

**EFFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y DE CARBONO EN LA TASA DE
CRECIMIENTO, BIOMASA Y PRODUCTIVIDAD EN *Auxenochlorella*
protothecoides Y DESCRIPCIÓN BIOQUÍMICA CUALITATIVA POR
ESPECTROSCOPIA FTIR**

FELIPE ALEJANDRO NIÑO MORALES



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI**

2011

**EFFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y DE CARBONO EN LA TASA DE
CRECIMIENTO, BIOMASA Y PRODUCTIVIDAD EN *Auxenochlorella*
protothecoides Y DESCRIPCIÓN BIOQUÍMICA CUALITATIVA POR
ESPECTROSCOPIA FTIR**

FELIPE ALEJANDRO NIÑO MORALES

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Biólogo**

Director

ALAN GIRALDO

Ph. D. Oceanógrafo

Codirector

JULIAN URRESTA

Ph. D. Químico

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

2011

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

FELIPE ALEJANDRO NIÑO MORALES (1987)

EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y DE CARBONO EN LA TASA DE
CRECIMIENTO, BIOMASA Y PRODUCTIVIDAD EN *Auxenochlorella*
protothecoides Y DESCRIPCIÓN BIOQUÍMICA CUALITATIVA POR
ESPECTROSCOPIA FTIR

TEMAS: tasa de crecimiento, monosacáridos, disacáridos, espectroscopía
infrarroja.

Nota de aprobación

El trabajo de grado titulado “**EFFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y DE CARBONO EN LA TASA DE CRECIMIENTO, BIOMASA Y PRODUCTIVIDAD EN *Auxenochlorella protothecoides* Y DESCRIPCIÓN BIOQUÍMICA CUALITATIVA POR ESPECTROSCOPIA FTIR**”, presentado por el estudiante FELIPE ALEJANDRO NIÑO MORALES, para optar al título de Biólogo, fue revisado por el jurado y calificado como:

Aprobado

Alan Giraldo, Ph. D.

Director

Julián Urresta, Ph. D.

Codirector

Jurado

*A mis padres, hermana y abuelo por haberme apoyado en este
camino brindándome sus consejos y amor incondicional....*

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Alan Giraldo por su valiosa contribución en el análisis de datos y la oportunidad que me brindó para realizar este trabajo bajo su dirección.

Al profesor Julián Urresta por sus enseñanzas en interpretación de espectros y haber brindado su apoyo como codirector del trabajo.

A mis padres por la importante colaboración y apoyo en los momentos duros y motivación a seguir adelante.

A la Universidad del Valle, Departamento de Biología, Sección de Zoología, por el espacio brindado para realizar los experimentos. Al Laboratorio de Biología y su personal por la colaboración dada. Al Laboratorio de Investigación en Catálisis Aplicada y Procesos (LICAP), por su asesoramiento en la preparación del catalizador y realización de reacciones. A la Escuela de Ingeniería Química y al Laboratorio de Microbiología Ambiental de Ingeniería Sanitaria por el espacio y equipos facilitados.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. MARCO TEÓRICO	5
2. OBJETIVOS	8
3. METODOLOGIA	9
3.1 Organismo objeto de estudio	9
3.2 Cultivo	10
3.2.1 Densidad óptica	10
3.2.2 Mediciones en experimentos	10
3.2.3 Cultivos experimentales	11
3.3 Cosecha y secado	12
3.4 Perfil IR	12
3.5 Análisis estadístico	13
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSIÓN	31
6. CONCLUSIONES	40
LITERATURA CITADA	42

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Bandas de infrarrojo integradas a las macromoléculas.	13
Tabla 2. Asignación tentativa para bandas encontradas en espectros FTIR biológicos.	13
Tabla 3. Densidad celular, biomasa y productividad en autotrofia y mixotrofia. Por triplicado.	19
Tabla 4. Tasa de crecimiento (d^{-1}) en el crecimiento autotrófico y mixotrófico.	20
Tabla 5. Densidad celular, biomasa y productividad en glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa tanto a una agitación de 70 rpm como 140 rpm.	24
Tabla 6. Tasa de crecimiento (d^{-1}) en el crecimiento en glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa tanto a una agitación de 70 rpm como 140 rpm (Media $\pm$ Desviación estándar).	25
Tabla 7. Porcentaje por componente y banda FTIR asignados para la biomasa de cada tratamiento.	27
Tabla 8. Proporción de éster de lípidos y carbohidratos respecto a la amida I por tratamiento.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fotografías a 400x (derecha), 1000x (centro) en microscopio y duplicado en agar inclinado de <i>A. protothecoides</i> . Fotografía realizada en un microscopio Olympus CH20 en el laboratorio de Ecología Animal.	9
Figura 2. Sistema de cultivo con agitación tipo shaker (imagen cultivo mixotrófico).	12
Figura 3. Microalga secada en horno (izquierda) y por liofilización (derecha).	12
Figura 4. Tubos con medio LB después de la incubación inoculados con <i>Auxenochlorella protothecoides</i> (izquierda) y coloración característica del cultivo de <i>A. protothecoides</i> (derecha).	15
Figura 5. Perfil de absorción de: pigmentos extraídos con acetona de biomasa (izquierda), y de cultivo en suspensión (derecha).	16
Figura 6. Distribución de la densidad celular respecto de la Absorbancia a 540 nm y 680 nm (arriba) y 700 nm (abajo) y su respectiva regresión lineal y r^2 .	17
Figura 7. A. Cultivo con medio BBM+V con amonio (izquierda) y nitrato (derecha). B. Densidad celular de <i>Auxenochlorella protothecoides</i> en nitrato y amonio.	18
Figura 8. Biomasa (derecha) y productividad (izquierda) obtenidas bajo crecimiento mixotrófico y autotrófico.	18
Figura 9. A. Distribución de las tasa de crecimiento específicas en el cultivo autotrófico y mixotrófico. B. Comportamiento del crecimiento microalgal según el tratamiento.	19

Figura 10. Coloración y resultado de cultivo autotrófico (<i>izquierda</i>) y mixotrófico (<i>derecha</i>).	20
Figura 11. Cultivo mixotrófico al cabo de 3 días en glucosa, sacarosa, maltosa y fructosa (<i>de izquierda a derecha</i>).	21
Figura 12. A. Biomasa, y B. productividad, en cada tratamiento y según la agitación.	22
Figura 13. Cinética de crecimiento en los 4 tratamientos con agitación de 70 rpm (<i>izquierda</i>), 140 rpm (<i>derecha</i>).	22
Figura 14. Densidad celular en las cuatro fuentes de carbono al final del experimento con agitación de 70 rpm y 140 rpm.	23
Figura 15. De izquierda a derecha: Tasas de crecimiento en cada tratamiento y a las velocidades de agitación de 70 rpm (azul) y 140 rpm (rojo) entre el día 0 a 1, 1 a 2 y 2 a 3.	25
Figura 16. Espectro FTIR de la biomasa según el tratamiento.	26
Figura 17. Porcentaje de cada componente según la banda FTIR y el tratamiento.	28
Figura 18. A. Región del espectro FTIR respecto a la banda amida I y éster de lípidos (<i>izquierda</i>); B. Región del espectro FTIR de las bandas de lípidos saturados e insaturados (<i>derecha</i>).	29
Figura 19. Proporción de lípidos y carbohidratos en el tratamiento autotrófico los mixotróficos respecto a la banda amida I.	29

RESUMEN

En este estudio se buscó la mejor correlación de densidad óptica (OD) por espectroscopía respecto a la densidad celular de la microalga *Auxenochlorella protothecoides*. Con base en el espectro de absorción de sus pigmentos y conteo celular, se estableció que la mejor longitud de onda para evaluar la densidad celular de esta especie por espectroscopía fue a 680 nm con un r^2 de 0,87. Además se comparó el cultivo autotrófico en 2 fuentes de nitrógeno (nitrato y amonio) resultando en una baja producción. Por otro lado, se comparó el cultivo autotrófico con uno mixotrófico con maltosa obteniendo en este último 1,4 veces más densidad celular, el doble de biomasa y 2,2 veces más productividad, además de diferencias significativas en la tasa de crecimiento (μ). Se probaron 4 medios para mixotrofia con glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa al 1% y a dos velocidades de agitación, 70 y 140 rpm. Hubo un aumento sustancial en la producción algal al subir la velocidad de 70 rpm a 140 rpm, así como también diferencias significativas entre un mismo medio ($p < 0,001$) a ambas agitaciones. Con glucosa se obtuvo la mayor densidad celular, biomasa y productividad en ambas velocidades, siendo de $4,385 \times 10^7$, 1,9 g/L y $0,642 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (70 rpm) y $3,315 \times 10^7$, 1,6 g/L y $0,548 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (140 rpm), respectivamente. En cuanto a la tasa de crecimiento (μ) en ambas velocidades la fructosa generó la mayor magnitud ($0,76 \text{ d}^{-1}$). Asimismo en los medios con glucosa, fructosa y sacarosa hubo una disminución del pH mientras que en el de maltosa hubo un aumento. Al cualificar las biomoléculas mediante FTIR los tratamientos autotróficos y mixotróficos tuvieron una mayor proporción de carbohidratos que de lípidos, y la cantidad de proteínas fue mayor en sacarosa y maltosa, seguida del autotrófico. Así pues, estos resultados obtenidos demuestran la flexibilidad metabólica que exhibe *A. protothecoides* para una variedad de nutrientes y, al contrastarse con resultados de otros investigadores, se evidencia que variables como la biomasa y la productividad son dependientes tanto de la cepa como de las condiciones experimentales utilizadas.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos generalmente fotoautotróficos que han recibido gran atención en los últimos años debido a su potencial en la generación de biomasa para nutrición animal y humana, pigmentos (clorofila, β -caroteno y astaxantina) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) tipo omega 3 y 6 (Spolaore *et al.*, 2006). Además se avanza en investigaciones biotecnológicas para generar la expresión de fármacos y en el mejoramiento de producción de lípidos para la generación de biocombustible (Rosenberg *et al.*, 2008). Resulta entonces relevante comprender los factores que afectan el crecimiento microalgal de este grupo taxonómico y lograr aclimatarlas para que generen una respuesta fisiológica hacia el producto deseado, considerando especialmente la tasa de crecimiento, biomasa y productividad.

Por otro lado, a pesar de que la mayoría de estudios involucran microalgas acuáticas (marinas y dulceacuícolas), existe una diversidad sorprendentemente activa de microalgas en los diferentes tipos de suelos de los ecosistemas (Thorn & Lynch, 2007), y aunque se registran poblaciones de entre 5×10^3 a 1×10^7 cel/g de suelo, los estudios son muy escasos en microalgas terrestres (edáficas), y aún menor en epifíticas, o que crecen sobre plantas (Maier & Pepper, 2008). Tal es el caso de *Auxenochlorella protothecoides* (Krüger) T.Kalina & M.Puncochárová 1987, una microalga verde (Chlorophyceae) aislada creciendo sobre la savia de árboles en Alemania, la cual puede desarrollarse fotoautotrófica o heterotróficamente, y de la que se han publicado muy escasos estudios sobre su crecimiento respecto a variables nutricionales y su perfil lipídico.

Aunque muestran una composición bioquímica versátil, siendo en condiciones favorables de 30-50% proteína, 20-40% carbohidratos y de 8-20% lípidos (hasta 80% ante un factor de estrés), sus cinéticas de crecimiento son similares para los varios tipos de metabolismos encontrados en algas, como el crecimiento fotosintético o fotoautotrófico, que requiere luz, CO_2 y una fuente de nitrógeno (N).

Pero son los cambios en las condiciones nutricionales, ya sea por limitación o un factor de estrés, al modular la fotosíntesis y la productividad celular, influenciando el patrón, trayecto y la actividad del metabolismo celular (Cohen, 1999).

Entre esas condiciones nutricionales, el nitrógeno (N), después del carbono, es el elemento que realiza la mayor contribución al crecimiento y producción de biomasa microalgal. Existiendo entre las fuentes aprovechables tanto formas inorgánicas, como el amonio (NH_4^+), el cual es captado y asimilado con mayor facilidad, y el nitrato (NO_3^-), generalmente preferido en ambientes terrestres debido a su disponibilidad; además de una variedad de compuestos nitrogenados orgánicos (aminonitrógeno), como aminoácidos y sus intermediarios, generando para su captación y asimilación canales iónicos en membranas, enzimas y algunos mecanismos genéticos regulatorios (Pérez *et al.*, 2011).

Otro tipo de metabolismo estudiado es el mixotrófico, debido a que genera un mayor crecimiento y producción respecto a la autotrofía, y en el cual la microalga se desarrolla con luz y una fuente de carbono distinta al CO_2 , tales como la glucosa, acetato, glicerol o sacarosa. Es un proceso especie específico afectado por la presencia de transportadores de membrana particulares, siendo la glucosa preferida, aunque implique un gasto energético alto de ATP (Yang *et al.*, 2000). Estas características han podido ser interpretadas comparando las vías metabólicas entre las algas verdes y las plantas ya que tienden a ser similares, respecto a enzimas y mecanismos moleculares de utilización de carbohidratos (Patron & Keeling, 2005). Pero sobre la maltosa hay muy escasos estudios en algas.

Entre las técnicas de química analítica para obtener información sobre la composición bioquímica de la biomasa algal, en los últimos años ha tomado considerable protagonismo la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). Ésta permite un acercamiento cualitativo y hasta cuantitativo de las principales biomoléculas, incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos

nucleicos, presentes en una muestra de forma rápida, sin necesidad de usar reactivos tóxicos y con cantidades muy pequeñas de muestra (<10mg para FTIR). Este método implica la identificación de constituyentes químicos basándose en sus modos vibracionales moleculares, en los que grupos moleculares específicos pueden ser identificados por sus bandas de absorción (Naumann *et al.*, 2009).

