

**RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS DE PROCESO FOTÓTROFO Y LA
PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE INTERÉS INDUSTRIAL EN MICROALGAS DE
LA DIVISIÓN *CHLOROPHYTA***

Nancy Marleny Córdoba Castro, Ing.

**Universidad de La Sabana
Facultad de Ingeniería
Maestría en Diseño y Gestión de Procesos
Bogotá, D.C
2012**

**RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS DE PROCESO FOTÓTROFO Y LA
PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE INTERÉS INDUSTRIAL EN MICROALGAS DE
LA DIVISIÓN *CHLOROPHYTA***

Nancy Marleny Córdoba Castro, Ing.

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
Para optar al título de
Magíster en Diseño y Gestión de Procesos**

**Dr. Gloria Eugenia González Mariño
DIRECTORA**

**Bernadette Klotz. PhD
CO-DIRECTORA**

**Universidad de La Sabana
Facultad de Ingeniería
Maestría en Diseño y Gestión de Procesos
Bogotá, D.C
2012**

**RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS DE PROCESO FOTÓTROFO Y LA
PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE INTERÉS INDUSTRIAL EN MICROALGAS DE
LA DIVISIÓN *CHLOROPHYTA***

JURADO 1

JURADO 2

JURADO 3

DIRECTOR

CO-DIRECTOR

Bogotá, D.C, 10 de febrero de 2012

DEDICATORIA.

A Dios, por ponerme todos los días ángeles en el camino, que han sido los cómplices de mis grandes sueños.

A mi madre, quien no conforme con darme la vida, me ha entregado la suya. A mi hermana por ser un apoyo incondicional. Gracias a las dos por ser mi guía y mi ejemplo.

A mi sobrino por transmitirme el amor y alegría, aun en la distancia.

A la persona que Dios me ha enviado para hacerme ver el mundo de una manera distinta.

A mis amigos, por cada uno tiene la palabra perfecta en el momento oportuno.

“Nunca se alcanza la verdad total, ni nunca se está totalmente alejado de ella”

Aristóteles

AGRADECIMIENTOS

Deseo brindar mis agradecimientos a la Facultad de Ingeniería de la Universidad de La Sabana, quien me dio la oportunidad de trabajar y acceder a un programa de Maestría de alta calidad a través de una beca, la cual ayudó a realizar mis sueños y a formarme como profesional.

A Dios, porque me ha dado la posibilidad de conseguir todos mis sueños y me ha regalado ángeles en todo lugar para acompañarme y guiarme.

A mi familia, por todo su cariño, comprensión y apoyo desde la distancia y por todas sus oraciones para que cada día sea mejor.

A la persona que todos los días me recuerda que cada día puede ser mejor. Gracias por su apoyo, por creer en mí y por su insistencia en animarme a terminar lo que había empezado.

A la Dra. Gloria E. González por brindarme una oportunidad, por sus valiosos aportes, su amistad y su confianza depositada en mí.

A la Dra. Bernadette Klotz, por sus asesorías y aportes para la culminación de este trabajo.

A los profesores Leonardo González, Erlide Prieto, Luis Eduardo Díaz, Mauricio Agudelo, Clementina Cueto y a todos los docentes que me brindaron su apoyo, asesorías y excelentes conocimientos en este proceso.

A todos los funcionarios de la Facultad y personal del laboratorio gracias por la paciencia, por sus enseñanzas y su colaboración.

A mis amigos, porque dentro del transcurso de agotadoras jornadas de estudio y trabajo descubres que no todo es conocimiento, sino lazos de amistad de personas con gran calidad humana, extraordinarias y únicas, que le dan otro sabor a la vida.

Mis más sinceros agradecimientos todas las personas que me brindaron su colaboración, conocimientos y su amistad que hicieron posible el desarrollo de esta investigación.

CONTENIDO

RESUMEN	14
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	18
1. OBJETIVOS.....	22
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
2. ESTADO DEL ARTE.....	23
2.1 Concentraciones de lípidos en microalgas.....	23
2.2 Factores que afectan la producción de lípidos en microalgas.	24
2.3 Potencial de los aceites de microalgas para aplicaciones alimentarias	27
2.4 Aceites de microalgas como materia prima alternativa en la producción de biodiesel	29
3. MARCO TEÓRICO.....	32
3.1 Generalidades de microalgas.....	32
3.2 Clasificación y aplicación industrial de los lípidos.....	33
3.2.1 Biodiesel	35
3.2.2 Ácidos grasos de alto valor nutricional.....	37
3.5 Estrés metabólico y síntesis de lípidos.....	38
3.5.1 Biosíntesis de ácidos grasos.....	39
3.5.2 Biosíntesis de triglicéridos	42
3.6 Definiciones básicas de modelos y criterios estadísticos.....	43
3.6.1 Minería de datos.....	43
3.6.2 Análisis multivariado por conglomerados o clusters.....	44
3.6.3 Generación de modelos a partir de minería de datos.....	45
3.6.4 Modelos de regresión lineal simple y múltiple.....	46
3.6.5 Selección del mejor modelo de regresión.....	47
4. METODOLOGÍA.....	50
4.1 Selección de las cinco microalgas de la división <i>Chlorophyta</i>	50

4.2 Obtención de los datos objetivo de las microalgas seleccionadas.....	51
4.3 Preparación y estandarización de los datos.....	53
4.4 Procesamiento de los datos.	54
4.4.1 Análisis preliminar de los datos.	54
4.4.2 Análisis del conjunto de datos de cada microalga.....	54
4.4.3 Validación y análisis de los modelos.....	56
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
5.1 Selección de cinco microalgas de la división <i>Chlorophyta</i>	57
5.2 Estudio preliminar de los datos.	63
5.2.1 Datos para <i>Chlorella</i>	64
5.2.2 Datos para <i>Botryococcus braunii</i>	65
5.2.3 Datos para <i>Scenedesmus</i>	65
5.2.4 Datos para <i>Neochloris oleoabundans</i>	66
5.2.5 Datos para <i>Parietochloris incisa</i>	66
5.3 Análisis del estudio preliminar de los datos para las cinco microalgas seleccionadas.	66
5.4 Ajuste de modelos para cada microalga.	68
5.4.1 Ajuste de modelos para <i>Chlorella</i>	70
5.4.2 Ajuste de modelos para <i>Botryococcus braunii</i>	83
5.5 Análisis y validación de los modelos	88
5.5.1 Modelos para la microalga <i>Chlorella</i>	88
5.5.2 Modelos para la microalga <i>B. braunii</i>	99
5.6 Explicaciones bio-metabólicas de las relaciones significativas encontradas en los modelos propuestos.....	103
5.6.1 Concentración de lípidos (%p/p) para las dos microalgas.	103
5.6.2 Productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$) para <i>Chlorella</i>	116
5.7 Potencial industrial de los ácidos grasos presentes en <i>Chlorella</i> y <i>B. braunii</i>	121
6. CONCLUSIONES	126
7. PROPUESTAS PARA INVESTIGACIONES FUTURAS	129
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
ANEXOS	142

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Especies de la división *Chlorophyta* con alto potencial en la producción de lípidos. _____ 57
- Tabla 2.** Especies de microalgas de la división *Chlorophyta* con concentración lipídica mayor a la media general (30%p/p). _____ 60
- Tabla 3.** Variables e interacciones significativas en la concentración de lípidos de *Chlorella*, bajo condiciones equilibradas de nitrógeno (N+). Datos para la selección del mejor modelo. _____ 75
- Tabla 4.** Variables e interacciones significativas en la productividad de lípidos de *Chlorella*, bajo condiciones equilibradas de nitrógeno (N+). Datos para la selección del mejor modelo. _____ 77
- Tabla 5.** Variables e interacciones significativas en la concentración de lípidos de *Chlorella*, bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno (N-). Datos para la selección del mejor modelo. _____ 79
- Tabla 6.** Variables e interacciones significativas en la productividad de lípidos de *Chlorella*, bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno (N-). Datos para la selección del mejor modelo. _____ 82
- Tabla 7.** Criterios estadísticos del modelo seleccionado para concentración de lípidos en *B. braunii* bajo condiciones equilibradas de nitrógeno (N+) _____ 86
- Tabla 8.** Comparación de los modelos para las variables de respuesta en condiciones equilibradas y de deficiencia de nitrógeno en la microalga *Chlorella*. 89
- Tabla 9.** Comparación de los modelos para la concentración de lípidos (%p/p) en condiciones equilibradas y de deficiencia de nitrógeno en la microalga *B. braunii*. _____ 100
- Tabla 10.** Comparación de los modelos para la concentración de lípidos (%p/p) para las microalgas *Chlorella* y *B. braunii* en las dos condiciones experimentales evaluadas (N+ y N-) _____ 104
- Tabla 11.** Comparación de los modelos para la productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$) para *Chlorella* en las dos condiciones experimentales evaluadas (N+ y N-) _ 116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los lípidos _____	34
Figura 2. Etapas del proceso de transesterificación de triglicéridos para la obtención de biodiesel. _____	36
Figura 3. Síntesis de ácidos grasos en los cloroplastos. _____	40
Figura 4. Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de triglicéridos en algas _____	42
Figura 5. Proceso de selección de artículos para la base de datos propia. _____	51
Figura 6. Diagrama de proceso para el análisis de datos y ajuste de modelos ____	55
Figura 7. Rangos y valores de la concentración de lípidos (%p/p) reportados en la literatura para especies de la división <i>Chlorophyta</i> , con potencial en la producción de lípidos. _____	58
Figura 8. Número de reportes en artículos de revisión para cada una de las especies y géneros de microalgas de la división <i>Chlorophyta</i> , con potencial para la producción de lípidos de interés industrial. _____	61
Figura 9. Morfología de las cinco microalgas seleccionadas para el presente estudio. _____	62
Figura 10. Proporción de datos para cada especie de <i>Chlorella</i> dentro de las referencias seleccionadas. _____	64
Figura 11. Dendograma para todas las variables evaluadas en la microalga <i>Chlorella</i> . _____	71
Figura 12. Dendograma para todas las variables evaluadas en la microalga <i>B. braunii</i> . _____	84
Figura 13. Diferencia de medias para la concentración de lípidos (%p/p) en condiciones de equilibrio de nitrógeno (N+) y deficiencia de nitrógeno (N-) _____	94

- Figura 14.** Diferencia de medias para la productividad de lípidos (%p/p) en condiciones de equilibrio de nitrógeno (N+) y deficiencia de nitrógeno (N-) _____ 99
- Figura 15.** Diferencia de medias para concentración de lípidos (%p/p) en condiciones de equilibrio de nitrógeno (N+) y deficiencia de nitrógeno (N-) (*B. Braunii*) _____ 103
- Figura 16.** Aporte de cada una de las variables significativas a la variabilidad de la concentración de lípidos para *Chlorella* y *B. braunii*. _____ 105
- Figura 17.** Relación de las rutas metabólicas para la producción de triglicéridos con la intensidad de luz, CO₂ y nitrógeno. _____ 115
- Figura 18.** Aporte de cada una de las variables significativas a la variabilidad de la productividad de lípidos para la microalga *Chlorella*. _____ 117
- Figura 19.** Perfil de ácidos grasos de las dos microalgas, bajo condiciones de equilibrio de nitrógeno. _____ 122
- Figura 20.** Perfil de ácidos grasos de las dos microalgas, bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno. _____ 122

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Análisis de conglomerados jerárquicos para <i>Chlorella</i> . _____	142
ANEXO 2. Modelo de regresión múltiple lineal inicial para la concentración de lípidos en equilibrio de nitrógeno (N+) para <i>Chlorella</i> _____	143
ANEXO 3. Modelo de Regresión lineal múltiple con interacciones para la concentración de lípidos en condiciones de equilibrio de nitrógeno (N+) (<i>Chlorella</i>) _____	144
ANEXO 4. Modelo de regresión lineal para Productividad de lípidos en condiciones de equilibrio de nitrógeno, para <i>Chlorella</i> _____	145
ANEXO 5. Modelo seleccionado para productividad de lípidos condiciones equilibradas de nitrógeno (<i>Chlorella</i>) _____	146
ANEXO 6. Regresión lineal múltiple para la concentración de lípidos en deficiencia de Nitrógeno (<i>Chlorella</i>). _____	147
ANEXO 7. Modelo de Regresión lineal con interacciones para la concentración de lípidos en condiciones deficiencia de nitrógeno (<i>Chlorella</i>). _____	148
ANEXO 8. Regresión lineal múltiple para la productividad de lípidos en condiciones de deficiencia de nitrógeno (<i>Chlorella</i>) _____	149
ANEXO 9. Modelo de regresión cuadrático para la productividad de lípidos en condiciones de deficiencia de nitrógeno (<i>Chlorella</i>). _____	150
ANEXO 10. Diferencia de medias de la concentración de lipidos de <i>Chlorella</i> N+ vs N- _____	151
ANEXO 11. Diferencia de medias para la productividad de lípidos de <i>Chlorella</i> N+ vs N- _____	151
ANEXO 12. Análisis de conglomerados jerárquicos para <i>B. braunii</i> _____	152

ANEXO 13. Análisis de regresión múltiple para la concentración de lípidos en condiciones estándar de nitrógeno (<i>B. braunii</i>). _____	153
ANEXO 14. Modelo para concentración de lípidos con las variables significativas en condiciones estándar de nitrógeno (<i>B. braunii</i>). _____	154
ANEXO 15. Análisis de regresión múltiple <i>B. braunii</i> para la concentración de lípidos en condiciones deficiencia de nitrógeno. _____	155
ANEXO 16. Modelo seleccionado para <i>B. braunii</i> con las variables significativas en condiciones de deficiencia de nitrógeno _____	156
ANEXO 17. Diferencia de medias para la concentración de lípidos en <i>B. braunii</i> _____	157

RESUMEN

Las microalgas han recibido especial interés en los últimos años puesto que pueden llegar a producir hasta un 70% o valores superiores de lípidos, utilizando como fuente de carbono CO₂ el cual es considerado un gas de efecto invernadero. Los lípidos de microalgas pueden almacenarse en forma de triglicéridos, constituidos por ácidos grasos de cadenas largas (C16-C18), con bajo grado de insaturación los cuales son deseables en la producción de biodiesel. Asimismo, muchas microalgas pueden producir ácidos grasos con alto grado de insaturación importantes en la dieta y salud humana.

El presente estudio revisó la información disponible en la literatura sobre microalgas de la división *Chlorophyta*, potenciales para la producción de lípidos de interés industrial. Se seleccionó cinco microalgas *Chlorella*, *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus*, *Neochloris oleoabundans*, *Parietochloris incisa*, las cuales presentaron los mayores valores de concentración de lípidos reportados en la literatura. Dos de estas microalgas: *Chlorella* y *Botryococcus braunii* se utilizaron para la construcción de modelos puesto que presentaron la mayor cantidad de datos disponibles. Los dos microalgas se evaluaron en dos condiciones: deficiencia y equilibrio de nitrógeno. A través de la minería de datos se extrajeron los datos para la construcción de modelos que permitieran establecer la relación de las variables concentración de nitrógeno, CO₂, intensidad de luz y temperatura sobre la concentración y la productividad de lípidos. Para el ajuste de los modelos primero se realizó un análisis exploratorio cualitativo por medio de la agrupación de variables a través de análisis por conglomerados jerárquicos, posteriormente se realizaron regresiones lineales simples y múltiples para evaluar el ajuste de los modelos. Para la concentración de lípidos en condiciones deficiencia de nitrógeno para la microalga *Chlorella* y *B. braunii* las variables significativas fueron la concentración de nitrógeno, CO₂ y la interacción entre estas dos variables, que solo estuvo presente en *Chlorella*. En condiciones de equilibrio de nutrientes

además de las anteriores variables, la luz fue significativa para las dos especies. La productividad de lípidos solo fue evaluada en *Chlorella* puesto que para *B. braunii* no se encontraron datos suficientes para el ajuste de modelos. En *Chlorella* la productividad de lípidos se encontró altamente influenciada por la concentración de nitrógeno y la luz, con efectos menores de la temperatura en las dos condiciones evaluadas.

El nitrógeno se presentó como una de las variables con mayor impacto sobre la concentración de lípidos y con efecto negativo sobre la respuesta. Es decir, las concentraciones menores e incluso la deficiencia de este nutriente maximiza la producción de lípidos. Los modelos también permitieron evidenciar que el nitrógeno no es el único factor que afecta la productividad y la acumulación de lípidos ya que estas se ven favorecidas por la presencia de luz y de carbono. Las explicaciones biometabólicas permitieron establecer que éstas últimas, también son importantes en el proceso, puesto que el metabolismo no podría llevarse a cabo si no existiese la luz la cual es necesaria para la fotosíntesis y la fijación de CO₂, que son importantes para la producción de Acetil-CoA necesaria para dar inicio a la síntesis de ácidos grasos.

Los modelos seleccionados permitieron una mejor comprensión del efecto de las variables de proceso sobre la producción de lípidos en las microalgas *Chlorella* y *B. braunii*. Lo anterior servirá como punto de partida para estandarizar procesos fotoautótrofos orientados hacia la producción de lípidos de interés industrial, con microalgas de la división *Chlorophyta*.

Palabras clave: Microalga, lípidos, *Chlorophyta*, biodiesel, parámetro de proceso, fotótrofo, minería de datos, regresión.

ABSTRACT

Microalgae have received particular attention in recent years because they can produce up to 70% or higher values of lipids, using CO₂ as a carbon source which is considered a greenhouse gas. Lipids of microalgae can be stored as triglycerides, consisting of long fatty acids chains (C16-C18), with a low degree of unsaturation which are a desirable characteristic in the production of biodiesel. Furthermore, many microalgae can produce fatty acids with a high degree of unsaturation important for human health.

This study reviewed the information available in the literature on the algae division *Chlorophyta*, organisms with high potential for lipid production at industrial level. Five microalgae were selected *Chlorella*, *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus*, *Neochloris oleoabundans*, *Parietochloris incisa*, which had the highest lipid concentration values reported in the literature. Two of these algae; *Chlorella* and *Botryococcus braunii* were used for model building as they had the largest amount of data available. The two algae were evaluated in two conditions: deficiency and nitrogen balance. Through data mining, data were extracted for the construction of models that allow establishing the relationship between the variables: nitrogen concentration, CO₂, temperature and light intensity on lipid concentration and productivity. For the fit of the models exploratory analysis was performed initially using qualitative grouping variables through hierarchical cluster analysis. Single and multiple linear regressions were subsequently used to evaluate the fit of the models. For the concentration of lipids in nitrogen deficient conditions for *Chlorella* and *B. braunii* the significant variables were the concentration of nitrogen, CO₂ and the interaction between these two variables, which was only present in *Chlorella*. Under nutrient equilibrium conditions in addition to the above variables mentioned, light was significant for both species. Lipid productivity was only evaluated in *Chlorella* as for *B. braunii* not enough data was found for models fitting. In *Chlorella*

lipid productivity was highly influenced by the concentration of nitrogen and light, with minor effects of temperature on the two conditions evaluated.

Nitrogen is introduced as one of the variables with the greatest impact on lipid levels and negative effect on the response. That is, even lower concentrations and the lack of this nutrient maximizes lipids production. The models also show that nitrogen is not the only factor that affects productivity and the accumulation of lipids as these are favored by the presence of light and carbon. The biometabolics explanations established that the latter are also important in the process, since the metabolism cannot be done if there were no light which is necessary for photosynthesis and CO₂ fixation, which are important for the production of Acetyl-CoA required to initiate fatty acid synthesis.

Selected models allowed a better understanding of the effect of process variables on lipid production in *Chlorella* and *B. braunii* microalgae. This will serve as a starting point to standardize photoautotrophs processes oriented through industrial lipid production with microalgae of the division *Chlorophyta*.

Key words: Microalgae, lipids, *Chlorophyta*, biodiesel, process parameter, phototroph, data mining, regression.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las microalgas han adquirido gran importancia, puesto que diversas investigaciones han establecido su potencial en la obtención de numerosas biomoléculas de interés industrial tales como ficobiliproteínas, polisacáridos, proteínas, ácidos grasos, y otros metabolitos secundarios (Ördög et al., 2004; Roeselers et al., 2008). Las aplicaciones actuales para las biomoléculas aisladas de las diversas clases de algas es amplio (Cardozo, 2007), dentro de estas sobresalen las aplicaciones en nutrición humana y animal, elaboración de cosméticos, biocombustibles, pigmentos, entre otros (Spolaore et al., 2006).

Los lípidos han recibido una creciente atención, puesto que algunas microalgas sintetizan ácidos grasos de cadena larga (C16-C18) con bajo grado de insaturación deseables para la producción de biodiesel (Xu et al., 2006). Asimismo, el contenido de lípidos en microalgas puede llegar hasta un 75% de su peso seco o incluso a valores superiores (Chisti, 2007; Hu et al., 2008; Rodolfi et al., 2009). Lo anterior hace que las microalgas se conviertan en una opción comercial para la producción de aceites para biodiesel, dentro de un mercado actual donde se buscan materias primas alternativas que no estén en competencia con la producción de alimentos para humanos.

El biodiesel a partir de lípidos microalgales ofrece ventajas en contraste con las plantas oleaginosas tales como: mayor eficiencia fotosintética, periodos cortos de producción sostenida durante todo el año, cultivos independientes de la estacionalidad y de la fertilidad del suelo, requieren menos extensiones de terreno y cantidades de agua para su cultivo. El contenido lipídico en las microalgas puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, además ofrece la posibilidad de obtener subproductos (biopolímeros, pigmentos, biogás, antioxidantes, fármacos y nutraceuticos) de alto valor agregado, una vez extraída

la fracción lipídica de la biomasa. (Chisti, 2007; Li et al., 2008; Garibay et al., 2009; Gouveia & Oliveira, 2009; Rodolfi et al., 2009).

El Departamento de Energía de los Estados Unidos (2010), en su estudio sobre el potencial de las microalgas para biocombustibles estipula, que los aceites de estos microorganismos se presentan como potenciales substitutos del petrodiesel, sin embargo, se afirma que su producción actualmente no es rentable, aún con la caída del precio del crudo, debido principalmente a sus costos de producción. En la búsqueda de incrementar su competitividad, se han planteado diferentes estrategias productivas orientadas hacia el mejoramiento del proceso, la ingeniería genética, metabólica, ingeniería de fotobiorreactores, modelos productivos integrados como las biorefinerías y nuevas alternativas orientadas hacia su escalamiento a nivel industrial.

