

## Evaluación de la relación Carbono Nitrógeno y Carbono Fósforo para mejorar la producción de biomasa y ácidos grasos en *Chlorella sorokiniana*

### Evaluation of the Carbon to Nitrogen and Carbon to Phosphorus ratios for improving the production of biomass and fatty acids in *Chlorella sorokiniana*

Catalina Andrea Lugo-De Ossa<sup>✉</sup>, Natalia Andrea Gómez-Vanegas<sup>✉</sup> y Mariana Peñuela-Vásquez<sup>✉</sup>

Recibido: 04 de agosto de 2021.

Aceptado: 24 de febrero de 2022.

Publicado: abril de 2022.

#### RESUMEN

**Antecedentes.** Las microalgas están siendo estudiadas como fuente de ácidos grasos para la producción de alimentos con alto valor agregado. El contenido de aceites en estas puede aumentar o disminuir debido a cambios en los factores abióticos como la concentración de nitrógeno y fósforo en el medio de cultivo. **Objetivo.** Determinar la relación carbono/nitrógeno y carbono/fósforo que favorezcan la producción de biomasa y ácidos grasos en la microalga nativa *Chlorella sorokiniana*. **Métodos.** La microalga aislada del lago del parque norte en la ciudad de Medellín, Antioquia, Colombia, fue cultivada de forma heterotrófica con glucosa como fuente de carbono a diferentes relaciones carbono nitrógeno (C/N) (10/1, 25/1 y 50/1) y carbono fósforo (C/P) (200/1, 300/1 y 400/1). **Resultados.** La máxima concentración de biomasa que se obtuvo fue de 9.70 gL<sup>-1</sup> y 9.17 gL<sup>-1</sup> con las relaciones C/N 10/1 y C/P 200/1, sus productividades fueron de 1.08 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> y 1.02 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> y sus rendimientos de biomasa en glucosa (fueron de 0.43 y 0.44 gg<sup>-1</sup>). Los ácidos grasos totales se ven favorecidos con las relaciones C/N 50/1 y C/P 400/1 alcanzando un 24.27% y 20.48% de ácidos grasos totales sobre la biomasa seca, además de mayores productividades de ácidos grasos en biomasa seca de 26.97 mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> y 22.76 mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> respectivamente. **Conclusiones.** Relaciones C/N y C/P bajas favorecen la producción de biomasa y disminuyen la producción de ácidos grasos totales, por el contrario, relaciones C/N y C/P altas, favorecen la producción de ácidos grasos totales y la productividad de lípidos en biomasa. De esta manera se debe alcanzar la máxima producción de biomasa con bajas relaciones C/N para lograr que en la etapa de agotamiento nutricional en el medio de cultivo se induzca la elongación de las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados como respuesta a las condiciones de estrés.

**Palabras claves:** biomasa, carbono, lípidos, nitrógeno, fósforo.

#### ABSTRACT

**Background.** Microalgae are being studied as a source of fatty acids to produce food with high added value. The content of oils can increase or decrease due to changes in abiotic factors such as nitrogen and phosphorus concentration in the culture medium. **Goals.** To determine the carbon/nitrogen and carbon/phosphorus ratio that favor biomass and fatty acid production in the native microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Methods.** Microalgae isolated from the Parque Norte Lake in the city of Medellín, Antioquia, Colombia, was cultured in a heterotrophic way using glucose as carbon source at different carbon to nitrogen (C/N) (10/1, 25/1 y 50/1) and carbon to phosphorus (C/P) (200/1, 300/1 y 400/1) ratios. **Results.** The highest concentration of biomass was 9.70 gL<sup>-1</sup> and 9.17 gL<sup>-1</sup> at C/N 10/1 and C/P 200/1. The yields were 1.08 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> and 1.02 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. The biomass yield from glucose (were 0.43gg<sup>-1</sup> and 0.44gg<sup>-1</sup>). Total fatty acids are favored by the C/N and C/P ratios of 50/1 and 400/1, yielding 24.27% and 20.48% total fatty acids measured over dried cell weight alongside higher fatty acid yield from biomass of 26.97m gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> and 22.76m gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusions.** Lower C/N and C/P ratios favor the production of biomass while lowering the production of total fatty acids; conversely, higher C/N and C/P ratios favor the production of total fatty acids and the lipid yield from biomass. Therefore, it is necessary to reach the highest production of biomass with low C/N ratio for enabling the elongation of the polyunsaturated fatty acid chain during the nutrient depletion stage in the culture medium as a response to the stress conditions.

**Keywords:** biomass, carbon, lipids, nitrogen, phosphorus.

Grupo de Bioprocesos, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia. Calle 67 No. 53 – 108, Medellín, 1226, Colombia.

**\*Corresponding author:**

Catalina Andrea Lugo-De Ossa: e-mail: catalina.lugo@udea.edu.co

**To quote as:**

Lugo-De Ossa, C. A., N. A. Gómez-Vanegas & M. Peñuela-Vásquez. 2022. Evaluación de la relación Carbono Nitrógeno y Carbono Fósforo para mejorar la producción de biomasa y ácidos grasos en *Chlorella sorokiniana*. *Hidrobiológica* 32 (1): 25-31.