En este trabajo se pretende evaluar cómo dos fuentes de nitrógeno (amonio y nitrato) afectan la tasa de crecimiento, biomasa y productividad de la microalga *Auxenochlorella protothecoides*, así como en cultivos autotróficos y mixotróficos con cuatro fuentes de carbono diferentes (glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa), y tomando como elemento de comparación el espectro FTIR generada por la biomasa obtenida.

1. MARCO TEÓRICO

Las microalgas son consideradas en taxonomía como un grupo filogenéticamente polimórfico (Brodie & Lewis, 2007). Son generalmente fotoautotróficos, aunque algunas especies son capaces de obtener su energía de modo mixotrófico o heterotrófico (Liang *et al.*, 2009). Inicialmente su biomasa se utilizaba como fuente de proteína pero posteriormente se encontraron muchas aplicaciones comerciales, entre ellas varios lípidos con importancia cosmética y medicinal, los omega 3 y 6 (PUFA), así como fuente para biodiesel (Pérez *et al.*, 2011).

En cuanto a microalgas edáficas los pocos estudios son los básicos realizados en el aislamiento y muchos se basan en supuestos más que en experimentos. Los datos son a partir de observar la fluorescencia de la clorofila o cepas capaces de formar colonias en agar, lo cual subestima las capacidades y números reales, ya que muchas pueden estar creciendo mediante heterotrofia o mixotrofia, utilizando fuentes de carbono (C) y nitrógeno (N) orgánicas. Cabe tener en cuenta que la mayoría de algas en el suelo o sobre plantas son fotoautotróficas obligadas, pero existe una pequeña porción que requiere nutrientes orgánicos, siendo la familia Chlorophyceae la más abundante (Reisser, 2007).

Por otro lado, en cuanto al crecimiento autotrófico Tam & Wong (1996) obtuvieron con una cepa de *Chlorella vulgaris* tasas de crecimiento específico entre 0.054 d^{-1} y 0.236 d^{-1} , y densidades celulares máximas entre 3 a $50 \times 10^6\text{ cel/mL}$, al variar la concentración de amonio de 0 a 1000 mg/L. Mientras que Converti *et al.* (2009) con una cepa de la misma especie lograron un crecimiento de 0.14 d^{-1} a 0.13 d^{-1} al variar el NaNO_3 de 1.5 a 0.375 g/L.

Esta tasa de crecimiento se ve afectada por un estrés nutritivo, como la limitación por nitrógeno, provocando decoloración debida a la pérdida de clorofila, y la acumulación de compuestos orgánicos de carbono, como polisacáridos y lípidos (Becker, 1994). Del mismo modo, cuando se usa amonio (NH_4^+) como fuente de

nitrógeno, el pH puede disminuirse por liberación de iones H^+ , mientras que hay un incremento cuando se utiliza nitrato (NO_3^-). Y aunque el NH_4^+ se volatiliza del medio de cultivo, por lo que debe tenerse precaución, éste genera una tasa de productividad y crecimiento similar al NO_3^- (Mulholland & Lomas, 2008).

Otro tipo de crecimiento en microalgas es la mixotrofía que permite la producción algal en fuentes de carbono orgánicas. Fue así por la que Bristol (1926) evaluó la respuesta de crecimiento de *Scenedesmus costulatus* en 3 hexosas, la fructosa, glucosa y galactosa, y 3 disacáridos, la lactosa, maltosa y sacarosa, obteniendo muy buen desarrollo en glucosa, maltosa, sacarosa y galactosa, y moderado con la fructosa. De manera similar, Liang *et al.* (2009), con *Chlorella vulgaris*, y Wan *et al.* (2011), con *Chlorella sorokiniana*, obtuvieron 5.38 y 2.2 veces más biomasa, y de 19.5 a 7 veces más productividad al crecer, respectivamente, en cultivo mixotrófico comparado con autotróficos

Por otro lado, el metabolismo de la sacarosa es poco conocido en microalgas, pero en varias especies de clorófitas, como *Chlorella vulgaris*, muestran similitudes en cuanto a las enzimas en plantas, como la sacarosa sintasa y la invertasa, siendo éstas detectadas en todas las etapas de la curva de crecimiento algal e independientes de la habilidad de llevar a cabo la fotosíntesis (Salerno, 1985 a; Salerno, 1985 b). Por otro lado, de la maltosa hay poca investigación en microalgas, conociéndose en otros organismos eucarióticos, que es hidrolizada en el interior celular por la maltasa (Boos & Shuman, 1998).

Por todo lo anterior se hace evidente la necesidad de considerar la historia natural de una cepa, con el fin de entender mejor el cómo será su comportamiento fisiológico. La cepa de *Auxenochlorella protothecoides* adquirida se reporta creciendo sobre la savia secretada en árboles de *Populus* (Álamo) y *Ulmus* (Olmo) en algunos sitios de Alemania. Dichos árboles generalmente están en zonas con una temperatura promedio anual de 9°C, con variaciones entre -2°C a hasta 26°C según el mes (Maoweather. < <http://www.meoweather.com/history/Germany/>

na/51.5/12/ Halle%20an%20der%20 Saale. html>, Consulta en Marzo 15 de 2011). De igual manera, en dichos árboles el nitrato es una de las formas de transporte de nitrógeno y es necesario para el balance de equivalentes eléctricos en el xilema. Además, la captación y transporte de nitrato y el potasio en el xilema están correlacionados fuertemente en el álamo (Siebrecht & Tischner, 1999).

Auxenochlorella (Chlorophyceae) es un género de microalgas de entre 3-9 µm de diámetro, con cloroplasto único y parietal, sin pirenoide y carotenoides secundarios, la cual se reproduce asexualmente por autosporas, de 2, 8 o 16 por esporangio, liberadas por la ruptura de la pared celular parental, la cual queda en el cultivo. Su crecimiento autotrófico requiere tiamina, aunque puede crecer sin luz, heterotróficamente, al agregársele una fuente adecuada de carbono orgánico. Es considerado basiónimo de *Chlorella protothecoides* (Krüger), pero se distingue del género *Chlorella* por la estructura de la pared celular y el análisis del 18S rRNA, el cual le da afinidad con el género *Prototheca* (Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2011. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; Consultado en: Mayo 2011).

Existen diferentes técnicas para los constituyentes bioquímicos de la biomasa microalgal, con el fin de establecer cómo las diferentes condiciones de cultivo influenciaron la acumulación de algún metabolito en especial. Usualmente la cualificación relativa de las macromoléculas se basan en cromatografía y pruebas extractivas, las cuales son laboriosas y costosas. Pero gracias a las constantes innovaciones y mejoras en instrumentación y quimiometría han surgido métodos rápidos y eficaces para el análisis sencillo, económico y eficiente encaminados a la caracterización de las biomoléculas en muestras biológicas, sin necesidad de pretratamientos especiales, entre las que se destaca la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) (Naumann *et al.*, 2009). Ha sido poco utilizada en microalgas, pero ha mostrado una gran eficiencia para determinar el contenido lipídico y de carbohidratos en el tiempo en *Chlamydomonas reinhardtii* y *Scenedesmus subspicatus* (Dean *et al.*, 2010).

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la variación de la tasa de crecimiento específica, biomasa y productividad en *Auxenochlorella protothecoides* con dos fuentes de nitrógeno (del nitrato y amonio) y 4 fuentes de carbono, y utilizar la espectroscopía de infrarrojo para establecer el perfil de biomoléculas de *Auxenochlorella protothecoides*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar un protocolo para la producción de *Auxenochlorella protothecoides* en fotobiorreactores a nivel de laboratorio.
2. Estimar la densidad celular utilizando la técnica de absorbancia específica para los pigmentos de *A. protothecoides*.
3. Evaluar el efecto de los medios Polytoma y Medio Bold Modificado con vitaminas (BBM+V) con amonio o con nitrato sobre el crecimiento de *A. protothecoides*.
4. Evaluar el efecto del tipo de cultivo (autotrófico o mixotrófico con maltosa) en la tasa de crecimiento, biomasa y productividad de *A. protothecoides*.
5. Evaluar la mixotrofia con dos monosacáridos (glucosa y fructosa) y dos disacáridos (sacarosa y maltosa) que se presentan naturalmente en suelos sobre la tasa de crecimiento, biomasa y productividad de *A. protothecoides*.
6. Realizar una aproximación cualitativa de la composición bioquímica de biomasa proveniente de 5 tratamientos distintos (uno autotrófico y cuatro mixotróficos) mediante espectroscopía de infrarrojo por transformación de Fourier.

3. METODOLOGIA

3.1 Organismo objeto de estudio

El trabajo se realizó a partir de la adquisición de la cepa *Auxenochlorella protothecoides* a la Sammlung von Algenkulturen (SAG) de la Universidad de Göttingen (Alemania) (Figura 1).

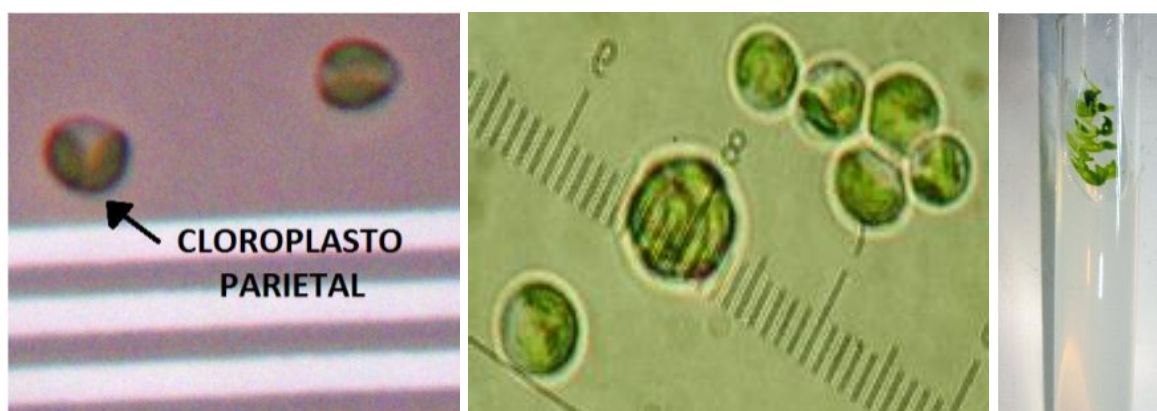


Figura 1. Fotografías a 400x (derecha), 1000x (centro) en microscopio y duplicado en agar inclinado de *A. protothecoides*. Fotografía realizada en un microscopio Olympus CH20 en el laboratorio de Ecología Animal.

La cepa se mantuvo en un cultivo primordial en tubo de tapa rosca con medio Polytoma (Pol) sólido y por triplicado. En todos los experimentos la temperatura se mantuvo alrededor de 26-28°C, una intensidad lumínica de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con lámparas fluorescentes de luz blanca acopladas a un timer para tener un fotoperíodo 12:12.

Debido a que durante el proceso de estandarización y aclimatación del cultivo se presentaron repetidos episodios de contaminación del sistema en el laboratorio, se probó la inoculación en caldo LB por duplicado de la cepa original. Luego se realizó un ensayo en 3 erlenmeyer con 150mL de medio estéril, adicionándole 10mL de cultivo con microalga y Penicilina G-potásica a 2 de los reactores y el tercero sin antibiótico como control. Se dejó 5 días en agitación a 100rpm y

fotoperiodo 12:12. Además el Laboratorio de Microbiología Industrial y Ambiental (Biología, Universidad del Valle) realizó un análisis de la calidad del aire.

3.2 Cultivo

3.2.1 Densidad óptica

La densidad óptica se basó en el perfil de absorción de los pigmentos extraídos con acetona. Para establecer las longitudes de onda que permitían cuantificar la densidad óptica (OD) de *A. protothecoides* en los cultivos se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis-1700 (Shimadzu, Japón). Dicha longitud de onda se recomienda que no sea un pico máximo sino que se encuentre asociada a éste debido a que tiene la ventaja de no ser tan sensible a los cambios de las condiciones de cultivo (Richmond, 2004). Posteriormente se realizaron mediciones de la OD del cultivo a 540 nm (OD₅₄₀), 680 nm (OD₆₈₀), y 700 nm (OD₇₀₀), con el propósito de determinar cuál recta se ajustaba mejor con la densidad celular.

3.2.2 Mediciones en experimentos

Se estimó la densidad celular (cel/mL) mediante conteo en cámara de Neubauer mejorada. La cuantificación total del número de celular se realizó con base en los conteos en la cámara como:

$$\frac{Cel}{mL} = \frac{n \text{ células contadas}}{0,0001} \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo 0,0001 el volumen total del recuadro en que se realizó el conteo.

