúcar. https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/82476/1/TG01745.pdf
- Kanstrup, N., & Balsby, T. J. S. (2018). Plastic litter from shotgun ammunition on Danish coastlines – Amounts and provenance. *Environmental Pollution*, 237, 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.087>
- Lam, M. K., & Lee, K. T. (2013). Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO₂ bio-mitigation and biodiesel production. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 14, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2013.01.016>
- Li, T., Xu, J., Gao, B., Xiang, W., Li, A., & Zhang, C. (2016). Morphology, growth, biochemical composition and photosynthetic performance of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) under low and high nitrogen supplies. *Algal Research*, 16, 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.008>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Ma'mun, S., Wahyudi, A., & Raghdanesa, A. S. (2022). Growth rate measurements of *Chlorella vulgaris* in a photobioreactor by Neubauer-improved counting chamber and densitometer. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 963(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/963/1/012015>
- Marzec, A., Kramarczuk, P., Kowalska, H., & Kowalska, J. (2023). Effect of Type of Flour and Microalgae (*Chlorella vulgaris*) on the Rheological, Microstructural, Textural, and Sensory Properties of Vegan Muffins. *Applied Sciences*, 13(13), 7632. <https://doi.org/10.3390/app13137632>
- Matos, J., Cardoso, C. L., Falé, P., Afonso, C. M., & Bandarra, N. M. (2020). Investigation of nutraceutical potential of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 303–312. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14278>
- Méndez Ancca, S., Alvarez, Y., Sosa, L. E., & Vizcarra, Y. G. (2020a). Concentración celular y biomasa seca en tres especies de microalgas marinas: *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis striata*. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 22(2), 155–160. <https://doi.org/10.18271/ria.2020.603>
- Méndez Ancca, S., Alvarez, Y., Sosa, L. E., & Vizcarra, Y. G. (2020b). Concentración celular y biomasa seca en tres especies de microalgas marinas: *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis striata*. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 22(2), 155–160. <https://doi.org/10.18271/ria.2020.603>
- Miao, M., Yao, X., Shu, L., Yan, Y., Wang, Z., Li, N., Cui, X., Lin, Y., & Kong, Q. (2016). Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with synthetic domestic wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 113, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.005>
- Milledge, J. J., & Heaven, S. (2013). A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*,

- 12(2), 165–178. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9301-z>
- Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., & Mtolera, M. S. P. (2020). Assessment of Antioxidant Contents and Free Radical-Scavenging Capacity of *Chlorella vulgaris* Cultivated in Low Cost Media. *Applied Sciences*, 10(23), 8611. <https://doi.org/10.3390/app10238611>
- Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., & Mtolera, M. S. P. (2021a). Supplementing wastewater with NPK fertilizer as a cheap source of nutrients in cultivating live food (*Chlorella vulgaris*). *Annals of Microbiology*, 71(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01618-0>
- Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., & Mtolera, M. S. P. (2021b). Supplementing wastewater with NPK fertilizer as a cheap source of nutrients in cultivating live food (*Chlorella vulgaris*). *Annals of Microbiology*, 71(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01618-0>
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.-G., & Lee, K. (2012). Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, 123, 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.057>
- NCBI. (n.d.). *Clasificación taxonómica. Chlorella vulgaris*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1348078>
- Nieto Calvache, J., Cueto, M., Farroni, A., de Escalada Pla, M., & Gerschenson, L. N. (2016). Antioxidant characterization of new dietary fiber concentrates from papaya pulp and peel (*Carica papaya* L.). *Journal of Functional Foods*, 27, 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.012>
- Okeke, E. S., Ejeromedoghene, O., Okoye, C. O., Ezeorba, T. P. C., Nyaruaba, R., Ikechukwu, C. K., Oladipo, A., & Orege, J. I. (2022). Microalgae biorefinery: An integrated route for the sustainable production of high-value-added products. *Energy Conversion and Management: X*, 16, 100323. <https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2022.100323>
- ONU. (2022). *Objetivos de Desarrollo Sostenible*. Paz, Dignidad e Igualdad En Un Planeta Sano. <https://www.un.org/es/>
- Pandey Ashok, Duu-Jong Lee, Yusuf Chisti. Soccol, C. (2014). *Biofuels From Algae Biofuels From*.
- Parra Huertas, R. (2010). Review. bacterias acido lacticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 8(1), 93–105. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>
- Pereira, G. V. da S., Vasconcelos da Silva Pereira, G., Paixão Xavier Neves, E. M., de Arimateia Rodrigues do Rego, J., Brasil, D. do S. B., de Fátima Henriques Lourenço, L., & Sarkis Peixoto Joele, M. R. (2020). Glycerol and fatty acid influences on the rheological and technological properties of composite films from residues of *Cynoscion acoupa*. *Food Bioscience*, 38(September). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100773>
- Phong, W. N., Show, P. L., Le, C. F., Tao, Y., Chang, J.-S., & Ling, T. C. (2018). Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. *Biochemical Engineering Journal*, 135, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.002>

- Pico, J., Xu, K., Guo, M., Mohamedshah, Z., Ferruzzi, M. G., & Martinez, M. M. (2019). Manufacturing the ultimate green banana flour: Impact of drying and extrusion on phenolic profile and starch bioaccessibility. *Food Chemistry*, 297, 124990. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124990>
- Pierce. (2020). *BCA Protein Assay Kit 23225* (Issue 2161296, pp. 0–3). https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411–3424. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- Rendón. (2013). Effect of Carbon Dioxide Concentration on the Growth Response of *Chlorella vulgaris* Under Four Different Led Illumination. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, January 2013. <https://doi.org/10.6000/1927-3037.2013.02.03.3>
- Rodas-Gaitán, H. A., Rodríguez-Fuentes, H., Flores-Mendiola, G., Vidales-Contreras, J. A., Aranda-Ruiz, J., & Luna-Maldonado, A. I. (2012). Effect of inoculation cellular density on *Chlorella vulgaris* CLV2 growth cultivated under mixotrophic conditions. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(ESPECIAL 5), 83–86.
- Ru, I. T. K., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Wahid, M. E. A., & Nagappan, T. (2020). *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Applied Phycology*, 1(1), 2–11. <https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1715256>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014a). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014b). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Sánchez Borroto, yisel. Tobio Pérez, I. Romero López, T. Díaz Dominguez, Y. Ahmed, E. Melo Espinosa, Piloto Rodríguez, R. (2019). Evaluación de las condiciones experimentales básicas para la producción de biomasa a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*. *Afinidad*, 76(585), 63–69.
- Sheng, Y., Mathimani, T., Brindhadevi, K., Basha, S., Elfakhany, A., Xia, C., & Pugazhendhi, A. (2022). Combined effect of CO2 concentration and low-cost urea repletion/starvation in *Chlorella vulgaris* for ameliorating growth metrics, total and non-polar lipid accumulation and fatty acid composition. *Science of The Total Environment*, 808, 151969. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151969>
- Silva-Benavides, A. M. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 265. <https://doi.org/10.15517/am.v27i2.24361>
- Silveira, Y., Gómez, L., & Kufundala, M. D. (2018). Variación de la composición de

- pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con la aplicación del campo magnético estático. *Revista Cubana de Química*, 30(1), 55–67.
- Tran, T., Le, T. D., Vo, T.-K.-Q., & Bui, X.-T. (2023). Exploring the combined effects of bicarbonate, NPK fertilizers, and salinity on *Chlorella vulgaris* growth. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. <https://doi.org/10.1007/s43393-023-00203-1>
- Wang, H.-M., Pan, J.-L., Chen, C.-Y., Chiu, C.-C., Yang, M.-H., Chang, H.-W., & Chang, J.-S. (2010). Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Process Biochemistry*, 45(12), 1865–1872. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.023>
- Wang, L., Addy, M., Lu, Q., Cobb, K., Chen, P., Chen, X., Liu, Y., Wang, H., & Ruan, R. (2019). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in sludge extracts: Nutrient removal and algal utilization. *Bioresource Technology*, 280, 505–510. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.017>
- Wang, Y., Guo, W., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Lo, Y.-C., Cheng, C.-L., Ren, N., & Chang, J.-S. (2015). Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresource Technology*, 198, 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.067>
- Xie, T., Xia, Y., Zeng, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2017). Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. *Bioresource Technology*, 233, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.099>
- Xing, Y., Guo, L., Wang, Y., Jin, C., Gao, M., Zhao, Y., & She, Z. (2022). Roles of illumination on distribution of phosphorus in *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. *Chemosphere*, 303, 134904. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134904>
- Yu, Q., Wang, H., Li, X., Yin, Y., Qin, S., & Ge, B. (2020). Enhanced biomass and CO₂ sequestration of *Chlorella vulgaris* using a new mixotrophic cultivation method. *Process Biochemistry*, 90, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.022>
- Zimmermann, J. D. F., Sydney, E. B., Cerri, M. L., de Carvalho, I. K., Schafranski, K., Sydney, A. C. N., Vitali, L., Gonçalves, S., Micke, G. A., Soccol, C. R., & Demiate, I. M. (2020). Growth kinetics, phenolic compounds profile and pigments analysis of *Galdieria sulphuraria* cultivated in whey permeate in shake-flasks and stirred-tank bioreactor. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101598. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101598>