DOI:10.24275/uam/izt/dobs/hidro/2022v32n1/Lugo

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas han despertado especial interés en los últimos años por su particular manera de acumular aceites, en forma de triglicéridos y de ácidos grasos poliinsaturados, que están ubicados principalmente en la membrana celular o en las organelas en forma de glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos y lipoproteínas (Canelli et al., 2020). Algunos de estos microorganismos pueden ser cultivados de forma autotrófica, mixotrófica y/o heterotrófica; los cultivos heterótrofos proveen ventajas competitivas ya que no se necesita luz, la luz es un factor limitante del cultivo debido a que no alcanza a llegar a las células que se encuentran en cultivos con altas densidades celulares (Singhasuwan et al., 2015; Zhang et al., 2020), adicionalmente, se utiliza una fuente de carbono orgánica lo que disminuye el tiempo de crecimiento y se obtienen altas concentraciones de biomasa logrando mejorar los rendimientos en la producción de lípidos totales hasta un 89% del peso seco de la biomasa (Safi et al., 2014; Shen et al., 2015; Wang et al., 2017).

El contenido de aceites en las microalgas puede aumentar o disminuir debido a cambios en los factores abióticos que tienen mayor relevancia en los cultivos microalgales entre los cuales se resaltan la deficiencia de nutrientes como nitrógeno y fósforo, intensidad de luz, fotoperiodo, salinidad, temperatura y pH (Paliwal et al., 2017; Singhasuwan et al., 2015). Cuando las células se enfrentan a alguna de estas condiciones se genera estrés ambiental causando disminución su división celular y cambiando su metabolismo hacia la producción y almacenamiento de lípidos como fuente de reserva de energía (Wang et al., 2017; Xin et al., 2010) como es el caso de la limitación de nitrógeno y fósforo, que puede causar disminución del contenido de proteínas en la célula, así como de tilacoides en la membrana y activar las enzimas que estimulan la hidrólisis de fosfolípidos y triglicéridos (Fu et al., 2017; Li et al., 2018; Singhasuwan et al., 2015).

La adecuada composición del medio de cultivo favorecerá entonces el crecimiento de las células, por esta razón muchos medios de cultivo comerciales han sido modificados y optimizados, a fin de establecer el efecto que tiene el aumento o la disminución de la concentración de algunos nutrientes sobre la producción de biomasa y lípidos (Singhasuwan et al., 2015). Para lograr buenos rendimientos de aceites en las microalgas se debe asegurar una alta concentración de biomasa con una adecuada concentración de nutrientes, los aceites, por ser metabolitos primarios, pueden ser inducidos al someter las microalgas a condiciones de estrés (Guedes et al., 2011; Wang et al., 2017) y estas condiciones de estrés dependen tanto de la especie como de los factores asociados a su crecimiento (Tonon et al., 2002).

Este trabajo muestra de qué manera la relación carbono/nitrógeno y carbono/ fósforo, favorecen la producción de biomasa y la síntesis de ácidos grasos totales en la microalga nativa *Chlorella sorokiniana*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Microorganismo y medio de cultivo:** La microalga *Chlorella sorokiniana* se aisló del lago del parque norte en la ciudad de Medellín, Colombia (2004), La cepa aislada se hizo axénica mediante subcultivo continuo utilizando medio basal Bold (BBM) en placas de agar suplementadas con ampicilina y kanamicina (10 y 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el medio, respectivamente). La colonia aislada se identificó mediante análisis molecular del espaciador transcrito interno ribosómico (Ribosomal Internal Trans-

cribed Spacer- ITS) y se conservó a 12 °C en medio de cultivo estándar modificado por Quevedo (2011) (Tabla 1). Para su mantenimiento, se realizan resiembras de la cepa cada 3 meses.

**Preparación del inóculo:** se preparó el medio de cultivo estándar modificado en un erlenmeyer de 250mL con 100mL de volumen efectivo. En otro recipiente se preparó 10ml de una solución de glucosa a 10gL<sup>-1</sup>. Estas soluciones se esterilizaron a 120°C/15min. Después de la esterilización se adicionó la solución de glucosa al medio de cultivo, se ajustó pH a 6.0 y se sembró la microalga *Chlorella sorokiniana* transfiriendo una colonia de un caja de petri con un asa de aro al medio líquido. El inóculo se dejó en incubación a 28°C bajo completa oscuridad en un agitador orbital a 120rpm/3días.

**Diseño experimental para la Relación Carbono/Nitrógeno y relación Carbono/Fósforo:** Con el fin de aumentar la producción de biomasa y el contenido de lípidos en la microalga nativa *Chlorella sorokiniana* se realizó una evaluación del comportamiento del cultivo heterotrófico de esta microalga con tres relaciones C/N (10/1, 25/1 y 50/1) manteniendo la concentración de glucosa inicial fija 20gL<sup>-1</sup> y la relación C/P inicial (200/1) fija en todos los ensayos. Estos se llevaron a cabo en erlenmeyer de 250mL con 120mL de medio de cultivo (volumen de trabajo), cada experimento se realizó por triplicado. La microalga se inoculó al 5%v/v con respecto al volumen total del cultivo. Los cultivos se mantuvieron bajo completa oscuridad a 28°C en un agitador orbital a 120rpm/9días. Se tomaron 6mL de cultivo para realizar los métodos analíticos.

Una vez seleccionada la mejor relación C/N, se procedió a evaluar de la relación C/P (200/1, 300/1 y 400/1) en un medio de cultivo con 20 gL<sup>-1</sup> de glucosa.

**Análisis estadístico:** Los resultados se analizaron por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA) y análisis de comparaciones múltiples utilizando el software libre estadístico RStudio Version 0.99.902 – © 2009-2016 RStudio, Inc.