Se estimó la biomasa en función del peso seco de cosecha (estandarizado por unidad de volumen filtrado (ecuación 2), y la productividad se estableció con base en la tasa de cambio de la biomasa en el tiempo (ecuación 3).

$$Biomasa (g L^{-1}) = \frac{peso \text{ seco } (g)}{L} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$P (g L^{-1} día^{-1}) = \frac{peso \text{ seco } (g/L)}{tiempo (días)} \quad \text{Ecuación 3}$$

Para la tasa específica de crecimiento o constante de crecimiento (μ), se siguió a Barsanti & Gualtieri (2006), considerando la tasa de cambio de la biomasa o el número de células entre intervalos de tiempo continuos (ecuación 4) y se expresó en 1/días (d^{-1}),

$$\mu = \frac{\ln N_2 / N_1}{t_2 - t_1}$$

Ecuación 4

3.2.3 Cultivos experimentales

Los cultivos se realizaron en sistema tipo batch, con subcultivos sucesivos (Figura 2) y se utilizaron los siguientes medios:

- 1- medio BBM+V con la concentración de amonio y de nitrato de 250mg/L, durante 4 días, a 100 rpm y por triplicado en erlenmeyer de 250 mL con un volumen de trabajo (Vt) de 175 mL (70%), un inóculo del 12% del Vt (21 mL) y completado con medio nuevo (154 mL);
- 2- medio con 0,5 g/L de extracto de levadura para el crecimiento autotrófico, y la misma concentración de extracto complementada con maltosa al 1% (10 g/L) para el medio mixotrófico, durante 4 días a 100 rpm y en triplicado;
- 3- medios mixotróficos todos contenían 0,5 g/L de extracto de levadura y el azúcar evaluado (glucosa, fructosa, sacarosa o maltosa) al 1% (10 g/L) durante 3 días, por duplicado, además se evaluaron dos velocidades de agitación a 70 rpm y 140 rpm.

Para los medios 2 y medios 3 se usaron frascos de 500 mL con un volumen de trabajo (Vt) de 350 mL (70%), un inóculo del 18% del Vt (63 mL) y completado con medio nuevo (287 mL).



Figura 2. Sistema de cultivo con agitación tipo shaker (imagen cultivo mixotrófico)

3.3 Cosecha y secado

Para cosechar se realizó una centrifugación a $4500 \times g$, 5 min. El secado (Figura 3) de las muestras que crecieron en nitrógeno se realizó en horno a 70°C (ThermoScientific, Estados Unidos) entre 6 a 8 horas. Mientras que la biomasa de los tratamientos con carbono fueron liofilizadas (Eyela FDU 1100, Japón).

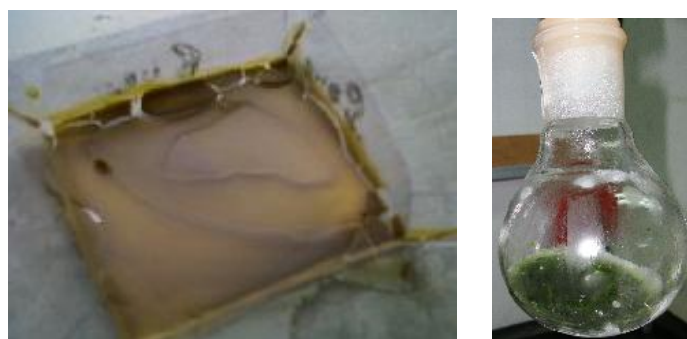


Figura 3. Microalga secada en horno (*izquierda*) y por liofilización (*derecha*)

3.4 Perfil IR

Se realizó el espectro vibracional infrarrojo por transmitancia, utilizando Bromuro de Potasio (KBr), a una cantidad determinada de biomasa del medio 2 autotrófico

(2.9 mg) y la obtenida en glucosa (2.8 mg), fructosa (2.4 mg), sacarosa (2.6 mg) y maltosa (2.7mg) a 70 rpm. La medición se realizó por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier en el equipo IRAffinity-1 (Shimadzu, Estados Unidos). Se midió de 400 a 4000 cm^{-1} , con una resolución de 2 cm^{-1} y se realizaron 10 escaneos por muestra, para tener el promedio del % de transmitancia. Al tener un peso establecido de biomasa de cada tratamiento se realizó la cuantificación relativa de las bandas de interés basándose en el área total de cada uno de los cinco espectros. Luego se les realizó ajustes como suavizado y la línea base. Para la asignación de las bandas se utilizaron las tablas 1 y 2:

Tabla 1. Bandas de infrarrojo integradas a las macromoléculas

Designación	Long. de onda (cm^{-1})
Amida I	1575-1705
Amida II	1480-1575
Carbohidratos	880-1064
Lípidos	1708-1780

Tabla 2. Asignación tentativa para bandas encontradas en espectros FTIR biológicos

Componente	Banda (cm^{-1})
Fingerprint	600 - 900
Carbohidratos	900 - 1194
Amida III	1200 - 1324
C-H alifáticos	1351 - 1481
Amida II	1513 - 1580
Amida I	1593 - 1722
Éster de lípidos	1728 - 1751
Lípidos saturados	2829 - 2984
Lípidos insaturados	2996 - 3024
Amida A	3200 - 3300

3.5 Análisis estadístico

Para el análisis de datos de los cultivos se empleó el software Statistica 10, mientras que para los espectros de FTIR se utilizaron Mathlab 7.10.0 y OriginPro 8.0. Se realizó un análisis por bloques, siendo las variables categóricas la fuente de nitrógeno o velocidad de agitación (70 o 140 rpm) y las medidas repetidas. Por otro lado, las variables dependientes fueron: la cinética de crecimiento, las densidades celulares, la biomasa, la productividad o la tasa de crecimiento específica obtenida por cada tratamiento. El nivel de confianza fue del 95% definiendo diferencias significativas con un $p < 0,05$. Cuando un resultado fue significativo, se realizaron pruebas de comparación de tipo Tukey para evaluar diferencias entre tratamientos o entre un mismo medio, de las agitaciones de 70 rpm y 140 rpm, según la variable dependiente evaluada. Las medidas de tendencia central (media) se graficaron en barras verticales que expresan los intervalos de confianza del 95% esta medida.

4. RESULTADOS

Contaminación (antibiótico)

El cultivo en caldo LB fue negativo, por lo que se descartó contaminación bacteriana de la cepa original (Figura 4). Al cabo de los 5 días los erlenmeyer con antibiótico no mostraron crecimiento, mientras que el control adquirió la coloración verde característica. Por último, la contaminación se determinó que era debido al aire, puesto que los análisis del aire realizados por el Laboratorio de Microbiología Industrial y Ambiental mostraron que contenía 388 UFC/m³ de aerobios mesófilos, y 1316 UFC/m³ de mohos y levaduras, lo cual se considera una carga de contaminación muy alta según las normas GMPs (Good Manufacturing Practice).

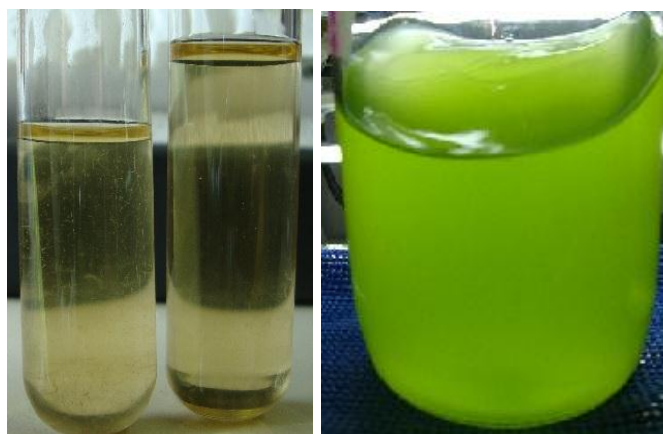


Figura 4. Tubos con medio LB después de la incubación inoculados con *Auxenochlorella protothecoides* (izquierda) y coloración característica del cultivo de *A. protothecoides* (derecha).

Densidad óptica

En la figura 5 se presenta el perfil de absorción del extracto acetónico de pigmentos así como del cultivo en suspensión.

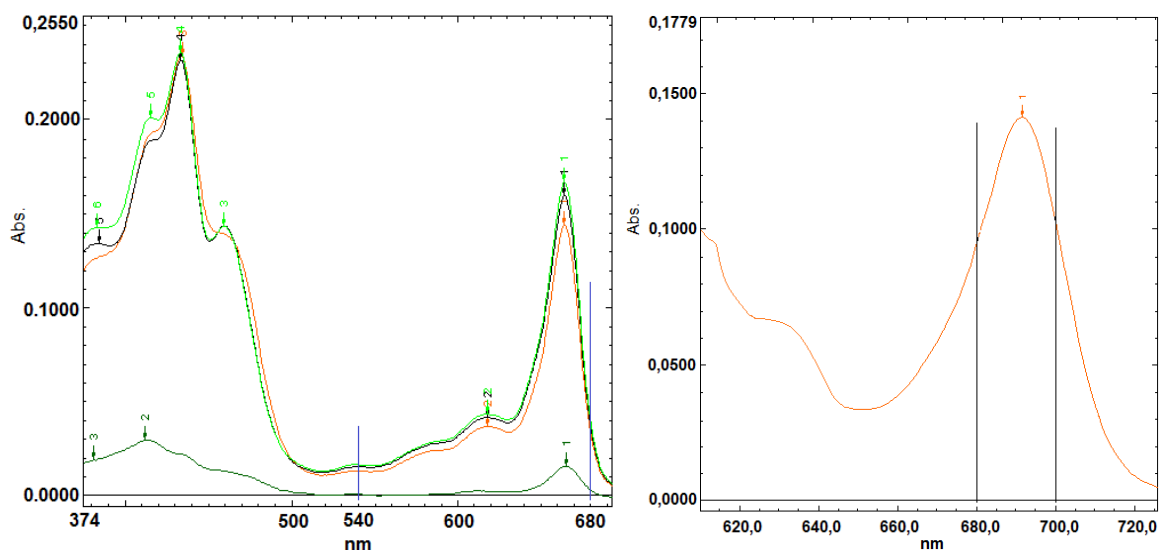


Figura 5. Perfil de absorción de: pigmentos extraídos con acetona de biomasa (*izquierda*), y de cultivo en suspensión (*derecha*)

Tanto en el extracto de pigmentos como en el cultivo en suspensión a 540 nm la absorbancia fue un pico de baja intensidad, mientras que 680 nm se encuentra en ambas mediciones, y 700 nm sólo se registra en el cultivo en suspensión. Así pues la longitud de onda de 680 nm, a pesar de no ser un pico máximo, se presenta en ambas de las metodologías asociada a uno de los picos de máxima absorción.

De las correlaciones realizadas entre la densidad celular (cel/mL) con respecto a la absorción medida en las 3 longitudes de onda seleccionadas, la que presentó el mejor coeficiente de correlación lineal fue la longitud de onda de 680nm con un r^2 de 0.87, seguido de 0.81 obtenido al emplear 700 nm (Figura 6). No se dieron diferencias significativas entre las 3 mediciones pero utilizar 680 nm sería la de mejor precisión para estimar la densidad celular de *A. protothecoides*.

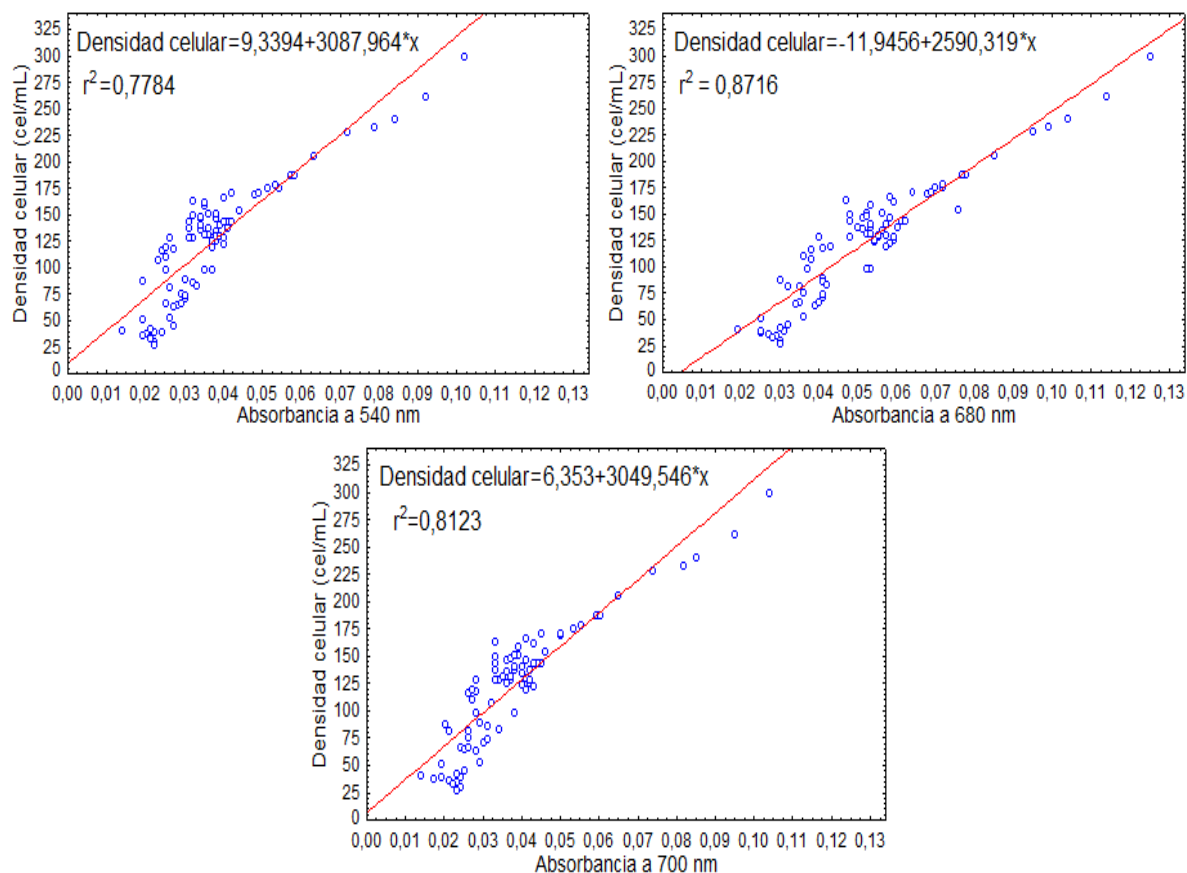


Figura 6. Distribución de la densidad celular respecto de la Absorbancia a 540 nm y 680 nm (*arriba*) y 700 nm (*abajo*) y su respectiva regresión lineal y r^2

Cultivo autotrófico con nitrato y amonio

A los 4 días de cultivo la microalga presentó un cambio en la coloración lo que sugiere crecimiento celular (Figura 7), pero al evaluar la biomasa se obtuvo que era aún muy baja con registros de 20 mg/L y 15 mg/L en medios de nitrato y amonio, respectivamente. En este experimento se evidenció la formación de conglomerados de más de 8 células.