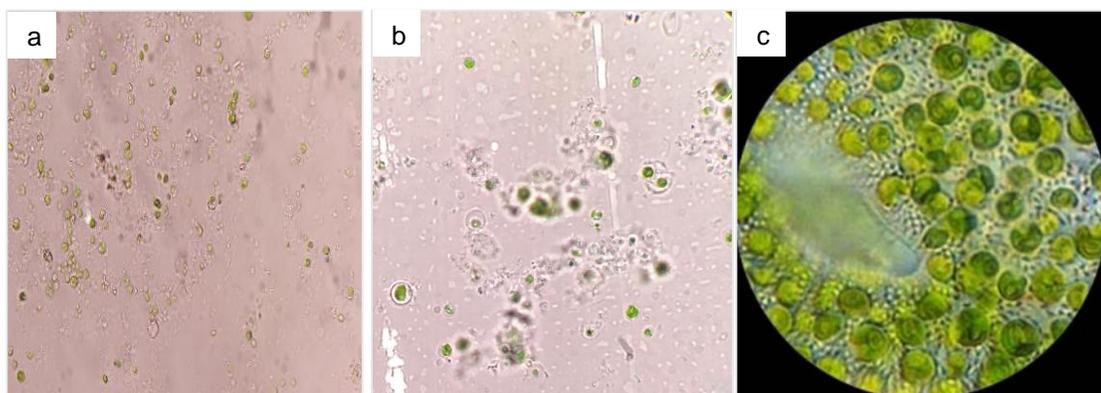
8. ANEXOS

Anexo A. Registro fotográfico

Figura 9. Ceba *Chlorella vulgaris* en tubos falcon de 90 mL



Figura 10. Reconocimiento inicial de *Chlorella vulgaris*



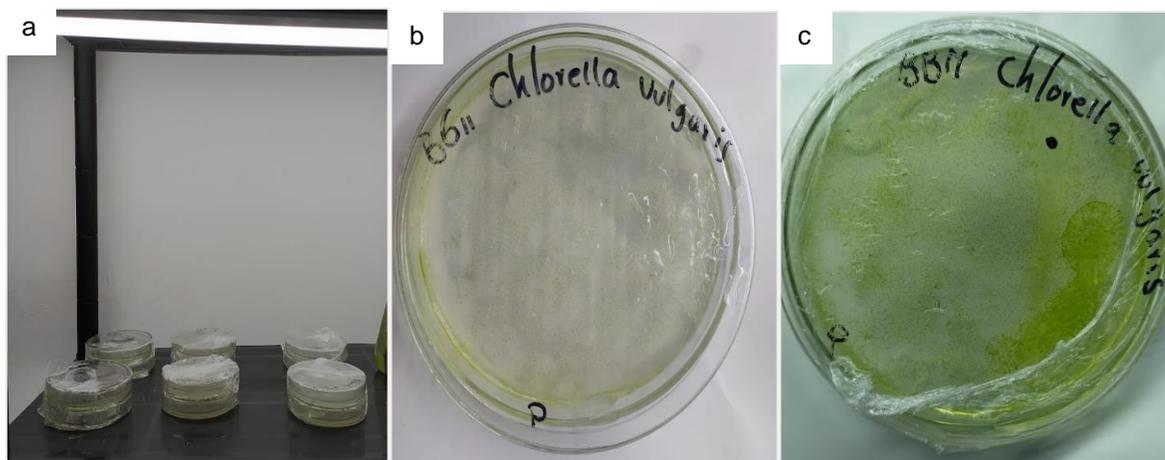
* Reconocimiento a nivel microscópico de *Chlorella vulgaris* a) Observación en objetivo 40X. b) Objetivo 100X. c) Imagen referencia GRUBIOC 2022.

Figura 11. Cultivos microalgales en medio BG11



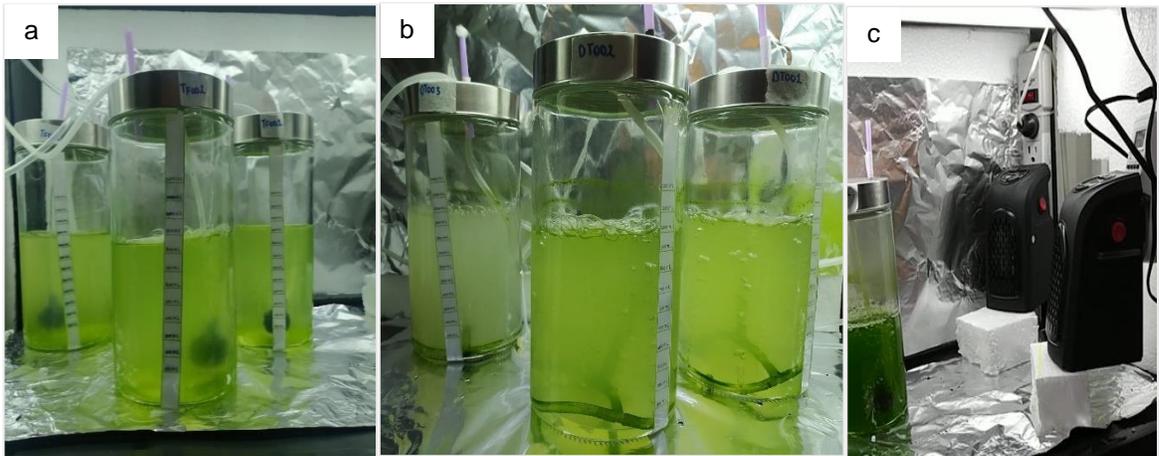
* Cultivos en condiciones bajo el ensayo 1 a) Día 1 inoculación de *Chlorella vulgaris*. b) Fotobiorreactor al día 4 de la inoculación c) Fotobiorreactor en condiciones de muerte celular.

Figura 12. Cultivos microalgales en medio sólido BG11



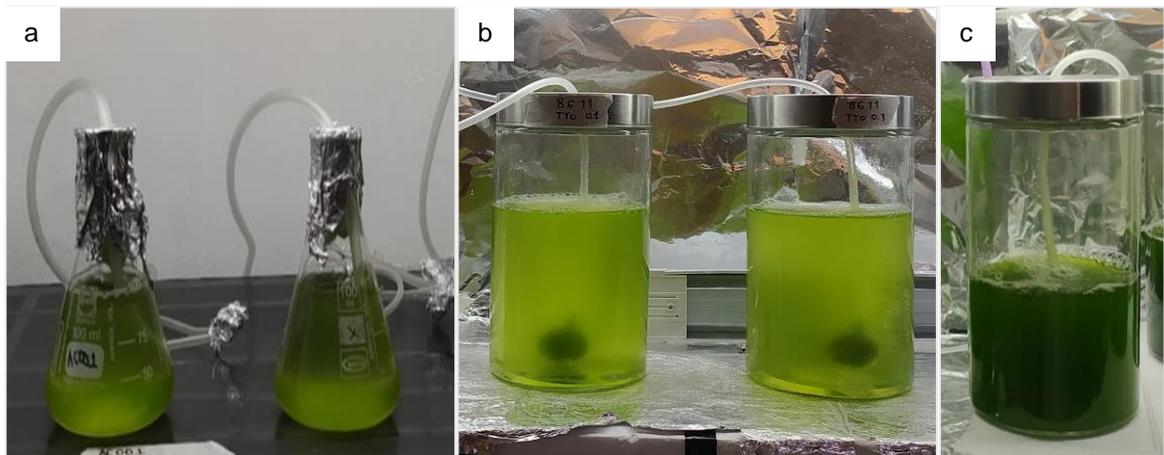
*Montajes en medio sólido bajo condiciones del ensayo 1 a) Día 1 inoculación de *Chlorella vulgaris*. b) Crecimiento celular 12 días de la inoculación. c) Crecimiento celular 21 días de la inoculación.

Figura 13. Ensayo 2 ajuste del sistema de aireación y temperatura.



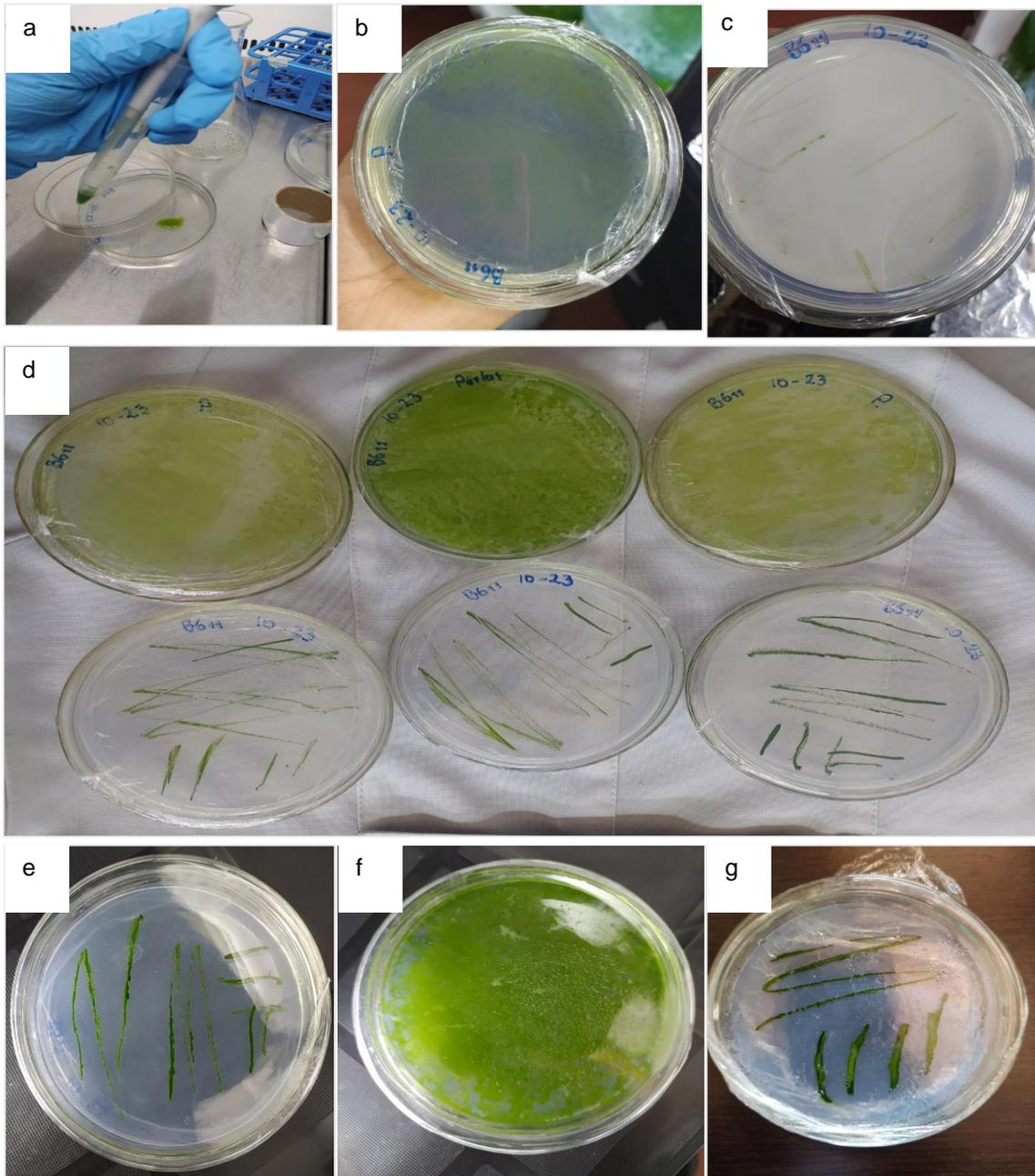
*Cultivos microalgales en fotobiorreactores de 1 L a) Sistema con difusores. b) Sistema de manguera con orificios. c) Adecuación del lugar con calefactores de 400 W.