**Concentración de biomasa:** Se empleó la metodología de peso seco ligeramente modificada de Arredondo & Voltolina (2007). Se tomaron 2mL del cultivo en crecimiento en eppendorfs previamente secados y pesados, se centrifugó a 15000rpm/10min. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con agua destilada, se llevó nuevamente a centrifugación bajo las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo estándar modificado por Quevedo (2011)

Macronutrientes (gL <sup>-1</sup> )		Micronutrientes (mgL <sup>-1</sup> )	
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,0073	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,002859
EDTA	0,00916	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,05
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04	ZnSO <sub>4</sub>	0,1234
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,05	CoCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,05
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,04	MnCl <sub>2</sub>	1,146
KNO <sub>3</sub>	0,1	CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,054
Para medio sólido se adiciona agar-agar a 15gL <sup>-1</sup> y NaHCO <sub>3</sub> 1gL <sup>-1</sup>			

el pellet con la biomasa se llevó a un horno a 105 °C/12 h. Finalmente se puso en un desecador hasta alcanzar un peso constante (Arredondo & Voltolina, 2007).

**Concentración de nitratos:** La concentración de nitratos fue cuantificada mediante el método del ácido salicílico. Las lecturas se realizaron en un lector de microplatos Synergy a 410 nm. La curva de calibración se construye a partir de una solución concentrada de  $\text{KNO}_3$  (Palomino *et al.*, 1997)

**Concentración de fosfatos:** La concentración de fosfatos se determinó por el método del ácido ascórbico modificado (Baird & Bridgewater, 2017). Las lecturas se llevaron a cabo en un lector de microplatos Synergy a 880 nm. La curva de calibración se construyó a partir de una solución concentrada de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

**Concentración de glucosa:** La concentración de Glucosa se cuantificó por el método de la glucosa oxidasa, utilizando el kit Glucose de Biosystem. Las lecturas se llevaron a cabo en un lector de microplatos Synergy a 500 nm.

**Extracción y contenido de lípidos:** El contenido de lípidos (g lípidos/g biomasa seca\*100) se determinó por la metodología gravimétrica, modificando el método de Bligh & Dyer (1959) y rompiendo las células por sonicación. Para esto, se tomaron 4ml de medio de cultivo, se separó la biomasa del medio de cultivo por centrifugación a 15000rpm/10min; esta se resuspendió en 1mL de solución cloroformo:metanol (relación 2:1) y se llevó a un ultrasonido por 2 horas a 30 hz, posteriormente se centrifugó a 15000rpm/10min separando la biomasa del solvente, se recuperó la fase del solvente con los aceites en un tubo eppendorf previamente pesado, se adicionó 1mL de solución salina (0.9%) para remover material no lipídico que se arrastró con el solvente y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, la fase acuosa se descartó y el eppendorf con los solventes se llevó a una estufa para su evaporación a 80°C hasta tener peso constante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Evaluación de la Relación C/N:** La Figura 1a representa las cinéticas de crecimiento y consumo de Glucosa de las 3 relaciones C/N evaluadas y la Figura 1b, muestra el consumo de nitratos. Las cinéticas con relación C/N 10/1 y 25/1 mostraron tendencias similares de consumo de glucosa, dándose un mayor consumo y posterior agotamiento de esta fuente de carbono a los 8 días de cultivo aproximadamente, además, tienen una mayor concentración de nitrógeno por lo tanto hay

mayor producción de biomasa. Sin embargo, con la relación C/N 50/1 se observó un menor consumo de glucosa, quedando glucosa residual al final de la cinética, y la microalga alcanza más rápido la fase estacionaria debido a que se agota el nitrógeno en el medio de cultivo en el día 3 (Fig. 1b), siendo la cinética con menor concentración de biomasa  $6.83 \pm 0.80 \text{ gL}^{-1}$ . El nitrógeno, al igual que el carbono, son nutrientes limitantes del crecimiento de las microalgas y deben estar presentes en el cultivo para asegurar la producción de proteínas y ácidos nucleicos importantes para la división celular (Beuckels *et al.*, 2015; Singhasuwan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

El análisis de varianza (ANOVA), para la variable respuesta concentración final de biomasa (a los 9 días de cultivo) mostró que hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres relaciones C/N evaluadas (valor  $p=0.00027$ ). A pesar de esto, el análisis de comparaciones múltiples realizado por el método de Tukey o método HSD, evidencia que no hay diferencias significativas en la concentración final de biomasa al utilizar las relaciones C/N 25/1 y 10/1.

En la Tabla 2 se resumen los parámetros de los cultivos evaluados al día 9. Las relaciones C/N 10/1 y 25/1 alcanzaron las mayores concentraciones de biomasa ( $9.70 \pm 0.33 \text{ gL}^{-1}$  y  $9.17 \pm 0.06 \text{ gL}^{-1}$ , respectivamente) y mayores productividades de biomasa ( $1.08 \pm 0.04 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$  y  $1.02 \pm 0.01 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ , respectivamente) en comparación a la relación C/N 50/1 ( $6.83 \pm 0.80 \text{ gL}^{-1}$  de biomasa y  $0.76 \pm 0.09 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ).