Los lípidos de microalgas también son considerados biomoléculas de alto valor agregado, puesto que dentro de la fracción lipídica de algunas especies se encuentran ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), tales como el ácido araquidónico (AA, 20:4 ω -6), eicosapentanoico (EPA, 20:5 ω -3), docosahexanoico (DHA, 20:6 ω -3); entre otros, los cuales se consideran importantes en la dieta y salud de animales y humanos (López et al., 1998).

Actualmente, se encuentran en desarrollo diversas investigaciones orientadas hacia el uso de ácidos grasos de microalgas como ingrediente funcional para el desarrollo de alimentos, productos nutracéuticos y suplementos alimenticios. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), particularmente el ácido docosahexanoico (DHA), se ha demostrado que es importante en el desarrollo y funcionamiento del cerebro, la retina y los tejidos reproductivos en niños y adultos. Éstos también han sido investigados en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, incluyendo problemas cardiovasculares, diversos tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias (Hejasi & Wijffels, 2004).

La producción de alimentos enriquecidos con ácidos grasos de la familia omega 3, considerados como funcionales, se ha incrementado en los últimos años en Europa y EE.UU. En la actualidad, existe una gran variedad de productos alimenticios de este tipo, dentro de los que se incluyen productos de panadería y pastelería, leche y derivados, grasas para untar, huevos, jugos y bebidas no alcohólicas, productos cárnicos, aves de corral, entre otros (Rubio-Rodríguez et al., 2010). La ventaja del uso de ácidos grasos de este tipo, proveniente de microalgas radica principalmente en que éstos no poseen el olor y sabor característicos del aceite de pescado, contienen una alta proporción de ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentanoico (EPA), y son más estables a la degradación oxidativa que aquellos obtenidos de otras fuentes (Hejasi & Wijffels, 2004).

Las microalgas han adquirido una importancia relevante para su aplicación en el sector industrial, esto ha hecho que se genere gran cantidad de estudios e información en las que se comprueba el potencial de estos microorganismos en la producción de aceites. La deficiencia de nutrientes, especialmente el nitrógeno, es bien conocido como un factor de estrés que incrementa el contenido de lípidos en muchas especies de microalgas (Griffiths & Harrison, 2009). Sin embargo, los estudios disponibles no explican de manera clara el efecto que ejercen otras variables importantes en la producción de microalgas; como la intensidad de luz, concentración de carbono y temperatura. Asimismo, no existen estudios que determinen el efecto de las interacciones de estas variables de manera conjunta, sobre el metabolismo y rendimiento lipídico para las especies consideradas como potenciales en la producción de lípidos.

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente proyecto pretende desarrollar modelos de minería de datos, que permitan explicar la relación entre las variables experimentales y sus interacciones significativas, sobre la producción de lípidos en microalgas, de la división *Chlorophyta*. Con las variables y relaciones significativas encontradas, se propondrán explicaciones biometabólicas que junto a los modelos

matemáticos, servirán para la comprensión de los procesos fotótrofos como herramienta necesaria para garantizar un escalamiento acertado de la producción de lípidos a partir de microalgas.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre los parámetros de proceso y la producción de lípidos de interés industrial en cinco microalgas pertenecientes a la división *Chlorophyta* a través de la construcción de modelos matemáticos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las cinco microalgas de la división *Chlorophyta* con mayor potencial para la producción de lípidos a través de la revisión sistemática de artículos publicados en bases de datos de alto impacto.
- Analizar la relación de los parámetros de proceso (temperatura, CO₂, intensidad de luz, concentración de nutrientes) que afectan de manera significativa la producción de lípidos en las cinco microalgas seleccionadas.
- Definir modelos matemáticos que expliquen en qué medida aporta cada uno de los parámetros de proceso sobre la producción de lípidos.
- Proponer explicaciones bio-metabólicas de las relaciones significativas encontradas en los modelos propuestos.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Concentraciones de lípidos en microalgas.

Las microalgas han sido catalogadas como microorganismos con alto potencial de uso en la industria, entre otras particularidades por su capacidad de acumular altas concentraciones de lípidos. Actualmente, en los estudios publicados para una misma cepa se pueden encontrar reportados amplios rangos de concentraciones lipídicas, sin especificarse en muchos de ellos las condiciones en que estos valores fueron obtenidos. Por lo tanto, los estudios publicados no permiten establecer un valor confiable de concentración lipídica que permita replicar los procesos y establecer un valor confiable con miras al escalamiento de la producción de lípidos a partir de microalgas.

Las microalgas en su composición natural contienen de un 20-30% de lípidos de su peso seco (Griffiths & Harrison, 2009). En la literatura se encuentran reportados valores en un rango del 1 al 80% e incluso superiores (Chisti, 2007; Hu et al., 2008; Schenk et al., 2008; Meng et al., 2009; Rodolfi et al., 2009). Por lo tanto, se requiere de una investigación que permita entender los factores que han llevado a obtener estos porcentajes tan variados, puesto que los reportes existentes, no permiten vislumbrar una relación entre las variables de proceso y la concentración de lípidos. Todas estas razones como se discute más adelante, dificultan realizar una selección directa y confiable de las microalgas que podrían ser usadas a nivel comercial, tanto para la producción de biodiesel como para uso alimentario.

Existen investigaciones en las cuales se recopila y analiza la información disponible a cerca de las microalgas productoras de lípidos, como la realizada por Griffiths & Harrison (2009), donde se resume y analiza la información disponible en la literatura de 55 cepas microalgales oleaginosas incluyendo 17 *Chlorophyta*,

11 *Bacillariophyta* y 5 *Cyanobacterias*. Sin embargo, los datos disponibles están lejos de poder hacer una comparación rigurosa y completa por la variabilidad de los datos, dada principalmente por las diferentes condiciones de los experimentos.

2.2 Factores que afectan la producción de lípidos en microalgas.

En la producción de lípidos a partir de microalgas se ha demostrado que existen muchos factores que influyen en el tipo y rendimiento de éstos. Brennan & Owende (2010), reportan estudios en los que se manifiesta que es posible incrementar la concentración de lípidos mediante la variación de los niveles de nitrógeno, la salinidad del medio de cultivo, la intensidad de luz, la temperatura y la concentración de CO₂. Sin embargo, los estudios existentes sobre estas variables no explican el efecto de la interacción de las variables sobre la acumulación de lípidos ya que cada una se evalúa por separado, en la mayoría de los casos. El desconocimiento de este tipo de información de manera agrupada hace que se carezca de evidencia clara, del rol de las variables de proceso y sus interacciones, en la acumulación y síntesis de lípidos.

El estudio de las variables experimentales es relevante puesto que cada una de ellas influye sobre la producción de lípidos y de biomasa. Por ejemplo, estudios de Sheehan et al. (1998), establecen que algunas algas son más productivas a altas temperaturas y con una mayor intensidad de luz, mientras que otras se ven afectadas por la intensidad de luz generando una disminución en su crecimiento. Se debe tener cuenta que un alto crecimiento, incrementa la productividad de biomasa y tal como lo establece Borowitzka (1992), una alta densidad de la biomasa incrementa el rendimiento por unidad de volumen de cosecha y disminuye el costo de producción. Asimismo, la concentración de nutrientes y la temperatura se han reportado como factores que afectan la producción de lípidos (Hu et al., 2008), que se deben tener en cuenta puesto que, un alto contenido de

producto deseado aumenta el coeficiente de rendimiento del proceso y reduce los costos de extracción y purificación por unidad de producto (Borowitzka, 1992).

Es importante destacar que la acumulación de lípidos se refiere al aumento en la concentración de lípidos en las células, sin considerar la producción de biomasa. La productividad lipídica tiene en cuenta la concentración de lípidos en las células y la biomasa producida; estos datos son esenciales puesto que son considerados como un indicadores de los costos de producción (Brennan & Owende, 2010), tanto para la producción de biodiesel como para ácidos grasos de interés alimentario.

Con el fin de lograr una mayor rentabilidad en los procesos de producción de aceites de microalgas se ha avanzado en diferentes estrategias o factores de estrés para mejorar la acumulación de lípidos en las microalgas. Una de las más evaluadas es la deficiencia de nutrientes. Amplios estudios en diferentes géneros de microalgas tales como *Botryococcus*, *Chlorella*, *Monodus* y *Neochloris*, revelan que cambios nutricionales direccionan el metabolismo hacia la biosíntesis y acumulación de lípidos (Verma et al., 2010). Las deficiencias de nitrógeno y fósforo son consideradas importantes para la concentración de lípidos en diferentes comunidades de algas (Takagi et al., 2006).

Griffiths & Harrison (2009), establecen que la limitación de nutrientes especialmente nitrógeno y silicio es considerada la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de lípidos en microalgas, después de examinar el contenido lipídico para algas verdes (*Chlorophyta*) y algas verde-azules (*Cyanobacteria*) bajo condiciones de suficiencia y limitación de estos dos nutrientes.

Otros factores, menos estudiados como la salinidad del medio, temperaturas excesivamente altas o bajas y variaciones en el pH, también se han considerado

como elementos que afectan la acumulación de lípidos y el tipo de ácidos grasos presentes en diferentes especies de microalgas (Verma et al., 2010).

Factores como la temperatura también han sido asociados con la composición de ácidos grasos de las algas. Una tendencia general sobre el incremento de la insaturación de los ácidos grasos con la disminución de la temperatura y el aumento de los ácidos grasos saturados con el incremento de la temperatura se ha observado en muchas algas y cianobacterias. El grado de insaturación también se estima que puede ser alterado por la intensidad de la luz (Hu et al., 2008).

Mata et al. (2010), reportan que además de los equipos necesarios para el crecimiento de microalgas, es esencial prestar mucha atención a la selección de las especies de microalgas, las condiciones de cultivo y los nutrientes disponibles para su crecimiento. Estos autores plantean que se debe tener en cuenta los siguientes factores:

- Tasa de crecimiento, medida por la cantidad total de biomasa acumulada por unidad de tiempo y unidad de volumen.
- Contenido de lípidos, enfocada, hacia el tipo de lípidos, dependiendo de la aplicación industrial a la que se oriente.
- Resistencia a los cambios ambientales, en particular, temperatura, nutrientes de entrada, luz y competencia de otras especies de microalgas y / o bacterias.
- Disponibilidad de nutrientes, en particular de las fuentes de dióxido de carbono cuando se considere el uso de carbono residual.
- Facilidad de separación de la biomasa y recuperación de biomoléculas (lípidos).
- Posibilidad de obtención de otros productos químicos valiosos.

Como puede evidenciarse anteriormente los criterios relevantes para la producción de biomoléculas a partir de microalgas, deben ser específicos y estudiados

detalladamente con el fin de establecer un proceso viable y escalable a nivel industrial. Además de los aspectos considerados anteriormente, Lassing et al., (2008), reportan que para lograr la tasa de producción de aceite más alta posible, el contenido de lípidos deberá estar balanceado con la cinética de crecimiento. Estos autores hacen algunas recomendaciones para la implementación de un proceso de producción de aceites a partir de microalgas, donde se destaca que para este propósito se deberá seleccionar una especie de alga robusta puesto que esto generará la ventaja de tener un sistema menos sensible a las variaciones de temperatura, pH y salinidad del medio de cultivo. Asimismo, se deberá tener en cuenta la cantidad y la composición de los lípidos, lo cual será importante para lograr procesos de separación simples y mínima cantidad de procesos posteriores para la recuperación del producto. Por último pero no menos importante, los autores recomiendan tener especial cuidado para que la cepa seleccionada sea bien conocida y que exista investigación e información suficiente sobre la misma.

2.3 Potencial de los aceites de microalgas para aplicaciones alimentarias

Comparadas con las cianobacterias, las microalgas eucariotas contienen generalmente gran cantidad de ácidos grasos insaturados. Muchas de ellas poseen ácidos grasos de cadena larga (>18C) poliinsaturados (AGPI) como componentes principales. Esta particularidad se presenta básicamente en algunas especies marinas. El 20% o más del total de los ácidos grasos está constituido por ácido araquidónico (AA), eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA), por esta razón las microalgas han adquirido gran importancia a nivel nutricional, puesto que los AGPI son considerados como esenciales en las dietas saludables (Harwood & Guschina, 2009).

El aceite de pescado y el pescado son las fuentes más comunes de AGPI de cadena larga (DHA y EPA), pero actualmente los problemas de seguridad han aumentado debido a la posible acumulación de toxinas en el pescado. Además, la

aplicación de este aceite como aditivo alimentario es limitada debido a problemas relacionados con su olor característico, sabor desagradable y pobre estabilidad oxidativa. Como los AGPI, se encuentran en el pescado procedente de microalgas consumidas en entornos oceánicos, es lógico considerar a las microalgas como fuente potencial de AGPI (Spolaore et al., 2006).

Los AGPI, exhiben un amplio rango de efectos benéficos sobre la salud humana y puede influir en diferentes enfermedades y trastornos. Son considerados nutrientes esenciales, puesto que no pueden ser sintetizados por los humanos. El ALA puede ser convertido en EPA y DHA en el cuerpo humano, pero el alcance de esta conversión en el mejor de los casos es limitada e ineficiente (Kalogeropoulos et al., 2010).

En la industria alimentaria, ácidos grasos como el ARA y el DHA se han utilizado ampliamente para la fortificación de fórmulas infantiles en muchas partes del mundo. El mercado mundial al por mayor de las formulas infantiles se estima en alrededor de US\$ 10 millones al año (Spolaore et al., 2006), lo cual representa una alternativa para la aplicación de ácidos grasos extraídos de microalgas para la fortificación de este tipo de productos.

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), son importantes en el desarrollo y funcionamiento del cerebro, la retina, tejidos y en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos cardiovasculares y enfermedades inflamatorias (Hejasi & Wijffels, 2004). Muchas investigaciones se han centrado en el estudio de las microalgas y sus biomoléculas para el desarrollo de alimentos funcionales y productos nutraceuticos por su potencial en promoción de la salud en su mayoría atribuidos a sus ácidos grasos, antioxidantes y otros compuestos bioactivos (Shahidi, 2008).

2.4 Aceites de microalgas como materia prima alternativa en la producción de biodiesel

Una de las ventajas de los ácidos grasos de microalgas frente a los de semillas oleaginosas radica principalmente en que estos microorganismos presentan un espectro de ácidos grasos más grandes, con estructura molecular de más de 18 carbonos, deseables en la elaboración de biodiesel (Belarbi et al., 2000). Las microalgas también se consideran una fuente alternativa con mucho potencial, debido a su sencilla estructura celular, mayores índices de biomasa y producción de aceites, comparados con los cultivos oleaginosos convencionales.

La producción de biodiesel a partir de lípidos microalgales es una alternativa que asegura satisfacer la demanda global de petrodiesel dado que esta tecnología ofrece ventajas en contraste con las plantas oleaginosas tales como mayor eficiencia fotosintética, periodos cortos de producción sostenida durante todo el año, cultivos independientes de la estacionalidad, requieren de menos extensiones de terreno y menores cantidades de agua para su cultivo, además su contenido lipídico puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo y ofrece una ventaja adicional dada la posibilidad de obtener subproductos (biopolímeros, pigmentos, biogás, antioxidantes, fármacos y nutraceúticos) a partir de la biomasa residual una vez que los lípidos han sido extraídos. (Sheehan et al., 1998; Kalacheva et al., 2002; Chisti, 2007; Dismukes et al., 2008; Hu et al., 2008; Li et al., 2008; Rittmann, 2008; Schenk et al., 2008; Garibay-Hernandez et al., 2009; Gouveia & Oliveira, 2009; Meng et al., 2009; Rodolfi et al., 2009; Norsker et al., 2011).

Comparando las microalgas con otros cultivos oleaginosos, no solo son más fáciles de manejar y más beneficiosas desde el punto de vista económico, sino que también son conocidas por su capacidad de biorremediación (Verma et al., 2010). Los lípidos de microalgas presentan grandes perspectivas en la producción

de biodiesel, pues estos microorganismos se caracterizan por acumular grandes cantidades de triglicéridos y su perfil de ácidos grasos de cadena larga (16-18C) con bajo grado de insaturación (monoinsaturados o saturados) las hace deseable para la elaboración de biodiesel de calidad, por su estabilidad oxidativa (Knothe, 2005).

En cuanto a los costos de producción de biodiesel a partir de microalgas, estudios de varios autores (Chisti, 2007, Satyanarayana et al., 2010), estiman la producción de 1kg de biomasa microalgal en US\$2,95 si se produce en fotobiorreactores; mientras que afirman que el costo puede disminuir (US\$0,47) si se incrementa la producción anual a 10.000 toneladas. Con estos valores los mismos autores establecen que si la biomasa contiene alrededor de un 30% de lípidos, el costo para proporcionar 1L de aceite recuperado a partir de la biomasa estaría en US\$2,80, lo que indica que el precio por litro de aceite de microalgas es mucho mayor al del aceite crudo de palma considerado como la fuente más barata de aceite vegetal que se vende a un precio promedio de US\$0,52/L (Chisti, 2007). De lo anterior, se puede establecer que para lograr una producción rentable de aceite de microalgas es necesario desarrollar diferentes estrategias que permitan no solo incrementar el contenido de lípidos en las células sino también su productividad en biomasa, junto al aprovechamiento de todos los subproductos generados en el proceso.

El presente estudio propone identificar las especies de microalgas de la división *Chlorophyta* con alto potencial para la producción de lípidos, a partir de los estudios publicados, en bases de datos de alto impacto. Posteriormente, a través de minería de datos se plantea, realizar modelos matemáticos para identificar las variables experimentales y sus interacciones, que ejercen un efecto significativo en la concentración y productividad de lípidos. Lo anterior, junto a las explicaciones bio-metabólicas de estos efectos, permitirá establecer herramientas

matemáticas que puedan mejorar la comprensión del proceso de producción de aceites de microalgas para un posterior escalamiento a nivel industrial.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de microalgas

Las microalgas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares que comprenden organismos eucariotas y a cianofíceas procariotas (cianobacterias). Se consideran uno de los grupos de organismos más versátiles en términos de tamaño, forma y función ecológica y se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (Garibay-Hernández et al., 2009). De la misma manera que las plantas, ellas convierten la energía solar en energía química mediante la fotosíntesis (Albarracín, 2007).

Las clases más importantes de algas son: las algas verdes (*Chlorophyta*), las algas rojas (*Rhodophyta*) y las diatomeas (*Bacillariophyta*). Las algas pueden ser autótrofas o heterótrofas, las primeras requieren únicamente compuestos inorgánicos como el CO₂, sales y la luz como fuente de energía para el crecimiento, mientras que las segundas no son fotosintéticas por lo que requieren una fuente externa de compuestos orgánicos, así como de nutrientes como fuente de energía. Algunas algas fotosintéticas son mixotróficas, es decir, tienen la capacidad tanto de realizar la fotosíntesis como de utilizar nutrientes exógenos orgánicos. Para las algas autótrofas, la fotosíntesis es un componente clave de supervivencia, por el que convierten la radiación solar y el CO₂ absorbido por los cloroplastos en adenosin trifosfato (ATP) y O₂, utilizable a nivel celular para la respiración y para producir energía en sus actividades de crecimiento (Brennan & Owende, 2010).

La división *Chlorophyta* fue seleccionada como objeto de estudio puesto que entre las eucariotas, estas son las más utilizadas en aplicaciones comerciales. Sin

embargo existen grupos de microalgas como las diatomeas o grupo de microalgas ricas en silicio y cianobacterias procariotas que también ofrecen grandes oportunidades en biotecnología e ingeniería metabólica (Rosenberg et al., 2008).

Las microalgas de la división *Chlorophyta* o también llamadas algas verdes, son consideradas como uno de los grupos más especializados que comprenden una variedad de organismos con alto potencial de estudio. Dentro de este grupo se encuentran microalgas con diversas morfologías y aunque muchas provienen de agua dulce, un gran número de estas también crecen en hábitats marinos y terrestres (Richmond, 2004). Muchas de estas algas son adaptables a condiciones extremas de temperatura, salinidad y humedad. Esta habilidad para adaptarse a condiciones cambiantes y de estrés severo se refleja en el patrón de diversos y a veces inusuales perfiles lipídicos presentes en sus membranas (Thompson, 1996).

3.2 Clasificación y aplicación industrial de los lípidos.

Los lípidos son un grupo de compuestos generalmente constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno, que integran cadenas alifáticas o aromáticas, aunque en ocasiones también contienen fósforo y nitrógeno. Debido al gran número de sustancias consideradas como lípidos, existen diferentes métodos para clasificarlos. Lo más común es clasificarlos en tres grupos de acuerdo a su estructura química (Baduí, 1993) (Figura 1).

-
- A. Lípidos simples.** Ésteres de ácidos grasos y alcoholes
1. *Grasas y aceites.* Ésteres de glicerol y alcoholes con ácidos monocarboxílicos
 2. *Ceras.* Ésteres de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos.
- B. Lípidos compuestos.** Lípidos simples conjugados con moléculas no lipídicas.
1. *Fosfolípidos:* Ésteres que contienen ácidos fosfórico en lugar de un ácido graso, combinado con una base de nitrógeno.
 2. *Glucolípidos.* Compuestos de carbohidratos, ácidos grasos y esfingosinol, llamados también cerebrósidos.
 3. *Lipoproteínas.* Compuestos de lípidos y proteínas
- C. Compuestos asociados.**
1. *Ácidos grasos* (derivados de lípidos simples)
 2. *Pigmentos*
 3. *Vitaminas liposolubles.*
 4. *Esteroles.* Entre los esteroides más destacados se encuentran las hormonas sexuales, las corticosteroides, el colesterol.
 5. *Hidrocarburos*
-

Figura 1. Clasificación de los lípidos

Fuente: BADUI, S. (1993). Química de los Alimentos. (3ª ed.). México D.F: Person.

Las grasas y los aceites son los lípidos más abundantes e importantes para la aplicación industrial. Éstos químicamente son mezclas de triglicéridos, con cantidades menores de otros lípidos. Los triglicéridos están constituidos por una molécula de glicerol (alcohol) a la cual se encuentran unidos tres ácidos grasos (Madigan et al., 1999).

Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas lineales con un grupo metil (CH_3) y un grupo carboxilo al final (Metz et al., 2001). Existe un amplio espectro de ácidos grasos de diferente longitud de cadena de carbonos, los más frecuentes en la naturaleza son los ácidos grasos de 18 átomos de carbono. Estos ácidos grasos también pueden presentar dobles enlaces, si solo presentan un enlace dentro de la estructura, se denominan ácidos grasos monoinsaturados, si hay dos o más dobles enlaces poliinsaturados y si por el contrario la cadena no presenta dobles enlaces, son designados saturados (Baduí, 1993).