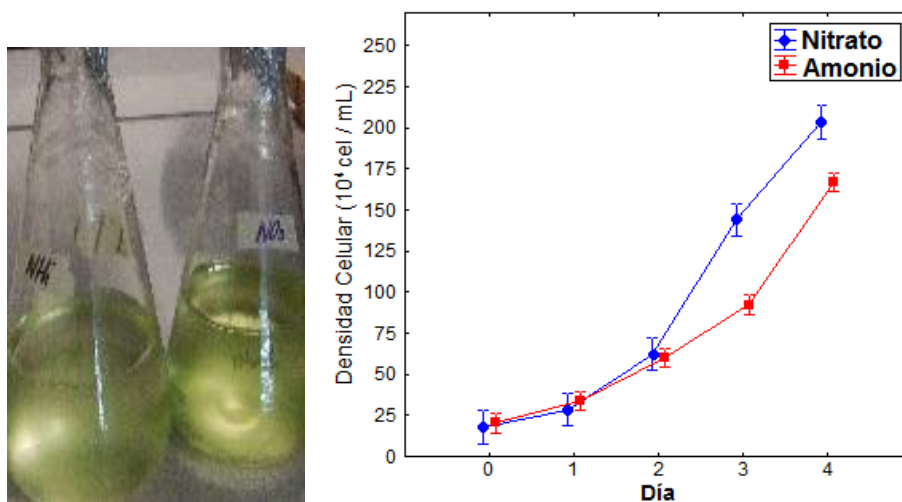


Figura 7. A. Cultivo con medio BBM+V con amonio (izquierda) y nitrato (derecha). B. Densidad celular de *Auxenochlorella protothecoides* en nitrato y amonio.

Cultivo autotrófico y mixotrófico

Se detectaron diferencias significativas en la biomasa y productividad ($p < 0.001$), siendo en promedio 2.2 veces superior en medio mixotrófico que en medio autotrófico (Figura 8).

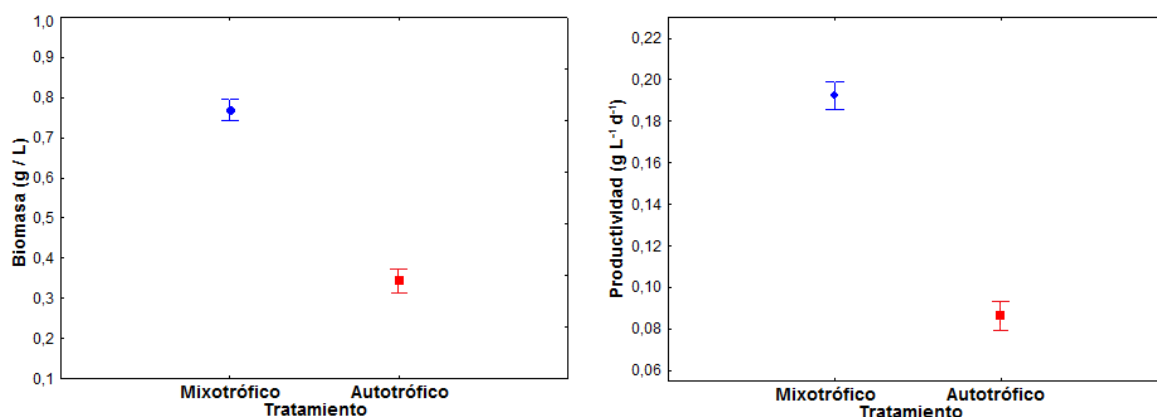


Figura 8. Biomasa (derecha) y productividad (izquierda) obtenidas bajo crecimiento mixotrófico y autotrófico

Esta respuesta es el resultado de un cambio en la tasa de crecimiento del alga en el medio mixotrófico a partir del segundo día de cultivo (Figura 9A) lo que se

traduce en una mayor densidad celular (Figura 9B). Al evaluar la variación de las tasas de crecimiento específicas durante el experimento se encontró que hay diferencias significativas entre el cultivo autotrófico respecto al mixotrófico ($p=0.029$), pero entre el primer y tercer día fue el cultivo con maltosa el que registró mayores tasas de generación celular respecto al autotrófico (Figura 9A), existiendo diferencias significativas entre el primer y segundo día ($p<0.001$) y entre el segundo y tercer día ($p=0.004$)

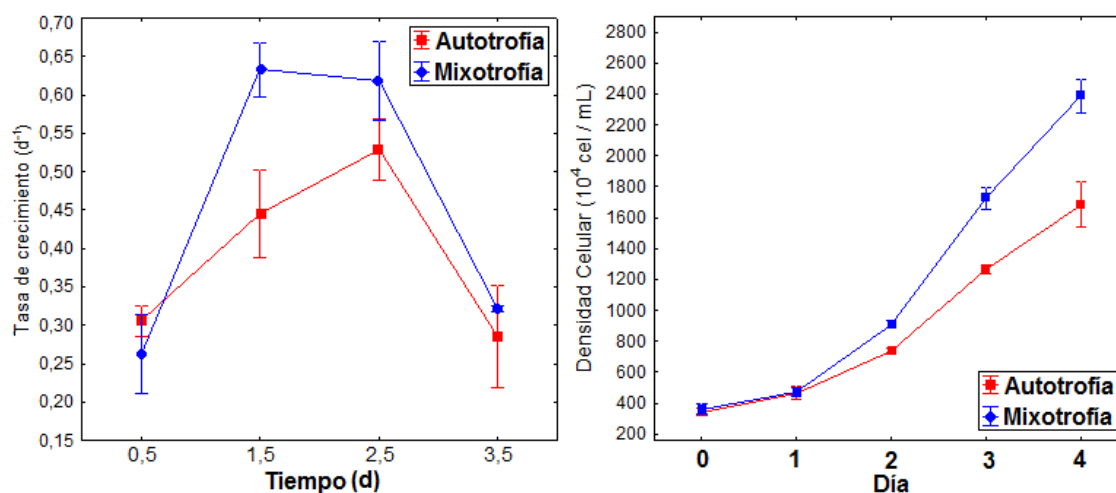


Figura 9. A. Distribución de las tasa de crecimiento específicas en el cultivo autotrófico y mixotrófico. B. Comportamiento del crecimiento microalgal según el tratamiento.

Los resultados descriptores de la densidad celular, biomasa y productividad bajo los tratamientos autotróficos y mixotróficos se presentan en la tabla 3, la cual evidencia como el cultivo mixotrófico generó 1.4 veces más densidad celular respecto al crecimiento autotrófico.

Tabla 3. Densidad celular, biomasa y productividad en autotrofía y mixotrofía. Por triplicado.

	Densidad celular final (cel/mL)	Biomasa (g/L)	Productividad (gL ⁻¹ d ⁻¹)
Autotrófico	$1.684 \times 10^7 \pm 147 \times 10^4$	0.346 ± 0.03	0.0867 ± 0.0296
Mixotrófico	$2.387 \times 10^7 \pm 111 \times 10^4$	0.7698 ± 0.029	0.1924 ± 0.0294

En la tabla 4 se consignan las tasas de crecimiento específicas (μ) obtenidas durante el experimento de acuerdo a la fuente de tipo de metabolismo evaluado. Así es como se obtuvo que la mayor μ estuvo en el cultivo mixotrófico, siendo 1.22 veces más que el autotrófico.

Tabla 4. Tasa de crecimiento (d^{-1}) en el crecimiento autotrófico y mixotrófico

	Día 0 a 1	Día 1 a 2	Día 2 a 3	Día 3 a 4
Autotrófico	0.3191 ± 0.016	0.4355 ± 0.011	0.5295 ± 0.006	0.2954 ± 0.007
Mixotrófico	0.2921 ± 0.018	0.5835 ± 0.006	0.6476 ± 0.013	0.3294 ± 0.007

La figura 10 se evidencia todo lo anteriormente comentado, mostrando un cultivo con maltosa cualitativamente más denso, evidenciado por la coloración verde más oscura.



Figura 10. Coloración y resultado de cultivo autotrófico (*izquierda*) y mixotrófico (*derecha*)

Efecto de 4 fuentes de carbono

La coloración final de los cultivos mixotróficos utilizando glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa fueron diferentes. Los medios con glucosa y fructosa adquieren una coloración verde distinta a la sacarosa y maltosa, algo que ha sido descrito normalmente para cultivos mixotróficos (Figura 11).

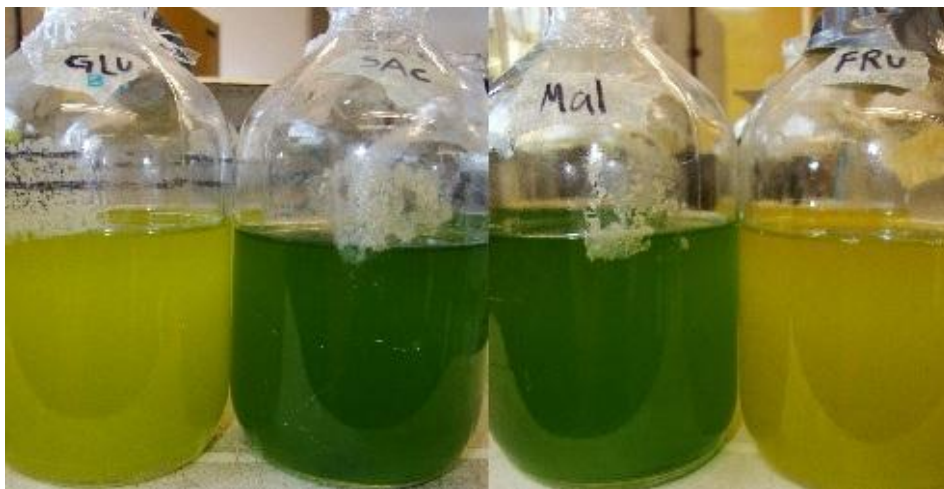


Figura 11. Cultivo mixotrófico al cabo de 3 días en glucosa, sacarosa, maltosa y fructosa (de izquierda a derecha)

Al incrementar la velocidad de agitación la biomasa cosechada fue significativamente mayor ($p = 0.045$) en los cuatro tratamientos mixotróficos (Figura 12A). Al realizar las pruebas de comparación múltiple (test de Tukey) se estableció que la biomasa fue significativamente mayor a una velocidad de agitación de 140 rpm en la glucosa ($p = 0.012$), fructosa ($p = 0.02$) y maltosa ($p = 0.01$), pero no en sacarosa. Adicionalmente se establecieron diferencias significativas para la biomasa entre las diferentes fuentes de carbono utilizados en los cultivos mixotróficos ($p < 0.001$), siendo significativamente mayor en la glucosa.

Al evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre la productividad se estableció un comportamiento similar a la biomasa (Figura 12B). Se estableció una productividad significativamente mayor ($p < 0.045$) a 140 rpm, e igualmente se encontró que esta diferencia se presentó en: glucosa ($p = 0.0129$), fructosa ($p = 0.0204$) y maltosa ($p = 0.0099$), pero no en sacarosa ($p = 0.1377$). Adicionalmente se establecieron diferencias significativas para la productividad entre las diferentes fuentes de carbono utilizadas en los cultivos mixotróficos ($p < 0.001$), siendo significativamente mayor en los medios con glucosa.

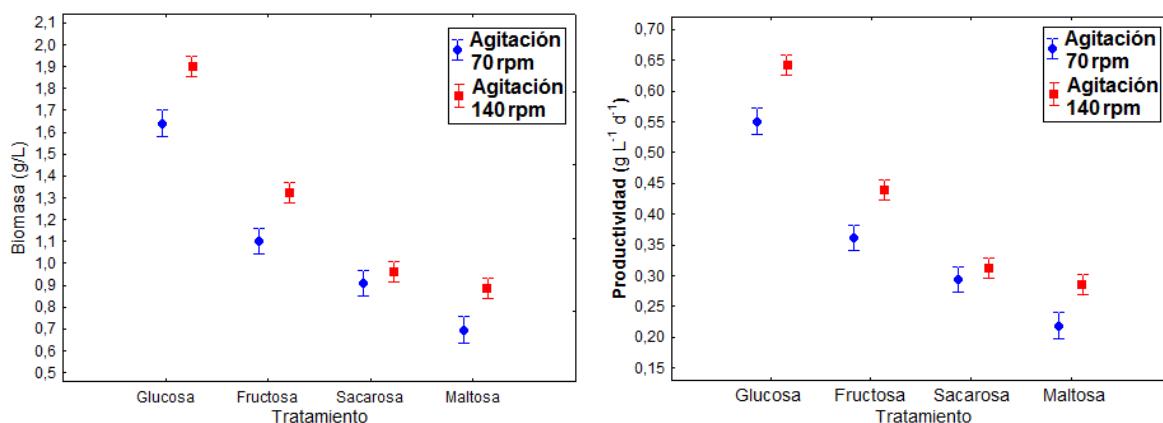


Figura 12. A. Biomasa, y B. productividad, en cada tratamiento y según la agitación.