Los resultados obtenidos en este trabajo con una relación C/N 10/1 coinciden con los reportados por Wei *et al.* (2009), quienes evaluaron una concentración de glucosa inicial de  $40 \text{ gL}^{-1}$  de los cuales la microalga *Chlorella protothecoides* consumió  $20 \text{ gL}^{-1}$  de glucosa aproximadamente, obteniendo una concentración de biomasa de  $10.7 \text{ gL}^{-1}$ , productividad de biomasa  $1.07 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$  y rendimiento de biomasa en sustrato de  $0.5 \text{ gg}^{-1}$  aproximadamente en 10 días de cultivo, se observa que son resultados similares a los alcanzados por esta investigación a pesar de trabajar con especies de *Chlorella* diferente. Wei *et al.* (2009) también obtuvieron un efecto similar cuando sometieron las microalgas a relaciones de C/N altas (50/1), encontrando bajas concentraciones de biomasa. Por lo que se corrobora que el factor limitante del crecimiento de la biomasa microalgal de los cultivos con altas concentraciones de glucosa es el nitrógeno, si el nitrógeno se agota en muy poco tiempo la microalga no es capaz de seguir sintetizando proteínas, DNA y RNA, y entra en una etapa de estrés nutricional conduciendo su metabolismo a la producción de lípidos neutros y triglicéridos como almacenamiento de energía (Sakarika & Kornaros, 2017; Xin *et al.*, 2010).

Tabla 2. Parámetros de cultivo: cultivos heterotróficos de *Chlorella sorokiniana* para las diferentes relaciones C/N evaluadas al día 9.

Parámetros Cinéticos	Relación C/N 10/1	Relación C/N 25/1	Relación C/N 50/1
Concentración final de biomasa ( $\text{gL}^{-1}$ )	$9.70 \pm 0.33$	$9.17 \pm 0.06$	$6.83 \pm 0.80$
Rendimiento de biomasa en sustrato $\text{Y}_x$ ( $\text{gg}^{-1}$ )	$0.43 \pm 0.03$	$0.44 \pm 0.01$	$0.38 \pm 0.03$
Productividad de biomasa ( $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	$1.08 \pm 0.04$	$1.02 \pm 0.01$	$0.76 \pm 0.09$
Contenido de lípidos (%) (g lípidos/g biomasa seca)	$15.65 \pm 0.85$	$18.82 \pm 1.63$	$24.27 \pm 0.33$
Productividad de lípidos ( $\text{mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	$17.39 \pm 0.94$	$20.92 \pm 1.82$	$26.97 \pm 0.36$
Rendimiento de lípidos en biomasa $\text{Y}_{\text{px}}$ ( $\text{gg}^{-1}$ )	$0.13 \pm 0.01$	$0.15 \pm 0.03$	$0.20 \pm 0.01$

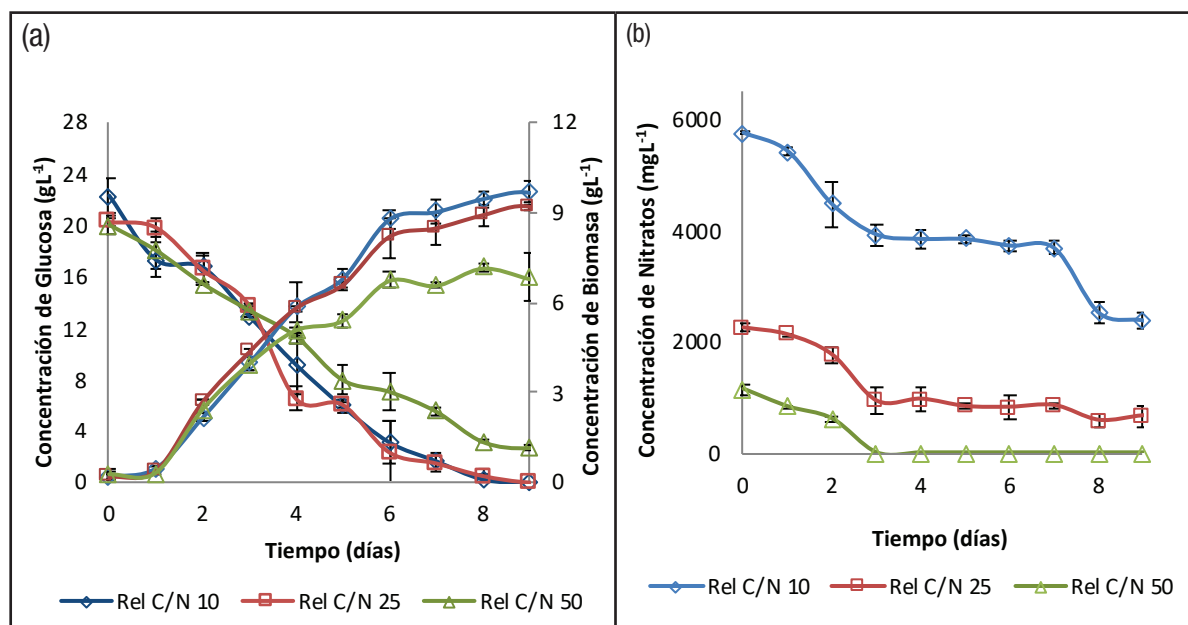


Figura 1. Curvas Cinéticas para el cultivo heterotrófico de *Chlorella sorokiniana*, a 28°C, 120rpm y pH inicial 6.0 con las diferentes relaciones C/N 10/1, 25/1 y 50/1. a) Producción de Biomasa y Consumo de Carbono. b) Consumo de Nitratos.