Los ácidos grasos poliinsaturados, se clasifican en n-6 (ω -6) y n-3 (ω -3) según la posición del doble enlace con respecto al metilo terminal de la molécula. El principal ácido graso n-6 es el ácido linoléico (18:2 ω -6), presente en los aceites vegetales de maíz, girasol y soja. El ácido γ -linolénico (18:3 ω -3) predomina en las plantas; y aquellos ácidos grasos n-3 de cadena más larga, como el eicosapentanoico (EPA, 20:5 ω -3) y el docosahexanoico (DHA, 22:6 ω -3) abundan en los pescados, mariscos y aceites marinos (Hernández, 2004).

Los principales componentes de la fracción lipídica en las microalgas son los triglicéridos ó triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glucolípidos (predominantes en membranas de los cloroplastos), fosfolípidos (abundantes en plasmalema y diversos sistemas endomembranosos), aunque pueden presentarse compuestos inusuales tales como ácidos grasos halogenados e hidroxilados, entre otros. (Metzger & Largeau, 2005; Guschina & Harwood, 2006; Hu et al., 2008).

3.2.1 Biodiesel

El biodiesel es una mezcla de ésteres de ácidos grasos obtenidos por transesterificación de los aceites vegetales o las grasas animales. Las materias primas lipídicas están compuestas por 90-98% (Peso) de triglicéridos y pequeñas cantidades de los mono y diglicéridos, ácidos grasos libres (1-5%), y cantidades residuales de fosfolípidos, fosfátidos, carotenos, tocoferoles, compuestos sulfurosos, y los trazas de agua (Bozbas, 2008)

La transesterificación es una reacción de varios pasos, entre ellos tres etapas reversibles en serie, donde los triglicéridos se convierten en diglicéridos, a continuación estos se convierten en monoglicéridos, y luego se convierten en ésteres metílicos (biodiesel) y glicerol (subproducto). La reacción de

transesterificación general se describe en la figura 2, donde los radicales R₁, R₂ y R₃ representan largas cadenas de hidrocarburos, conocidos como ácidos grasos. Para la reacción de transesterificación el aceite o grasa y una cadena corta alcohol (generalmente metanol) se usan como reactivos en presencia de un catalizador (usualmente hidróxido de sodio (NaOH)) (Mata et al., 2010).

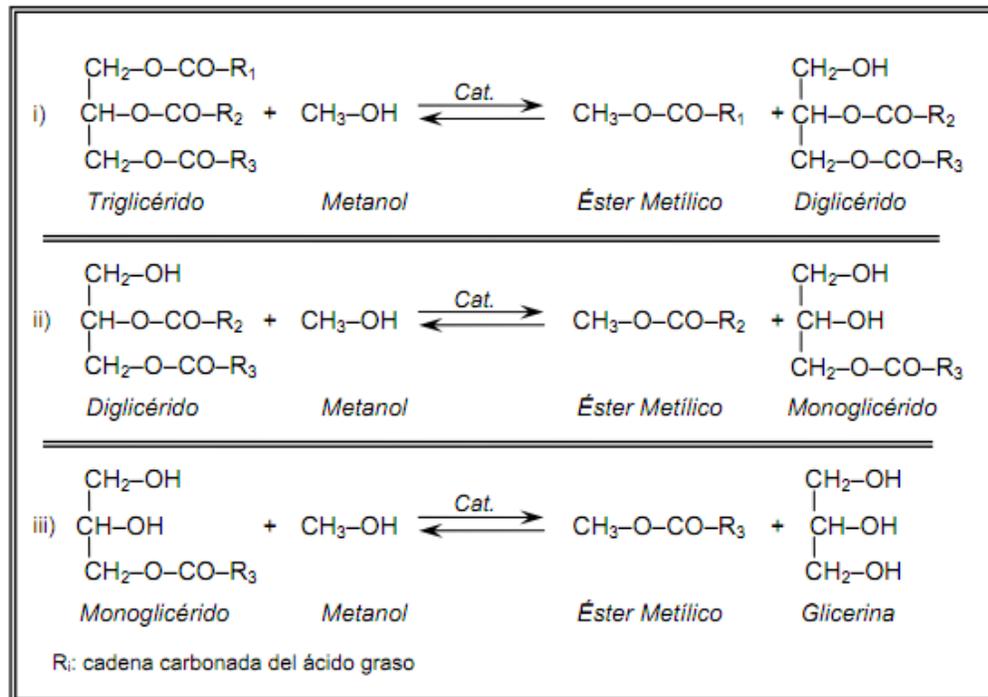


Figura 2. Etapas del proceso de transesterificación de triglicéridos para la obtención de biodiesel.

Se presentan las diferentes reacciones que tienen lugar en la transesterificación, la cual consiste químicamente en tres reacciones reversibles y consecutivas. El triglicérido es convertido consecutivamente en diglicérido, monoglicérido y glicerina. En cada reacción un mol de éster metílico es liberado.

Fuente: GARCÍA, C.J. M & GARCÍA, L.J.A. (2006). Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol. Informe de vigilancia tecnológica. Madrid. España., de, http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt4_biocarburantes_liquidos_biodiesel_y_bioetanol.pdf. Consultado 2011

La introducción y comercialización del biodiesel en varios países ha dado lugar al establecimiento de normas que regulan sus propiedades y su calidad. Los

estándares usualmente utilizados son la norma ASTM D6751 en Estados Unidos y las normas europeas EN 14213 (biodiesel para calefacción) y EN 14214 (biodiesel para uso vehicular) (Knothe, 2005). En términos generales las disposiciones de esta normatividad precisa que las materias primas para la elaboración de biodiesel deben estar enriquecidas en ácidos grasos de cadena larga con elevado grado de saturación. Se prefiere la presencia de ácidos grasos como el palmitoleico (16:1), oleico (18:1) y mirístico (14:0) que permitan disminuir las emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del biocombustible (número de cetano, poder calorífico y estabilidad oxidativa), sin comprometer sus características de flujo, viscosidad y lubricidad (Knothe, 2005; Chisti, 2007; Schenk et al., 2008).

Según los estándares de la norma europea se acepta un biodiesel conformado por un máximo del 1% mol de ácidos grasos o metil ésteres de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés) con cuatro o más enlaces dobles, debido a que estos biocombustibles son susceptibles a oxidación durante el almacenamiento (Chisti, 2008). Sin embargo, si las materias primas contienen ácidos grasos insaturados en cantidad mayor que la establecida por la norma, pueden ser mejoradas mediante la hidrogenación catalítica, proceso normalmente realizado en la hidrogenación de aceites para la producción de margarinas (Jang et al., 2005; Dijkstra, 2006).

3.2.2 Ácidos grasos de alto valor nutricional.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, en especial el ácido araquidónico de la serie ω -6 (AA, C20:4 n-6) y el ácido docosahexanoico de la serie ω -3 (DHA, C22:6 ω -3), tienen una gran importancia en el neurodesarrollo infantil (Rivero et al., 2005). Un alto contenido de DHA en el cerebro y en la retina es esencial para el sistema nervioso central y la función visual (Atalah et al., 2009). Asimismo, se conoce que los ácidos grasos ω -3 son esenciales para el

normal crecimiento y desarrollo del individuo y juega un rol importante en la prevención y tratamiento de enfermedades coronarias, hipertensión, diabetes, artritis, otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes y cáncer (Simopoulos, 1999).

Actualmente, los aceites de pescado son la principal fuente de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) del tipo omega-3 (ω 3) como el ácido eicosapentanoico (C20:5 ω 3) y el ácido docosahexanoico (C22:6 ω 3). Se estima que en los próximos años la demanda por AGPI ω 3 aumentará debido al crecimiento de la industria acuícola y al incremento en la demanda de AGPI específicos para la elaboración de suplementos alimenticios para humanos y animales (Hinzpeter et al., 2006).

3.5 Estrés metabólico y síntesis de lípidos.

Las microalgas buscan adaptarse a sus condiciones ambientales con el fin almacenar o incrementar la eficiencia en la utilización de los recursos disponibles. En general el crecimiento de biomasa microalgal (que consiste en un 40-50% de carbono) depende del suministro suficiente de una fuente de carbono y luz para realizar la fotosíntesis (Mata et al., 2010). Sin embargo, se puede ajustar o cambiar su estructura interna, cuando en el exterior se realizan variaciones o se modifican los nutrientes disponibles (Richmond, 2004).

Existen varios factores que influyen en el crecimiento de algas: a) *Factores abióticos*, como la luz (calidad, cantidad), la temperatura, la concentración de nutrientes, la concentración de oxígeno, dióxido de carbono, pH, salinidad, y presencia de productos químicos tóxicos. b) *Factores bióticos*, tales como agentes patógenos externos (bacterias, hongos, virus) y la competencia con otras algas. c) *Factores operacionales*, tales como efecto de cizalla producido por el mezclado, la tasa de dilución, la profundidad, la frecuencia de la cosecha, y la adición de bicarbonato, entre otros (Mata et al., 2010).

La producción y composición de lípidos en las microalgas, dependen en primera medida de la especie y de su constitución genética. Sin embargo, ellos se pueden ver afectados por diversas condiciones físicas y químicas de cultivo, como la fase de crecimiento en que se encuentren las células, la disponibilidad y la clase de nutrientes, la salinidad del medio, el tipo y la intensidad de luz, la temperatura, el pH, e incluso, la asociación con otros microorganismos. La limitación de nutrientes y la adecuación a diferentes condiciones de su entorno hacen que se evidencien diversas respuestas en las células como cambios morfológicos, alteración en la permeabilidad de las membranas, acumulación de lípidos y/o polisacáridos, reducción de la actividad fotosintética y modificación de procesos metabólicos (Garibay-Hernández et al., 2009)

El metabolismo de los lípidos en microalgas no ha sido tan estudiado en comparación con el de las plantas superiores. Sin embargo, se cree que la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos se lleva a cabo de manera análoga que en las plantas, puesto que se han encontrado similitudes en ciertos genes y enzimas de origen vegetal y algal involucrados en la producción de lípidos. De esta forma se establece que los ácidos grasos y la formación de triglicéridos y otros lípidos celulares, son sintetizados en el cloroplasto usando un conjunto de enzimas de las cuales la Acetil-CoA Carboxilasa (ACCase, por sus siglas en inglés) es la que regula la tasa de síntesis de ácidos grasos (Hu et al., 2008).

3.5.1 Biosíntesis de ácidos grasos.

En algas, la síntesis de nuevos ácidos grasos ocurre principalmente en el cloroplasto. La ruta metabólica produce ácidos grasos de 16, 18 átomos de carbono o ambos. Estos ácidos grasos obtenidos son usados como precursores para la formación de membranas de los cloroplastos y otras membranas celulares, así como para la síntesis de lípidos neutrales, principalmente triglicéridos, los

cuales pueden acumularse bajo condiciones ambientales adversas o de crecimiento sub-óptimo (Figura 3) (Hu et al., 2008).

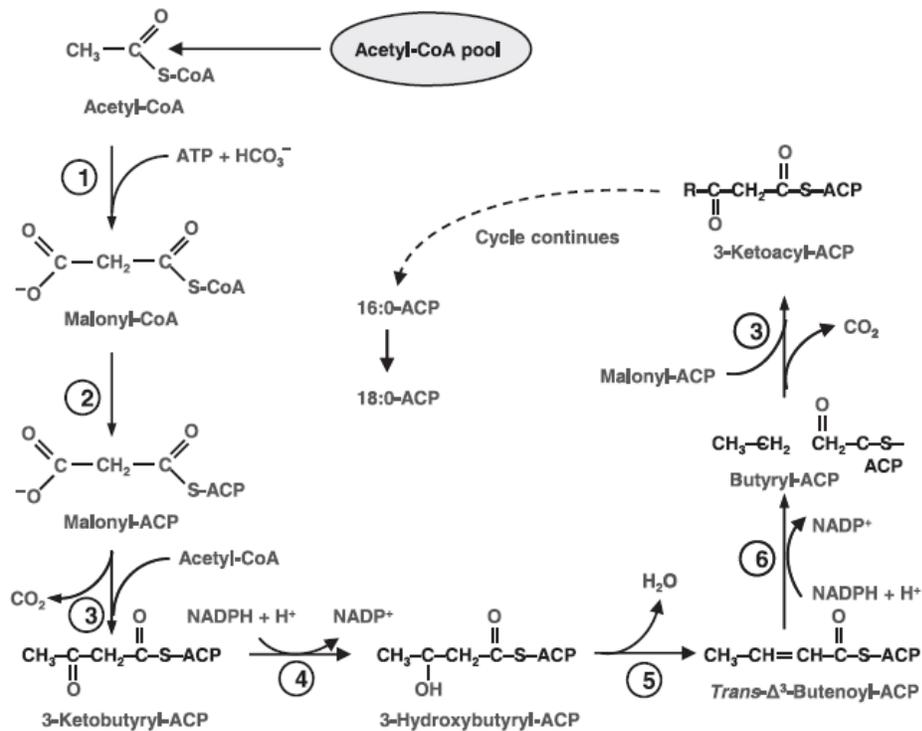


Figura 3. Síntesis de ácidos grasos en los cloroplastos.

La acetil CoA entra en la ruta como sustrato para la acetil CoA Carboxilasa (reacción 1), así como para sustrato para la reacción de condensación inicial (reacción 3). La reacción 2, la cual es catalizada por malonil: ACP transferasa y transfiere malonil de la Coenzima A para formar malonil: ACP. El malonil: ACP es el donador de carbono para las reacciones subsecuentes de elongación. Después de condensaciones subsecuentes el producto 3-ketoacil ACP es reducido (reacción 4), deshidratado (reacción 5) y reducido (reacción 6) por la 3 ketoacil-ACP reductasa, la 3 hidroxil ACP deshidrata y en enoil ACP reductasa, respectivamente.

Fuente: HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GHIRARDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERT, M. et al. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54 (4), 621-39.

El paso comprometido en la síntesis de ácidos grasos es la conversión de acetil CoA a malonil CoA, catalizado por la acetil CoA Carboxilasa (ACCase). En el cloroplasto, la fotosíntesis proporciona una fuente endógena de acetil CoA, y más de una ruta puede contribuir al mantenimiento de la fuente de acetil CoA (Hu et al., 2008).

Una vez la malonil-CoA es sintetizada, esta es transferida por la CoA:ACP transacetilasa a la proteína-transportadora acil (ACP, por sus siglas en inglés) del complejo multi-enzimático ácido-graso sintasa (FAS, por sus siglas en inglés). Bacterias y plantas tienen FAS tipo II, la cual es una proteína con multi-subunidades en la cual cada péptido es dissociable y puede catalizar una reacción enzimática, lo opuesto de la FAS tipo I encontrada en levaduras y vertebrados, la cual es una proteína multifuncional. FAS cataliza la elongación del ácido graso al condensar las moléculas de malonil-CoA y acetil-CoA. ACP, una de las subunidades del FAS, contienen un grupo tiol que puede formar malonil-ACP vía la formación de tioésteres con la malonil-CoA, y posteriormente con el crecimiento de la cadena acilo para de esta forma asegurar su transporte. ACP puede también fijar al acetil formando acetil-ACP. A continuación, el grupo acetilo es transferido a otra subunidad del FAS, la ketoacil-ACP sintasa (KAS), la cual cataliza la condensación de malonil-ACP o el crecimiento de la cadena acilo para formar ketobutil-ACP o ketoacetil-ACP. Este compuesto resultante es primero transformado vía tres reacciones sucesivas, reducción, deshidratación y reducción, y luego condensado con otra malonil-CoA. Este ciclo es repetido hasta que la cadena saturada de ácido palmítico (16:0) o ácido esteárico (18:0) es formada. Por último, la ACP-tioesterasa rompe la cadena ácido y libera el ácido graso (Subrahmanyam & Cronan, 1998).

Para obtener cadenas largas o insaturadas de ácidos grasos, elongasas y desaturasas son requeridas, las cuales actúan sobre el palmitato o estearato. Estas enzimas se encuentran localizadas en la membrana del retículo

endoplasmático y mitocondria. Muchos experimentos se han llevado a cabo para modificar el contenido de lípidos en las plantas transgénicas con estas enzimas, como por ejemplo el aumento de la producción de ácidos grasos omega-3 (Courchesne et al., 2009).

3.5.2 Biosíntesis de triglicéridos

Para los eucariotas, la formación de los triglicéridos, se lleva a cabo en organelos especializados como la mitocondria y plastidios (solo en plantas). En las células procariontas, la síntesis se lleva a cabo en el citoplasma de las células. Este proceso produce lípidos neutros (Rajakumari et al., 2008). La biosíntesis de los triglicéridos en algas ha sido propuesta por la vía directa del glicerol (Figura 4) (Hu et al., 2008).

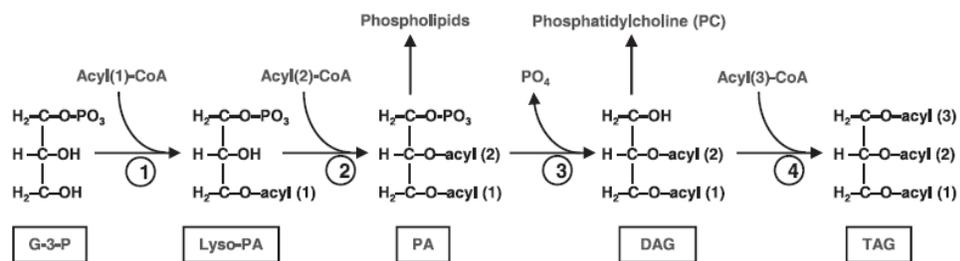


Figura 4. Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de triglicéridos en algas.

Los ácidos grasos producidos en el cloroplasto son secuencialmente transferidos de CoA a las posiciones uno y dos del glicerol-3-fosfato, resultando en la formación del metabolito central de ácido fosfatídico (PA, por sus siglas en inglés), luego se da la desfosforilación del PA catalizado por una fosfatasa específica liberando diacilglicerol (DAG). En el paso final la síntesis de triglicéridos (TAG), un tercer ácido graso es transferido a la posición 3 que está libre en el DAG, y la reacción es catalizada por la diacilglicerol transferasa, una reacción enzimática que es única para la biosíntesis de TAG.

Fuente: HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GHIRARDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERT, M. et al. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54 (4), 621-39.

El primer paso para la síntesis de triglicéridos es la condensación (acilación) del glicerol-3-fosfato (G-3-P, por sus siglas en inglés) con una acil-CoA para formar lisofosfatidato (Lyso-PA, por sus siglas en inglés), la cual es catalizada por la acetil-CoA: glicerol-sn-3-fosfato acil transferasa (GPAT, por sus siglas en inglés). Esta enzima exhibe la actividad específica más baja de la ruta de síntesis de triglicéridos, y ha sido sugerida como potencialmente limitante de la velocidad de síntesis en este paso (Cao et al., 2006; Coleman & Lee, 2004).

El lisofosfatidato es además condensado, catalizado por la GPAT con otro acil-CoA para producir fosfatidato (PA, por sus siglas en inglés). Posteriormente, el PA puede ser fosforilado por la fosfatasa ácido fosfatídica (PAP; por sus siglas en inglés) para producir diacilglicerol. Por último, la síntesis de triglicéridos es catalizada por la acetil-CoA: diacilglicerol-transferasa, que incorpora el tercer acil-CoA en la molécula de diacilglicerol. Esta enzima es también conocida como un importante regulador de la ruta metabólica. Los triglicéridos finalmente son almacenados como cuerpos lipídicos (Courchesne et al., 2009).

3.6 Definiciones básicas de modelos y criterios estadísticos.

3.6.1 Minería de datos.

La minería de datos es el proceso que permite descubrir la información procesable de los conjuntos grandes de datos, utilizando el análisis matemático para deducir los patrones y tendencias que existen entre ellos (MSDN, 2008). Normalmente, estos patrones no se pueden detectar mediante la exploración tradicional de los datos porque las relaciones son demasiado complejas o porque hay demasiados datos. La generación de un modelo de minería de datos forma parte de un proceso mayor que incluye desde la formulación de preguntas acerca de los datos y la creación de un modelo para responder dichas cuestiones, hasta la implementación

del modelo en un entorno de trabajo (MSDN, 2008). Este proceso se puede definir mediante los seis pasos básicos siguientes:

- Definir el problema
- Preparar los datos
- Explorar los datos
- Generar modelos
- Explorar y validar los modelos
- Implementar y actualizar los modelos.

La creación de un modelo de minería de datos es un proceso dinámico e iterativo. Una vez que se han explorado los datos, puede que se descubra que estos resultan ser insuficientes para crear los modelos más adecuados y que, por tanto, se debe buscar más datos. Asimismo, es posible que se deban actualizar los modelos una vez implementados debido a que haya más datos disponibles o repetir cada paso del proceso muchas veces para crear un modelo adecuado (MSDN, 2008).

3.6.2 Análisis multivariado por conglomerados o clusters.

En la etapa de exploración de la minería de datos, una de las herramientas que pueden utilizarse para este propósito es el análisis de clusters o conglomerados. Éste análisis es considerado como una técnica de análisis exploratorio de datos para resolver problemas de clasificación. Su esencia consiste en ordenar objetos (personas, cosas, animales, plantas, variables, entre otros) en grupos (conglomerados o clusters) de forma que el grado de asociación/similitud entre miembros del mismo clúster sea más fuerte que el grado de asociación/similitud entre miembros de diferentes clusters (Villardón, 2008).

El análisis de clúster es un método que permite descubrir asociaciones y estructuras en los datos que no son evidentes a priori pero que pueden ser útiles una vez que se han encontrado. Los resultados de un análisis de clusters pueden contribuir a la definición formal de un esquema de clasificación tal como una taxonomía para un conjunto de objetos, a sugerir modelos estadísticos para describir poblaciones, a asignar nuevos individuos a las clases para diagnóstico e identificación (Villardón, 2008).