Figura 14. Mantenimiento de la cepa *Chlorella vulgaris* en medio de cultivo BG11



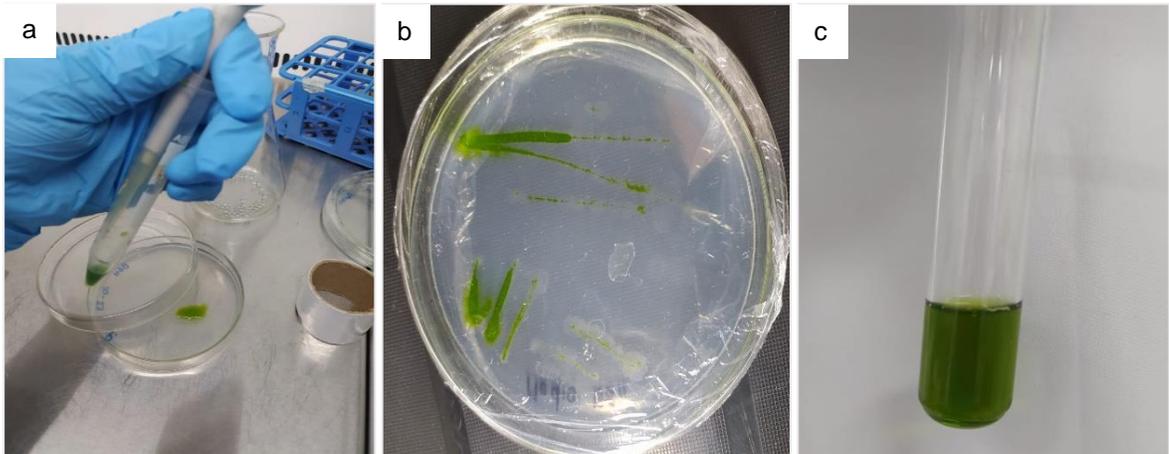
*Mantenimiento de la cepa de *Chlorella vulgaris* bajo las condiciones establecidas a) Reactor 250 mL en el día 3 de crecimiento. b) Reactor 1000 mL en el día 3. c) Reactor de 1000 mL al día 7.

Figura 15. Siembra de *Chlorella vulgaris* en medio sólido BG11



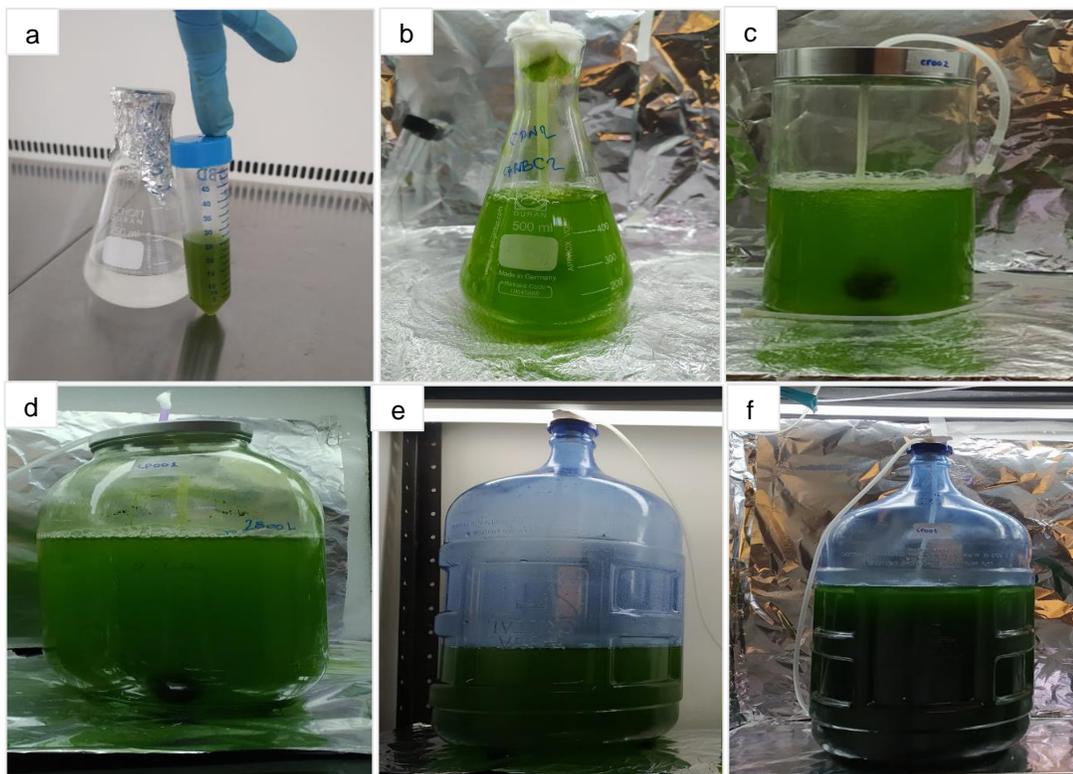
*Proceso de la siembra en medio sólido para la conservación de la cepa de *Chlorella vulgaris* desde el 0 de inoculación hasta el día 25, a) Inoculación de la cepa de *Chlorella vulgaris*, b) Siembra por agotamiento, c) Siembra por estría, d) Siembra por agotamiento y por estría al día 7, e) Inóculo en medio sólido por estría, f) Inóculo en medio sólido por agotamiento al día 27, g) Inóculo en medio sólido por agotamiento al día 27

Figura 16. Proceso para la activación de la cepa de *Chlorella vulgaris*



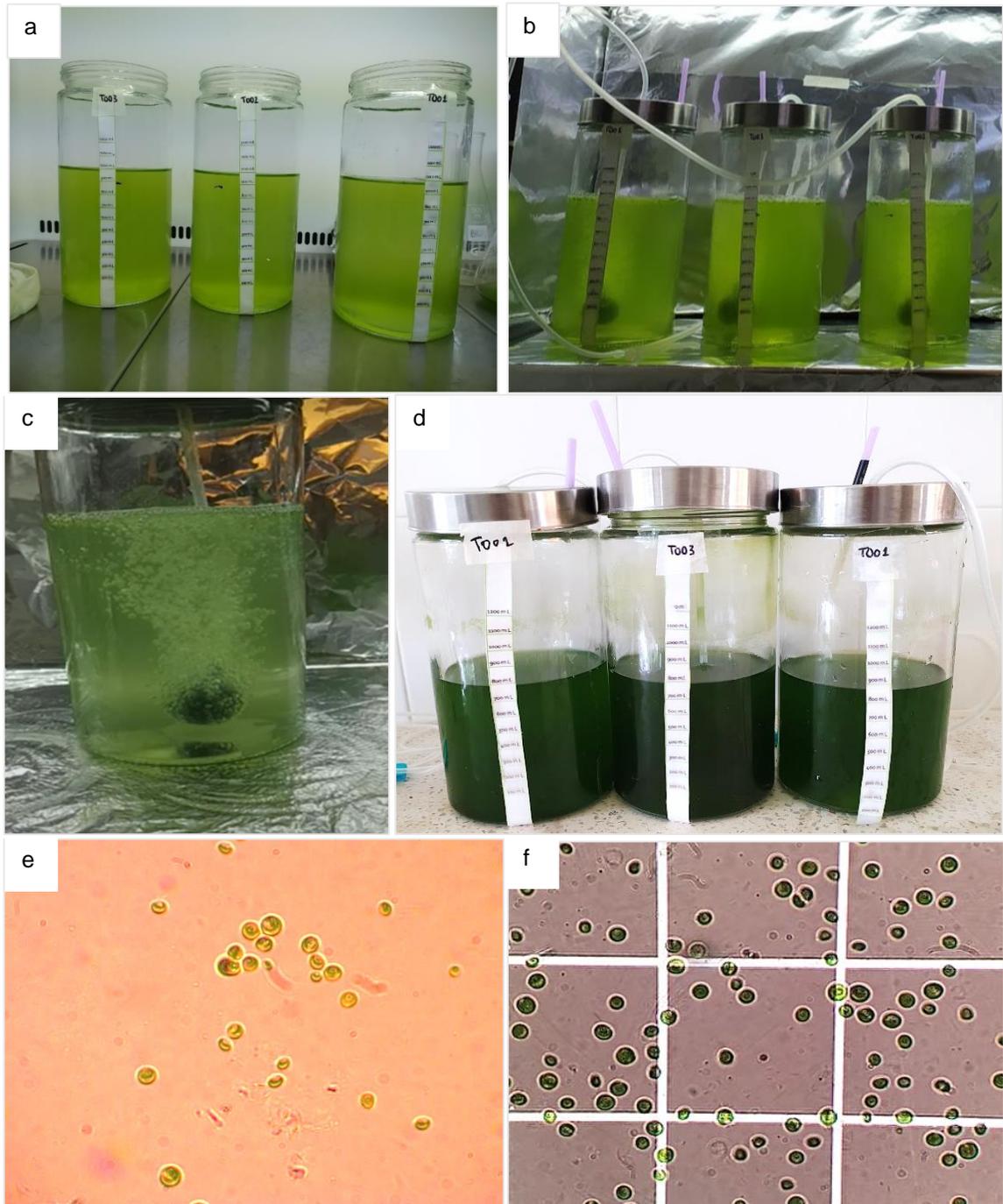
* Activación de la cepa a) Siembra en medio sólido. b) Cultivo de *Chlorella vulgaris* al día 7 de la inoculación. c) Activación de inóculo en 10 mL de medio BG11.