Singhasuwan *et al.* (2015) evaluaron 3 relaciones C/N 29/1, 63/1 y 95/1 para la microalga *Chlorella* sp. TISR8990, encontraron que con la relación menor 29/1 se obtienen mayores concentraciones de biomasa 2,7gL<sup>-1</sup>, y con la más alta relación C/N 95/1 encontraron la menor producción de biomasa 1.3 gL<sup>-1</sup> la cuál es un 48% menor a la relación C/N 29/1, lo mismo ocurre con nuestro estudio en el cual con la más alta relación C/N se obtiene un 74% menos de biomasa, todo esto indica que altas relaciones C/N disminuyen la concentración de biomasa debido al rápido agotamiento de nitrógeno en el medio de cultivo.

El contenido de lípidos en la microalga *Chlorella sorokiniana* (Tabla 2), alcanzó un mayor porcentaje con la relación C/N 50/1 (24.27±0.33%) que con las relaciones C/N 10/1 y 25/1 (15.65±0.85% y 18.82±1.63% respectivamente). El ANOVA realizado para la variable respuesta contenido de lípidos (a los 9 días de cultivo) mostró en que hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres relaciones carbono nitrógeno evaluadas (valor p=1.392e-05), esto se confirma con el análisis de comparaciones múltiples realizado el método de Tukey en el cual se evidencia diferencias significativas en las tres relaciones C/N en el día 9.

Este resultado confirma que la deficiencia de nitrógeno induce la producción de lípidos en la microalga *Chlorella sorokiniana*, como se observa en la curva cinética de consumo de Nitratos (Fig. 1b), en la cual, para la relación C/N 50/1 se agota este nutriente el día 3, por lo tanto la microalga comienza a almacenar lípidos de reserva, aumentando la productividad de lípidos intracelulares (26.97±0.36mgg<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>), esta productividad es mayor que la obtenida con las relaciones C/N 10/1 y 25/1 (17.39±0.94 mgg<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> y 20.92±1.82 mgg<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> respectivamente) (ver Tabla 2).

El estudio realizado por Wei *et al.* (2009), en el cual se obtuvo un contenido de lípidos de 28% con 20gL<sup>-1</sup> de glucosa en 10 días de cultivo, utilizando urea como fuente de nitrógeno, es similar a lo encontrado en nuestro estudio con la microalga nativa *Chlorella sorokiniana* donde se obtuvo un contenido de lípidos de 24.27±0.33% con 20 gL<sup>-1</sup> de Glucosa en 9 días de cultivo utilizando nitrato de potasio como fuente de nitrógeno. Otros autores como Wang *et al.* (2017) también han trabajado con limitación de nitrógeno en el medio de cultivo para evaluar el efecto de este nutriente en la acumulación de lípidos intracelulares en un cultivo en Batch con glucosa a 38 gL<sup>-1</sup> y NaNO<sub>3</sub>, la fuente de nitrógeno es agotada aproximadamente a los 3 días de cultivo, obteniendo una mayor concentración de biomasa 18.38 gL<sup>-1</sup> y mayor contenido de lípidos de 27.2% al igual que en nuestro estudio.

Singhasuwan *et al.* (2015) encontraron que la relación C/N 63/1 es la mejor para la producción de ácidos grasos totales en la microalga *Chlorella* sp TISR8990, obtuvieron un contenido de lípidos de 394 mgg<sup>-1</sup> y una productividad de lípidos de 186mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. Este resultado es parecido a lo encontrado en nuestro trabajo con la relación C/N 50/1 (242.7 mgg<sup>-1</sup> y 26.97±0.36 mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> respectivamente) y nos confirma que esta relación C/N es la mejor para inducir la producción de ácidos grasos totales en la microalga nativa *Chlorella sorokiniana*.

**Evaluación de la Relación C/P:** Los comportamientos cinéticos para todas las relaciones C/P evaluadas son similares en el crecimiento y consumo de glucosa (Fig. 2a), la cinética de consumo de fosfatos (Fig. 2b) es más lenta para la relación C/P 200/1 agotándose los fosfatos a los 5 días de cultivo, mientras que para las relaciones C/P 400/1 y 300/1 se agotan los fosfatos a los 3 y 4 días de cultivo respectivamente. Sin embargo, a pesar de la diferencia en el consumo de fósforo, la ten-