3.6.3 Generación de modelos a partir de minería de datos.

Los métodos de la minería de datos se basan en la generación de modelos. El modelado se refiere al desarrollo de expresiones matemáticas que describen de alguna manera el comportamiento de una variable aleatoria de interés. En todos los casos esta variable es llamada *variable dependiente* denotada con Y. Lo más común es el modelado orientado a describir como la media de la variable dependiente (Y) cambia con la modificación de determinadas condiciones. La variación de la variable dependiente se supone que es afectada por el cambio en estas condiciones. En el modelo se incorporan otras variables que se cree que proporcionan información sobre el comportamiento de la variable dependiente, estas se conocen como *predictores o variables explicativas* y se denominan variables independientes, denotadas por X. La complejidad del modelo y el realismo del mismo dependen de cómo el proceso es estudiado y del propósito de ejercicio de modelado (Rawlings et al., 1998).

En estadística todos los modelos utilizados tienen supuestos de distinta naturaleza y la regresión no es la excepción. Siempre que se haya estimado un modelo de regresión, deberá asegurarse que los supuestos requeridos se cumplen; para no dar lugar a inferencias no adecuadas. Para evaluar objetivamente el cumplimiento de estas condiciones el modelo de regresión lineal establece los siguientes supuestos:

1. La variable respuesta Y tiene distribución condicional. Esto equivale a decir que “los residuos deben tener distribución de probabilidad normal”.
2. La varianza condicional de la variable respuesta debe ser constante; es decir, “los residuos tienen varianza constante para todos los valores de X”.
3. Los valores de la respuesta deben ser probabilísticamente independientes. Es decir, los residuos correspondientes a distintas observaciones deben ser no correlacionados (ausencia de autocorrelación) (Silva & Salinas, 2007).

3.6.4 Modelos de regresión lineal simple y múltiple.

Un modelo de regresión lineal simple explica la relación entre una variable predictora y una variable respuesta, ambas de carácter cuantitativo continuo. El modelo de regresión lineal es el más utilizado y por ser el matemáticamente más simple facilita entender otros modelos de regresión más generales, el modelo se define por la siguiente expresión: (Silva & Salinas, 2006).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 * X + \varepsilon$$

Donde;

Y= Variable de respuesta

β_0 =Intercepto

β_1 =Pendiente

X=Variable predictora

ε =Componente aleatorio

La regresión lineal múltiple es una técnica que intenta modelar probabilísticamente el valor esperado de una variable Y, a partir de los valores de dos o más predictores. Es un método muy poderoso y ampliamente utilizado en investigación para determinar la posibilidad de predecir a través de una expresión muy simple el valor de la respuesta de interés a partir de los valores observados de una serie de

factores, asimismo, permite determinar la importancia relativa de la asociación lineal entre la respuesta y un predictor respecto a la asociación entre ella y otro predictor y estimar la relación lineal entre los predictores y la variable respuesta. La regresión lineal múltiple es matemáticamente similar a la regresión lineal simple, tomando la siguiente forma: (Salinas & Silva, 2007).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 * X_1 + \beta_2 * X_2 + \dots + \beta_p * X_p + \varepsilon$$

Donde;

Y= Variable de respuesta

β_0 =Intercepto

β_1 =Pendiente del predictor X_1

β_2 =Pendiente del predictor X_2

β_p =Pendiente del predictor X_p

ε =Parte de la variabilidad de la respuesta correspondiente a un perfil dado de los predictores no explicada por el conjunto de los distintos predictores; parte aleatoria del modelo de regresión múltiple.

3.6.5 Selección del mejor modelo de regresión.

En situaciones complejas, cuando existe un número grande de variables explicatorias que pueden o no ser relevantes para hacer predicciones acerca de la variable de respuesta, es útil tener la capacidad de reducir el modelo de tal manera que este solo contenga las variables que proporcionan información relevante sobre la variable de respuesta (Veldt Larsen, 2008). Para la selección del modelo que mejor explica el comportamiento de la variable dependiente, se utilizan diferentes criterios estadísticos entre los más usados se pueden mencionar los siguientes:

- **Coefficiente de determinación múltiple (R^2) y coeficiente de determinación múltiple ajustado R_a^2** , el primero es la proporción de la cantidad total de la variación en los datos la cual puede ser explicada por el ajuste del modelo (Veldt Larsen, 2008). Un valor alto de R^2 no necesariamente es un indicador de un buen modelo de regresión, como tampoco lo indicaría un valor pequeño (Quevedo et al., 2007), puesto que el modelo más grande siempre tendrá un valor de R^2 más grande, sin importar si las variables explican o no la variable de respuesta. Una forma común para evitar este problema es utilizar el R_a^2 el cual no necesariamente incrementa cuando incrementan las variables explicatorias (Veldt Larsen, 2008).
- **Error estándar de lo estimado (s)**. El valor de s es un diagnóstico estadístico importante el cual involucra las diferencias entre los valores reales del modelo y los valores pronosticados. Entre más pequeño sea el valor de s, mejor será el modelo seleccionado. Sin embargo, entre más grande sea el valor de s, más dispersión habrá en los puntos, con respecto al plano de regresión (Quevedo et al., 2007).
- **PRESS (del inglés, prediction error sum of squares o suma de cuadrados del error de predicción)**. Este criterio, que también se le suele llamar residuales eliminados, se usa para validar el modelo de regresión en términos de validación cruzada de errores o en términos de predicción. Es de notarse que entre más pequeño sea el valor de PRESS mejor será el modelo seleccionado (Quevedo et al., 2007).
- **Criterio Test-F**. El estadístico F es utilizado de manera general para determinar la significancia de las pruebas (Veldt Larsen, 2008). En la selección de modelos explica la significancia del modelo de regresión y de cada uno de los predictores presentes en la ecuación.

- **Valores estadísticos t** (o sus correspondientes valores p): Utilizados para para comprobar qué variables son o no significativas. Si una variable no es significativa no debe incluirse en el modelo (Veldt Larsen, 2008).

No solo la selección de criterios es importante dentro de la elección del mejor modelo de regresión y de las variables que deben incluirse en éste. Dentro de este proceso también se debe tener en cuenta el proceso o estrategia de selección del mejor modelo. Los procedimientos tradicionales son: *selección hacia delante* y *eliminación hacia atrás*; estos se concentran en determinar si cada una de las variables explicativas debe o no, ser incluida en el modelo final; aunque estos procedimientos son fáciles de ejecutar, no siempre llevan al mejor modelo. El método de *regresión por pasos* es otra opción, el cual se desarrolló basado en el anterior procedimiento con el fin de lograr el mejor modelo posible. El procedimiento más reciente y considerado como el más sensible es, el de *todos los modelos posibles*, en éste procedimiento todos los modelos son ajustados y comparados y el mejor es elegido, teniendo en cuenta los criterios estadísticos mencionados anteriormente. Sin embargo, cuando el número de predictores es grande, el procedimiento demanda una gran cantidad de cálculos y el resultado puede ser difícil de interpretar (Veldt Larsen, 2008).

4. METODOLOGÍA

4.1 Selección de las cinco microalgas de la división *Chlorophyta*

Para realizar la minería de datos, por lo general se consultan bases de datos que han sido consolidadas con diferente tipo de información sobre un tema determinado, sin embargo, para el caso específico de microalgas la literatura existente no permite definir las cepas con mayor potencial para la producción de lípidos de interés comercial ni las condiciones de crecimiento para lograr altas concentraciones de aceites. Los datos existentes en la literatura presentan una gran variabilidad dada principalmente porque que los autores reportan sus experimentos, bajo sus propias condiciones, las variables experimentales y de respuesta no son consistentes en el uso de los sistemas de unidades y pocos se comparan con otros autores. Teniendo en cuenta lo anterior, se construyó una base de datos que permitiera establecer de manera general, las principales microalgas de la división *Chlorophyta* que han sido estudiadas por su alto potencial en la acumulación de lípidos.

Con el fin de seleccionar las cinco microalgas de la división *Chlorophyta* con mayor potencial para la producción de lípidos con las cuales se trabajaría en la construcción de los modelos, se realizó un análisis sistemático de los artículos disponibles en las bases de datos científicas de alto impacto. Para la búsqueda de este tipo de información se utilizó el metabuscador ISI web a través de palabras claves asociadas al tema. Las principales bases de datos de las cuales se recopiló la información fueron: Science Direct, Springerlink, Wiley Interscience, entre otras. Del proceso anterior se generó una base de datos propia con artículos de carácter científico con información útil para el estudio. El proceso de selección de artículos para incluir en la base de datos y posterior análisis, se muestra en la figura 5.

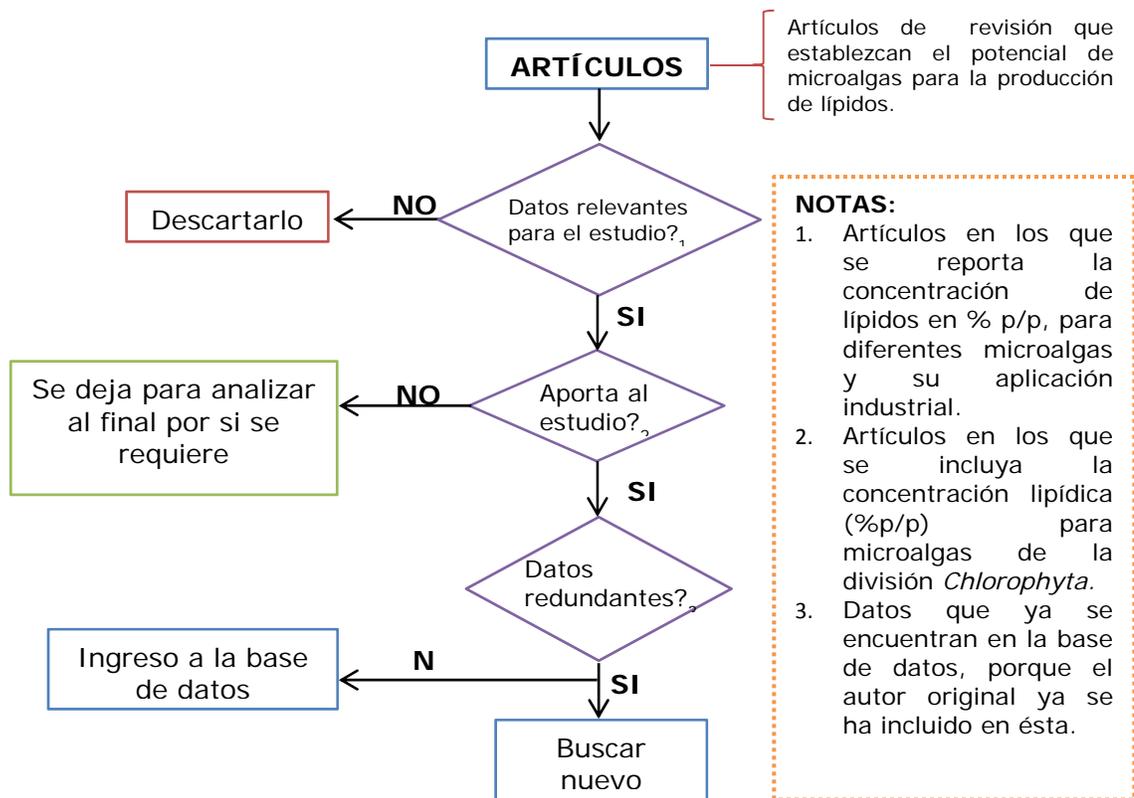


Figura 5. Proceso de selección de artículos para la base de datos propia.

Con la información disponible en la base de datos, se realizó un análisis de los artículos y se elaboró un listado de los géneros y especies de la división *Chlorophyta* reportadas por su contenido de lípidos. Estos datos fueron analizados con el fin de seleccionar las cinco (5) microalgas que presentaron mayores valores en cuanto a concentración de lípidos (%p/p). Las microalgas seleccionadas fueron tomadas como referencia para el estudio de la relación entre los parámetros de proceso y la producción de lípidos de interés industrial.

4.2 Obtención de los datos objetivo de las microalgas seleccionadas.

Con las cinco microalgas seleccionadas se llevó a cabo una nueva revisión bibliográfica en bases de datos científicas de alto impacto. Para la búsqueda se

tomó como referencia el género y especie de la microalga, las variables de proceso (intensidad de luz, concentración de dióxido de carbono, temperatura y cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo) y la producción de lípidos y biomasa. Se creó una base de datos con los artículos para las cinco microalgas seleccionadas. Los artículos se incluyeron en la base de datos teniendo en cuenta que cumplieran con las siguientes condiciones:

- Método de cultivo: estudios realizados a nivel de laboratorio o piloto en sistemas cerrados (fotobiorreactores)
- Estudios realizados bajo condiciones metabólicas fotoautótrofas.
- El artículo debía reportar al menos, la producción de lípidos de la especie expresado como porcentaje en peso seco (%p/p). También se tuvo en cuenta la productividad sin importar las unidades en la que estuviese expresada.
- Tener en el texto los valores de las variables de proceso intensidad de luz, concentración dióxido de carbono, temperatura y cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo, que se utilizaron en la experimentación. De no ser evidentes en el artículo, que al menos se brindaran datos que permitieran calcular los valores no expresados.
- Tener otros datos adicionales como: concentración de biomasa, productividad de biomasa, coeficiente específico de crecimiento, tiempo de duración del cultivo.
- Otras pero no menos importantes, tener reportado el tipo de ácidos grasos y aplicación industrial.

Los valores del contenido de lípidos (%p/p), productividad de lípidos y biomasa, coeficiente específico de crecimiento, tiempo de cultivo, tipo de ácidos grasos, acumulación de biomasa y los valores experimentales de las variables: intensidad de luz, concentración de dióxido de carbono, temperatura y cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo, fueron extraídos de la literatura para las cinco microalgas seleccionadas e ingresadas en la base de datos para análisis posteriores.

4.3 Preparación y estandarización de los datos

Se revisó la base de datos de cada una de las cinco microalgas seleccionadas y se procedió a unificar unidades y realizar cálculos para las variables no encontradas a partir de los datos disponibles. Para la unificación de unidades de las variables experimentales se tuvo en cuenta que estas quedarán expresadas de la siguiente manera:

- Concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (mM)
- Concentración de CO₂ (%v/v)
- Intensidad de luz (μE/(m²·s¹))
- Temperatura (°C)

En cuanto a las variables de respuesta, estas deberían expresarse así:

- Contenido de lípidos en porcentaje en peso seco (%p/p)
- Productividad de lípidos (mg L⁻¹día⁻¹)
- Productividad en biomasa (g L⁻¹día⁻¹)
- Tipo y cantidad de ácidos grasos (% mol)
- Tiempo de duplicación (días)
- Coeficiente específico de crecimiento (día⁻¹)
- Biomasa máxima obtenida (mg)
- Tiempo de cultivo (días)

Se utilizaron las siguientes fórmulas para calcular datos no disponibles en la literatura, en los casos donde fue posible.

- ***Datos de crecimiento celular***

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Donde;

t_d = tiempo de duplicación (días)

μ = Coeficiente específico de crecimiento (día^{-1})

- **Productividad de lípidos calculada ($\text{g L}^{-1} \text{día}^{-1}$)**

$$\text{Productividad lípidos} = \frac{C_{\text{lipidos}}(\text{g/g}) * \text{DCW}(\text{g/L})}{t(\text{días})}$$

Donde;

C_{lipidos} = Contenido de lípidos en las células (gramos de lípidos/gramo de biomasa)

DCW = Peso seco de las células

t = Tiempo del periodo de cultivo

4.4 Procesamiento de los datos.

4.4.1 Análisis preliminar de los datos.

En esta etapa se evaluó el conjunto de datos para cada una de las microalgas seleccionadas. Para esto se revisó si los datos estaban completos y si era posible graficarlos para determinar de manera visual la presencia de tendencias entre las variables estudiadas. Además, esta etapa sirvió para establecer si cada microalga tenía los datos suficientes que permitieran formular modelos.

4.4.2 Análisis del conjunto de datos de cada microalga

Al conjunto de datos de las especies seleccionadas aptos para el estudio, se les aplicó el proceso que se muestra en la figura 6, para el ajuste de los modelos.

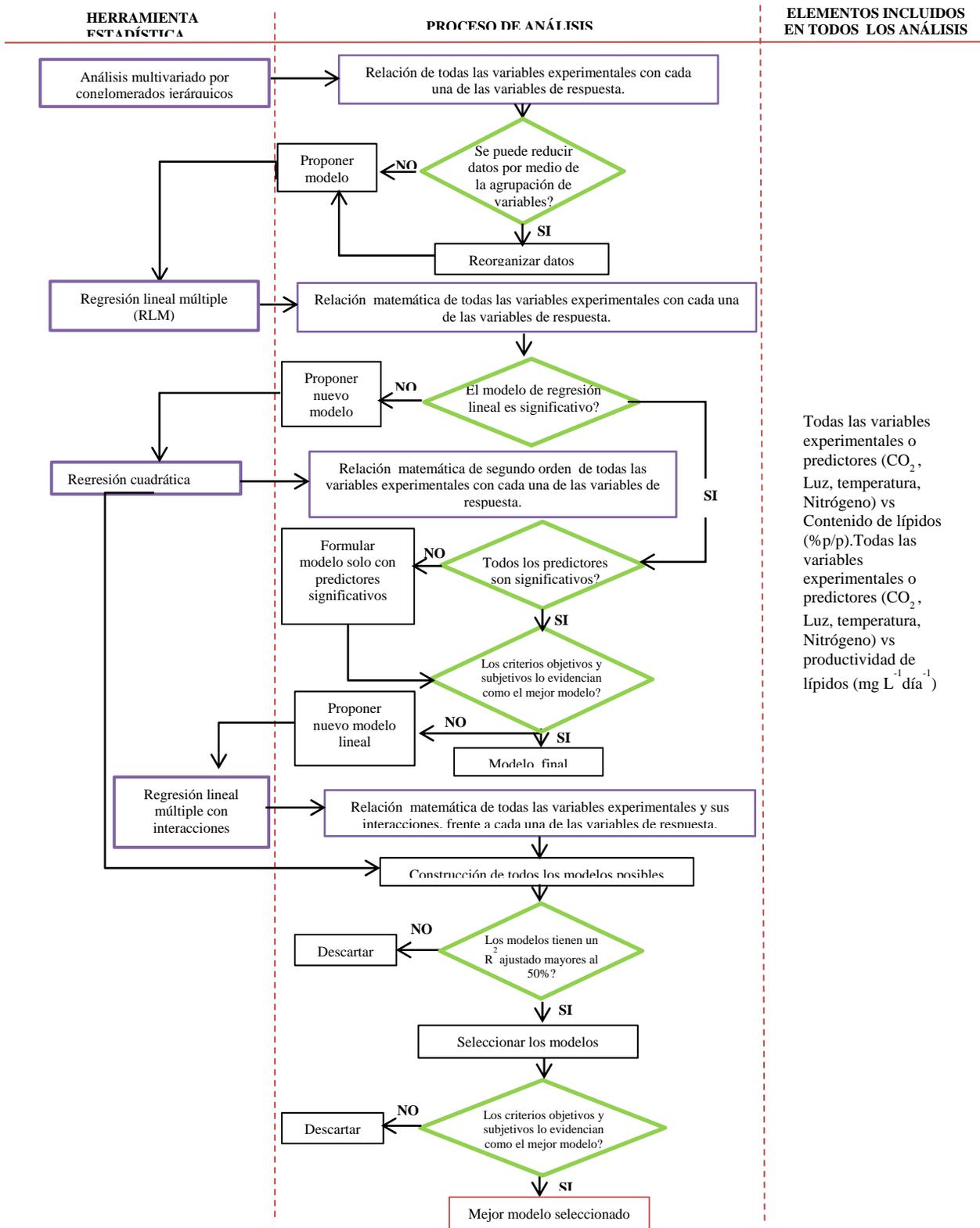


Figura 6. Diagrama de proceso para el análisis de datos y ajuste de modelos

Los modelos de regresión lineal simple, múltiple y cuadrática, fueron utilizados para el ajuste de los datos para cada especie, utilizando la herramienta *Essential regression* que funciona como complemento de Excel® y el paquete estadístico Minitab 15®.

Para encontrar el mejor modelo se utilizó el procedimiento de regresión de *todos los modelos posibles*. La selección preliminar de los mejores modelos se realizó teniendo en cuenta la bondad de ajuste de éstos (R^2 y R^2_{ajustado}). Con los mejores modelos seleccionados se procedió a realizar un análisis objetivo de éstos a través los criterios estadísticos R^2 , R^2_{ajustado} , R^2 pronosticada, el error estándar (s) y PRESS (del inglés, *prediction error sum of squares* o suma de cuadrados de error de predicción). Además del análisis de los criterios anteriores, cada modelo se evaluó de manera subjetiva; es decir, teniendo en cuenta el caso de estudio y la experiencia previa del investigador.

4.4.3 Validación y análisis de los modelos.

Los mejores modelos para cada variable de respuesta, se validaron a través de escenarios. A cada predictor del modelo se le asignó un valor determinado y se analizó la respuesta. Ésta fue evaluada de acuerdo a su aplicabilidad en escenarios reales para la producción de lípidos de microalgas. El estudio se complementó a través del análisis desde el punto de vista biológico y metabólico.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Selección de cinco microalgas de la división *Chlorophyta*

Con la base de datos construida a partir de la revisión bibliográfica, se elaboró un listado de las especies de la división *Chlorophyta* que se presentaron como potenciales en la producción de lípidos de interés industrial (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de la división *Chlorophyta* con alto potencial en la producción de lípidos.

Especie	Clase
<i>Parietochloris incisa</i>	Trebouxiophyceae
<i>Botryococcus braunii</i>	Trebouxiophyceae
<i>Chlorella minutissima</i>	Trebouxiophyceae
<i>Chlorella emersonii</i>	Trebouxiophyceae
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Trebouxiophyceae
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Chlorophyceae
<i>Ourococcus sp.</i>	Chlorophyceae
<i>Dunaliella sp.</i>	Chlorophyceae
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Chlorophyceae
<i>Chlorella protothecoides</i>	Trebouxiophyceae
<i>Nannochloris sp</i>	Trebouxiophyceae
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	Chlorophyceae
<i>Chlorella vulgaris</i>	Trebouxiophyceae
<i>Chlorella sp.</i>	Trebouxiophyceae
<i>Dunaliella primolecta</i>	Chlorophyceae
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Chlorophyceae
<i>Tetraselmis suecica</i>	Prasinophyceae
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Trebouxiophyceae
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlorophyceae
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Trebouxiophyceae
<i>Scenedesmus sp.</i>	Chlorophyceae
<i>Chlorococcum sp</i>	Chlorophyceae
<i>Dunaliella salina</i>	Chlorophyceae
<i>Tetraselmis sp.</i>	Prasinophyceae
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Chlorophyceae
<i>Dunaliella bioculata</i>	Chlorophyceae

Dentro de las especies reportadas se encontraron microalgas pertenecientes a diferentes clases taxonómicas. Se confirmó que en microalgas eucariotas, el contenido de lípidos totales puede variar notablemente entre las distintas especies o cepas dentro y entre grupos taxonómicos, tal como lo han reportado varios autores (Ben-Amotz et al., 1987; Basova, 2005; Hu et al., 2008; Courchesne et al., 2009; Mutanda et al., 2011).