Figura 17. Escalamiento del cultivo en medio BG11



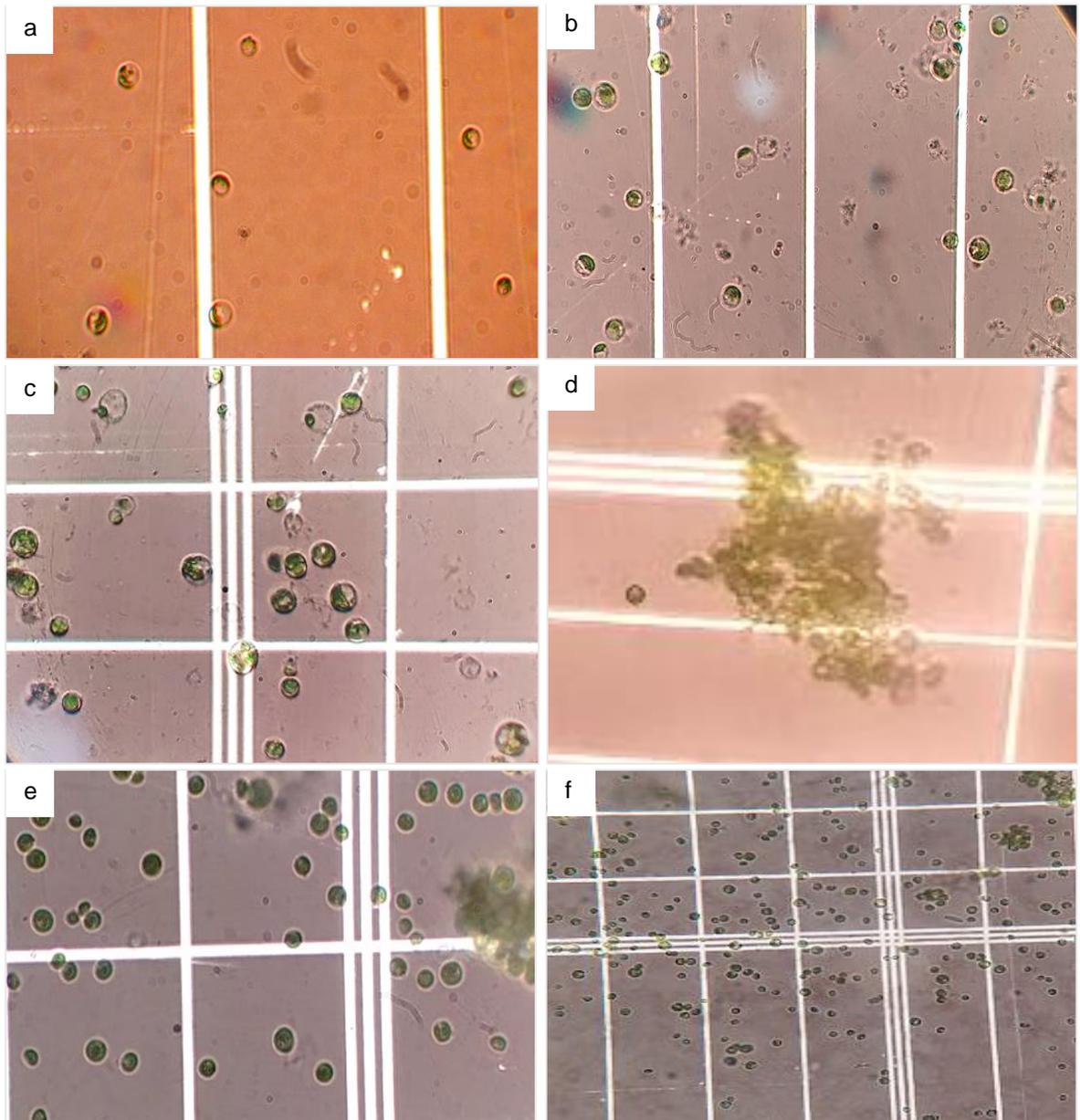
* Escalamiento del cultivo microalgal de *Chlorella vulgaris* en medio BG11 a) Inoculo a partir del medio BG11. b) Fotobiorreactor de 250 mL. c) Reactor de 500 mL. d) Reactor de 1 L. e) Reactor de 10 L. f) Reactor de 18 L

Figura 18. Evaluación de las fases de crecimiento en medio BG11



*Comportamiento de medios de cultivo y densidad celular a) Día 0 inoculación del cultivo. b) Día 0 del cultivo bajo condiciones establecidas, c) Sistema de aireación. d) Día 10 del cultivo. e) Densidad celular al día de la inoculación. f) Densidad celular al día 10.

Figura 19. Cambios morfológicos durante la etapa de adaptación al medio NBC



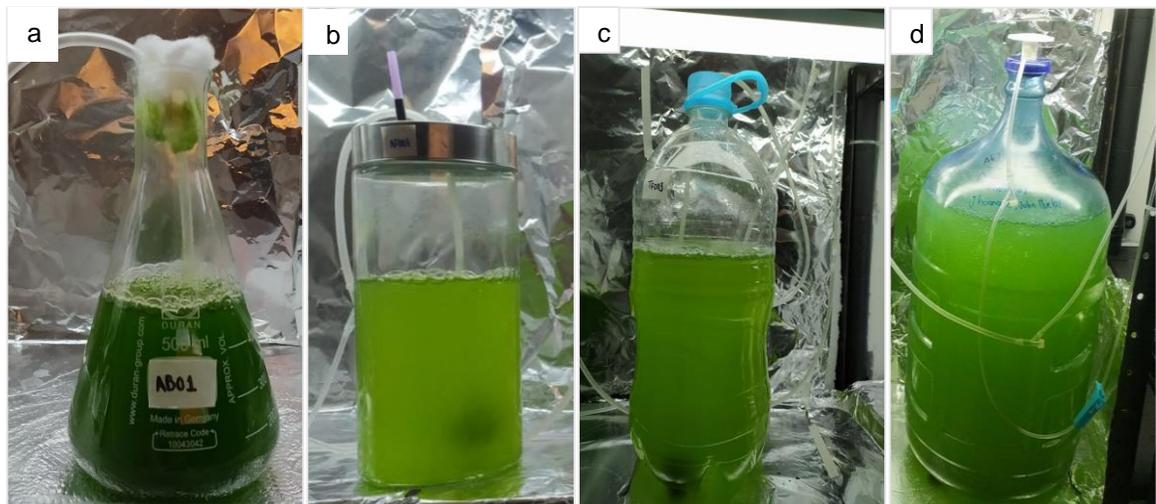
*Cambios morfológicos en la etapa de adaptación al medio NBC a) Pérdida de color. b) Lisis celular. c) Hinchamiento celular. d) Aglomeración de biomasa. e) Formación celular completa. f) Densidad celular.

Figura 20. Fotobiorreactores de cultivos microalgales.



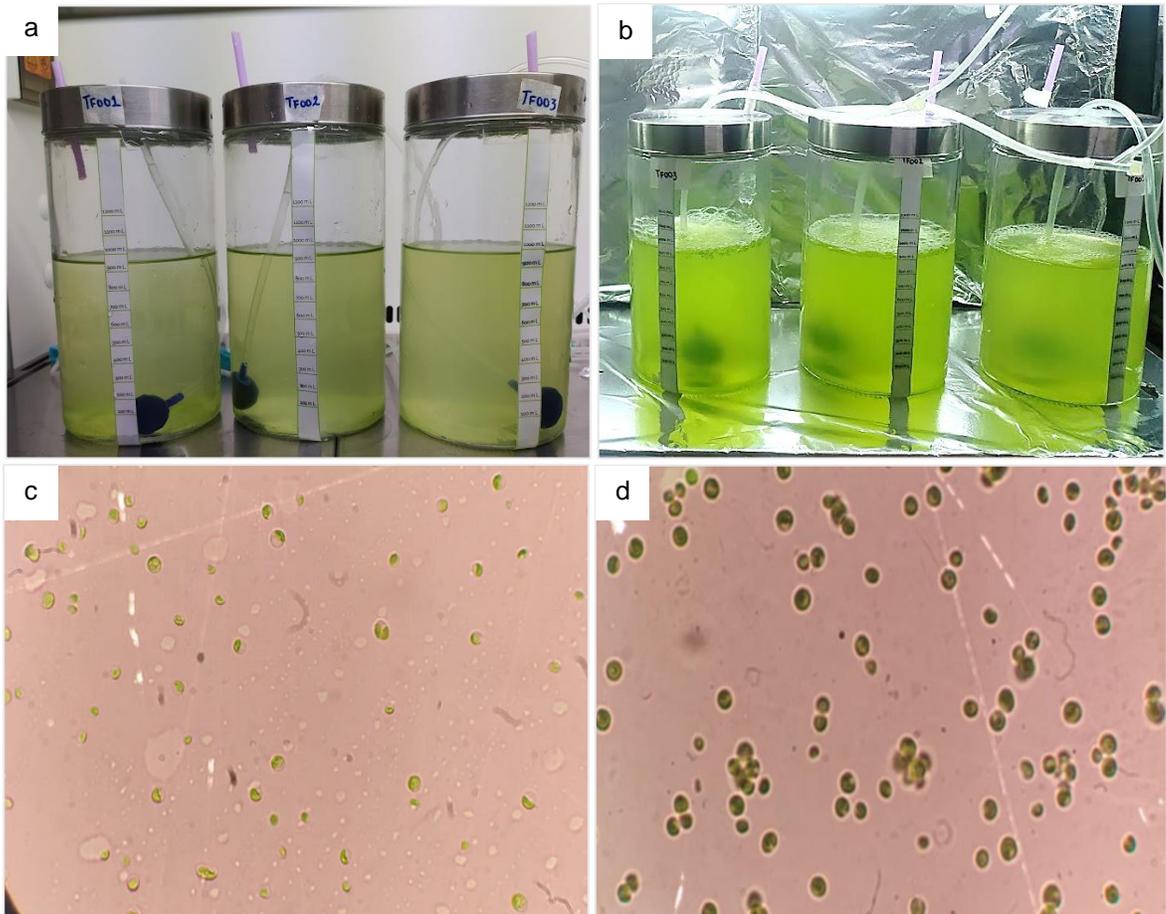
*Cultivos microalgales de *Chlorella vulgaris* en medio BG11 (extremo izquierdo) y en medio NBC (extremo derecho)