Sin embargo, el comportamiento de la cinética de crecimiento de *Auxenochlorella protothecoides* fue similar a 70 rpm o a 140 rpm, pero fue significativamente diferente entre medios a partir del primer día (Figura 13). Esta tendencia se evidenció tanto a 70 rpm como a 140 rpm. Este resultado sugiere que al interior de cada fotobiorreactor, tanto a 70 rpm como a 140 rpm, la tasa de crecimiento fue específica, tal que le permitió una distribución temporal similar pero magnitudes significativamente diferentes en cuanto a la densidad celular.

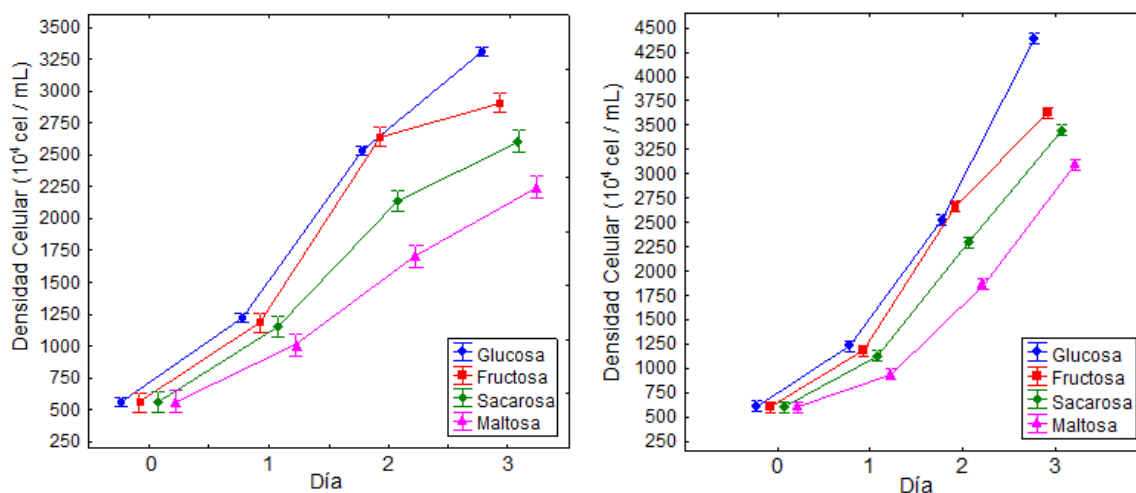


Figura 13. Cinética de crecimiento en los 4 tratamientos con agitación de 70 rpm (izquierda), 140 rpm (derecha).

A partir de esa cinética, se obtuvo que las densidades celulares iniciales entre las 4 fuentes de carbono no tuvieron diferencias significativas tanto a 70 rpm como a 140 rpm, lo cual era de esperar ya que los fotobiorreactores comenzaron del mismo inóculo, estadio (exponencial) y volumen de inóculo. Sin embargo, al final del experimento, tanto a 70 rpm como a 140 rpm, se presentaron diferencias significativas entre los 4 medios ($p < 0,001$) (Figura 14). En ambos casos la glucosa fue la que llegó a una población más alta comparada con las otras fuentes de carbono, siendo de $3.315 \times 10^7 \pm 28.2 \times 10^4$ cel/mL (70 rpm) y $4.385 \times 10^7 \pm 84.8 \times 10^4$ cel/mL (140 rpm), mientras que la maltosa fue la menor con $2.245 \times 10^7 \pm 49.4 \times 10^4$ cel/mL (70 rpm) y $3.095 \times 10^7 \pm 28.2 \times 10^4$ cel/mL (140 rpm). De igual modo, hubo diferencias al comparar el mismo tratamiento a las dos velocidades ($p < 0,001$).

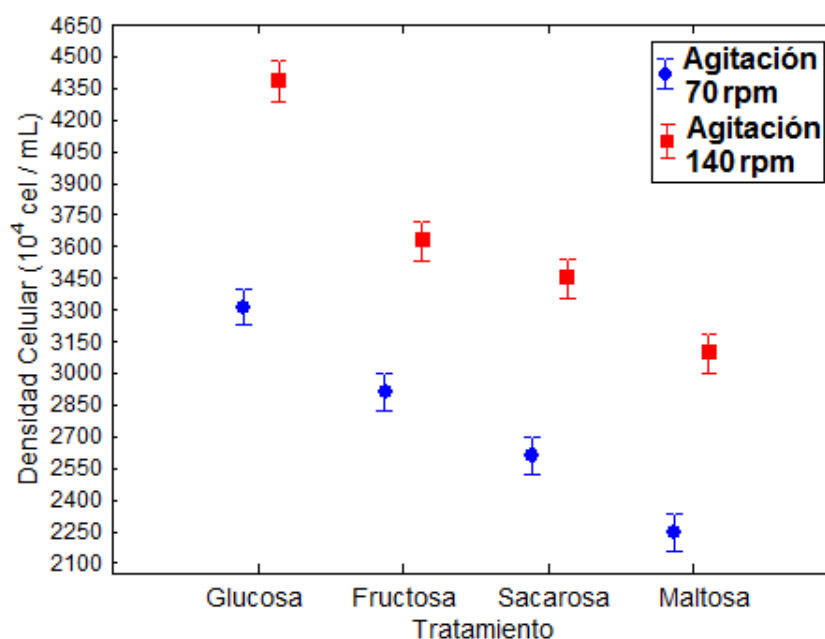


Figura 14. Densidad celular en las cuatro fuentes de carbono al final del experimento con agitación de 70 rpm y 140 rpm.

La densidad celular, la biomasa y productividad de *A. protothecoides* en cada medio y por cada velocidad de agitación se consignan en la tabla 5. Con glucosa a 70 rpm se obtuvo 1.47 veces más densidad celular que en maltosa y a 140 rpm fue de 1.41 veces. Asimismo, la glucosa con agitación de 70 rpm obtuvo 1.53 más

biomasa y productividad que la fructosa, 1.87 veces más que la sacarosa y 2.5 veces más que maltosa, mientras que a 140 rpm tuvo unas 1.46 veces que en fructosa, 2.05 más que con sacarosa y 2.25 veces más que en maltosa.

Por otro lado, se evidencia claramente como en ambas velocidades de agitación el pH final disminuyó, teniendo la siguiente distribución: glucosa > fructosa > sacarosa, según el grado de mayor concentración de H^+ , mientras que en maltosa el pH aumentó. Esta disminución fue ligeramente más elevada a 140 rpm.

Tabla 5. Densidad celular, biomasa y productividad en glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa tanto a una agitación de 70 rpm como 140 rpm.

Item	Densidad celular final (cel/mL)	Biomasa (g/L)	Productividad (g L ⁻¹ d ⁻¹)	pH i	pH f
<i>70 rpm</i>					
Glucosa	$3.315 \times 10^7 \pm 28 \times 10^4$	1.6444 ± 0.0287	0.5481 ± 0.0096	6.75	6.23
Fructosa	$2.910 \times 10^7 \pm 63.6 \times 10^4$	1.0746 ± 0.0459	0.3582 ± 0.0153	6.79	6.27
Sacarosa	$2.607 \times 10^7 \pm 24.7 \times 10^4$	0.8787 ± 0.0209	0.2929 ± 0.007	6.74	6.38
Maltosa	$2.245 \times 10^7 \pm 49 \times 10^4$	0.6557 ± 0.0236	0.2186 ± 0.0079	6.73	6.86
<i>140 rpm</i>					
Glucosa	$4.385 \times 10^7 \pm 84 \times 10^4$	1.927 ± 0.0352	0.6423 ± 0.0117	6.72	6.14
Fructosa	$3.627 \times 10^7 \pm 3.5 \times 10^4$	1.3167 ± 0.0183	0.4389 ± 0.0061	6.75	6.22
Sacarosa	$3.45 \times 10^7 \pm 35.3 \times 10^4$	0.937 ± 0.0271	0.3123 ± 0.009	6.73	6.34
Maltosa	$3.095 \times 10^7 \pm 28 \times 10^4$	0.8547 ± 0.015	0.2849 ± 0.005	6.71	6.95

La variación de la tasa de crecimiento a través de los 3 días del experimento entre las 4 fuentes de carbono fue similar, teniendo diferencias significativas al comparar las dos velocidades de agitación en glucosa ($p=0.011$) y maltosa ($p=0.002$). Entre la inoculación (día 0) y las primeras 24 horas (día 1) el fotobiorreactor con maltosa tuvo unas tasas de crecimiento menores a las otras 3 fuentes de carbono, siendo altamente significativas (promedio: $p<0.02$) tanto a 70 rpm como a 140 rpm. Entre el día 1 y el día 2 hubo diferencias entre maltosa (promedio: $p=0.004$) y la glucosa y fructosa, y entre sacarosa ($p=0.01$) y fructosa. Al comprar cada medio en las dos velocidades de agitación, se dieron diferencias significativas en las tasas de

crecimiento específicas de glucosa ($p=0.01106$) y en maltosa ($p=0.00226$) (Figura 15).

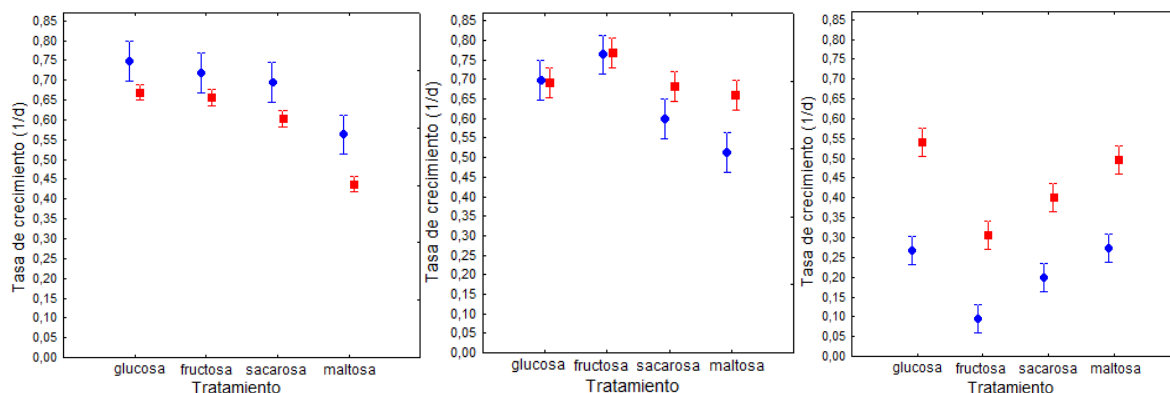


Figura 15. De izquierda a derecha: Tasas de crecimiento en cada tratamiento y a las velocidades de agitación de 70 rpm (azul) y 140 rpm (rojo) entre el día 0 a 1, 1 a 2 y 2 a 3.

En la tabla 6 se presentan las tasas de crecimiento específicas establecidas para los diferentes intervalos de tiempo evaluados de acuerdo a la fuente de carbono y la velocidad de agitación. La fructosa fue el medio en el que se estableció la mayor tasa de crecimiento específica, de 0.7636 ± 0.024 (70 rpm) y 0.7689 ± 0.013 d⁻¹ (140 rpm).

Tabla 6. Tasa de crecimiento (d⁻¹) en el crecimiento en glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa tanto a una agitación de 70 rpm como 140 rpm (Media $\pm$ Desviación estándar)

Item	Día 0 a 1	Día 1 a 2	Día 2 a 3
<i>70 rpm</i>			
Glucosa	0.6692 ± 0.0081	0.6905 ± 0.0075	0.2676 ± 0.003
Fructosa	0.6565 ± 0.0104	0.7688 ± 0.0133	0.0962 ± 0.0164
Sacarosa	0.6032 ± 0.0023	0.683 ± 0.0222	0.1994 ± 0.0142
Maltosa	0.4382 ± 0.0054	0.6607 ± 0.0058	0.2737 ± 0.0135
<i>140 rpm</i>			
Glucosa	0.7475 ± 0.0012	0.6977 ± 0.0116	0.5403 ± 0.0093
Fructosa	0.7185 ± 0.0249	0.7635 ± 0.0243	0.3068 ± 0.0107
Sacarosa	0.695 ± 0.026	0.5999 ± 0.0085	0.4021 ± 0.0215
Maltosa	0.563 ± 0.0009	0.5138 ± 0.0228	0.4959 ± 0.001

Perfil IR

El espectro FTIR asociado a la biomasa de *A. protothecoides* de los cinco medios, muestra un patrón muy similar, lo cual era de esperar al tratarse de la misma especie y haber crecido en condiciones similares (Figura 16). Los distintos picos ilustrados resultaron de la sumatoria de los picos de diferentes biomoléculas que vibran en una determinada región, lo que genera una dificultad para hacer análisis muy detallados de compuestos, debido a que provienen de muestras biológicas con gran diversidad de compuestos, pero que brindan una aproximación a la composición y cantidad relativa de carbohidratos, lípidos y proteínas. Además, ya que la cantidad de absorbancia está asociada a la proporción existente de un enlace (correlacionado con alguna de las biomoléculas analizadas) puede notarse como algunas bandas están en mayor proporción que otras.