Los valores de concentración de lípidos reportados para cada una de las especies fueron analizados con el fin de evidenciar las microalgas con mayor concentración lipídica (Figura 7).

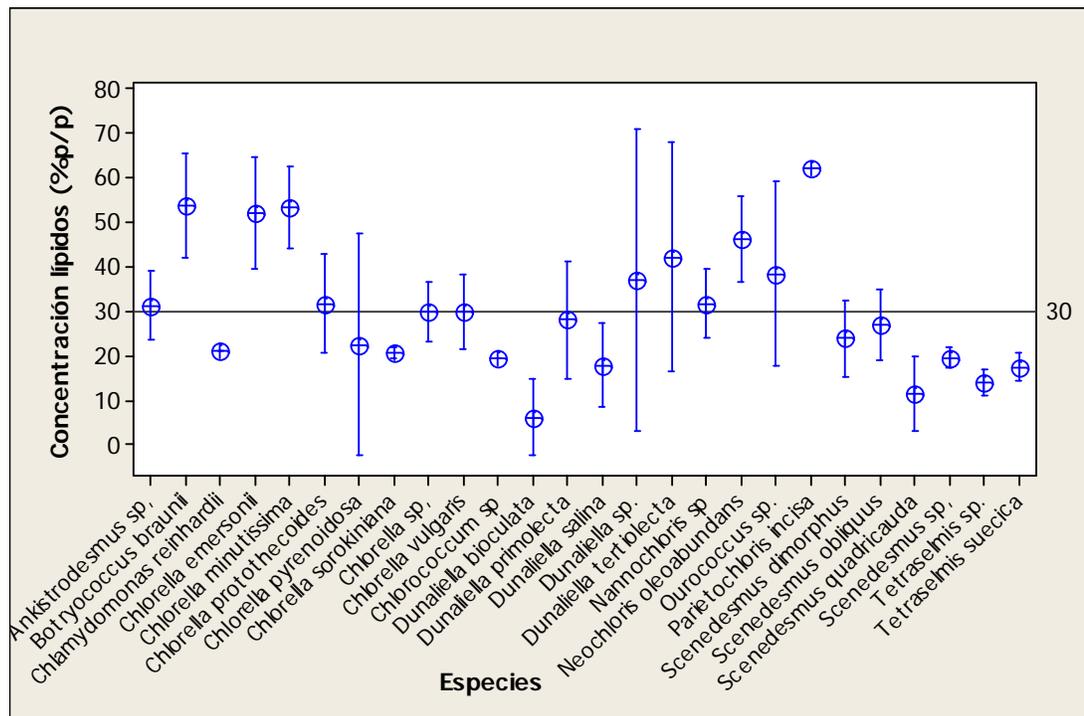


Figura 7. Rangos y valores de la concentración de lípidos (%p/p) reportados en la literatura para especies de la división *Chlorophyta*, con potencial en la producción de lípidos.

La línea central con el valor 30, corresponde a la media general de la concentración de lípidos (30%p/p) (Intervalos de confianza con 95% para la media).

El promedio general de concentración de lípidos fue del 30% p/p. Se encontraron especies en las que se reportan rangos de concentración lipídica muy amplia, tal como el de *Dunaliella sp.*, entre el 10 al 70%, *Dunaliella tertiolecta* (16-67%) y *Chlorella pyrenoidosa* (2-47%). Asimismo, se encontraron especies en las que no se reportaron rango, sino un valor fijo de lípidos. La variabilidad de los datos podría estar dada entre otros factores, por las diferentes las condiciones de cultivo de los estudios. Sin embargo, esto no está expresado de manera clara y detallada en los artículos de revisión de los cuales se obtuvieron los datos.

Griffiths & Harrison (2009), en su revisión analizaron 55 cepas microalgales oleaginosas, reportadas en literatura, al final de estudio los autores señalan que una rigurosa selección de microalgas con potencial de uso industrial para la producción de lípidos, es difícil debido a:

- Existe una gran cantidad de microalgas disponibles pero una limitada caracterización de estas, ya que el número de cepas comúnmente explotadas en la biotecnología de algas es muy poca.
- Cuando se realizan aislamientos y caracterización de lípidos de diferentes especies, no existe una recomendación de cuáles son las mejores.
- Existe poco consenso entre los investigadores sobre las especies más adecuadas en la producción de lípidos.

Para la selección de las cinco especies de microalgas del presente estudio, se tuvo en cuenta como primer criterio, aquellas microalgas que presentaron promedios de concentraciones lipídicas, iguales o mayores que la media general (30%). De las especies analizadas el 50% (13 especies), fueron reportadas con valores promedio de concentración de lípidos iguales o superiores al 30%. De estas 13 microalgas, 4 son del mismo género correspondiente a *Chlorella*. El 61% pertenecen a la clase *Trebouxiophyceae*, mientras el 39% a la *Chlorophyceae* (Tabla 2).

Tabla 2. Especies de microalgas de la división *Chlorophyta* con concentración lipídica mayor a la media general (30%p/p).

Especie	Clase	Promedio contenido de lípidos (%p/p)
<i>Parietochloris incisa</i>	Trebouxiophyceae	62,00
<i>Botryococcus braunii</i>	Trebouxiophyceae	53,68
<i>Chlorella minutissima</i>	Trebouxiophyceae	53,29
<i>Chlorella emersonii</i>	Trebouxiophyceae	52,00
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Trebouxiophyceae	46,29
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Chlorophyceae	42,12
<i>Ourococcus sp.</i>	Chlorophyceae	38,38
<i>Dunaliella sp.</i>	Chlorophyceae	35,68
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Chlorophyceae	32,41
<i>Chlorella protothecoides</i>	Trebouxiophyceae	31,66
<i>Nannochloris sp</i>	Trebouxiophyceae	31,63
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	Chlorophyceae	31,30
<i>Chlorella vulgaris</i>	Trebouxiophyceae	29,90

Además de la concentración de lípidos, se tuvo en cuenta la cantidad de veces que la especie o el género apareció reportado en la literatura revisada (Figura 8). Esto con el fin de seleccionar microalgas que además de considerarse potenciales por su alto contenido de lípidos, también se han estudiado en diferentes condiciones experimentales y poseen un mínimo de datos disponibles, los cuales son de gran utilidad en el presente estudio para poder modelar su comportamiento, en etapas posteriores.

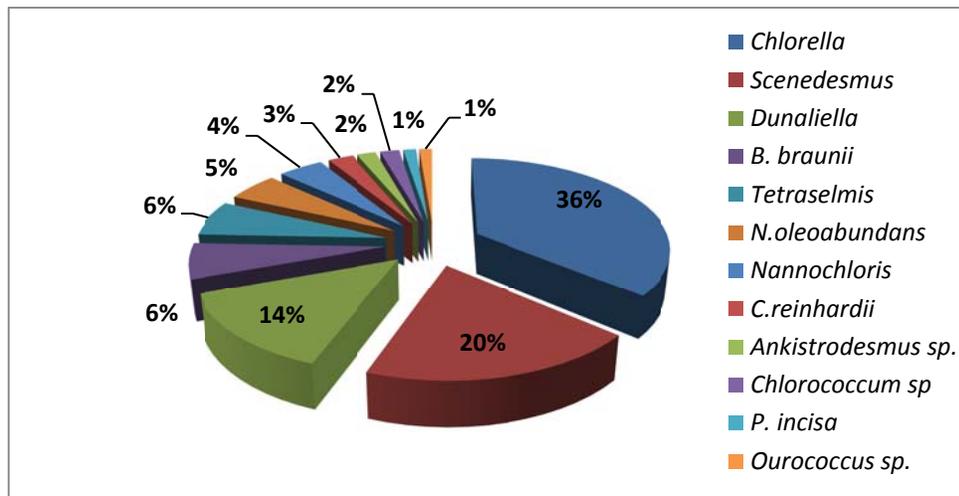


Figura 8. Número de reportes en artículos de revisión para cada una de las especies y géneros de microalgas de la división *Chlorophyta*, con potencial para la producción de lípidos de interés industrial.

La primera microalga seleccionada fue *Chlorella*, teniendo en cuenta que presenta el 36% de los reportes dentro de la literatura, lo que puede ser evidencia de una alta disponibilidad de estudios relacionados con la producción de lípidos. El género *Chlorella* abarca varias especies, con potencial de producción de lípidos, por lo tanto se decidió revisar todos los estudios con estas características. *Scenedesmus* fue seleccionada por el 20% en número de veces reportadas y porque su contenido de lípidos fue mayor al 30%. Si bien, *B. braunii* y *P. incisa*, muestran un 6% en número de veces reportadas, fueron seleccionadas porque presentaron más del 50% de promedio en concentración de lípidos, lo mismo que ocurrió con *N. oleoabundans* con un promedio mayor al 45%, aunque el número de veces reportadas fue del 5%.

El género *Dunaliella* mostró un 14% de veces reportadas, con un promedio de lípidos entre un 35-40%, sin embargo; no fue seleccionada puesto que esta microalga es halófila y los estudios para la producción de lípidos se han enfocado

a factores de estrés en diferentes concentraciones de sal (Takagi et al., 2006), la cual no es una variable contemplada en este estudio, puesto que se considera específica para microalgas con estas características particulares. Asimismo, Weldy & Huesemann (2007) establecieron que se ha realizado muy poca investigación sobre los efectos de diferentes concentraciones de nitrógeno e intensidad de luz sobre el contenido de lípidos en estas especies.

La morfología de las microalgas seleccionadas para el estudio del efecto de las variables de proceso concentración de nitrógeno, dióxido de carbono, intensidad de luz y temperatura sobre la producción de lípidos, se muestran en la figura 9.

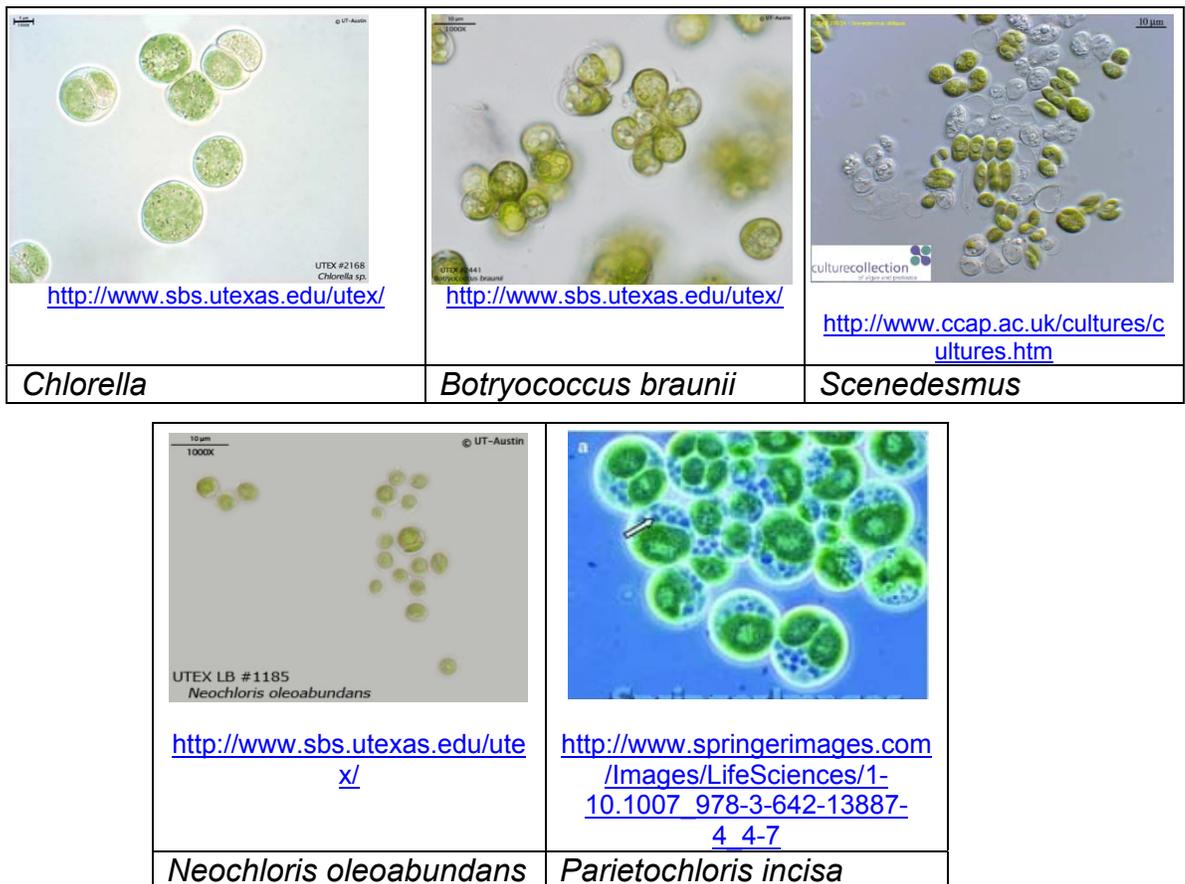


Figura 9. Morfología de las cinco microalgas seleccionadas para el presente estudio.

5.2 Estudio preliminar de los datos.

La información consignada en los artículos científicos, permitió construir una base de datos para cada una de las microalgas seleccionadas. Estos datos fueron unificados y los valores que no aparecieron de manera evidente fueron calculados (ver numeral 4.3). Sin embargo, se presentaron inconvenientes para la conversión y cálculo de variables, debido a la falta de información reportada por los autores. Los problemas más comunes fueron:

- Los datos de productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{dia}^{-1}$), en muchos casos no fueron reportados por los autores de los artículos revisados y tampoco se pudieron calcular puesto que no se tenía la información de producción de biomasa y/o tiempo de cultivo.
- El coeficiente específico de crecimiento y el tiempo de duplicación en los artículos revisados, solo fueron reportados en casos aislados.
- Se descartaron artículos en los cuales la intensidad de luz apareció reportada en unidades fotométricas (luxes), puesto que no es posible realizar la conversión a unidades radiométricas ($\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1})$) (Richmond, 2004).
- Fue común encontrar artículos donde se enfocaron en el estudio de la acumulación de lípidos (%p/p), pero no reportaron el tipo de ácidos grasos o los autores solo estudiaron ácidos grasos específicos y no reportaron la concentración de lípidos total alcanzada en la microalgas.

Teniendo en cuenta lo anterior, cada una de las bases de datos fue revisada y las referencias que no presentaron valores de las variables experimentales: concentración de nitrógeno, concentración de CO_2 , intensidad de luz y temperatura fueron eliminadas. Asimismo, se tuvo en cuenta que dentro de las variables de respuesta, se tuviera al menos la productividad y/o acumulación de lípidos (%p/p). Las referencias para cada una de las especies se obtuvieron de las bases de

datos de artículos científicos de alto impacto. La revisión se realizó desde 1994 hasta 2011.

5.2.1 Datos para *Chlorella*

Se encontraron en las bases de datos 60 artículos. Después de la revisión de éstos, se seleccionaron 17 teniendo en cuenta los requerimientos de las variables de proceso y de respuesta, establecidas para el presente estudio. De las referencias seleccionadas se extrajeron 52 conjuntos de datos correspondientes a diferentes condiciones de proceso estudiadas en la producción de lípidos. De estos datos, el 77% correspondió a estudios realizados con la especie *Chlorella vulgaris*; y en menor proporción aparecieron *Chlorella minutissima*, *Chlorella sp.* y *Chlorella sorokiniana*, respectivamente (Figura 10).

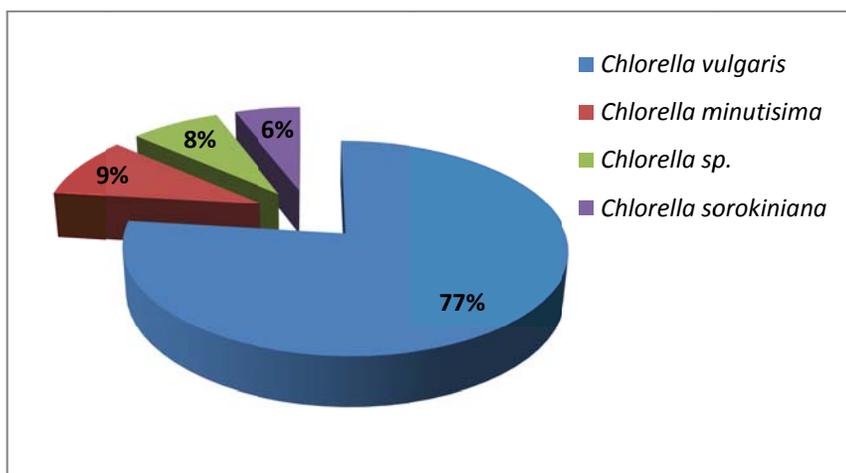


Figura 10. Proporción de datos para cada especie de *Chlorella* dentro de las referencias seleccionadas.

Después de realizar un proceso de consolidación de los conjuntos de datos, se seleccionaron de manera definitiva 42 conjuntos los cuales cumplieron con las características deseadas, es decir, disponibilidad de valores en todas las variables

experimentales y en las unidades requeridas. Sin embargo, no todas las variables de respuesta planteadas al inicio del estudio tuvieron datos disponibles (productividad en biomasa, tipo y cantidad de ácidos grasos, tiempo de duplicación, coeficiente específico de crecimiento, biomasa máxima obtenida, tiempo de cultivo) por lo tanto, se decidió trabajar únicamente con el contenido de lípidos (%p/p) y la productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{day}^{-1}$). Del conjunto de datos final (42), cuarenta (40) correspondieron a la especie *Chlorella vulgaris* y dos a *Chlorella sp.*

5.2.2 Datos para *Botryococcus braunii*

Se revisaron 30 artículos de cuales se seleccionaron 12, de estos últimos se extrajeron 20 conjuntos de datos correspondientes a las variables experimentales para el presente estudio. En cuanto a las variables de respuesta únicamente el contenido de lípidos (%p/p) fue reportado, puesto que la productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{day}^{-1}$), solo apareció en 4 conjuntos de datos de los 20 establecidos. Además, los artículos no mencionaron datos de biomasa y tiempo de cultivo lo que no permitió el cálculo de esta variable.

5.2.3 Datos para *Scenedesmus*

Para el género *Scenedesmus* se revisaron 12 artículos, de éstos se seleccionaron 5, que contenían los datos de variables experimentales completas. Se obtuvieron 8 conjuntos de datos. Sin embargo, la única variable de respuesta que se pudo establecer de acuerdo a la disponibilidad de datos fue el contenido de lípidos (%p/p). Las especies que se encontraron más reportadas fueron *Scenedesmus sp.*, *S. obliquus*, *S. quadricauda* y *S. dimorphus*, respectivamente.

5.2.4 Datos para *Neochloris oleoabundans*

Para la especie *N. oleoabundans* se encontraron 7 artículos, de los cuales 3 fueron seleccionados. De estos se obtuvieron 11 conjuntos de datos, con los valores de las variables experimentales completas y en las unidades requeridas para este estudio. Las variables de respuesta seleccionadas de acuerdo a la disponibilidad de datos fueron contenido de lípidos (%p/p) y la productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$).

5.2.5 Datos para *Parietochloris incisa*

Para la microalga *P. incisa* se revisaron 12 artículos. De los cuales se seleccionaron seis (6). Con estas referencias se generaron 10 conjuntos de datos, sin embargo, no se consiguieron datos para ninguna de las variables de respuesta fijadas en el presente estudio. Lo anterior se presentó principalmente porque las publicaciones de esta especie, se enfocaron en determinar solo el efecto de diferentes condiciones experimentales en la cantidad ácido araquidónico presente en los triglicéridos del aceite producido por esta microalga.

5.3 Análisis del estudio preliminar de los datos para las cinco microalgas seleccionadas.

El estudio preliminar de los datos para las cinco especies de microalgas de la división *Chlorophyta*, permitió evidenciar una gran cantidad de estudios sobre ciertas microalgas como *Chlorella* y sus diferentes especies. Mientras que otras, como el caso de *N. oleoabundans*, presentan un número limitado de reportes científicos sobre la producción de lípidos. Sin embargo, lo anterior no necesariamente se puede relacionar con un bajo potencial para producir lípidos, de las especies menos reportadas en la literatura.

Scenedesmus, *Chlorella*, *B. braunii*, *P. incisa* y *Neochloris oleoabundans* han sido reportadas por su capacidad de acumular grandes cantidades de lípidos (Bigogno et al., 2002; Metzger & Largeau, 2005; Xu et al., 2006; Li et al., 2008). *N. oleoabundans* puede producir hasta un 80% de triglicéridos de sus lípidos totales, lo que la hace ideal para la producción de biodiesel (Li et al., 2008). *P. incisa* se considera como una de las fuentes más ricas de ácido araquidónico (20:4 ω 6), puesto que contiene hasta el 47% de éste, del total de sus ácidos grasos (Bigogno et al., 2002), importante en la industria alimentaria. Asimismo, *B. braunii*, es reportada por su capacidad de producción de lípidos extracelulares y grandes cantidades de hidrocarburos importantes en la elaboración de biocombustibles (Li & Qin, 2005; Metzger & Largeau, 2005).

La productividad de lípidos, es considerada un variable esencial puesto que permite establecer la viabilidad y la relación costo efectividad de la producción de estas biomoléculas a escala industrial. Sin embargo, ésta solo fue reportada en los artículos de una, de las cinco especies evaluadas. Tampoco aparecieron en la mayoría de artículos, parámetros cinéticos que permitieran establecer el crecimiento celular y la única variable que apareció en las cinco microalgas fue el contenido de lípidos (%p/p). Al respecto, Griffiths & Harrison (2009), en su revisión de 55 especies de microalgas, donde solo evaluaron el efecto de la presencia y ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la concentración y productividad de lípidos establecen que si bien, los datos obtenidos de la literatura no son los mejores, por sus vacíos en cuanto a disponibilidad de información, éstos pueden ser utilizados para identificar las principales especies potenciales para la producción de lípidos como herramienta clave para un trabajo experimental posterior.