Figura 21. Escalamiento de *Chlorella vulgaris* en medio de cultivo NBC



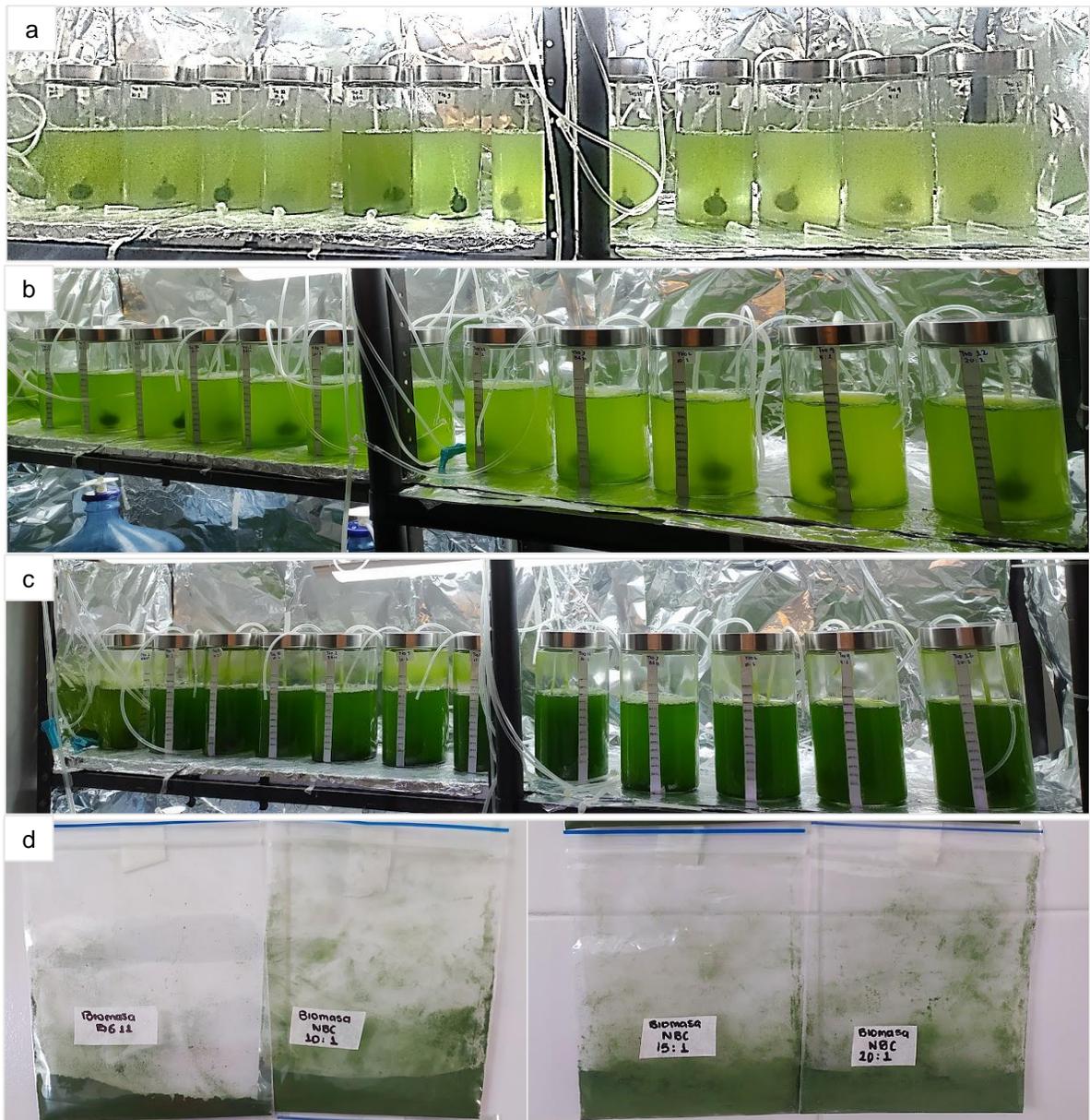
*Escalamiento del cultivo microalgal a) Inóculo del BG11. b) Inóculo en medio NBC de 1L. c) Fotobiorreactor a un volumen de 5L. d) Fotobiorreactor a un volumen de 18 L.

Figura 22. Evaluación de las fases de crecimiento en medio NBC



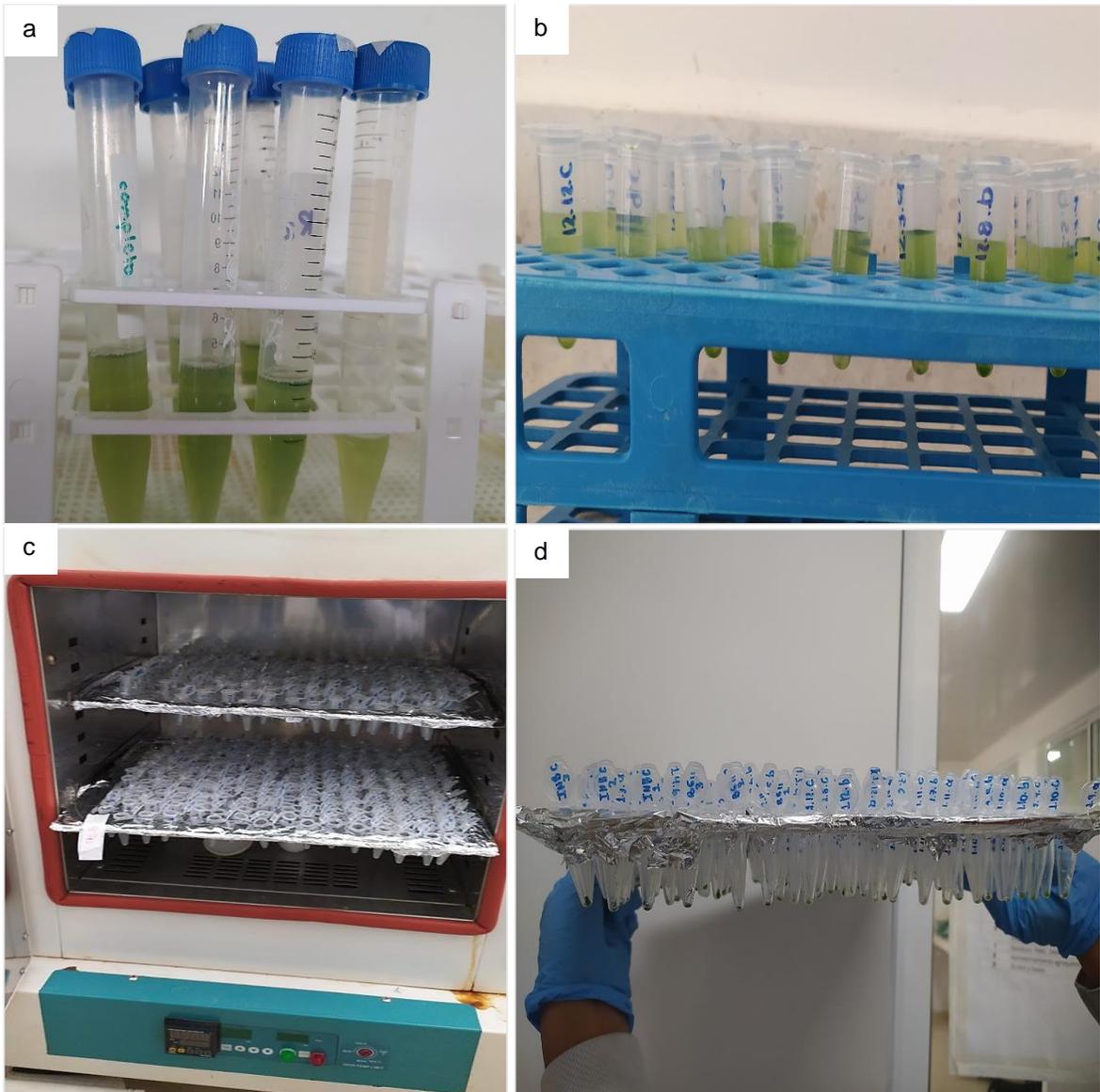
*Comportamiento de medios de cultivo y densidad celular a) Día 0 inoculación del cultivo. b) Día 5 del cultivo bajo condiciones establecidas 7.1.2., c) Sistema de aireación. d) Día 8 del cultivo.

Figura 23. Cultivos microalgales evaluando relación N-P hasta la fase de latencia en medio de cultivo NBC



*Cultivos microalgales evaluando relación N-P a) Día 0 de la inoculación del cultivo. b) Día 3 a partir de la inoculación. c) Día 12 de a partir de la inoculación. d) Biomasa microalgas en el orden correspondiente de BG11 relación molar 10:1. R 15:1 y R 20:1.