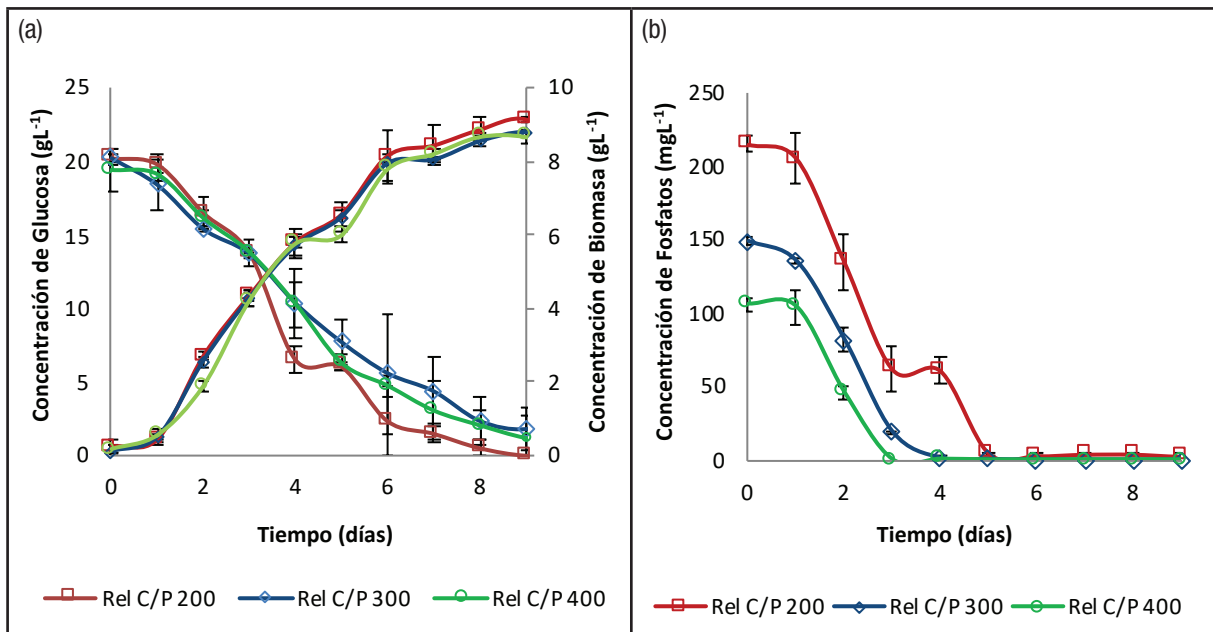


Figura 2. Curvas Cinéticas para el cultivo heterotrófico de *Chlorella sorokiniana* a 28°C, 120rpm y pH inicial 6.0, con las relaciones C/P 200/1, 300/1 y 400/1. a) Producción de Biomasa y Consumo de Carbono. b) Consumo de Fosfatos.

dencia de crecimiento de la biomasa en las tres cinéticas es el mismo, esto se debe a que algunas microalgas pueden reducir su demanda de fósforo fisiológico en hasta un 50% en respuesta a la limitación de fósforo, por tanto, se disminuye la tasa de síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos (Belotti *et al.*, 2013). Otras microalgas también poseen la capacidad de almacenar fósforo en forma de polifosfatos como reserva de energía, que puede ser utilizada posteriormente por la célula debido a la limitación de nutriente en el medio de cultivo (Fu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018). Es por esto que cuando encontramos una deficiencia de fósforo como la observada en nuestro trabajo, no se observa una marcada diferencia en la concentración final de biomasa.

La Tabla 3 resume los parámetros de los cultivos evaluados al día 9. La relación C/P 200/1 alcanzó la mayor concentración de biomasa ( $9.17 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1}$ ) en comparación a las relaciones C/P 300/1 y 400/1 ( $8.80 \pm 0.05 \text{ g L}^{-1}$  y  $8.70 \pm 0.17 \text{ g L}^{-1}$  respectivamente). El análisis de varianza (ANOVA), para la variable respuesta concentración final de biomasa mostró que hay diferencias estadísticamente significativas entre

las 3 relaciones C/P evaluadas (valor  $p = 0.002432$ ). A pesar de esto el análisis de comparaciones múltiples realizado por el método de tukey evidenció que no hay diferencias significativas entre las relaciones C/P 300/1 y 400/1 para la concentración final de biomasa en el día 9.

La Tabla 3 muestra que el contenido de lípidos en las relaciones C/P 200/1, 300/1 y 400/1 fue  $18.82 \pm 1.63\%$ ,  $21.31 \pm 1.72\%$  y  $20.48 \pm 1.27\%$  respectivamente, este contenido de lípidos es prácticamente el mismo para las tres relaciones evaluadas, esto se confirma con el ANOVA, para la variable respuesta contenido de lípidos, mostró que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las relaciones C/P evaluadas (valor  $p = 0.2686$ ), por lo tanto la acumulación de lípidos en la microalgas nativa *Chlorella sorokiniana* bajo deficiencia de fósforo no es tan evidente como la acumulación de lípidos cuando hay deficiencia de nitrógeno, además, el contenido de lípidos de las tres relaciones C/P evaluadas están alrededor del 20% como se observa para la relación C/N 25/1 ( $20.92 \pm 1.82\%$ ).

Tabla 3. Parámetros de cultivo heterotrófico para *Chlorella sorokiniana* a diferentes relaciones C/P evaluadas al día 9.

Parámetro	Relación C/P 200	Relación C/P 300	Relación C/P 400
Concentración final de biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ )	$9.17 \pm 0.06$	$8.80 \pm 0.05$	$8.70 \pm 0.17$
Rendimiento de biomasa en sustrato $Y_x$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	$0.44 \pm 0.01$	$0.44 \pm 0.06$	$0.43 \pm 0.03$
Productividad de biomasa ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	$1.02 \pm 0.01$	$0.98 \pm 0.01$	$0.97 \pm 0.02$
Contenido de lípidos (%) (g lípidos/g biomasa seca)	$18.82 \pm 1.63$	$21.31 \pm 1.72$	$20.48 \pm 1.27$
Productividad de lípidos ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	$20.92 \pm 1.82$	$23.67 \pm 1.91$	$22.76 \pm 1.41$
Rendimiento de lípidos en biomasa $Y_{px}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	$0.15 \pm 0.03$	$0.17 \pm 0.02$	$0.16 \pm 0.02$

En el estudio realizado por Rodolfi *et al.*, (2009), la disminución de la concentración de fósforo en el medio de cultivo de la microalga *Nannochloropsis* sp., provocó un aumento en el contenido lipídico de 13,2 % a 50,1%, sin embargo no se presentó un efecto benéfico en la productividad de lípidos debido al bajo crecimiento celular, pues a medida que aumentó el tiempo de deficiencia de fósforo disminuyó la productividad de biomasa hasta 0.1gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, en el presente estudio la evaluación de la relación C/P para *Chlorella sorokiniana* no mostró un notable aumento en el contenido de lípidos a pesar de haber deficiencia de fósforo en el medio de cultivo, sin embargo sí hay un aumento en la productividad de biomasa de hasta 1.02±0.01gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> para la relación C/P 200/1 y un incremento en la productividad de lípidos, las cuales oscilan entre 20.92±1.82mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> y 23.67±1.91mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

En la Tabla 4 se encuentran los perfiles de ácidos grasos obtenidos bajo las diferentes relaciones C/N y C/P evaluadas en la microalga *Chlorella sorokiniana*, se puede observar que bajo condiciones heterotróficas en general se obtiene muy buen perfil de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados de tipo omega 6 y omega 3.