El análisis preliminar de los datos también permitió identificar una carencia de información sobre los efectos de las diferentes condiciones de cultivo y variables de proceso en el crecimiento celular y la producción de lípidos, para muchas

especies de microalgas que se presentan como prometedoras en la producción de lípidos para diferentes usos industriales.

A partir de este análisis preliminar de la literatura encontrada, se decidió trabajar la siguiente etapa, de ajuste de modelos, con *Chlorella* y *B. braunii*, puesto que estas microalgas presentaron una mayor cantidad de datos disponibles provenientes de diferentes autores, lo cual permitirá un análisis más real del efecto de las diferentes variables de proceso sobre la producción de lípidos. *N. oleoabundans* tuvo 11 conjuntos de datos pero solo provenían de 3 autores diferentes, *Scenedesmus* 8 conjuntos de datos de 5 artículos y *P. incisa* no fue seleccionada porque las variables de respuesta reportadas, no fueron las establecidas para el presente estudio.

5.4 Ajuste de modelos para cada microalga.

La selección de las variables experimentales se realizó teniendo en cuenta su importancia en el metabolismo de microorganismos fotoautótrofos. En cuanto a la concentración de nutrientes, se optó por el nitrógeno, puesto que de todos los nutrientes evaluados, éste es considerado el más crítico en el metabolismo de lípidos en algas, y ha sido observado en muchos taxones (Hu et al., 2008). Las variables experimentales o de proceso, para el presente estudio fueron:

- Concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (mM)
- Concentración de CO₂ (%v/v)
- Intensidad de luz ($\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}^1$)
- Temperatura (°C)

Las variables de respuesta se escogieron teniendo en cuenta la disponibilidad de datos en cada una de las microalgas evaluadas. Las dos variables seleccionadas fueron:

- Contenido de lípidos en porcentaje en peso seco (%p/p)
- Productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$)

Se realizó un análisis inicial con el fin de entender el comportamiento de los conjuntos de datos de cada una de las microalgas (*Chlorella* y *B. braunii*), a través de la construcción de curvas de cada una de las variables de experimentales frente a las variables de respuesta, sin embargo, el análisis visual en ninguno de los casos permitió evidenciar algún comportamiento o relación entre las variables evaluadas. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo una nueva revisión del conjunto de datos y los artículos de los cuales se extrajo la información para cada microalga, con el fin de examinar los motivos de esta falta de tendencia y ajuste en los datos.

Por medio de la revisión de la literatura se pudo establecer que los estudios publicados se enfocan en la maximización de lípidos en microalgas a través de la modificación de los nutrientes del medio de cultivo como primer mecanismo de estrés y las variables físicas CO_2 , intensidad de luz y temperatura, son evaluadas posteriormente. Al respecto, Hu (2004), especifica que el estrés químico generado por la modificación de nutrientes es el más utilizado para la acumulación de lípidos en microalgas, siendo el nitrógeno, el más común para especies de la división *Chlorophyta*. Seguido por el estudio del estrés físico generado principalmente por factores como la temperatura y la intensidad de luz.

Griffiths & Harrison (2009), en su revisión sobre el efecto del nitrógeno en la producción de lípidos, establecen que siendo la deficiencia de nitrógeno tan conocida y considerada como el factor relevante para mejorar la cantidad de lípidos, para un análisis adecuado de las investigaciones existentes, es conveniente dividir los datos en dos condiciones: condiciones equilibrada de nutrientes y deficiencia de estos.

De acuerdo al análisis anterior, para el presente estudio se decidió dividir los conjuntos de datos de cada una de las microalgas antes del ajuste de modelos, puesto que de manera conjunta no presentaron tendencias fácilmente identificables. Los datos se dividieron en dos grupos:

- **Condiciones equilibradas de nitrógeno:** en este escenario se agruparon los conjuntos de datos los cuales fueron trabajados en condiciones estándar de nitrógeno, es decir, medios de referencia para los cultivos de microalgas en los que no hubo evidencia de una reducción o eliminación del contenido de nitrógeno en el medio de cultivo. Un medio de referencia es aquel que contiene la cantidad estequiométrica necesaria de nutrientes para el crecimiento y viabilidad celular (Griffiths y Harrison, 2009).
- **Condiciones de deficiencia de nitrógeno.** Se agruparon los conjuntos de datos en los que se evidenció una reducción o eliminación de nitrógeno con respecto a medios de cultivo referencia.

Dentro de estos dos escenarios se valoró el efecto de las diferentes concentraciones de nitrógeno y la variación de las condiciones de estrés físico intensidad de luz, temperatura y concentración de CO₂, sobre la producción de lípidos, medida en concentración y productividad.

5.4.1 Ajuste de modelos para *Chlorella*.

Se realizó un primer estudio exploratorio cualitativo por medio de la agrupación de todas las variables y todos los conjuntos de datos, a través de un análisis multivariado por conglomerados jerárquicos (Figura 11). El análisis de conglomerados o clúster es una técnica que permite realizar una reducción de los datos en subgrupos más manejables y evidenciar si se pueden eliminar variables

(Gutiérrez, 2008). El análisis multivariado se llevó a cabo utilizando como herramienta el paquete estadístico Minitab 15[®].

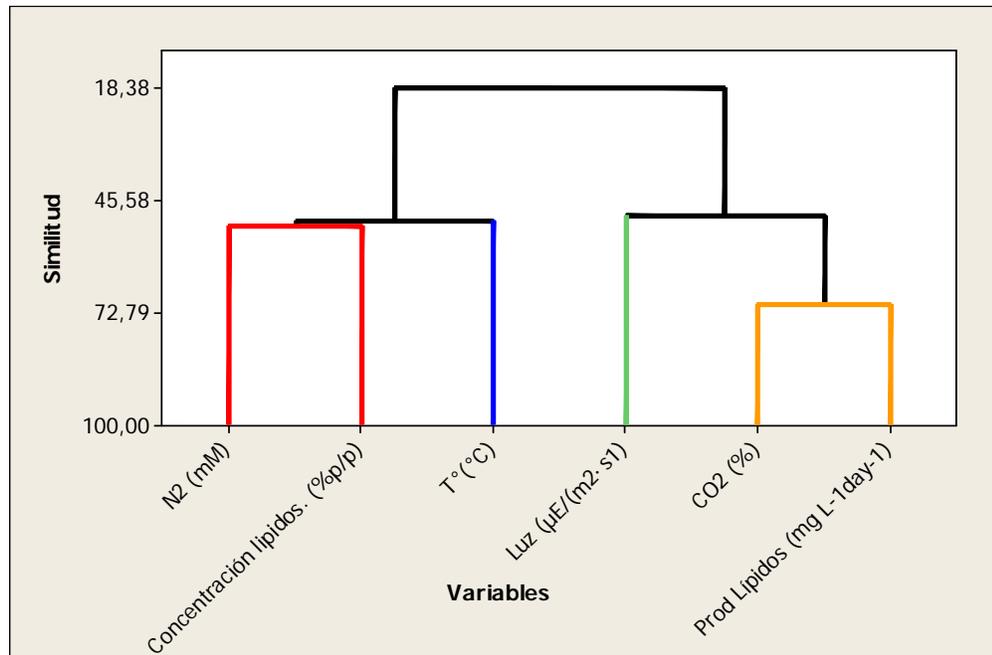


Figura 11. Dendrograma para todas las variables evaluadas en la microalga *Chlorella*.

Enlace de promedios, distancia del coeficiente de correlación absoluto. La gráfica muestra los conglomerados o clusters formados a través de la agrupación de las variables de acuerdo a su similitud.

En el dendrograma se pudo evidenciar la presencia de dos grandes clúster o agrupaciones. En cada uno se ubicaron dos variables experimentales y una variable de respuesta. En el clúster 1, la concentración de lípidos (%p/p) tuvo la misma similitud con la concentración de nitrógeno y la temperatura. De lo anterior se podría establecer que la concentración de lípidos se encuentra relacionada con la concentración de nitrógeno y con la temperatura. En el clúster 2, se agrupó la intensidad de luz y el CO₂ con la productividad de lípidos (mg L⁻¹·día⁻¹), sin embargo, la variable de respuesta presenta mayor similitud con el CO₂, lo que

podría explicar que la productividad de lípidos puede estar influenciada de manera más cercana por el CO₂, pero sin dejar de lado la intensidad de la luz. A pesar de agrupar las variables en diferentes clúster y encontrar algunas relaciones relevantes, se debe tener en cuenta que este tipo de análisis es de carácter cualitativo, y según lo establecido por Gutiérrez (2008), esta técnica no permite realizar ningún tipo de inferencia estadística.

A pesar de ser un buen acercamiento, el análisis de conglomerados no permitió realizar ninguna eliminación de variables para disminuir su número, puesto que todas fueron relacionadas entre sí y demostraron una similitud con las variables de respuesta. Por lo tanto se decidió plantear el ajuste de modelos con todas las variables y con los 42 conjuntos de datos disponibles, divididos en dos grupos como se había planteado inicialmente: condiciones equilibradas y de deficiencia de nitrógeno; teniendo en cuenta las variables de respuesta: contenido de lípidos (%p/p) y productividad de lípidos (mg L⁻¹día⁻¹).

5.4.1.1 Ajuste del modelo para la concentración de lípidos (%p/p) bajo condiciones equilibradas de nitrógeno (N+)

Los datos fueron procesados y analizados a través de un modelo de regresión múltiple lineal usando la concentración de lípidos (%p/p) como variable de respuesta o dependiente y las variables concentración de nitrógeno, CO₂, intensidad de la luz y temperatura como variables independientes o predictores; teniendo en cuenta la ecuación paramétrica de regresión lineal múltiple de la forma:

$$Y_j = \beta_0 + \beta_1 X_{1j} + \beta_2 X_{2j} + \beta_3 X_{3j} \dots + \beta_k X_{kj} + \varepsilon_j$$

Donde Y_j es el valor de la variable dependiente; β₀ es el valor del intercepto en la ordenada; β₂, ..., β_k son los valores de los coeficientes parciales de regresión; X_{1j},

X_{2j}, \dots, X_{kj} son los valores de las variables independiente; y , ε_j es el factor de error asociado con las fluctuaciones de las variables aleatorias. Este primer ajuste de los datos se realizó utilizando como herramienta el paquete estadístico Minitab 15[®].

El modelo de regresión lineal múltiple presentó un R^2 de 78,6% indicando que los predictores explican en este porcentaje la variabilidad de la concentración de lípidos. El valor P del análisis de varianza (0,002) mostró que el modelo estimado de regresión múltiple lineal fue significativo ($P < 0,05$). De las variables evaluadas la única que resultó ser significativa dentro del modelo fue la concentración de CO_2 , con un valor de p de 0,02 ($\alpha = 0,05$), con un efecto positivo sobre la variable de respuesta (Anexo 2).

Según el modelo de regresión lineal múltiple, se estableció que únicamente la concentración de CO_2 tiene un efecto sobre la concentración de lípidos en la microalga *Chlorella*, que para este caso es positivo; es decir, que para incrementar la cantidad de lípidos en la microalga solo se necesitaría un incremento en la concentración de CO_2 en el medio de cultivo. Sin embargo, esta afirmación no representa de manera real el comportamiento del sistema, puesto que se debe tener en cuenta que los modelos con más de dos variables pueden presentar interacciones y que al tratarse de un sistema biológico donde interactúan todos los elementos del conjunto para generar una respuesta determinada, es importante establecer de manera clara el rol de las demás variables. De esta manera, si se eliminan las variables no significativas en este primer acercamiento, se pueden estar obviando relaciones que afectan de manera determinante no solo la concentración de lípidos, sino también la producción de biomasa y la viabilidad celular.

De acuerdo al análisis anterior, se decidió realizar una nueva regresión lineal con interacciones que permitiera explicar el sistema de manera conjunta y poder

evidenciar la importancia de las demás variables dentro de la acumulación de lípidos en *Chlorella*. Asimismo, poder establecer un modelo que además de explicar la relación de las variables pudiese ser utilizado para predecir la concentración de lípidos en la célula en estudios de validación posteriores.

Para generar el modelo se realizó una regresión lineal múltiple con interacciones, utilizando el procedimiento de *todos los modelos posibles*. La selección del mejor modelo se efectuó a través de un análisis objetivo por medio de los siguientes criterios estadísticos: coeficiente de determinación múltiple R^2 , R^2 ajustado, R^2 pronosticada, error estándar (s) y PRESS (del inglés, *prediction error sum of squares* o suma de cuadrados de error de predicción). El ajuste de los datos se realizó utilizando como herramienta *Essential regression* que funciona como complemento de Excel[®].

El total de modelos obtenidos fue de 1022. Para la primera selección se identificaron los mejores valores de R^2 y R^2 ajustado, luego se procedió a realizar el cálculo de los demás criterios estadísticos de selección y la comparación de los modelos. Dentro de este proceso también se tuvieron en cuenta los análisis preliminares de los datos, el análisis subjetivo de acuerdo al caso de estudio y al conocimiento previo del investigador. Los modelos analizados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Variables e interacciones significativas en la concentración de lípidos de *Chlorella*, bajo condiciones equilibradas de nitrógeno (N+). Datos para la selección del mejor modelo.

Variables e interacciones en el modelo	R ²	R ² ajustado	R ² pronosticada	PRESS	Error estándar (s)
N ₂ , Luz, N ₂ *CO ₂	0,87	0,84	0,816	86,45	2,324
N ₂ , Luz, CO ₂ , T°*CO ₂	0,88	0,83	0,798	94,91	2,404
N ₂ , CO ₂ , N ₂ *Luz, T°*CO ₂	0,88	0,83	0,709	136,98	2,406
N ₂ , CO ₂ , N ₂ *Luz, N ₂ *CO ₂	0,88	0,83	0,608	184,35	2,410
N ₂ , N ₂ *Luz, N ₂ *CO ₂ , T°*CO ₂	0,88	0,83	0,429	268,78	2,412
Luz, CO ₂ , N ₂ *Luz, Luz*CO ₂	0,88	0,83	0,661	159,73	2,412
N ₂ *T°, N ₂ *CO ₂ , Luz*T°	0,86	0,83	0,784	101,55	2,413
N ₂ , N ₂ *Luz, N ₂ *CO ₂ , Luz*CO ₂	0,88	0,83	-4,769	2715,29	2,415
N ₂ , Luz, CO ₂ , Luz*CO ₂	0,88	0,83	0,001	470,16	2,419
N ₂ , CO ₂ , N ₂ *Luz, Luz*CO ₂	0,87	0,82	-0,566	737,00	2,426
Luz, CO ₂ , N ₂ *Luz, T°*CO ₂	0,87	0,82	0,650	164,90	2,432
N ₂ , Luz, CO ₂ , N ₂ *CO ₂	0,87	0,82	-0,336	628,59	2,437

El modelo seleccionado para explicar la variación del contenido de lípidos incluyó las variables: concentración de nitrógeno, intensidad de luz y la interacción entre la concentración de nitrógeno y CO₂. El mejor modelo seleccionado muestra que se ajustó satisfactoriamente al conjunto de datos con un R² de 87% y un error estándar de 2,32. El valor de F menor a 0,05 confirma que el modelo de regresión múltiple con interacciones resultó ser significativo. Asimismo, todos los predictores presentes en el modelo fueron significativos (P<0,05) (Anexo 3). La ecuación obtenida para el modelo es la siguiente:

$$C_{LP} = 14,87 - 0,606 * N_2 + 0,06480 * Luz + 0,09357 * N_2 * CO_2$$

Donde;

C_{LP}: Concentración de lípidos (%p/p)

N₂: Concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (mM)

Luz: Intensidad de la luz ($\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

CO₂: Concentración de CO₂ (%v/v)

5.4.1.2 Ajuste del modelo para la productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$) bajo condiciones equilibradas de nitrógeno (N+)

Se analizaron los datos a través del modelo de regresión múltiple, utilizando como variable de respuesta la producción de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$), en condiciones de nitrógeno iguales o superiores a las concentraciones estándar. Las variables experimentales utilizadas como predictores del modelo fueron la concentración de nitrógeno, CO₂, intensidad de la luz y temperatura. La regresión se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico Minitab 15[®].

El modelo de regresión lineal múltiple según el análisis de varianza fue significativo con un valor de P de 0,000 ($\alpha=0,05$). De los cuatro predictores solo la concentración de nitrógeno y CO₂ fueron significativos en el ajuste del modelo ($P<0,05$). El R² indicó que los predictores explicaron el 97,3% de la varianza de la productividad de lípidos en la microalga *Chlorella* (Anexo 4).

Posteriormente, se realizó el ajuste de datos a través de un modelo de regresión lineal múltiple con interacciones. Para encontrar el mejor modelo se utilizó el procedimiento de *todos los modelos posibles* y la selección se llevó a cabo teniendo en cuenta los criterios objetivos y subjetivos. El ajuste de los datos se realizó utilizando como herramienta *Essential regression* que funciona como complemento de Excel[®].

Se generaron 1022 modelos de los cuales se seleccionaron los que mejor ajuste presentaron, teniendo en cuenta el R² y R² ajustado. Se eligieron cuarenta modelos que presentaron estas características. Cada modelo de este grupo fue analizado teniendo en cuenta los predictores presentes, con el fin de determinar

su significancia ($P < 0,05$) en el modelo. Con el análisis anterior, 36 modelos se descartaron puesto que dentro su estructura se identificó predictores o interacciones que no fueron significativas. Finalmente, los cuatro modelos escogidos fueron analizados teniendo en cuenta los criterios objetivos R^2 , R^2 ajustado; R^2 pronosticada, el error estándar (s) y PRESS y los criterios subjetivos (Tabla 4).

Tabla 4. Variables e interacciones significativas en la productividad de lípidos de *Chlorella*, bajo condiciones equilibradas de nitrógeno (N+). Datos para la selección del mejor modelo.

No	Variables e interacciones en el modelo	R^2	R^2 ajustado	R^2 pronosticada	PRESS	Error estándar (s)
1	$N_2 * T^\circ$, $T^\circ * CO_2$	0,98	0,98	0,971	380,99	4,726
2	CO_2 , $N_2 * T^\circ$, $N_2 * CO_2$	0,98	0,98	0,496	6581,02	4,819
3	N_2 ; T° ; $Luz * CO_2$	0,98	0,97	0,938	813,48	5,364
4	CO_2 , $N_2 * T^\circ$	0,97	0,96	0,942	758,17	5,346

Los cuatro modelos se ajustaron satisfactoriamente a los conjuntos de datos de productividad de lípidos con un R^2 que está entre 0,98 y 0,99. Los demás criterios presentaron variaciones entre los diferentes modelos. Los valores bajos de PRESS y error estándar, sugieren que el mejor modelo el número 1. Sin embargo, este solo presenta interacciones que en la práctica son más complicadas de manejar que las variables unitarias. El modelo número 4, presenta una estructura más simple e incluye las mismas variables que el modelo 1. Teniendo en cuenta lo anterior, se seleccionó el modelo número 4, que además presenta los segundos valores más bajos de PRESS y error estándar, con un R^2 pronosticada apropiada del 94%.

El análisis de varianza del modelo seleccionado muestra que la regresión múltiple con interacciones resultó significativa ($F < 0,05$) (Anexo 5). La ecuación del modelo

que explica la variabilidad de la productividad de lípidos con respecto a las variables experimentales significativas, se presenta a continuación:

$$P_{LP} = 31,88 + 6,35*CO_2 - 0,048*N_2*T^{\circ}$$

Donde;

P_{LP} : Productividad de lípidos ($mg\ L^{-1}día^{-1}$)

CO_2 : Concentración de CO_2 (%v/v)

N_2 : Concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (mM)

T° : Temperatura ($^{\circ}C$)

5.4.1.3 Ajuste del modelo para la concentración de lípidos (%p/p) bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno (N-)

Para el ajuste del conjunto de datos de *Chlorella* en condiciones de deficiencia de nitrógeno, se realizó una regresión lineal múltiple estableciendo como variable de respuesta o dependiente la concentración de lípidos. La concentración de nitrógeno, CO_2 , intensidad de la luz y temperatura, fueron fijadas como variables independientes o predictores. La regresión se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico Minitab 15[®].

En el modelo de regresión lineal múltiple generado, solo uno de los predictores incluidos en el modelo resultó ser significativo ($P < 0,05$), este fue la concentración de nitrógeno ($P = 0,001$), lo que indica que esta variable está relacionada de manera significativa con la concentración de lípidos en la microalga. El valor P de 0,001 del análisis de varianza mostró que el modelo estimado mediante el procedimiento de regresión lineal fue significativo ($P < 0,05$). El valor R^2 indica un ajuste de los datos de 0,92 (Anexo 6).

Según el modelo anterior, la concentración de lípidos depende únicamente de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo. Con el fin de evidenciar si existen relaciones significativas entre todos los predictores del modelo, se realizó un nuevo análisis a través del ajuste de datos a un modelo de regresión lineal múltiple con interacciones. La selección del mejor modelo se realizó teniendo en cuenta la metodología descrita en apartados anteriores. Se seleccionaron 17 modelos teniendo en cuenta los valores de R^2 y R^2 ajustado. Para la selección del mejor modelo a éstos se les realizó el cálculo de los criterios objetivos de selección: R^2 , R^2 ajustado; R^2 pronosticada, el error estándar (s) y PRESS (Tabla 5).

Tabla 5. Variables e interacciones significativas en la concentración de lípidos de *Chlorella*, bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno (N-). Datos para la selección del mejor modelo.