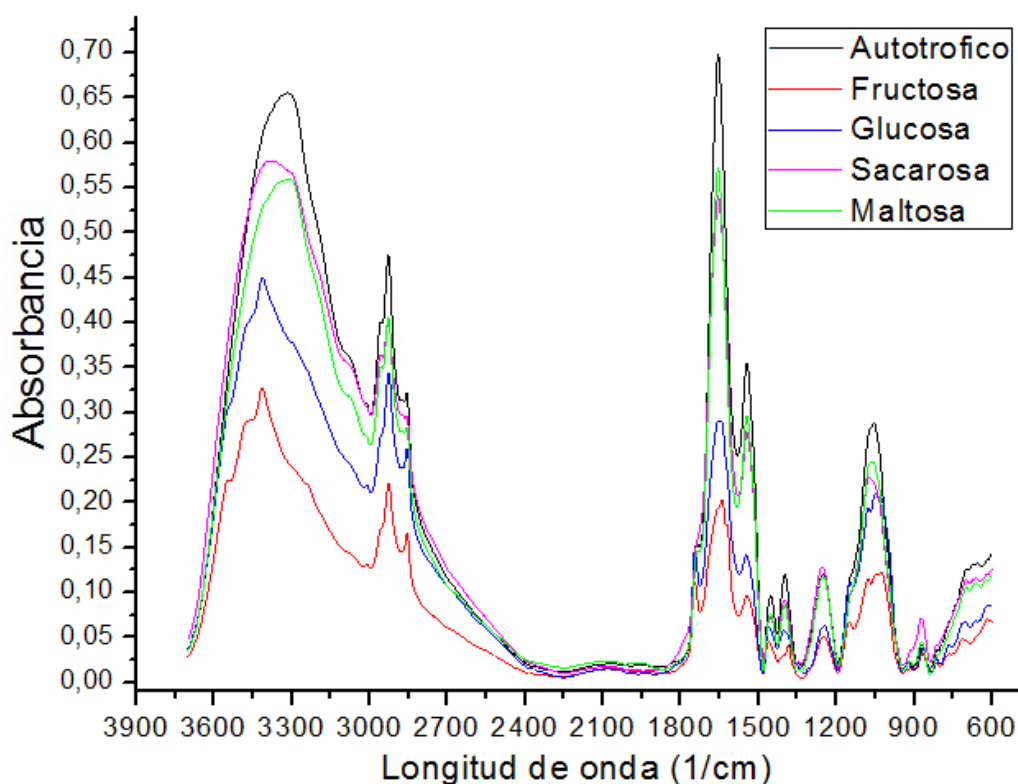


Figura 16. Espectro FTIR de la biomasa según el tratamiento

En el análisis cualitativo de cada uno de los cinco espectros FTIR, se evidenció la variación en el porcentaje asociado a cada componente (tabla 7). Mientras hay bandas con poca variación, como la de Amida III, hay otras con mayor fluctuación, como la región de huella molecular o fingerprint ($600-900\text{ cm}^{-1}$) y carbohidratos ($900-1194\text{ cm}^{-1}$).

Tabla 7. Porcentaje por componente y banda FTIR asignados para la biomasa de cada tratamiento

Componente	Banda (cm^{-1})	Autotrófico	Fructosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa
Fingerprint	600 - 900	0.1474	0.1869	0.179	0.1575	0.1708
Carbohidratos	900 - 1194	0.2061	0.2422	0.2472	0.2093	0.2078
Amida III	1200 - 1324	0.0824	0.088	0.0837	0.0869	0.0865
C-H alifáticos	1351 - 1481	0.0853	0.0818	0.0828	0.0848	0.0833
Amida II	1513 - 1580	0.0697	0.0492	0.0494	0.0668	0.062
Amida I	1593 - 1722	0.1577	0.1176	0.1129	0.1494	0.1399
Éster de lípidos	1728 - 1751	0.0104	0.0136	0.0124	0.0114	0.0114
Lípidos saturados	2829 - 2984	0.1063	0.1086	0.1146	0.1051	0.1089
Lípidos insaturados	2996 - 3024	0.0159	0.0152	0.017	0.0161	0.0182
Amida A	3200 - 3300	0.1156	0.0936	0.0975	0.1094	0.1079

Al graficar los porcentajes queda más clara la fluctuación de cada componente (Figura 17). La banda de amida I muestra la resultante de la sumatoria de la intensidad vibracional de las diferentes estructuras secundarias de las proteínas (α -hélice, hoja plegada β , hojas antiparelelas β y giros β), presentando en *A. protothecoides* una mayor proporción en el medio autotrófico y los mixotróficos con disacáridos (maltosa y sacarosa), mientras la glucosa fue la menor seguida de la fructosa. Caso contrario sucede con la banda del componente de carbohidratos, en la que se observa que los cultivos mixotróficos con los monosacáridos (glucosa y fructosa) fueron los de mayor porcentaje, mientras los otros tres tratamientos fueron en alrededor de 4% menores.

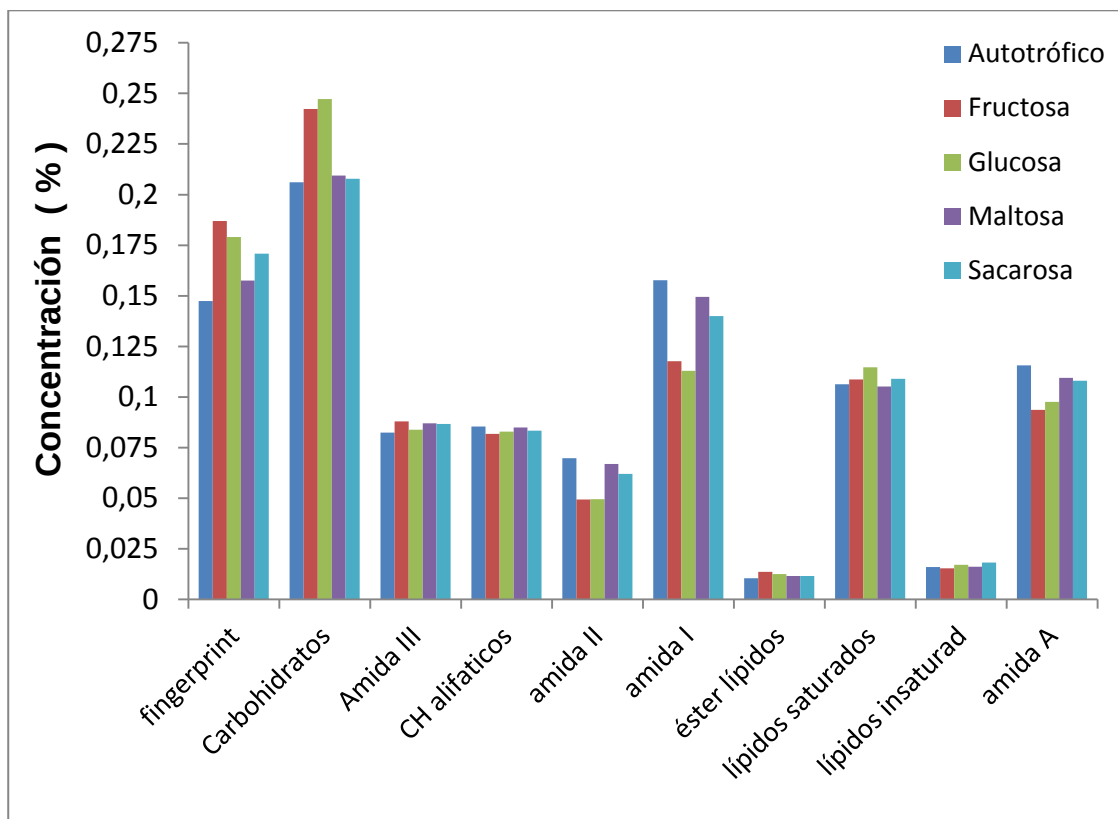


Figura 17. Porcentaje de cada componente según la banda FTIR y el tratamiento.

En la banda de éster de lípidos, los tratamientos de glucosa y fructosa evidencian más su presencia con respecto a los disacáridos y el autotrófico. Estos últimos presentan un hombro debido, probablemente, por el solapamiento con la banda amida I (Figura 18A). Por otro lado, la región que da información de los componentes de lípidos saturados y de lípidos insaturados muestra un comportamiento similar entre todos los tratamientos pero variando un poco su proporción (Figura 18B).

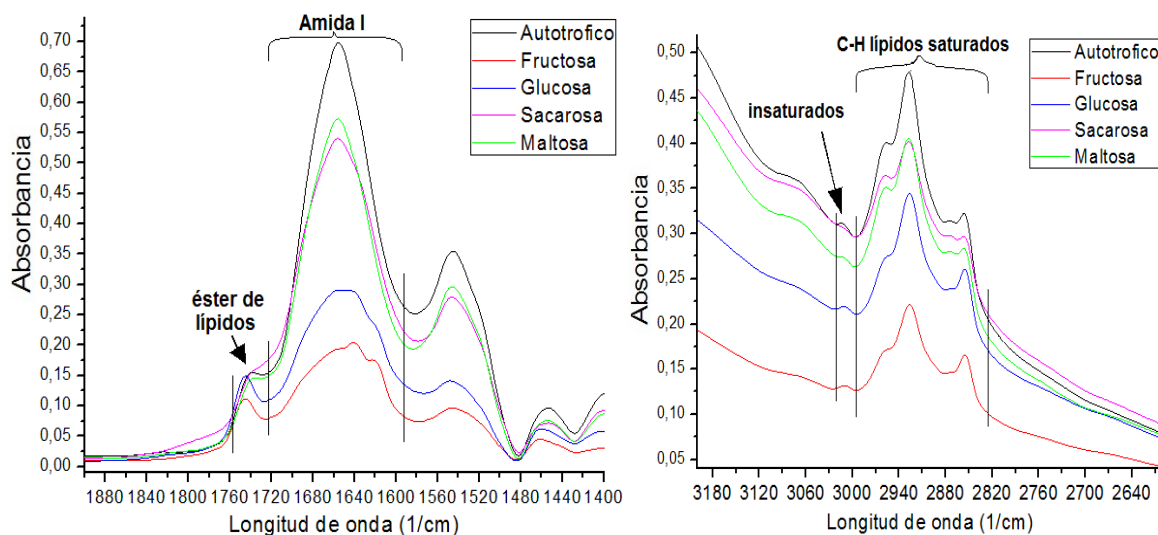


Figura 18. A. Región del espectro FTIR respecto a la banda amida I y éster de lípidos (izquierda); B. Región del espectro FTIR de las bandas de lípidos saturados e insaturados (derecha)

Basándose en las bandas de carbohidratos ($900-1194\text{ cm}^{-1}$), amida I ($1593-1722\text{ cm}^{-1}$) y éster de lípidos ($1728-1751\text{ cm}^{-1}$) se determinó que los medios mixotróficos con glucosa y fructosa obtuvieron la mayor proporción de carbohidratos y lípidos, siendo 1.65 veces y 1.58 veces mayores, respectivamente, al compararse con el tratamiento autotrófico, el cual fue el de menor proporción (Figura 19)

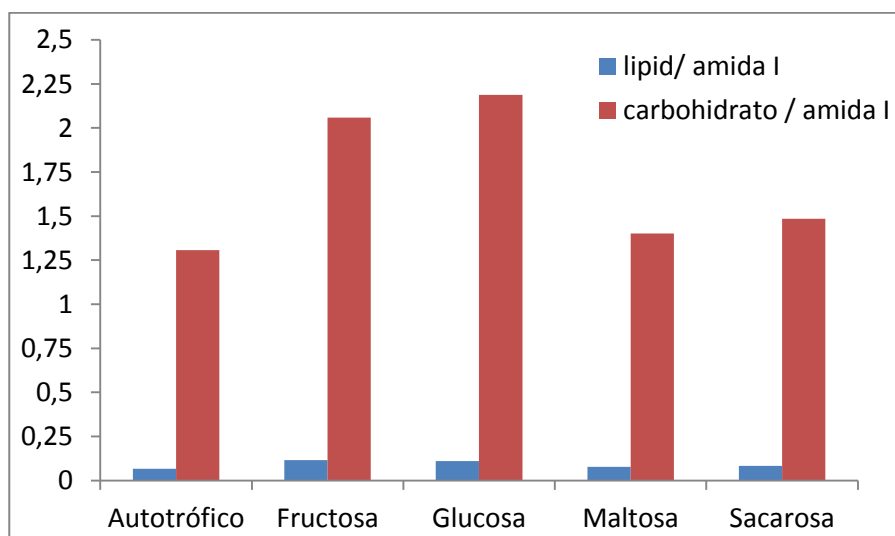


Figura 19. Proporción de lípidos y carbohidratos en el tratamiento autotrófico y en los mixotróficos respecto a la banda amida I.

La proporción relativa de carbohidratos y lípidos de cada tratamiento muestra que los monosacáridos tienen una mejor conversión para la generación de estas biomoléculas (Tabla 8). Además, todas las fuentes de carbono evaluadas estimularon una mayor acumulación de estos compuestos, permitiendo reconocer que el crecimiento mixotrófico es más eficiente, que el autotrófico, en la síntesis de carbohidratos y lípidos.

Tabla 8. Proporción de éster de lípidos y carbohidratos respecto a la amida I por tratamiento

bandas	Autotrófico	Fructosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa
éster lípidos / amida I	0.06623	0.11623	0.1101	0.07682	0.08205
carbohidratos / amida I	1.30687	2.05947	2.18833	1.4014	1.48481

5. DISCUSIÓN

El que *Auxenochlorella protothecoides* no haya crecido en el medio tratado con antibiótico sugiere que esta microalga es susceptible a la penicilina, probablemente afectando algún proceso metabólico asociado con su crecimiento. Aunque es necesario realizar experimentos más detallados que evalúen los efectos de antibióticos en el normal crecimiento de esta microalga, se conoce que el efecto depende de la especie de microalga y del tipo de antibiótico utilizado, tal y como lo plantean Holten *et al.* (1999) para *Mycrocystis aeruginosa* (cianobacteria), *Selenastrum capricornutum* (clorofícea) y *Rhodomonas salina* (criptofícea) al poner a prueba el efecto de 7 antibióticos.