Figura 24. Cuantificación de biomasa microalgal (g/L) por gravimetría



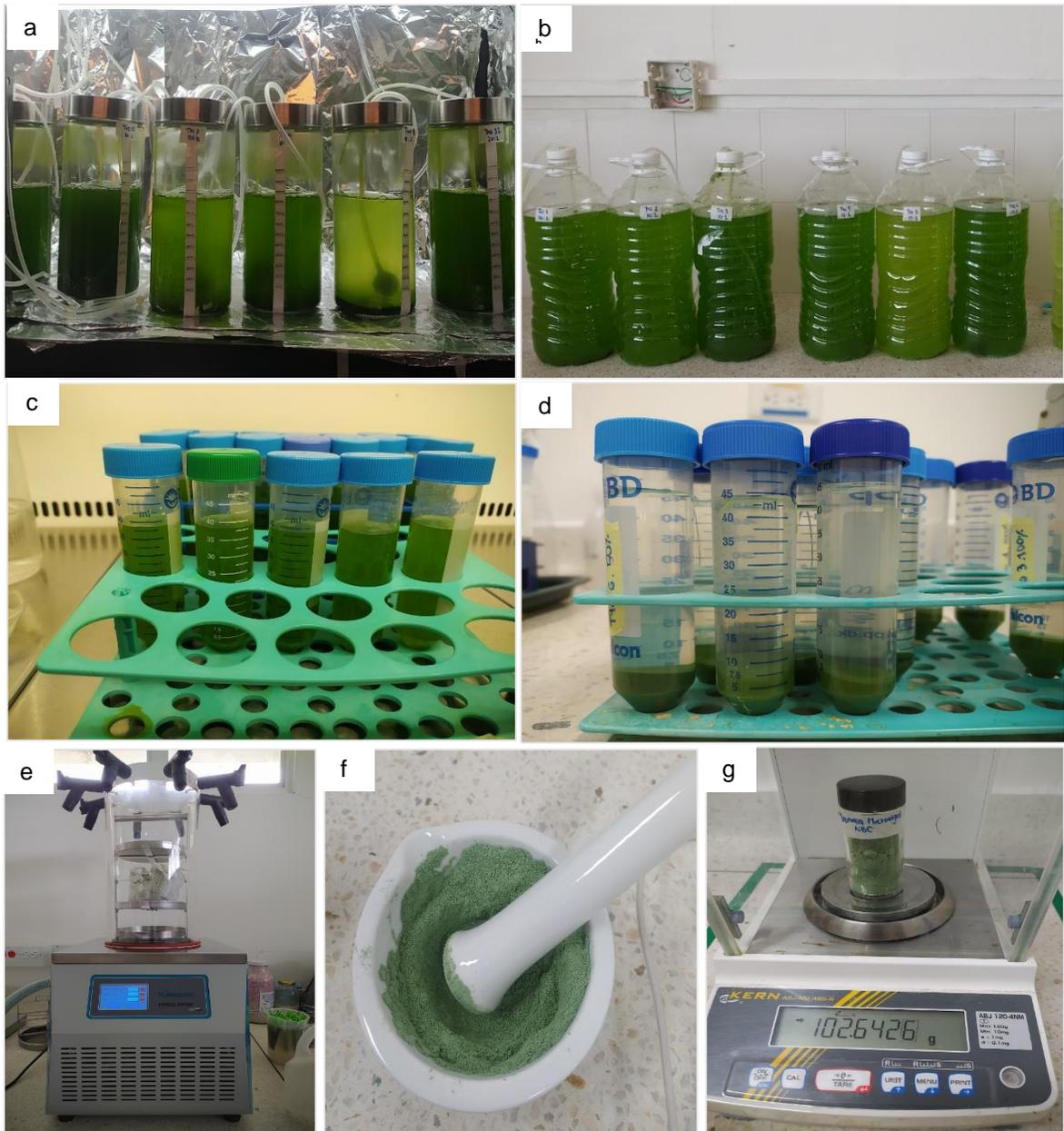
*Cuantificación de biomasa microalgal a) Muestras de 5 mL en tubos falcón. b) Muestra en eppendorf 1 mL. c) Secado en horno Lab. Companion. d) Pesaje de las muestras.

Figura 25. Cultivos microalgales evaluando relación N-P hasta fase exponencial



*Cultivos microalgales hasta fase exponencial a) Día 0 de la inoculación del cultivo. b) Día 3 a partir de la inoculación. c) Cosecha de la biomasa mediante el método por precipitación.

Figura 26. Proceso de cosecha de biomasa microalgal en cultivos de fotobiorreactores de 1L y 5 L.



*Proceso se cosecha a-b) Suspensión de la aireación en fotobiorreactores de 1 y 5 L. c) Transvaso a tubos falcon de 50 mL para el proceso de centrifugación. d) Biomasa centrifugada. e) Liofilización de la biomasa. f) Maceración de la biomasa. g) Pesaje de la biomasa.

Figura 27. Biomasa microalgal seca en medio BG11 y NBC

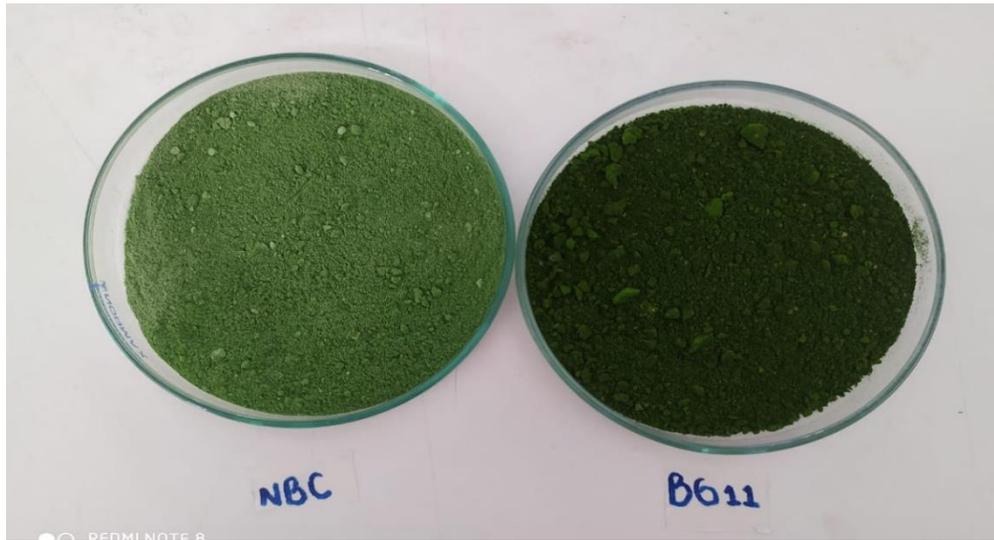


Figura 28. Determinación de humedad

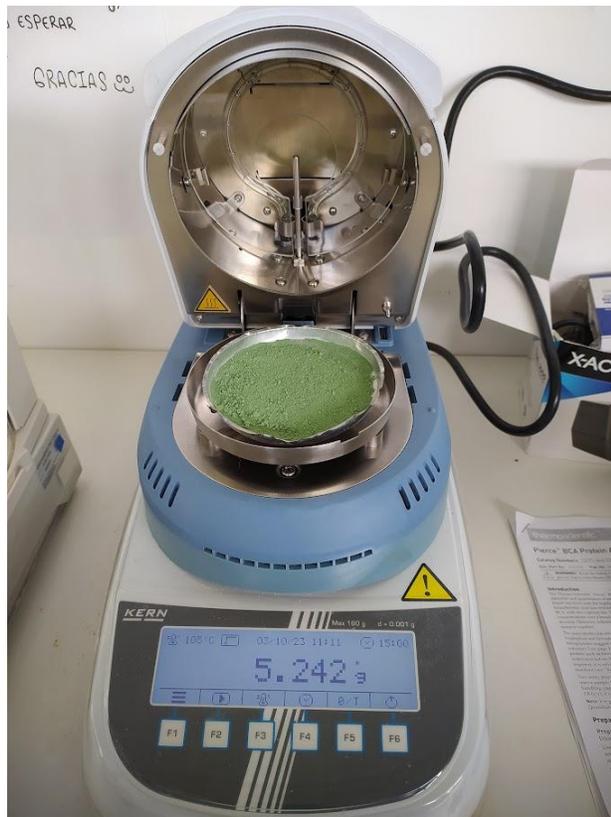


Figura 29. Determinación de cenizas



Figura 30. Determinación de lípidos



Figura 31. Determinación de proteína



Figura 32. Determinación de capacidad antioxidantes y compuestos fenólicos



Figura 33. Escalamiento y periodicidad en reactores de 20 L





*Escalamiento y periodicidad de la relación molar 20:1 N-P a) Inoculación del cultivo microalgal. b) Fotobiorreactores a un volumen de 4 L. c) Fotobiorreactor a un volumen de 6. d) Alimentación del fotobiorreactor. e) Fotobiorreactor a un volumen de 9 L. f) Fotobiorreactor a un volumen de 13.5 L. g) Fotobiorreactor a un volumen de 18.5 L.

Anexo B. Composición del medio de cultivo BG11

Para la preparación del medio de cultivo primero se preparó soluciones stock para luego tomar un mililitro por cada litro de cultivo.

Tabla 16. Composición medio BG11

#	Componente	Solución stock (g/L dH ₂ O)	mL/ L Medio cultivo
1	KNO ₃		1.5 g
2	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	40.0	1 mL
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	75.0	1 mL
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	36.0	1 mL
5	Ácido cítrico	6.0	1 mL
6	Citrato de Amonio Férrico	6.0	1 mL
7	MgNa ₂ EDTA.H ₂ O	1.0	1 mL
8	Na ₂ CO ₃	3.0	1 mL
9	Metales traza		1 mL
	Preparación soluciones Metales Traza	Adicionar (g/L)	
1	H ₃ BO ₃	2.86	
2	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81	
3	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22	
4	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.30	
5	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08	
6	Co (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.05	

*El NaNO₃ fue sustituido por KNO₃

Figura 34. Sales para la preparación de soluciones stock para el medio de cultivo BG11.



Anexo C. Preparación del medio de cultivo NBC

La preparación del medio de cultivo NBC. se realizó con base a la composición de ambos fertilizantes líquidos. Para determinar la cantidad de nitrógeno y fosforo necesario. se tuvo en cuenta el aporte realizado por el medio BG11.

Nitrógeno necesario:

$$\frac{2.0 \text{ g } KNO_3}{L \text{ cultivo}} * \frac{14 \text{ gN}}{101.1032 \text{ g } KNO_3} = \frac{0.277 \text{ g N}}{L \text{ cultivo}}$$

$$\frac{0.277 \text{ g N}}{L \text{ cultivo}} * \frac{1 \text{ mol N}}{14 \text{ g N}} = \frac{0.0214 \text{ mol N}}{\text{mol}}$$

Moles de Fosfato necesarios:

$$\frac{0.04 \text{ gP}}{L \text{ cultivo}} \times \frac{1 \text{ mol P}}{31 \text{ g}} = 0.0013 \text{ mol/L}$$

Tabla 17. Características del fertilizante rico en Fosforó.