	Variables e interacciones del modelo	R^2	R^2 ajustado	R^2 pronosticada	PRESS	Error estándar (s)
1	CO ₂ , N ₂ *T°, N ₂ *CO ₂	0,95	0,94	0,926	137,46	3,267
2	N ₂ , CO ₂ , N ₂ *CO ₂	0,97	0,94	0,915	157,34	3,629
3	N ₂ , CO ₂ , N ₂ *T, N ₂ *CO ₂	0,96	0,93	0,899	187,66	3,375
4	CO ₂ , N ₂ *T°, N ₂ *CO ₂ , T°*CO ₂	0,96	0,94	0,888	207,12	3,286
5	N ₂ , CO ₂ , N ₂ *Luz, N ₂ *CO ₂	0,96	0,94	0,867	246,60	3,288
6	N ₂ , Luz, CO ₂ , N ₂ *CO ₂	0,96	0,94	0,867	246,60	3,288
7	Luz, CO ₂ , N ₂ *Luz, N ₂ *CO ₂	0,96	0,94	0,867	246,60	3,288
8	N ₂ , T°, CO ₂ , T°*CO ₂	0,95	0,92	0,856	267,24	3,572
9	N ₂ *T°, N ₂ *CO ₂ , Luz*T°, T°*CO ₂	0,96	0,94	0,847	284,76	3,304
10	N ₂ , T°, CO ₂ , N ₂ *CO ₂ , Luz*CO ₂	0,96	0,94	0,834	308,78	3,296
11	T°, CO ₂ , N ₂ *T°, N ₂ *CO ₂ , Luz*CO ₂	0,96	0,94	0,834	308,78	3,296
12	N ₂ , CO ₂ , N ₂ *T°, N ₂ *CO ₂ , Luz*CO ₂	0,96	0,94	0,834	308,78	3,296
13	Luz, CO ₂ , N ₂ *T°, N ₂ *CO ₂ , Luz*CO ₂	0,97	0,94	0,797	377,94	3,276
14	CO ₂ , N ₂ *T°, N ₂ *CO ₂ , Luz*CO ₂ , T°*CO ₂	0,97	0,94	0,769	428,47	3,282
15	Luz, CO ₂ ² , N ₂ *Luz, N ₂ *CO ₂ ² , T°*CO ₂ ²	0,97	0,94	0,758	448,7	3,274
16	N ₂ ² , CO ₂ ² , N ₂ ² *CO ₂ ² , Luz*CO ₂ ² , T°*CO ₂ ²	0,96	0,94	0,728	504,76	3,299
17	N ₂ ² , Luz, T°, CO ₂ ²	0,92	0,87	0,660	631,68	4,756

Los modelos mostraron valores de R^2 superiores al 90%, sin embargo; se evaluaron más criterios con el fin de determinar el modelo que mejor explicara la relación entre los predictores y la variable de respuesta. El valor PRESS se usó para validar el modelo de regresión en términos de predicción para lo cual se tuvo en cuenta que entre más pequeño el valor de este criterio mejor sería el modelo seleccionado.

Los tres primero modelos fueron seleccionados teniendo en cuenta además de la bondad de ajuste, los menores valores de PRESS y error estándar. Para seleccionar el mejor modelo se realizó un nuevo análisis teniendo en cuenta la simplicidad del modelo y su coherencia dentro del caso de estudio. De esta manera se eligió el modelo número dos, el cual además de tener valores de los criterios estadísticos muy similares al primero fue considerado de mayor simplicidad para su manejo y validación posterior. El modelo seleccionado se presenta en la siguiente ecuación:

$$C_{LP} = 35,98 - 18,47 \cdot N_2 + 9,664 \cdot CO_2 - 9,920 \cdot N_2 \cdot CO_2$$

Donde;

C_{LP} : Concentración de lípidos (%p/p)

N_2 : Concentración de nitrógeno (mM)

CO_2 : Concentración de CO_2 (%v/v)

El valor R^2 indicó que los predictores que se incluyeron en el modelo explican el 97% de la varianza de la concentración de lípidos. El valor F del análisis de varianza ($2,4888E-05$) mostró que el modelo estimado mediante el procedimiento de regresión lineal con interacciones fue significativo ($\alpha=0,05$). Los valores de P para el coeficiente estimado de nitrógeno, CO_2 y la interacción $N_2 \cdot CO_2$, indicaron que estos predictores fueron significativos ($P < 0,05$) en el modelo (Anexo 7).

5.4.1.4 Ajuste del modelo para la productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$) bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno (N-)

El ajuste del conjunto de datos de *Chlorella* teniendo como variable de respuesta la productividad de lípidos en condiciones de deficiencia de nitrógeno, se realizó a través de regresión múltiple lineal. Los predictores fueron: la concentración de nitrógeno, CO_2 , intensidad de la luz y temperatura. La regresión se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico Minitab 15[®].

El modelo de regresión lineal mostró ser no significativo ($P > 0,05$) para explicar el comportamiento de los datos de productividad de lípidos en condiciones de deficiencia de nitrógeno y no se ajustó satisfactoriamente al conjunto de datos ($R^2 = 51,4\%$ y R^2 ajustado: $23,7\%$) (Anexo 8). Teniendo en cuenta lo anterior, se procedió a realizar un nuevo ajuste de los datos a través de un modelo polinomial de segundo grado o regresión cuadrática. Se incluyeron todos los predictores frente a la variable de respuesta bajo estudio; para esto se utilizó como herramienta el complemento de Excel[®], *Essential regression*.

El ajuste de datos generó 1470 modelos, de los cuales se seleccionaron los que presentaron mejor bondad de ajuste o los mejores valores de R^2 y R^2 ajustado. Los modelos seleccionados fueron ocho. A cada uno de estos se les calculó los criterios estadísticos R^2 , R^2 ajustado; R^2 pronosticada, el error estándar (s) y PRESS (Tabla 6). Para la selección del mejor modelo se tuvo en cuenta el análisis de los anteriores criterios (análisis objetivo) y el análisis subjetivo.

Tabla 6. Variables e interacciones significativas en la productividad de lípidos de *Chlorella*, bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno (N-). Datos para la selección del mejor modelo.

	Variables e interacciones en el modelo	R ²	R ² ajustado	R ² pronosticada	PRESS	Error estándar (s)
1	CO ₂ , Luz*Luz, Luz*T°, Luz*CO ₂	0,98	0,97	-4,169	8336	2,177
2	Luz*Luz, Luz*T°, Luz*CO ₂ , T°*CO ₂	0,97	0,96	-22,536	8336	2,491
3	Luz, Luz*Luz, Luz*CO ₂ , T°*CO ₂	0,97	0,96	-7,318	13416	2,526
4	CO ₂ , Luz*Luz, Luz*T°, T°*CO ₂	0,97	0,95	-52,246	85879	2,777
5	Luz, CO ₂ , Luz*Luz, Luz*CO ₂	0,96	0,93	-18,814	31957	3,125
6	Luz*Luz, Luz*T°, Luz*CO ₂	0,94	0,91	-0,043	1682	3,559
7	N ₂ *CO ₂ , Luz*Luz, Luz*T°	0,93	0,91	0,607	633	3,661
8	Luz*Luz, Luz*T°, CO ₂ *CO ₂	0,93	0,90	-0,354	2183	3,773

El modelo seleccionado fue el número siete, si bien, este modelo presenta los valores más bajos de R² y R² ajustado; el ajuste de 0,93-0,90 se considera adecuado. Este modelo es el único que presenta un R² pronosticada coherente (0,60) que indica en que el modelo es capaz de predecir en un 60% las respuestas de nuevas observaciones (Anexo 9). Asimismo, el valor de PRESS favorece la selección de este modelo puesto que es el más bajo de todos los modelos comparados. La ecuación de modelo seleccionado se describe a continuación.

$$P_{LP} = -28,49 - 1,998 * N_2 * CO_2 - 0,01180 * Luz * Luz + 0,0734 * Luz * T^\circ$$

Donde;

P_{LP}: Productividad de lípidos (mg L⁻¹día⁻¹)

N₂: Concentración de nitrógeno (mM)

CO₂: Concentración de CO₂ (%v/v)

Luz: Intensidad de luz (μE/m²·s¹)

T°: Temperatura (°C)

5.4.2 Ajuste de modelos para *Botryococcus braunii*.

Para *B. braunii* se realizó un estudio exploratorio inicial con los conjuntos de datos, a través de un análisis multivariado por conglomerados jerárquicos. Se evaluaron las variables experimentales concentración de nitrógeno, CO₂, intensidad de la luz y temperatura. Como variable de respuesta únicamente se tuvo en cuenta la concentración de lípidos (%p/p), porque los datos encontrados de productividad de lípidos en esta microalga, no fueron suficientes. El análisis multivariado se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico Minitab 15[®].

El dendograma generado del análisis de conglomerados (Figura 12), mostró un clúster con la misma similitud, conformado por la concentración de nitrógeno y la concentración de lípidos. Lo anterior podría establecer la existencia de una relación directa entre estas dos variables. Sin embargo, las demás variables también se encuentran relacionadas con éstas dos aunque con menor similitud (Anexo 12). A pesar de la presencia de las relaciones entre las variables, este análisis no permitió realizar inferencias estadísticas. Por lo tanto, las variables estudiadas no se agruparon, ni eliminaron para el análisis posterior; principalmente, porque podría perder o encubrir el efecto real de las variables experimentales sobre la respuesta.

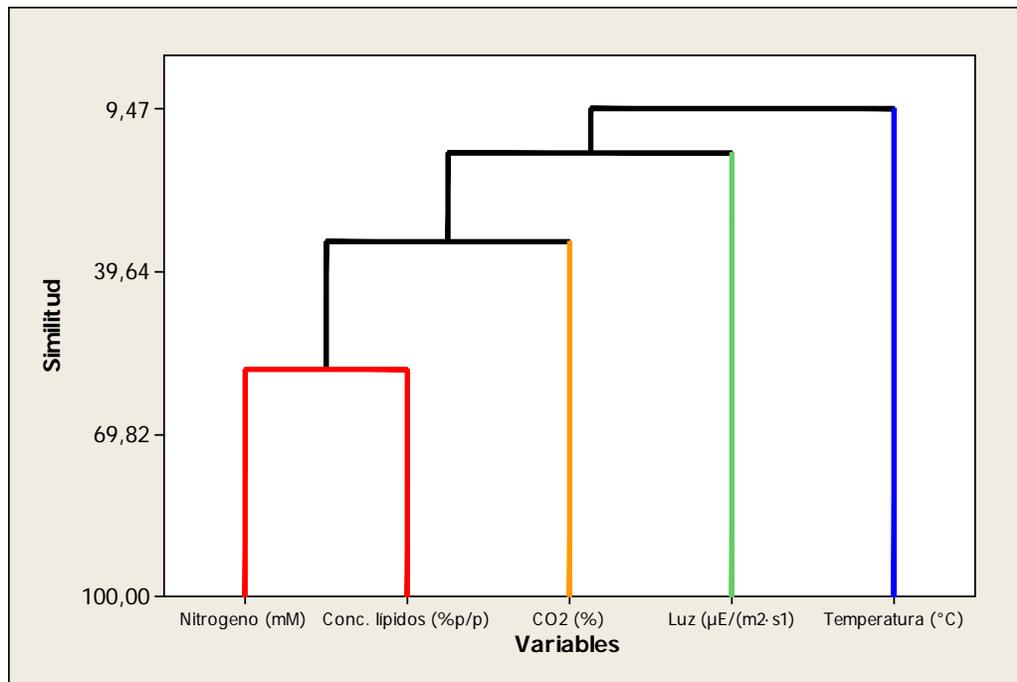


Figura 12. Dendrograma para todas las variables evaluadas en la microalga *B. braunii*.

Enlace de promedios, distancia del coeficiente de correlación absoluto. La gráfica muestra los conglomerados o clusters formados a través de la agrupación de las variables de acuerdo a su similitud.

De acuerdo al análisis anterior, el ajuste de modelos se realizó con 30 conjuntos de datos disponibles, divididos en dos grupos: deficiencia y condiciones equilibradas de nitrógeno. La única variable de respuesta estudiada fue el contenido de lípidos (%p/p).

5.4.2.1 Ajuste del modelo para la concentración de lípidos (%p/p) bajo condiciones equilibradas de nitrógeno (N+)

El primer ajuste de datos para la concentración de lípidos en la microalga *B. braunii*, se realizó a través de una regresión lineal múltiple. Las concentración de

nitrógeno, CO₂, intensidad de la luz y temperatura, fueron fijadas como predictores y la concentración de lípidos (%p/p), como variable de respuesta. La regresión se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico Minitab 15[®].

El análisis de varianza mostró que el modelo de regresión lineal fue significativo con un valor de p de 0,002 ($\alpha=0,05$). De los predictores estudiados, solo la concentración de nitrógeno y la intensidad de luz fueron significativas ($P<0,05$), en la variación de la concentración de lípidos. El valor de R² mostró una bondad de ajuste del modelo del 88% (Anexo 13).

Con el fin de evaluar la presencia de interacciones entre las variables experimentales, las cuales se consideran importantes en modelos con más de dos variables y en sistemas biológicos, se procedió a realizar una regresión lineal múltiple con interacciones. Para encontrar el mejor modelo se utilizó el procedimiento de *todos los modelos posibles*. La selección se llevó a cabo por medio de los criterios objetivos y subjetivos. El ajuste de los datos se realizó con *Essential regression* que funciona como complemento de Excel[®].

Se generaron 1022 modelos de los cuales se escogieron los que mejor ajuste presentaron, teniendo en cuenta el R² y R² ajustado. Se eligieron veinte (20) modelos con estas características. Cada uno de estos se analizó teniendo en cuenta la significancia ($P<0,05$) de los predictores en el modelo y la coherencia de éstos. En los modelos evaluados no se encontraron interacciones significativas. Por lo tanto el modelo seleccionado, fue aquel que no presentó interacciones y además coincidió con lo establecido en el ajuste de datos por regresión lineal múltiple, analizada anteriormente. La ecuación del modelo seleccionado se describe a continuación:

$$C_{LP} = 45,58 - 1,062 \cdot N_2 - 0,0096 \cdot Luz$$

Donde;

C_{LP} : Concentración de lípidos (%p/p)

N_2 : Concentración de nitrógeno (mM)

Luz: Intensidad de luz ($\mu E/m^2 \cdot s^{-1}$)

El modelo seleccionado presentó una bondad de ajuste adecuada de 0,84, además presentó un R^2 pronosticada coherente (0,61) que indica en que el modelo es capaz de predecir en un 61% las respuestas de nuevas observaciones (Tabla 7).

Tabla 7. Criterios estadísticos del modelo seleccionado para concentración de lípidos en *B. braunii* bajo condiciones equilibradas de nitrógeno (N+)

Criterios estadísticos	Valores
R^2	0,84
R^2 ajustado	0,81
R^2 pronosticada	0,607
PRESS	650,37
Error estándar (s)	5,371

La ecuación del modelo mostró que tanto la concentración de nitrógeno, como la intensidad de luz, ejercen un efecto negativo sobre la variable de respuesta. El coeficiente de la concentración de nitrógeno (-1,062 con un valor p de 0,000987) indicó que el efecto negativo es significativo sobre la variable de respuesta, es decir, que si se deja constante la luz y se genera un incremento de una unidad en la concentración de nitrógeno, la concentración de lípidos disminuye en 1,062 unidades. Asimismo, el incremento de la intensidad de la luz por su efecto negativo significativo (Anexo 14), genera una disminución de la concentración de lípidos si su nivel se incrementa, aunque su efecto es menor si se compara con la variación que genera el nitrógeno en la concentración de lípidos.

5.4.2.2 Ajuste del modelo para la concentración de lípidos (%p/p) bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno (N-)

El ajuste del conjunto de datos se realizó utilizando como herramienta un modelo de regresión lineal múltiple. La regresión se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico Minitab 15[®]. El valor p en la tabla Análisis de varianza (0,002) mostró que el modelo estimado mediante el procedimiento de regresión fue significativo ($P < 0,05$). Los valores de p para el coeficiente estimado de la concentración nitrógeno (0,003) y CO_2 (0,009) permitieron establecer que estas dos variables se encuentran relacionadas de manera significativa ($\alpha = 0,05$) con la variable de respuesta. El valor de R^2 indicó que los predictores que se incluyeron en el modelo explican el 76,1% de la varianza de la concentración de lípidos (Anexo 15).

Con el fin de establecer la existencia de relación entre variables, se llevó a cabo un nuevo ajuste de datos a un modelo de regresión lineal múltiple con interacciones, para seleccionar el mejor modelo que explicara la variabilidad de la concentración de lípidos en condiciones de deficiencia de nitrógeno. El método de regresión utilizado fue el de *todos los modelos posibles*, de donde se obtuvieron 1022 modelos, de los cuales se seleccionaron 35 por su mejor ajuste al conjunto de datos, dado por sus valores de R^2 y R^2 ajustado. Al analizar cada uno de los modelos se descartaron 34 de ellos, puesto que las interacciones que se incluyeron resultaron no significativas ($P > 0,05$).

El modelo seleccionado fue el que no presentó interacciones y coincidió con el establecido en la regresión lineal múltiple inicial, con las variables concentración de nitrógeno y CO_2 , con relación significativa frente a la concentración de lípidos. La ecuación del modelo se presenta a continuación:

$$C_{LP} = 58,18 - 20,77 \cdot N_2 + 6,489 \cdot \text{CO}_2$$

Donde;

C_{LP} : Productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$)

N_2 : Concentración de nitrógeno (mM)

CO_2 : Concentración de CO_2 (%v/v)

Los valores de R^2 y R^2 ajustado evidenciaron que el modelo se ajustó satisfactoriamente a los datos con valores de 0,72 y 0,67, respectivamente, y un R^2 pronosticada del 60% (Anexo 16). La ecuación del modelo mostró que el nitrógeno tiene un efecto negativo y el CO_2 un efecto positivo sobre la concentración de lípidos. Según los coeficientes significativos del modelo, el incremento en una unidad de la concentración del nitrógeno manteniendo constante el CO_2 , disminuye la concentración de lípidos en 20 unidades. Mientras que manteniendo constante el nitrógeno e incrementando en una unidad el CO_2 , la concentración de lípidos incrementa en 6,5 unidades.

5.5 Análisis y validación de los modelos

5.5.1 Modelos para la microalga *Chlorella*.

Los modelos generados en condiciones de equilibrio y deficiencia de nitrógeno para la microalga *Chlorella*, fueron comparados con el fin de analizar los predictores que resultaron significativos en cada uno de estos, para la concentración y productividad de lípidos, establecidas como variables de respuesta (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación de los modelos para las variables de respuesta en condiciones equilibradas y de deficiencia de nitrógeno en la microalga *Chlorella*.

Condiciones de experimentación evaluadas	VARIABLES DE RESPUESTA	
	Concentración de lípidos (%p/p)	Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ día ⁻¹)
Equilibrio de nitrógeno (N+)	$C_{LP} = 14,87 - 0,606 * N_2 + 0,06480 * Luz + 0,09357 * N_2 * CO_2$ (1)	$P_{LP} = 31,88 + 6,35 * CO_2 - 0,048 * N_2 * T^o$ (3)
Deficiencia de nitrógeno (N-)	$C_{LP} = 35,98 - 18,47 * N_2 + 9,664 * CO_2 - 9,920 * N_2 * CO_2$ (2)	$P_{LP} = -28,49 - 1,998 * N_2 * CO_2 - 0,01180 * Luz * Luz + 0,0734 * Luz * T^o$ (4)

5.5.1.1 Concentración de lípidos (%p/p), en condiciones de equilibrio de nitrógeno

De acuerdo a los parámetros y relaciones mostradas en la ecuación del modelo se puede establecer que en medios de cultivo con cantidades equilibradas de nitrógeno, es decir, concentraciones correspondientes a los valores estándares o superiores a estos, la concentración de lípidos en la microalga, depende de manera significativa de tres factores: concentración de nitrógeno, intensidad de luz, y la relación carbono-nitrógeno.

La concentración de lípidos se relacionó de manera negativa con el nitrógeno, lo que significa que un incremento de este nutriente, genera una disminución de la cantidad de lípidos (%p/p), en una proporción de 0,6 unidades, sí las demás variables se mantienen constantes. Lo anterior se comprobó a través de la validación del modelo por escenarios (ver numeral 4.4.3), donde la concentración de lípidos fue mayor cuando el nitrógeno se fijó en 3mM, concentración considerada como la más baja dentro de las condiciones de equilibrio de

nutrientes, según lo reportado en la literatura. Estudios de Li et al. (2008), probaron concentraciones de nitrógeno iguales y superiores a los estándares (3, 5, 10, 15 y 20mM de NaNO₃) con *N. oleoabundans* (*Chlorophyta*) y demostraron que la mayor acumulación de lípidos (40%p/p) se originó cuando la concentración se fijó en 3mM (la más baja) y disminuyó a medida que se incrementó la concentración de nitrógeno, obteniendo solo un 8%p/p de lípidos a 20mM de nitrógeno. Asimismo, estos autores demostraron que la concentración de nitrógeno también impacta en la concentración de biomasa, puesto que evidenciaron un efecto positivo cuando se incrementó el nitrógeno de 3mM a 10mM obteniendo 1,85g/L y 3,15g/L de biomasa, respectivamente. Sin embargo, cuando el nitrógeno se ubicó en 15mM y 20mM la concentración de biomasa disminuyó a 2,91g/L y 2,70 g/L, respectivamente.

Esto determina que aún en condiciones equilibradas de nitrógeno, este nutriente sigue siendo relevante en la concentración de lípidos, donde valores bajos favorecen la acumulación de aceites. Sin embargo, el nitrógeno también está implicado en la producción de biomasa, por lo tanto concentraciones bajas de este elemento generan baja cantidad de biomasa.

La concentración de lípidos según el modelo, también depende del CO₂ y la intensidad de luz. A través de la validación del modelo se determinó que si el nitrógeno se mantiene en 3mM, la concentración de lípidos incrementa de manera proporcional a la variación del CO₂ y la luz. Al respecto, estudios realizados por Hsueh et al. (2009), donde estudiaron la concentración de CO₂ en un rango de 0,04% a 8% v/v, demostraron que el CO₂ no solo incrementa la producción de biomasa, sino también el contenido de lípidos. Asimismo, la luz también es considerada por varios autores como uno de los factores determinantes en la composición bioquímica de la biomasa, contenido de pigmentos y actividad fotosintética de microalgas (Widjaja et al., 2009; Hu, 2004).

De acuerdo a lo anterior, con el fin de generar procesos reproducibles y rentables se deberá equilibrar la cantidad de nitrógeno, la concentración de CO₂ y luz, de tal manera que se pueda lograr un rendimiento general de proceso adecuado que facilite los procesos de cosecha de biomasa y recuperación de lípidos.