Lo contrastante con el ensayo realizado con *A. protothecoides* es que los compuestos β -lactámicos, familia de compuestos a la pertenece la penicilina, han mostrado una toxicidad significativamente baja en microalgas eucarióticas. Pero en los últimos años se ha venido dilucidando que el cloroplasto es el organelo que presenta una más alta sensibilidad a los antibióticos, pudiendo ser el blanco los fotosistemas (Pan *et al.*, 2008). Esta evidencia concuerda con la pérdida de coloración en el cultivo experimental durante el tratamiento con antibióticos. Así pues, sería interesante realizar a futuro una mejor evaluación del efecto de algunos antibióticos y en concentraciones variables, ya que este no fue un objetivo central del presente trabajo.

Con respecto a la densidad óptica, la longitud de onda de 680 nm resultó cercana a uno de los picos máximos de absorción y parece ser que en *A. protothecoides* ofrece una menor sensibilidad que las otras longitudes de onda evaluadas para establecer la biomasa. De acuerdo con Rocha *et al.* (2003), este tipo de microalgas debe responder mejor a una absorbancia de 540nm, sin embargo esta absorbancia no es tan sensible a los cambios de las condiciones de cultivo y en *A. protothecoides* presenta una respuesta muy baja. Por lo tanto, la calibración debe

ser realizada según la especie a evaluar, conociendo que el perfil de absorbancia de los pigmentos es especie específico (Richmond, 2004).

La formación de conglomerados de varias células durante los cultivos con nitrato y amonio probablemente esté asociado con el hecho de que en microalgas tipo cocoides se ha detectado que se afecta la liberación de las autoesporas a partir de la pared celular parental bajo estas condiciones de crecimiento (Arad *et al.* 1980). Otra posibilidad, es que la pared celular parental al ser liberada al medio de crecimiento, producto de la liberación de las autosporas, se va acumulando con el paso del tiempo, y al ser su composición principalmente de carácter glicosídico provoca la formación de agregados celulares (Rodolfi *et al.*, 2003).

Por otro lado, contrario a lo obtenido en el presente trabajo, otras especies muestran un mejor crecimiento y preferencia por el amonio (Fernández & Galván, 2008), ya que, como ha sido revisado por Pérez *et al.* (2011), es la fuente energéticamente más eficiente, debido a que no se gasta tanto ATP para su asimilación, como si es el caso del nitrato que implica gasto de energía y la mediación de dos enzimas antes de poder ser aprovechado su nitrógeno.

Otro aspecto que pudo incidir en la baja producción fue la concentración empleada de nitrógeno con *Auxenochlorella protothecoides*, como lo sugieren Tam & Wong (1996), quienes evalúan un amplio rango de concentraciones de amonio (10-1000 mg N/L) sobre esta especie. La concentración que se utilizó en este estudio (250 mg/L) está asociada con una de las más bajas eficiencias de conversión del amonio en densidad celular. Por otro lado, otro factor que pudo incidir en el bajo desenvolvimiento de *A. protothecoides* fue que el medio que se preparó no contenía fuente de potasio (K^+), que normalmente es adicionado en forma de nitrato de potasio o en alguna de las sales de fosfato. Como lo sugiere Martinac *et al.* (2008), el potasio resulta esencial para el buen funcionamiento de cualquier célula, ya que es el catión más abundante en cualquier citoplasma, desde procarióticos hasta eucarióticos, y esto es debido a que es necesario para el

normal funcionamiento del sistema transportador antiporte de Na^+/K^+ o bomba electrogénica sodio-potasio, encargada de mantener un flujo iónico de estos dos iones, y el cual permite que la célula mantenga directa e indirectamente un potencial eléctrico de membrana viable con los procesos basales o de mantenimiento celular.

El que inicialmente en ambos medios la tasa de crecimiento fuese menor al inicio del experimento, muestra que *A. protothecoides* pasó por una etapa de aclimatación de las nuevas condiciones, siendo mayor en el medio de maltosa debido a que es necesario que sintetice la maltasa para hidrolizar este disacárido (Bristol, 1926). Por otro lado, la obtención en promedio de 2.22 veces más biomasa y productividad del cultivo mixotrófico con respecto al autotrófico está acorde con resultados obtenidos con otras microalgas. Como lo obtenido por Liang *et al.* (2009) que al crecer una cepa de *Chlorella vulgaris* con carbono inorgánico (CO_2) y mixotróficamente con 2 fuentes de carbono (glucosa y glicerol) alcanzaron 5.38 veces y 2.13 veces más biomasa, y 19.5 veces y 7 veces más productividad que con solo CO_2 . De manera similar, Wan *et al.* (2011) obtuvieron con *Chlorella sorokiniana* 4.2 veces y con *Dunaliella salina* 2.2 veces más productividad con el cultivo mixotrófico respecto al autotrófico.

La cinética de crecimiento fue más acelerada a 140 rpm, ya que al aumentar la magnitud de la velocidad de mezcla, se genera una mejor transferencia de masa de la fase gaseosa hacia el medio líquido, y por ende una cantidad de oxígeno disuelto mayor, lo que impulsa las reacciones de mantenimiento así como de generación celular (Amanullah *et al.*, 2004). Además, a esta velocidad el mezclado provocado no genera efectos adversos sino que mejora el rendimiento de *A. protothecoides*. De manera similar, este aumento significativo en la cantidad de biomasa y productividad entre 70 rpm y 140 rpm al evaluar cada tratamiento, concuerda con lo obtenido por Heredia *et al.* (2011), que al crecer mixotróficamente una cepa de *Chlorella vulgaris*, obtuvieron un incremento en la

biomasa de 1.44 y hasta 7.0 g/L al aumentar la velocidad de agitación de 60, 100 a 200 rpm, respectivamente.

La mayor cantidad de biomasa obtenida en los tratamientos mixotróficos respecto a los cultivos autotróficos, concuerda con lo realizado por Yang *et al.* (2000) en *Chlorella pyrenoidosa*, especie que al crecer mixotróficamente con glucosa a 5 g/L, 200 rpm e intensidad lumínica de 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ llegó a 15 g/L de biomasa mientras que con nitrato solamente alcanzó una biomasa de 5g/L, después de 100 horas. Estos resultados, mayores a los reportados en el presente trabajo, son el resultado de una mayor velocidad de mezcla y una iluminación más elevada, lo que le permitirían a dicha microalga tener una mayor disponibilidad de metabolitos energéticos (ATP) proveniente del flujo metabólico de la sección fotosintética.

De forma similar, Liang *et al.* (2009) obtuvieron la mayor cantidad de biomasa y productividad al hacer crecer, otra cepa de *Chlorella vulgaris*, durante 6 días en un medio con glucosa al 1%, siendo una producción de 1.6 g/L y 0.254 g L⁻¹ d⁻¹. Esto indica que *A. protothecoides* a 140 rpm (1.92 g/L y 0.642 g L⁻¹ d⁻¹), velocidad de agitación similar a los 150 rpm utilizados en el trabajo de Liang *et al.* (2009), tuvo un mejor rendimiento, ya que fue superior aunque el periodo de crecimiento solamente fue de 3 días. Asimismo, todas las fuentes de carbono tanto a 70 y 140 rpm, excepto el medio con maltosa a 70 rpm, tuvieron una productividad mayor, confirmando que la cepa evaluada presenta una mejor generación de biomasa diaria. Sin embargo, Heredia *et al.* (2011) con otra cepa de *Chlorella vulgaris* obtuvieron 4.85 g/L de biomasa al emplear 15 g/L de glucosa y 160 rpm durante 72 h, y tuvieron una mayor productividad, de 1.62 g L⁻¹ d⁻¹, respecto a los 0.642 g L⁻¹ d⁻¹ obtenidos con *A. protothecoides* en el presente trabajo.

Teniendo en cuenta que las algas verdes y las plantas tienen mecanismos metabólicos similares (Patron & Keeling, 2005), los resultados obtenidos con la sacarosa y la maltosa, en cuanto a una generación menor en biomasa y productividad comparada a los monosacáridos evaluados, es debida a que para

los disacáridos es necesario la mediación de una hidrólisis enzimática para la liberación de sus constituyentes, además de contar con ciertos mecanismos de represión moleculares.

En cuanto a la alta tasa de crecimiento específica encontrada en los medios de glucosa entre el día de inoculación y las primeras 24 horas, esto es debido a que es el azúcar con mayor efecto inductor, respecto a la fructosa y la sacarosa, de la maquinaria molecular implicada en captación de fuentes de carbono orgánicas y que, en últimas, es direccionada a las rutas metabólicas para el crecimiento celular. Así es como Bristol (1926) encontró que al crecer *Scenedesmus costulatus* en glucosa, sacarosa y fructosa, siempre la glucosa tuvo una mayor tasa de crecimiento y densidad celular. De manera similar, Becker (1994) al crecer *Scenedesmus obliquus* consiguió la más alta densidad celular y la máxima tasa de captación de carbono hacia biomasa al emplear glucosa, seguida de la fructosa y por último la sacarosa.

El cambio de pH generado en los medios con glucosa, fructosa y sacarosa concuerda con lo que se ha reportado acerca del sistema de captación de estos carbohidratos. Se conoce que hay una captación estequiométrica 1:1 de hexosa (glucosa y fructosa) y protones H^+ debido a un transportador simporte pero el medio se acidifica debido a la acción de una ATPasa bombeara de protones que expulsa esos hidrogeniones que entran a la célula (Komor 1974a, Komor 1974b). En cambio para la sacarosa existen varios sistemas de aprovechamiento por lo que será discutida más adelante.

Continuando con respecto al pH, Komor *et al.* (1979) encontraron que el transportador de hexosa era óptimamente activado cuando el medio extracelular llegaba a pH 6. Por tal motivo, el que al final el medio estuviese cercano a pH 6 podría ser un factor que ayudaría al *A. protothecoides* a seguir impulsando la translocación de las hexosas aún presentes en el medio, y que explicaría en parte

porque la glucosa mantiene la alta tasa de crecimiento específica todo el experimento.

En este punto cabe anotar que debido a la escasez de estudios, respecto a fructosa, sacarosa y maltosa, en la respuesta fisiológica y productiva en microalgas, se enuncian los procesos factibles para hacer un acercamiento a los resultados, basándose en conocimientos más generales y realizados con bacterias, levaduras, plantas y algunas aproximaciones en algas.

Una posibilidad de porqué en fructosa pudo haber bajado la tasa de crecimiento al final del periodo de incubación, puede ser debido a que se realizó la captación de la gran mayoría del nutriente disponible. Esto se basa en que la mayor tasa de crecimiento específica obtenida en ambas velocidades de agitación fue con fructosa, ya que a pesar de ser captado a una menor tasa respecto a la glucosa, la asimilación de la fructosa es más fácil que la glucosa, porque entra en la glucólisis evitando la hexoquinasa, una enzima regulatoria en esta vía bioquímica, contrario a la glucosa que debe ser activada por ella (Stick & Williams, 2009). Por lo tanto, podría ser consumida más rápidamente, disminuyendo su disponibilidad del medio, lo que impulsaría a *A. protothecoides* a disminuir sus procesos metabólicos como respuesta y que explicaría porqué la tasa de crecimiento al final del periodo de incubación se vio afectada en ambas velocidades de mezcla.

Con respecto a los disacáridos, una alternativa factible por la cual el medio de *A. protothecoides* con sacarosa no bajó tanto el pH y tuviese un menor rendimiento, respecto a la glucosa y la fructosa, puede ser debido a tener una actividad aditiva de diferentes transportadores (cinética multifásica) con afinidad variada, como la existencia de la sacarosa sintasa, encontrada en algunas clorófitas y en plantas, y la cual le permitiría al disacárido entrar al citoplasma y ser hidrolizado, mientras otra parte es hidrolizada por una invertasa en el exterior de la membrana y generar un flujo de protones debido a los monosacáridos (Salerno, 1985b; Büttner & Sauer, 2000).

En este mismo sentido, otra posibilidad es que la enzima invertasa, detectada en varios organismos procarióticos y eucarióticos, como microalgas, puede estar presente únicamente por fuera de la membrana celular e hidrolizar la sacarosa, para que luego la glucosa y fructosa liberadas sean llevadas al interior celular por transportadores simporte, teniendo en cuenta que el canal de glucosa permite una mayor tasa de captación respecto al de la fructosa (Salerno, 1985a; Delrot *et al.*, 2001). Así pues *A. protothecoides* podría estar contando con una hidrólisis externa y luego un sistema de translocación simporte que le permita tener disponible esos monosacáridos para la glucólisis, o contar con un sistema con varios mecanismos de captación.

Por otro lado, el que *A. protothecoides* presente la menor tasa de crecimiento en maltosa entre la inoculación y el primer día es debido a la necesidad de sintetizar una mayor cantidad de la maltasa, algo evaluado por Bristol (1926) con *Scenedesmus costulatus*, en el que presentó un periodo de adaptación (*lag*) más prolongado, respecto a la glucosa y fructosa, mientras que en éstas iniciaban el crecimiento rápidamente, siendo el periodo *lag* muy corto. Además, es muy probable que *A. protothecoides* presente en la membrana un sistema ABC transportador de maltosa y esta sea hidrolizada dentro de la célula (Boos & Shuman, 1998), ya que si la maltosa hubiese sido hidrolizada en la parte exterior de la membrana, esto implicaría la utilización de transportadores simporte para glucosa, y al final hubieran disminuido el pH inicial (pH 6.7) y no haberlo aumentado a 6.86 (70 rpm) y pH 6.95 (140 rpm).