Fertilizante rico en Fosforó	
Precio (COP)	\$ 19.500
	Composición g/L
Nitrógeno Total	100.00
Nitrógeno amoniacal	72.00
Nitrógeno nítrico	3.20
Nitrógeno Ureico	24.80
Fosforo asimilable (P ₂ O ₅)	300.00
Potasio soluble en agua (K ₂ O)	100.00
Calcio (CaO)	0.20
Magnesio (MgO)	0.20
Azufre Total (s)	0.80
Boro (B)	0.20
Cobre (Cu)	0.20
Hierro (Fe)	0.40
Manganeso (Mn)	0.40
Molibdeno (Mo)	0.03
Zinc (Zn)	0.50
Quelatos EDTA y ácido cítrico	
pH en solución al 10%	6.5
Densidad a 20°C g/mL	

Tabla 18. Característica del fertilizante rico en Nitrógeno

Fuentes ricas en Nitrógeno	
Precio (COP)	\$ 22.000
Composición g/L	
Nitrógeno Total	300
Nitrógeno amoniacal	50
Nitrógeno nítrico	101
Nitrógeno Ureico	149
Calcio soluble en agua (CaO)	54
Magnesio soluble en agua (MgO)	38
Zinc soluble en agua (Zn)	11
Quelatos con EDTA	5.87
pH en solución al 10%	3.45
Densidad a 20°C g/mL	1.4

El nitrógeno tenía su valor neto como elemento. Pero el fósforo se encontraba como óxido de fosforo (P_2O_5), por ello, se determinó a cuanto correspondía el fósforo como elemento en el fosfato (ver Tabla 19). Se realizaron los siguientes cálculos.

Tabla 19. Determinación del porcentaje de fósforo en el fosfato.

Elemento	Peso molecular (g/mol)	Numero de átomos	Peso molecular (g/mol)	Cantidad (g/L)
P	31	2	62	130,99
O	16	5	80	169,01
P_2O_5	142	1	142	300,00

El fertilizante comercial rico en fósforo contiene 300 g/L de P_2O_5 , por lo tanto, el fósforo equivalente es de 130,99 g/L. Además, este se debe tener presente que aporta 100g/L de nitrógeno. Estos valores de determinaron como con base a al contenido total de la P_2O_5 y el peso molecular de cada elemento

Potra parte, el fertilizante comercial rico en nitrógeno (ver Anexo 2. Tabla 20) contiene 300g/L de nitrógeno.

Tabla 20. Cantidad de Nitrógeno y Fósforo en fertilizantes comerciantes

Fertilizantes Comercial	N (g/L)	P (g/L)
Rico en Fosforo	100	130.99
Rico en Nitrógeno (Triple hoja)	300	0

Determinación de las moles de N aportadas por los fertilizantes

$$\frac{300 \text{ g N}}{L \text{ cultivo}} * \frac{1 \text{ mol N}}{14 \text{ g N}} * \frac{L \text{ cultivo}}{1000 \text{ mL}} = \frac{0.0214 \text{ mol N}}{\text{mol}}$$

Luego se determina la cantidad en mol que aporta el fertilizante rico en fosforo en términos de nitrógeno y fósforo.

Teniendo en cuenta Con base a las cantidades aportadas por BG11 de los dos macronutrientes se realizan los cálculos para determinar la cantidad en mL a agregar de cada uno de los fertilizantes.

$$\frac{0.04 \text{ g P}}{L \text{ cultivo}} * \frac{1000 \text{ mL F.R. fosforo}}{130.99 \text{ g P}} = \frac{0.305 \text{ mL F.R. Fosforó}}{L \text{ de cultivo}}$$

$$\frac{0.305 \text{ mL F.R. Fosforó}}{L \text{ de cultivo}} * \frac{100 \text{ g N}}{1000 \text{ mL F.R. Fosforó}} = \frac{0.031 \text{ g N}}{L \text{ cultivo}}$$

$$\frac{0.246 \text{ g N}}{L \text{ de cultivo}} * \frac{100 \text{ mL F.R. Nitrogeno}}{\text{g N}} = \frac{0.821 \text{ mL F.R. Nitrogeno}}{L \text{ cultivo}}$$

Tabla 21. Cálculos de la relación N-P.

Relación N-P (mol/mol)	Valores de la relación N-P en mL			
	Bajo	Central	Alto	Blanco BG11
	10	15	20	15
Rico en Fosforo	0.305	0.305	0.305	
Rico en Nitrógeno	0.500	0.821	1.103	

ANEXO D. Análisis estadístico

Tabla 22. Análisis estadístico de las relaciones molares N-P con respecto a la concentración celular (cel/mL).

Análisis de Varianza

<u>Fuente</u>	<u>GL</u>	<u>SC Ajust.</u>	<u>MC Ajust.</u>	<u>Valor F</u>	<u>Valor p</u>
Factor	3	1,32375E+12	4,41250E+11	9,76	0,026
Error	4	1,80800E+11	45200000000		
Total	7	1,50455E+12			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>Factor</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
R 20	2	16,2223	A
BG11	2	16,1668	A B
R 15	2	16,1667	A B
R 10	2	16,1131	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 23. Análisis estadístico de las diferentes relaciones molar N-P con respecto a la concentración biomasa (g/L)

Análisis de Varianza

<u>Fuente</u>	<u>GL</u>	<u>SC Ajust.</u>	<u>MC Ajust.</u>	<u>Valor F</u>	<u>Valor p</u>
Factor	3	0,020425	0,006808	51,06	0,000
Error	8	0,001067	0,000133		
Total	11	0,021492			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>Factor</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
R 20	3	0,32000	A
R 15	3	0,30333	A
R 10	3	0,23000	B
BG11	3	0,23000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 24. Análisis estadístico de la relación molar N-P 20:1 con respecto al porcentaje de proteína.

Análisis de Varianza

<u>Fuente</u>	<u>GL</u>	<u>SC Ajust.</u>	<u>MC Ajust.</u>	<u>Valor F</u>	<u>Valor p</u>
Factor	3	283,316	94,4388	164,14	0,000
Error	4	2,301	0,5754		
Total	7	285,618			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>Factor</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
BG11	2	56,4851	A
R 20:1	2	53,90	A
R 15:1	2	44,020	B
R 10:1	2	42,898	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo D. Cotizaciones con respecto al suministro de nutrientes del BG11.



SUMINISTROS DE LABORATORIOS KASALAB S.A.S
NIT 900.745.087 - 2 IVA RÉGIMEN COMÚN
 CR. 81 B No. 51 - 52 / Teléfono (604)3629187 - 3006224380
 info@kasalab.com
 Medellín - Antioquia
 SOMOS AUTORRETENEDORES DE RENTA RESOLUCIÓN 004921 DE 06/JUL/2021
 NO SOMOS GRANDES CONTRIBUYENTES

COTIZACION DE VENTA

COT-4984
 Fecha: 20-05-2023

Asesor: JESSICA PAOLA BACA PAEZ Email: asistenteb@kasalab.com Teléfono: (604) 362 91 87 (601) 354 08 17. Sitio web: www.kasalab.com Validez de oferta: 20 de Junio de 2023 Tiempo de entrega: Ver items.	Cliente: YESICA JHOANA BENAVIDES ESCOBAR Contacto: Email: Teléfono: Ciudad: Forma de pago: CONTADO
---	---

Item	Descripción	Imagen	Entrega	Cant	Precio	Valor Total
1	MSH-500 - MAGNESIO SULFATO HEPTAHIDRATO 500 g - .		15 DÍAS	1	152,000	152,000
2	131232.1211 - CALCIO CLORURO 2-HIDRATO.. "SNE" 1 kg - .		8 DÍAS	1	350,000	350,000
3	131018.1211 - ACIDO CITRICO 1-HIDRATO ACS 1 kg - .		8 DÍAS	1	417,000	417,000
4	MCH99-500 - MAGNESIO CLORURO HEXAHIDRATO 500 g - .		15 DÍAS	1	175,000	175,000
5	131669.1211 - ACIDO ETILEN DIAMINO TETRACETICO DISODICO DIHIDRATO (EDTA DISODICO) ACS 1 kg - .		8 DÍAS	1	918,000	918,000
6	SCA99-500 - SODIO CARBONATO ANHIDRO 99.5% "SNE" 500 g - .		8 DÍAS	2	145,000	290,000
7	131015.1211 - ACIDO BORICO ACS 1 kg - .		8 DÍAS	1	339,000	339,000
8	AMC-500 - AMONIO CLORURO 500 g - .		8 DÍAS	1	123,000	123,000
9	CIISP99-1000 - COBRE II SULFATO PENTAHIDRATO 99% 1 kg - .		15 DÍAS	1	222,000	222,000
10	131258.1208 - COBALTO II NITRATO HEXAHIDRATADO ACS 100 g - .		8 DÍAS	1	956,000	956,000



SUMINISTROS DE LABORATORIOS KASALAB S.A.S
NIT 900.745.087 - 2 IVA RÉGIMEN COMÚN
 CR. 81 B No. 51 - 52 / Teléfono (604)3629187 - 3006224380
 info@kasalab.com
 Medellín - Antioquia
 SOMOS AUTORRETENEDORES DE RENTA RESOLUCIÓN 004921 DE 06/JUL/2021
 NO SOMOS GRANDES CONTRIBUYENTES

COTIZACION DE VENTA

COT-4984
 Fecha: 20-05-2023

OBSERVACIONES

TIEMPOS DE ENTREGA SALVO VENTA PREVIA Y/O SUJETO A CAMBIOS POR DISPONIBILIDAD DE FABRICA.