Es importante resaltar que en el trabajo realizado bajo condiciones heterotróficas con la relación C/N 25/1 se obtiene un 13.6% de ácido eicosapentaenoico (EPA), y al compararlo con el trabajo realizado por Quevedo en el 2011 bajo condiciones autotróficas utilizando la misma microalga, vemos que ellos no reportan este ácido graso poliinsaturado.

Comparando el perfil heterotrófico obtenido en nuestro estudio con el perfil obtenido por Singhasuwan *et al.* (2015) con la microalga *Chlorella* sp. TISR8990 se observa que son bastante similares menos en el ácido linoleico que es mayor para *Chlorella* sp. TISR8990 y no hay presencia de ácido eicosapentaenoico (EPA).

Los resultados obtenidos en este trabajo utilizando la microalga nativa *Chlorella sorokiniana* muestran que al tener una menor relación

C/N y C/P aumenta la concentración de biomasa hasta 9.7gL<sup>-1</sup> debido a que hay suficientes nutrientes para el apropiado crecimiento celular, y al tener altas relaciones C/N y C/P se obtienen mayores contenidos de lípidos 24.27% y productividades de lípidos de hasta 26.97mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. También se observó, que a pesar que el fósforo no haya mostrado una diferencia estadísticamente significativa para la producción de lípidos intracelulares, el Nitrógeno muestra ser un nutriente limitante tanto en la producción de biomasa como en la acumulación de lípidos en la microalga nativa *Chlorella sorokiniana*.

Lo anterior nos lleva a sugerir que realizar una estrategia de cultivo en dos etapas puede ser una opción para aumentar la productividad de lípidos totales en la microalga nativa *Chlorella sorokiniana*. Es evidente que al optimizar las condiciones de cultivo de la microalga *Chlorella sorokiniana* con suficientes nutrientes para su crecimiento se puede asegurar una alta producción de biomasa en poco tiempo, y en la segunda etapa donde habrá deficiencia de nutrientes como nitrógeno y fósforo, se puede alcanzar una alta productividad de lípidos totales como respuesta al estrés abiótico, pero se debe asegurar la presencia de fuente de carbono en el medio de cultivo para que se produzca la elongación de los ácidos grasos.

## AGRADECIMIENTOS

La información presentada en este artículo hace parte de los resultados de investigación de las Tesis de Maestría del primer autor, los cuales fueron desarrollados en el marco del proyecto "Inducción de la producción de aceites esenciales en la microalga nativa *Chlorella* sp". Financiado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación – CODI, en la Convocatoria Programática Ingeniería y Tecnología 2014-2015. Vicerrectoría de investigación, Universidad de Antioquia.

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos heterotrófico para la microalga *Chlorella sorokiniana* a diferentes relaciones C/N y C/P y comparación con otros estudios.

Perfil de ácidos grasos (%)	Cultivo			Heterotrófico			Cultivo Autotrófico		
	C/N 10/1	C/N 25/1	C/N 50/1	C/P 200/1	C/P 300/1	C/P 400/1	Singhasuwan <i>et al.</i> 2015	Quevedo 2011	Arora <i>et al.</i> , 2016
<b>Saturados</b>									
Mirístico (C14:0)								0.6	1
Octanoico (C17:0)		0.8						12.6	
Octadecanoico (C18:0)	2.9	9.4		2.6		3.9	2.7		1
Palmitico (C16:0)	35.9		39.9	36.5	40.8	37.0	20.1	28.6	10
Eicosanoico (C20:0)								0.8	
Pentadecanoico (C15:0)			5.6						
<b>Monoinsaturados</b>									
Palmitoleico (C16:1)		28.5		3.4			2.2		
Eicosenoico (C20:1)								0.4	
Oleico (C18:1, n-9)	17.2	13.2	13.7	18.8	18.4	18.5	20.1	9.01	40
<b>Poliinsaturados</b>									
Eicosapentaenoico (C20:5, n-3)		13.6							
Linoleico (C18:2, n-6)		7.9	29.1	34.1	36.3	35.9	50.2	9.9	7
Gama Linolénico (C18:3, n-6)	39.9	4.3					4.0	26,1	