Por otro lado, el que la maltosa haya registrado en el último lapso del tiempo de incubación una tasa de crecimiento por debajo de glucosa pero superior a fructosa y sacarosa, puede ser debido a que en ese momento la gran mayoría de la maltosa esté hidrolizada en glucosa, y por ende la cepa esté aprovechando mejor esta fuente de carbono para la generación celular, además de que los mecanismos represores, que se conocen del metabolismo de la glucosa sobre la maltosa (Boos & Shuman, 1998), se vean disminuidos. Algo parecido sucede con

la sacarosa, en la que en ambas velocidades de agitación, a pesar de ser un disacárido, la tasa de generación celular resultó superior a la fructosa, lo que podría ir acorde con que en el último lapso temporal la mayoría esté hidrolizada y esté siendo mejor aprovechados sus monosacáridos constitutivos.

La disminución en la tasa de crecimiento al final del periodo de incubación en todos los cultivos e independientemente de la velocidad de agitación, fue afectada debido a la alta densidad celular. Al aumentar la población celular, la eficiencia de transferencia de la luz hacia todas las células disminuye exponencialmente en función de la profundidad, con respecto a la superficie del fotobiorreactor (Molina *et al.*, 1999). Por tal motivo, el flujo energético de la fotosíntesis de *A. protothecoides* redujo su eficiencia y afectó el desenvolvimiento celular.

Los resultados del experimento entre autotrofia y mixotrofia, y entre diferentes fuentes para el cultivo mixotrófico, permite evidenciar que esta cepa de *A. protothecoides* es muy probable, como lo muestra Richmond (2004) para varias microalgas, haya adquirido y mantenido la información genética tal que le permite responder fisiológicamente, contando con las vías metabólicas y estructurales para captar y asimilar diferentes fuentes de nitrógeno y carbono.

Dean *et al.* (2010) encontraron que la banda amida I tiende a presentar poca variación al considerar una misma especie y un mismo medio. Así pues, los resultados del presente trabajo son congruentes al haber tomado dicha banda para realizar la normalización del espectro y conocer el contenido relativo de carbohidratos y lípidos. En cuanto a la biomasa producida cuando se utilizó monosacáridos, las proteínas presentes deben estar relacionadas con los transportadores simporte de membrana, las enzimas y las proteínas del metabolismo energético central y del sistema de fotosíntesis. Asimismo, en los medios con disacáridos el mayor porcentaje en la banda amida I indican que *A. protothecoides*, aparte de las proteínas sintetizadas en los monosacáridos, generó una mayor cantidad de proteínas relacionadas muy probablemente con la

necesidad de generar enzimas para hidrolizar los disacáridos y así estar disponibles para su aprovechamiento. Por otro lado, dicha cantidad de proteínas fue mayor en el medio autotrófico, comparado con los mixotróficos, pudiendo estar relacionadas con la fotosíntesis, las cuales presentan una gran diversidad y como este proceso es la única fuente de energía y es menos eficiente que los procesos mixotróficos, debe generar una gran cantidad para compensar y suplir sus necesidades energéticas de mantenimiento y crecimiento algal (Fromme, 2008).

Fidalgo *et al.* (1998) creciendo una cepa de *Isochrysis galbana* obtuvieron una mayor cantidad de lípidos que de carbohidratos, siendo un caso contrario a lo sucedido con otra cepa de *Isochrysis galbana*, evaluada por Valenzuela *et al.* (2002), con la que obtuvieron en la etapa logarítmica de crecimiento una mayor cantidad de carbohidratos estando esto acorde con los resultados obtenidos con *A. protothecoides* en el presente trabajo. Un reporte similar es el realizado por Dean *et al.* (2010), en la que obtuvieron con *Chlamydomonas reinhardtii* y *Scenedesmus subspicatus* una buena correlación entre el contenido relativo de carbohidratos y lípidos estimado con FTIR y los resultados cuantitativos obtenidos con las metodologías tradicionales. Además, observaron que los cultivos al inicio y durante la etapa exponencial tienen mayor contenido de carbohidratos respecto de los lípidos, lo cual concuerda con lo obtenido con *A. protothecoides*. Así pues, aunque generalmente una microalga tiende a acumular más carbohidratos respecto a lípidos cuando crece en un medio con suficientes nutrimentos y durante el periodo logarítmico, estos resultados permiten enunciar que la cantidad relativa de estas biomoléculas varían entre cepas, según las condiciones de cultivo y la etapa de crecimiento que se considere.

6. CONCLUSIONES

- La cepa de *A. protothecoides* logró aclimatarse satisfactoriamente a la temperatura de 26-28°C y una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- *A. protothecoides* fue muy susceptible a contaminación bacteriana y el tratamiento con penicilina G-potásica afectó su crecimiento.
- La mejor longitud de onda para medir la densidad óptica (OD) de *A. protothecoides* es a 680nm debido a sus características de absorción de sus pigmentos con un r^2 de 0.87.
- El nitrato generó una mejor respuesta fisiológica en *A. protothecoides* respecto al amonio pero estas fuentes inorgánicas o su concentración producen una baja biomasa, productividad y densidad celular.
- El crecimiento mixotrófico tiene un efecto altamente estimulante en la tasa de crecimiento, biomasa y productividad de *A. protothecoides* al ser comparado con el desenvolvimiento en condiciones autotróficas.
- El aumento de 70 rpm a 140 rpm en la velocidad de agitación mejora el rendimiento de biomasa, productividad y densidad celular de *A. protothecoides* independientemente de la fuente de carbono utilizada y generando diferencias significativas entre glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, siendo la primera el azúcar que genera la mayor cantidad de biomasa y productividad respecto a los otros carbohidratos evaluados.
- Los monosacáridos y la sacarosa provocan una acidificación del medio mientras que la maltosa aumenta el pH respecto al inicial siendo esto indicios de los mecanismos de captación de los azúcares empleados por *A. protothecoides*

- La maltosa si fue captada y asimilada por *A. protothecoides* evidenciándose en la biomasa y la productividad.
- La proporción de carbohidratos fue mayor que la de lípidos en todos los tratamientos analizados por FTIR, siendo los tratamientos mixotróficos más eficientes en la síntesis de carbohidratos y lípidos respecto al autotrófico.

LITERATURA CITADA

Amanullah, A.; Buckland, B. & Nienow, A. 2004. Mixing in the fermentation and cell culture industries. Chp. 18, pags. 1071-1170 in: Paul, E.; Atiemo, V. & Kresta, S. (eds.). *Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice*. First Edition. John Wiley & Sons Inc, USA.

Arad, S.; McGowan, R.; Friedlander, M. & Richmond, A. 1980. Alkalinity induced aggregate formation in *Chlorella vulgaris*. Pags. 401-410. in: Shelef, G. & Soeder C. (eds.). *Algae Biomass: production and use*. Elsevier, Netherlands.

Barsanti, L. & Gualtieri, P. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. First Edition. USA. CRC Press. 301p.

Becker, E.W. 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. First Edition. USA. Cambridge University Press. 304p.

Boos, W. & Shuman H. 1998. Maltose/Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Transport, Metabolism, and Regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(1): 204-229.

Bristol, B. 1926. On the relation of certain soil algae to some soluble carbon compounds. *Annals of Botany*. 40(1): 149-202.

Brodie, J. & Lewis, J. 2007. *Unravelling the algae: the past, present and future of algal systematics*. First Edition. USA. CRC Press. 402p.

Büttner, M. & Sauer, N. 2000. Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465(1-2): 263-274.

Cohen, Z. 1999. Chemicals From Microalgae. First Edition. United Kingdom. CRC Press. 419p.

Converti, A.; Casazza, A.; Ortiz, E.; 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. 48(6): 1146-1151.

Dean, A.; Sigee, D.; Estrada, B. & Pittman, J. 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. Bioresource Technology. 101(12): 4499-4507.

Delrot, S.; Atanassova, R.; Gomès, E. & Coutos, P. 2001. Review - Plasma membrane transporters: a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. Plant Science. 161(3): 391-404.

Fernández, E. & Galván, A. 2008. Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*. Eukaryotic Cell. 7(4): 555-559.

Fidalgo, J.; Cid, A.; Torres, E.; Sukenik, A. & Herrero, C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marina microalgae *Isochrysis galbana*. Aquaculture. 166(1-2): 105-116.

Fromme, P. 2008. Photosynthetic Protein Complexes: A structural approach. First Edition. Germany. Wiley-VCH. 360p.

Heredia, T.; Wei, W.; Ruan, R. & Hu, B. 2011. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. Biomass and Bioenergy. 35(5): 2245-2253.

Holten, H.; Halling, B. & Jørgensen, S. 1999. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 36(1):1-6.

Komor, E. & Tanner, W. 1974 a. The Hexose-Proton Symport System of *Chlorella vulgaris* Specificity, Stoichiometry and Energetics of Sugar-Induced Proton Uptake. *European Journal of Biochemistry*. 44(1): 219-223.

Komor, E. & Tanner, W. 1974 b. The hexose-proton cotransport system of *Chlorella*. pHdependent change in K_m -values and translocation constants of the uptake system. *The Journal of General Physiology*. 64(5): 568-581.

Komor, E.; Schwab, W. & Tanner, W. 1979. The effect of intracellular pH on the role of hexose uptake in *Chlorella*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 555(3): 524-530.

Laurens, L. & Wolfrum, E. 2011. Feasibility of Spectroscopic Characterization of Algal Lipids: Chemometric Correlation of NIR and FTIR Spectra with Exogenous Lipids in Algal Biomass. *Bioenergy Research*. 4(1): 22-35.

Liang, Y.; Sarkany, N. & Chu, Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*. 31(7): 1043-1049.

Maier, R. & Pepper, I. 2008. Earth environment. Chp. 4, pags. 57-81. in: Maier, R.; Pepper, I. & Gerba, C. (eds.). *Environmental Microbiology*. Second Edition. Academic Press.

Martinac, B.; Saimi, Y. & Kung, C. 2008. Ion Channels in Microbes. *Physiological Reviews*. 88(4):1449-1490.

Molina, E.; Fernández, A.; García, F. & Chisti, Y. 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*. 70(1-3): 231-247.

Mulholland, M. & Lomas, M. 2008. Nitrogen Uptake and Assimilation. Chp. 7, pags. 303-384. in: Capone, D.; Bronk, D.; Mulholland, M. & Carpenter, E. (eds.). *Nitrogen in marine environment*. Second Edition. Academic Press, United Kingdom.

Naumann, D.; Fabian, H. & Lasch, P. 2009. FTIR spectroscopy of cells, tissues and body fluids. Pags. 312-354. in: Barth, A. & Haris, P. (eds.). *Biological and Biomedical Infrared Spectroscopy*. IOS Press, Netherlands.

Pan, X.; Deng, C.; Zhang, D.; Wang, J.; Mu, G. & Chen, Y. 2008. Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis* sp. characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. *Aquatic Toxicology*. 89(4): 207-213.

Patron, N. & Keeling, P. 2005. Common evolutionary origin of starch biosynthetic enzymes in green and red algae. *Journal of Phycology*. 41(6): 1131-1141.

Pérez, O.; Escalante, F.; de-Bashan, L. & Bashan, Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potencial products. *Water Research*. 45(1): 11-36.

Reisser, W. 2007. The hidden life of algae underground. Pags. 49-58. in: Seckbach, J. (ed.). *Algae and cyanobacteria in extreme environments*. First Edition. Springer. Netherlands.

Richmond, A. 2004. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. United Kingdom. Blackwell Science Ltd. 566p.

Rocha, J.; Garcia, J. & Henriques, M. 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*. 20(4-6): 237-242.

Rodolfi, L.; Zittelli, G.; Barsanti, L.; Rosati, G. & Tredici, M. 2003. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomolecular Engineering*. 20(4-6): 243- 248.

Rosenberg, J.; Oyler, G.; Wilkinson, L. & Betenbaugh, M. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*. 19(5): 430-436.

Salerno, G. 1985 a. Measurement of enzymes related to sucrose metabolism in permeabilized *Chlorella vulgaris* cells. *Physiologia Plantarum*. 64(2): 259-264.

Salerno, G. 1985 b. Occurrence of sucrose and sucrose metabolizing enzymes in achlorophyllous algae. *Plant Science*. 42(1): 5-8.

Siebrecht, S. & Tischner, R. 1999. Changes in the xylem exudate composition of poplar (*Populus tremula*×*P. alba*) - dependent on the nitrogen and potassium supply. *Journal of Experimental Botany*. 50(341): 1797-1806.

Spolaore, P.; Joannis, C.; Duran, E. & Isambert, A. 2006. Commercial Applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101(2): 87-96.

Stick, R. & Williams, S. 2009. Carbohydrates: The essential molecules of life. Second Edition. United Kingdom. Elsevier. 474p.

Tam, N. & Wong, Y. 1996. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresource Technology*. 57(1): 45-50.

Thorn, R. & Lynch, D. 2007. Fungi and eukaryotic algae. Chp. 6, pags. 145-162. in: Paul, E. (ed.). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Third Edition. Academic Press. USA.

Valenzuela, E.; Millán, R. & Núñez, F. 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering*. 25(4): 207-216.

Wan, M.; Liu, P.; Xia, J.; Rosenberg, J.; Oyler, G.; Betenbaugh, M.; Nie, Z. & Qiu, G. 2011. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(3): 835-844.

Yang, C.; Hua, Q. & Shimizu, K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark- heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 6(2): 87-102.