[Signature]
 Gerente General

SUBTOTAL:	\$ 3,942,000
TOTAL, IVA 19%:	\$ 748,980
TOTAL:	\$ 4,690,980



IT	CANT.	REFERENCIA	DESCRIPCION / ESPECIFICACIONES	MARCA	PRECIO UNITARIO	SUBTOTAL	IVA %	TOTAL CIVI	ENTREGA
7	1	141297.1211	Hierro(III) Nitrato 9-hidrato puro Riqueza (Yodom.): 98% X 1Kg CAS: 7782-61-8 NOTA: 2 UNIDADES DISPONIBLES EN BODEGA, SALVO VENTA PREVIA.	PANREAC	\$ 608.000	\$ 608.000	19	\$ 723.520	10 A 15 DIAS HABILES
8	1	131669.1211	EDTA Sal Disódica 2-hidrato (Reag. USP, Ph. Eur.) para análisis, ACS Riqueza (Compl.): 99,0-101,0% X 1Kg CAS: 6381-92-6	PANREAC	\$ 908.000	\$ 908.000	19	\$ 1.080.520	10 A 15 DIAS HABILES
9	1	AC223210010	Cloruro de magnesio, puro X 1Kg CAS: 7786-30-3	Thermo Scientific Chemicals	\$ 425.000	\$ 425.000	19	\$ 505.750	60 A 90 DIAS
10	1	31432-1KG	Sodio Carbonato Puriss. p.a., ACS Reagent, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur., anhydrous, ≥99,8% * 1 KG. CAS: 497-19-8	HONEYWELL -FLUKA	\$ 150.000	\$ 150.000	19	\$ 178.500	3 A 5 DIAS HABILES
11	1	31146-1KG	Acido Borico Puriss. p.a., ACS Reagent, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur. ≥99,8% Fco por Kg. CAS: 10043-35-3	HONEYWELL -FLUKA	\$ 160.000	\$ 160.000	19	\$ 190.400	3 A 5 DIAS HABILES
12	1	131121.1211	Amonio Cloruro (Reag. USP) para análisis, ACS, ISO Riqueza mínima (Arg.): 99,5% X 1Kg CAS: 12125-02-9	PANREAC	\$ 300.000	\$ 300.000	19	\$ 357.000	10 A 15 DIAS HABILES
13	1	131410.1210	Manganeso(II) Cloruro 4-hidrato para análisis, ACS X 500g CAS: 13446-34-9	PANREAC	\$ 652.000	\$ 652.000	19	\$ 775.880	10 A 15 DIAS HABILES
14	1	131787.1211	Zinc Sulfato 7-hidrato para análisis, ACS Riqueza (Compl.): 99,5-103,0% X 1Kg CAS: 7446-20-0	PANREAC	\$ 249.000	\$ 249.000	19	\$ 296.310	10 A 15 DIAS HABILES



COTIZACIÓN N° 20230515LM4

Fecha: **15/05/2023**

Cliente: **UNIVERSIDAD DEL CAUCA**
Atn: **JOHANA BENAVIDES ESCOBAR**
Ciudad: **POPAYAN**

Cordial Saludo

De acuerdo con su amable solicitud cotizamos lo siguiente:

IT	CANT.	REFERENCIA	DESCRIPCION / ESPECIFICACIONES	MARCA	PRECIO UNITARIO	SUBTOTAL	IVA %	TOTAL CIVA	ENTREGA
1	1	131702.1211	Sodio Nitrato (Reag. USP, Ph. Eur.) para análisis, ACS, ISO X 1Kg CAS: 7631-99-4	PANREAC	\$ 608.000	\$ 608.000	19	\$ 723.520	10 A 15 DIAS HABILES
2	1	122333.1211	di-Potasio Hidrógeno Fosfato 3-hidrato para análisis X 1Kg CAS: 16788-57-1	PANREAC	\$ 956.000	\$ 956.000	19	\$ 1.137.640	10 A 15 DIAS HABILES
3	1	M63500	Magnesio Sulfato Heptahidrato certificado ACS 98 a 102% * 500 gramos. CAS: 10034-99-8	FISHER	\$ 210.000	\$ 210.000	19	\$ 249.900	3 A 5 DIAS HABILES
4	1	131232.1211	Calcio Cloruro 2-hidrato polvo (Reag. USP) para análisis, ACS Riqueza (Compl.): 99,0-105,0% X 1Kg CAS: 10035-04-8	PANREAC	\$ 330.000	\$ 330.000	19	\$ 392.700	10 A 15 DIAS HABILES
5	1	A9401	Ácido Cítrico Anhidro cristalino certificado ACS ≥ 99,5% * 1000 gramos. CAS: 77-92-9 NOTA: 7 UNIDADES DISPONIBLES EN BODEGA, SALVO VENTA PREVIA.	FISHER	\$ 340.000	\$ 340.000	19	\$ 404.600	3 A 5 DIAS HABILES
6	2	172-500	Citrato férrico de amonio (laboratorio) X 500g CAS: 1185-57-5	Fisher Chemical	\$ 430.000	\$ 860.000	19	\$ 1.023.400	60 A 90 DIAS



IT	CANT.	REFERENCIA	DESCRIPCION / ESPECIFICACIONES	MARCA	PREGO UNITARIO	SUBTOTAL	IVA %	TOTAL CIVA	ENTREGA
15	4	131701.1209	Sodio Molibdato 2-hidrato (Reag. USP, Ph. Eur.) para análisis, ACS Riqueza (Compl.): 99,5-103,0% X 250g CAS: 10102-40-6	PANREAC	\$ 1.209.000	\$ 4.836.000	19	\$ 5.754.840	10 A 15 DIAS HABILES
16	1	31293-1KG	Cobre (II) Sulfato Pentahidratado Puriss. p.a., ACS Reagent, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur., 99-102% * 1 KG. CAS: 7758-99-8	HONEYWELL -FLUKA	\$ 210.000	\$ 210.000	19	\$ 249.900	3 A 5 DIAS HABILES
17	10	131258.1208	Cobalto(II) Nitrate 6-hidrato (Reag. USP, Ph. Eur.) para análisis, ACS Riqueza (Compl.): 98,0-102,0% X 100g CAS: 10026-22-9	PANREAC	\$ 956.000	\$ 9.560.000	19	\$ 11.376.400	10 A 15 DIAS HABILES
SUBTOTAL								\$ 21.362.000	
IVA								\$ 4.068.780	
T O T A L								\$ 25.420.780	
OBSERVACIONES:									
LOS TIEMPOS DE ENTREGA COTIZADOS SON SALVO VENTA PREVIA SUJETO A DISPONIBILIDAD EN INVENTARIO AL ELABORAR SU ORDEN FAVOR VERIFICAR REFERENCIA Y DESCRIPCION; EN PRODUCTOS DE IMPORTACION ESPECIAL NO SE ACEPTA DEVOLUCION									

Forma de Pago **60 DIAS**
Vigencia de la Oferta **15 DIAS**

Esperamos tener el gusto de atenderlos.



Qca. Ind. Katherine Andrea Henao

Asesora Comercial
Movil: 316 347 7524
ventas1@spltda.com
NUEVO PBX (2) 641 1100 Ext. 105
Cali - Colombia

Anexo E. Costo del suministro de los nutrientes

Tabla 25. Sales utilizadas para la preparación del medio BG11

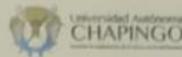
#	Componente	Cantidad	Cotización	\$/ gramo	g/L medio	Precio L sn	Precio/mL
1	KNO ₃	1 kg	469.098	469	2		938
2	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1 kg	1.013.880	1.014	40.0	40.555.2	40.56
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 kg	383.180	383	75.0	28.738.5	28.74
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 kg	342.720	343	36.0	12.337.9	12.34
5	Ácido cítrico	1 kg	426.020	426	6.0	2.556.1	2.56
6	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	1 kg	536.715	537	6.0	3.220.3	3.22
7	EDTA	1 kg	962.710	963	0.7	673.9	0.67
8	MgCl ₂	1 kg	467.670	468	0.3	140.3	0.14
9	Na ₂ CO ₃	1 kg	283.220	283	20.0	5.664.4	5.66
10	H ₃ BO ₃	1 kg	190.400	190	2.9	544.5	0.54
11	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 kg	257.040	257	0.2	56.5	0.06
12	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	1 kg	1.285.200	1.285	0.4	501.2	0.50
13	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 kg	249.900	250	0.1	20.0	0.02
14	KNO ₃	1 kg	469.098	469	0.1	23.5	0.02
							1.033

Tabla 26. Costos del suministro de nutrientes en una relación molar N-P en el medio NBC.

	Fertilizante rico en N	Fertilizante rico en P	Fertilizante rico en N	Fertilizante rico en P	Fertilizante rico en N	Fertilizante rico en P
	R 10:1		R15:1		R 20:1	
\$/mL	22	19.5	22	19.5	22	19.5
mL/L	0,5	0.305	0.821	0.305	1.303	0.305
Total	11	5.9	18.1	5.9	28.7	5.9
Costo/L cultivo	16.9		24.0		34.6	

Anexo F. Participación en eventos internacionales





*"IX Congreso Internacional de Ingeniería
Agroindustrial, México, 2023"*

**LA RED UNIVERSITARIA DE
INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**

OTORGAN EL PRESENTE:

RECONOCIMIENTO

A:

Jhoana Benavides Escobar, John Alexander
Muelas, Jorge Luis Sánchez, Jhon Nieto Calvache

POR LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO

*"Producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* empleando
nutrientes de bajo costo"*

MODALIDAD COMUNICACIÓN ORAL

23 al 27 de Octubre de 2023
Universidad Autónoma Chapingo



Dr. Anastacio Espejel García
PRESIDENTE DEL CIIA -
MÉXICO 2023



Universidad de los Llanos

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales



Certifican que:

JOHN ALEXANDER MUELAS CALAMBÁS

Documento de identidad No. 1.061.532.991

Asistió:

En calidad de **PONENTE** en el **II CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN AGROINDUSTRIAL** realizado el **23 y 24 de noviembre del 2023**, con el proyecto denominado **“PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* EMPLEANDO MEDIOS ALTERNATIVOS”**.

CRISTÓBAL LUGO LOPEZ

Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales
Se expide a los veinticuatro (24) días del mes de noviembre del 2023