## BIBLIOGRAFÍA

- ARORA, N., A. PATEL, P.A. PRUTHI & V. PRUTHI. 2016. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorus influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. *Bioresource Technology* 213:79-87. DOI:10.1016/j.biortech.2016.02.112
- ARREDONDO, B. & D. VOLTOLINA. 2007. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. Arredondo, B. & D. Voltolina (eds.). *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal*. CIBNOR S.C., La paz, B.C.S., pp.23-26.
- BAIRD, R. & L. BRIDGEWATER. 2017. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23rd ed. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. 164 p. DOI:10.2105/SMWW.2882.008
- BELOTTI, G., M. BRAVI, B. CAPRARIIS, P. FILIPPIS & M. SCARSELLA. 2013. Effect of Nitrogen and Phosphorus Starvations on *Chlorella vulgaris* Lipids Productivity and Quality under Different Trophic Regimens for Biodiesel Production. *American Journal of Plant Sciences* 04(12):44-51. DOI:10.4236/ajps.2013.412a2006
- BEUCKELS, A., E. SMOLDERS & K. MUJLAERT. 2015. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research* 77:98-106. DOI:10.1016/j.watres.2015.03.018
- BUGH, E.G. & W. J. DYER. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8):911-917.
- CANELLI, G., L. NEUTSCH, R. CARPINE, S. TEVERE, F. GIUFFRIDA, Z. ROHFRTSCH, F. DIONISI, C.J. BOLTEN & A. MATHYS. 2020. *Chlorella vulgaris* in a heterotrophic bioprocess: Study of the lipid bioaccessibility and oxidative stability. *Algal Research* 45:1-9. DOI:10.1016/j.algal.2019.101754
- FU, L., X. CUI, Y. LI, L. XU, C. ZHANG, R. XIONG, D. ZHOU & J.C. CRITTENDEN. 2017. Excessive phosphorus enhances *Chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation. *Chemical Engineering Journal* 330:566-572. DOI:10.1016/j.cej.2017.07.182
- GUEDES, A.C., H.M. AMARO, C.R. BARBOSA, R.D. PEREIRA & F.X. MALCATA. 2011. Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and  $\alpha$ -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International* 44(9):2721-2729. DOI:10.1016/j.foodres.2011.05.020
- LI, Q., L. FU, Y. WANG, D. ZHOU & B.E. RITTMANN. 2018. Excessive phosphorus caused inhibition and cell damage during heterotrophic growth of *Chlorella regularis*. *Bioresource Technology* 268(July):266-270. DOI:10.1016/j.biortech.2018.07.148
- PALIWAL, C., M. MITRA, K. BHAYANI, S.V.V. BHARADWAJ, T. GHOSH, S. DUBEY & S. MISHRA. 2017. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology* 244:1216-1226. DOI:10.1016/j.biortech.2017.05.058
- PALOMINO, F., M. ROJAS & M. BELTRÁN. 1997. Nueva técnica colorimétrica para la determinación de nitratos en el plasma. *Revista de La Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia* 45(2):63-69.
- QUEVEDO, C. 2011. Estudio de las condiciones de cultivo de la microalga *Chlorella sp* para la producción de hidrocarburos y su caracterización con aplicaciones en combustibles. Tesis de maestría en ingeniería, Facultad de ingeniería, Universidad de Antioquia. 176 p.
- RODOLFI, L., G. C. ZITTELLI, N. BASSI, G. PADOVANI, N. BIONDI, G. BONINI & M. R. TREDICI. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102(1):100-112. DOI:10.1002/bit.22033
- SAFI, C., B. ZEBIB, O. MERAH, P.Y. PONTALIER & C. VACA-GARCIA. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35:265-278. DOI:10.1016/j.rser.2014.04.007
- SAKARIKA, M. & M. KORNAROS. 2017. Kinetics of growth and lipids accumulation in *Chlorella vulgaris* during batch heterotrophic cultivation: Effect of different nutrient limitation strategies. *Bioresource Technology* 243:356-365. DOI:10.1016/j.biortech.2017.06.110
- SHEN, X.F., J.J. LIU, F.F. CHU, P.K.S. LAM & R. J. ZENG. 2015. Enhancement of FAME productivity of *Scenedesmus obliquus* by combining nitrogen deficiency with sufficient phosphorus supply in heterotrophic cultivation. *Applied Energy* 158:348-354. DOI:10.1016/j.apenergy.2015.08.057
- SINGHASUWAN, S., W. CHOORIT, S. SIRISANSANEYAKUL, N. KOKKAEW & Y. CHISTI. 2015. Carbon-to-nitrogen ratio affects the biomass composition and the fatty acid profile of heterotrophically grown *Chlorella sp.* TISTR 8990 for biodiesel production. *Journal of Biotechnology* 216:16-177. DOI:10.1016/j.jbiotec.2015.10.003
- TONON, T., D. HARVEY, T.R. LARSON & I.A. GRAHAM. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61(1):15-24. DOI:10.1016/S0031-9422(02)00201-7
- WANG, T., X. TIAN, T. LIU, Z. WANG, W. GUAN, M. GUO, J. CHU & Y. ZHUANG. 2017. A two-stage fed-batch heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* that combined nitrogen depletion with hyperosmotic stress strategy enhanced lipid yield and productivity. *Process Biochemistry* 60(April):74-83. DOI:10.1016/j.procbio.2017.05.027
- WEI, A., X. ZHANG, D. WEI, G. CHEN, Q. WU, S.T. YANG. 2009. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36(11):1383-1389. DOI:10.1007/s10295-009-0624-x
- XIN, L., H. HONG-YING, G. KE & S. YING-XUE. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology* 101(14):5494-5500. DOI:10.1016/j.biortech.2010.02.016
- ZHANG, J., T.B.T. TRAN, B. TAIDI, P. LU & P. PERRÉ. 2020. *Chlorella vulgaris* heterotrophic colony development and interaction. *Algal Research* 49(April):1-12. DOI:10.1016/j.algal.2020.101907