5.5.1.2 Concentración de lípidos (%p/p), en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

En la ecuación del modelo, el coeficiente de la concentración de nitrógeno (-18,47 con un valor p de 0,003) indicó un efecto negativo significativo sobre la concentración de nitrógeno; es decir, que si se deja constante el CO₂ y se incrementa en una unidad el nitrógeno, la concentración de lípidos (%p/p) disminuye en 18,5 unidades. El incremento tan marcado en la concentración de lípidos que genera la disminución de nitrógeno cuando se trabaja por debajo de las concentraciones estándar, demuestra que en estas condiciones la eliminación de este nutriente es el principal factor para maximizar la respuesta. Lo anterior se pudo confirmar a través de la validación del modelo. Cuando el nitrógeno tomó el valor de cero, y el CO₂ se mantuvo constante, la concentración de lípidos fue de 36%p/p; mientras que el incremento del nitrógeno a 1mM, bajo estas mismas condiciones, generó una disminución de la concentración de lípidos al 17,5% p/p.

El CO₂ es otra de las variables significativas y ejerce un efecto positivo sobre la concentración de lípidos. Es decir, que un incremento en la concentración de CO₂ genera un aumento proporcional en la concentración lipídica de la microalga. Lo cual se evidenció en la validación del modelo, donde la concentración de lípidos paso de 45 a 74%, cuando la concentración de CO₂, se incrementó del 1 al 4% (v/v) y el nitrógeno se mantuvo en cero. Sin embargo, dentro del modelo la interacción N₂*CO₂, es significativa y ejerce un efecto negativo sobre la respuesta. Al respecto, los resultados de la validación del modelo mostraron que un incremento en la concentración de nitrógeno a 1mM, con una variación del CO₂ de

1 al 4% disminuye la concentración de lípidos de 17 y 16%. Mientras que el incremento a 2mM, sin importar la concentración de CO₂, genera un valor negativo en la concentración de lípidos. Por lo tanto, el incremento de la concentración de CO₂, solo favorece la concentración de lípidos, cuando el nitrógeno es eliminado del medio de cultivo (0mM), si existe un incremento en la concentración del nitrógeno, la concentración de CO₂, debe ser la menor posible.

Al respecto, Schenk et al. (2008), indican que cuando hay deficiencia de crecimiento celular por agotamiento de nutrientes, las células tienen la capacidad de fijar CO₂ y acumular sustancias como almidones o lípidos como reservas importantes para las funciones de supervivencia en condiciones desfavorables. Chiu et al. (2008), reconoce que la asimilación de carbono ya sea orgánico u inorgánico en condiciones de estrés, dado principalmente por deficiencia de nitrógeno, continua después que la célula ha sido expuesta a estas condiciones y tiende a acumularse en productos de reserva, tales como triglicéridos.

5.5.1.3 Comparación de los modelos para concentración de lípidos

Comparando las relaciones significativas encontradas en los dos modelos para la concentración de lípidos, se evidenció que el nitrógeno fue significativo para las dos condiciones experimentales evaluadas (equilibrio y deficiencia de nitrógeno), lo cual permitió establecer, que el incremento en la concentración de este nutriente ocasiona una disminución en la concentración lipídica de la microalga. Lo anterior concuerda con muchos autores los cuales comprueban que la deficiencia de nitrógeno es uno de los factores de estrés más importantes en la acumulación de lípidos en microalgas, aunque bajo estas condiciones las concentraciones de biomasa son bajas, comparadas con las obtenidas en cultivos en condiciones de equilibrio de nitrógeno (Schenk et al., 2008; Griffiths & Harrison, 2009; Lv et al., 2010). Sin embargo, al comparar los coeficientes de los modelos para la concentración de nitrógeno en las dos condiciones experimentales (0,606 para N+

y 18,47 para N-), el incremento más marcado se presenta cuando la disminución de nitrógeno se ubica por debajo de las concentraciones estándar, lo que permite sustentar que la concentración de lípidos se ve más favorecida si la microalga es cultivada en ausencia o muy bajas concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo.

Dentro de los predictores de los modelos, el CO₂ también se presentó como significativo para las dos condiciones experimentales. Apareciendo de manera independiente en condiciones de deficiencia de nitrógeno y formando interacción con el nitrógeno en las dos condiciones experimentales evaluadas. Cabe destacar que la interacción N₂*CO₂, en condiciones de equilibrio y deficiencia de nitrógeno, ejerce un efecto positivo y negativo, respectivamente, sobre la concentración de lípidos.

Teniendo en cuenta los diferentes efectos de los predictores en las dos condiciones experimentales, se comparó la concentración de lípidos para evidenciar si existían diferencias significativas entre las dos condiciones experimentales (N+ y N-). Se realizó una prueba de hipótesis para las medias de las dos condiciones (t-student). La formulación de hipótesis fue: H₀: $\mu_1 = \mu_2$ y H_a: $\mu_1 \neq \mu_2$. Para el cálculo se utilizó el paquete estadístico Minitab 15[®].

El estadístico de prueba t fue de 2,52 con un valor de P de 0,025 ($\alpha=0,05$) (Anexo 10), lo que permitió rechazar la hipótesis nula la cual establece que las medias de las dos condiciones experimentales son iguales, por lo tanto se comprueba que existe diferencia significativa entre las medias de la concentración de lípidos en condiciones de equilibrio y deficiencia de nitrógeno, siendo la media de la concentración de lípidos mayor en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Figura 13).

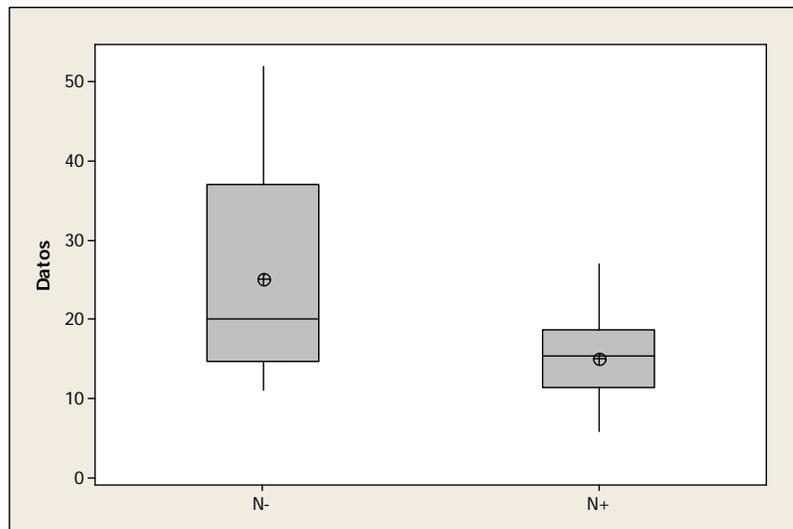


Figura 13. Diferencia de medias para la concentración de lípidos (%p/p) en condiciones de equilibrio de nitrógeno (N+) y deficiencia de nitrógeno (N-)

Para maximizar la concentración de lípidos es fundamental controlar las variables: concentración de nitrógeno, CO₂ e intensidad de luz, las cuales resultaron significativas en los modelos. Es necesario tener en cuenta que estas presentan relaciones entre sí, por lo tanto del valor que se asigne a cada una de ellas, dependerá en que niveles se fijen las otras, con el fin de obtener la mayor concentración de lípidos en la microalga.

5.5.1.4 Productividad de lípidos (mg L⁻¹día⁻¹) en condiciones de equilibrio de nitrógeno.

De acuerdo al modelo ajustado a los datos de *Chlorella*, se pudo establecer que el predictor que más influencia tiene sobre la productividad de lípidos es la concentración de CO₂ en el medio de cultivo. Esta variable tiene un efecto positivo sobre la respuesta y según el modelo, si la concentración de CO₂ se incrementa en una unidad, la productividad lipídica incrementará en 6,35 unidades. La validación del modelo determinó que una variación del CO₂ del 1 al 5% (v/v),

manteniendo constante el nitrógeno y la temperatura, ocasionó un incremento de la productividad de lípidos de 35 a 60 mg L⁻¹día⁻¹. Singh et al., 2011, mencionan que el carbono es un requisito fundamental, puesto que la composición de las microalgas es alrededor de 45% de carbono y que se estima que por cada kg de microalgas por lo menos 1,6 Kg de CO₂ son necesarios, en función del balance de masa. Asimismo, estudio de Ugwu et al. (2008), establecen que las deficiencias de CO₂ pueden reducir la productividad de lípidos.

La ecuación del modelo también muestra una interacción entre la concentración de nitrógeno y la temperatura, la cual ejerce un efecto negativo sobre la variable de respuesta, sin embargo; su efecto es muy bajo comparado con el CO₂. La interacción establece que si cada una de sus variables se incrementa en tiempos diferentes, la disminución de la productividad de lípidos no es tan marcada; pero si juntas incrementan en una unidad, manteniendo constante el CO₂, el efecto multiplicativo de la interacción hace que la disminución de la productividad de lípidos sea mucho más alta. Lo anterior fue evidenciado a través de la validación del modelo, de esta forma cuando la concentración de CO₂ se fijó en 4%v/v, el nitrógeno se incrementó de 3 a 17,5 mM y la temperatura de 26 a 28°C, la productividad disminuyó de 54 a 34 mg L⁻¹day⁻¹.

De acuerdo a lo anterior, temperaturas y concentraciones de nitrógeno bajas favorecen el incremento de la productividad lipídica, lo que concuerda con los estudios realizados por Converti et al. (2009), quienes demostraron que una disminución de temperatura de 30 a 25°C incrementó en 2.5 veces la productividad de lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris*. Estos autores también encontraron que al disminuir la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo de 1,5g/L a 0,375g/L (NaNO₃) se generó un incremento en la productividad de lípidos de 8,16 a 20,30 mg L⁻¹día⁻¹.

5.5.1.5 Productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$) en condiciones de deficiencia de nitrógeno

Cuando *Chlorella* se mantiene en condiciones de deficiencia de nitrógeno, la concentración de este nutriente y el CO_2 generan un efecto negativo en la variable de respuesta. Por lo tanto, el incremento de las dos variables al tiempo causa una disminución en la productividad de lípidos. En el modelo también se muestra que la luz presenta un efecto cuadrático negativo, sin embargo, cuando interacciona con la temperatura ejerce un efecto positivo en la productividad de lípidos.

En el modelo planteado, la concentración de nitrógeno, CO_2 , la intensidad de luz y la temperatura, fueron significativas para la productividad de lípidos en la microalga *Chlorella*. Al respecto se puede establecer que aunque la deficiencia de nutrientes (nitrógeno), ha sido hasta ahora el método más empleado para inducir la biosíntesis de lípidos en microalgas, es importante tener en cuenta que las microalgas acumulan lípidos bajo estas condiciones, cuando la fuente energía (luz) está disponible en abundancia y cuando los mecanismos de la fotosíntesis están activos (Courchesne et al., 2009).

La validación del modelo, permitió establecer que la productividad de lípidos se incrementa cuando las concentraciones de nitrógeno se mantienen en cero. En ausencia de nitrógeno, el aumento del CO_2 y de la intensidad de luz, manteniendo constante la temperatura produce un incremento de la productividad. De esta forma, a 30°C con 1% v/v de CO_2 y $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ se logró una productividad teórica, según la validación del modelo de $74 \text{ mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$. Este valor de productividad fue mejorado cuando la temperatura se incrementó hasta 34°C , el CO_2 al 4%v/v y la luz se fijó en $120 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, alcanzando la máxima productividad de $101 \text{ mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$. Una mayor intensidad de luz puede incrementar la productividad. Sin embargo, el límite máximo de este factor, es de $172 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, puesto que por encima de este valor la productividad fue impactada

negativamente obteniendo valores de cero. De esta manera se puede establecer que la luz es un factor limitante y aunque el incremento de temperatura favorece el incremento de la productividad, este último factor por encima de 30°C puede ser dañino para algunas microalgas.

Teniendo en cuenta que la productividad de lípidos relaciona la concentración de lípidos y la cantidad de biomasa, varios autores (Ma et al., 1997; Phatarpekar et al., 2002; Danesi et al., 2004; Richmond, 2004), han descrito que la luz en grandes concentraciones incrementa la biomasa; sin embargo esto se lleva a cabo hasta un punto de saturación. Después de éste se manifiestan fenómenos de fotoinhibición que limitan la producción de biomasa, atribuido principalmente a la reacción de fotooxidación que se presenta en el interior de la célula puesto que el exceso de luz no puede ser absorbido por el aparato fotosintético.

También se comprobó por la validación del modelo, que si se mantiene los valores de luz constantes, el incremento de la temperatura genera un aumento progresivo de la productividad, lo cual debe ser revisado con cuidado puesto que las microalgas por lo general poseen un rango de temperatura óptimo para el desarrollo de sus funciones metabólicas y de crecimiento. Estudios en la microalga *Chlorella*, han demostrado que temperaturas por encima de los 30°C, pueden tener un efecto negativo en el crecimiento, llegando incluso a generar muerte celular (Converti et al., 2009).

5.5.1.6 Comparación de los modelos para la productividad de lípidos.

El conjunto de datos de productividad de lípidos, en condiciones de equilibrio se ajustó de manera significativa a una regresión lineal, mientras que en condiciones de deficiencia de nitrógeno se ajustó a un polinomio de segundo grado o regresión cuadrática. Los predictores significativos en condiciones de equilibrio de nitrógeno fueron la concentración de CO₂, nitrógeno y temperatura. En

condiciones de deficiencia de nitrógeno además de las variables anteriores, la intensidad de luz se presentó con un efecto marcado y relacionado de manera cuadrática con la variable de respuesta.

Del modelo seleccionado para condiciones equilibradas de nitrógeno, se pudo establecer que la variación de la concentración de CO₂ es el predictor que genera mayor efecto (coeficiente 6,35), sobre la productividad de lípidos, por lo tanto el incremento de esta variable permite maximizar la productividad de lípidos en la microalga. Mientras que en condiciones de deficiencia de nitrógeno, la variación de la intensidad de la luz es la que genera un efecto positivo o incremento en la productividad de lípidos, teniendo en cuenta que por su efecto cuadrático existe un límite superior donde el incremento de la variable de respuesta ya no puede ser proporcional al incremento de la luz.

Los modelos para las dos condiciones experimentales presentaron diferentes predictores y relaciones significativas dentro de su estructura. Teniendo en cuenta lo anterior se decidió evaluar si la productividad de lípidos, en estas dos condiciones presentaba diferencias significativas. Para este propósito se realizó una prueba de hipótesis para las medias de las dos condiciones (t-student). La formulación de hipótesis fue: H₀: $\mu_1 = \mu_2$ y H_a: $\mu_1 \neq \mu_2$. Para el cálculo se utilizó el paquete estadístico Minitab 15[®].

El valor de P de 0,044 (P<0,05) para la prueba de hipótesis (Anexo 11), permitió rechazar la hipótesis nula y se determinó que existe diferencia significativa entre la productividad de lípidos en condiciones de equilibrio y deficiencia de nitrógeno, siendo la productividad lipídica mayor en la primera condición (Figura 14).

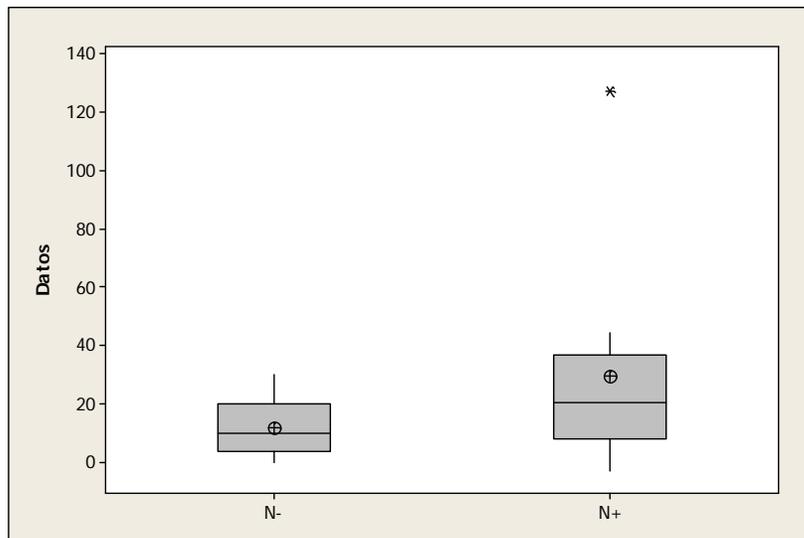


Figura 14. Diferencia de medias para la productividad de lípidos (%p/p) en condiciones de equilibrio de nitrógeno (N+) y deficiencia de nitrógeno (N-)

5.5.2 Modelos para la microalga *B. braunii*

Los modelos establecidos para la concentración de lípidos (%p/p) con el conjunto de datos de la microalga *B. braunii*, fueron comparados y analizados, teniendo en cuenta los predictores significativos y su efecto en la variable de respuesta, en condiciones de equilibrio y deficiencia de nitrógeno (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de los modelos para la concentración de lípidos (%p/p) en condiciones equilibradas y de deficiencia de nitrógeno en la microalga *B. braunii*.

Condiciones de experimentación evaluadas	VARIABLE DE RESPUESTA
	Concentración de lípidos (%p/p)
Equilibrio de nitrógeno (N+)	$C_{LP} = 45,58 - 1,062 \cdot N_2 - 0,0096 \cdot Luz$
Deficiencia de nitrógeno (N-)	$C_{LP} = 58,18 - 20,77 \cdot N_2 + 6,489 \cdot CO_2$

5.5.2.2 Concentración de lípidos (%p/p), en condiciones de equilibrio de nitrógeno

De acuerdo a los predictores significativos para el modelo, la variabilidad de la concentración de lípidos, depende de manera significativa del nitrógeno y de la intensidad de luz. Las cuales presentan un efecto negativo en la respuesta, siendo mayor el efecto ejercido por el nitrógeno.

En la validación del modelo la máxima concentración de lípidos (42% p/p) se presentó cuando el nitrógeno se fijó en la concentración más baja para las condiciones de equilibrio de nitrógeno (3mM) y la intensidad de luz fue cero. El incremento de la concentración de nitrógeno de 3mM a 17,5mM (valor reportado como estándar), manteniendo la luz en cero, generó una disminución de la concentración de lípidos de 42 a 26%. Mientras que la variación de la luz de 50 a 100 $\mu E/m^2 \cdot s^{-1}$, manteniendo en nitrógeno en 3mM, generó un cambio de 38 a 33% en la concentración de lípidos. Aunque el efecto negativo es más marcado cuando se modifica la concentración de nitrógeno, el incremento de las dos variables al tiempo produjo una mayor disminución de la variable de respuesta.

Estudios de Li & Qin (2005), en algunas cepas de *B. braunii*, han demostrado que intensidades de luz altas ($450 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^1$), pueden ocasionar una disminución en la concentración de lípidos. Sin embargo, algunas cepas de las evaluadas resultaron no ser afectadas por la variación de la intensidad de luz. Por lo tanto, el autor afirma que además de otros factores, el tipo de cepa utilizada también determina la cantidad de luz empleada para el crecimiento y producción de lípidos en esta especie.

5.5.2.3 Concentración de lípidos (%p/p), en condiciones de deficiencia de nitrógeno

La variabilidad de la concentración de lípidos en condiciones de deficiencia de nitrógeno, depende de la concentración de nitrógeno y CO_2 , las cuales resultaron significativas en el modelo. La primera ejerce un efecto negativo muy marcado, puesto que establece que la variación en una unidad de la concentración de nitrógeno, incrementa la variable de respuesta en 20,77 unidades, si se mantiene constante el CO_2 . De manera inversa, el efecto del CO_2 es positivo y genera un incremento en la concentración de lípidos en 6,5 unidades, si se mantiene constante el nitrógeno.

De acuerdo a la validación del modelo, cuando el nitrógeno se elimina del medio de cultivo (0mM), se presenta la mayor concentración de lípidos. Cuando se mantuvo estas condiciones y a la concentración de CO_2 se le asignó un valor del 4%, la concentración de lípidos fue del 84% p/p. Según los escenarios planteados para la evaluación del modelo, si se incrementa el CO_2 de manera progresiva, mayor será la concentración de lípidos. Sin embargo, para validaciones experimentales será necesario tener en cuenta la relación carbono-nitrógeno para no generar efectos no deseados en la producción de microalgas. Estudios realizados por Zhila et al. (2005), especifican que el cambio generado en la proporción carbono/nitrógeno en el medio de cultivo genera una direccionalidad

del metabolismo, que en muchas algas conlleva a una acumulación de lípidos neutros, principalmente, triglicéridos y/o carbohidratos, acompañados de un reordenamiento de la composición de los ácidos grasos. Sin embargo, estudios con *B. Braunii* (cepa 765), realizados por Ge et al. (2011), demostraron que esta cepa incrementó su contenido de lípidos solo de 16,43% a 24,45% (p/p) cuando se incrementó la concentración de CO₂ del 2 al 20% (v/v) en el medio de cultivo.

5.5.2.4 Comparación de los modelos para concentración de lípidos

De los modelos se puede establecer que en las dos condiciones evaluadas (equilibrio y deficiencia de nitrógeno), para *B. braunii*, la variable que presenta mayor efecto sobre la respuesta es la concentración de nitrógeno. Esta variable presentó un coeficiente alto en los dos casos, por lo tanto; la variación de la concentración de nitrógeno tiene un efecto mayor sobre la concentración de lípidos, que las otras variables presentes en los modelos. Varios autores (Benerjee et al., 2002; Dayananda et al., 2005; Ahlgren & Hyenstrand, 2009) han determinado que las algas con frecuencia acumulan metabolitos del carbono, como los lípidos y/o polisacáridos, cuando son sometidas a atmósferas ausentes o deficientes de nitrógeno. Como respuesta a estas condiciones desfavorables las células sintetizan este tipo de macromoléculas en cantidades mayores, a las producen en condiciones de equilibrio estequiométrico de nutrientes.

Con el fin de establecer si existían diferencias significativas entre la concentración de lípidos de las dos condiciones evaluadas, equilibrio y deficiencia de nitrógeno, se realizó una prueba de hipótesis para las medias de las dos condiciones (t-student). La formulación de hipótesis fue: H₀: $\mu_1 = \mu_2$ y H_a: $\mu_1 \neq \mu_2$. Para el cálculo se utilizó el paquete estadístico Minitab 15[®].

El estadístico de prueba t fue de 4,69 con un valor de P de 0,000 ($\alpha=0,05$) (Anexo 17). Estos valores permitieron rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias de

la concentración de lípidos en condiciones equilibradas y de deficiencia de nitrógeno. Por lo tanto, se estableció que existe diferencias significativas entre las medias de la variable de respuesta en las dos condiciones evaluadas, siendo mayor la concentración lipídica en *B. braunii*, cuando las concentraciones de nitrógeno son menores a las estándar (Figura 15).

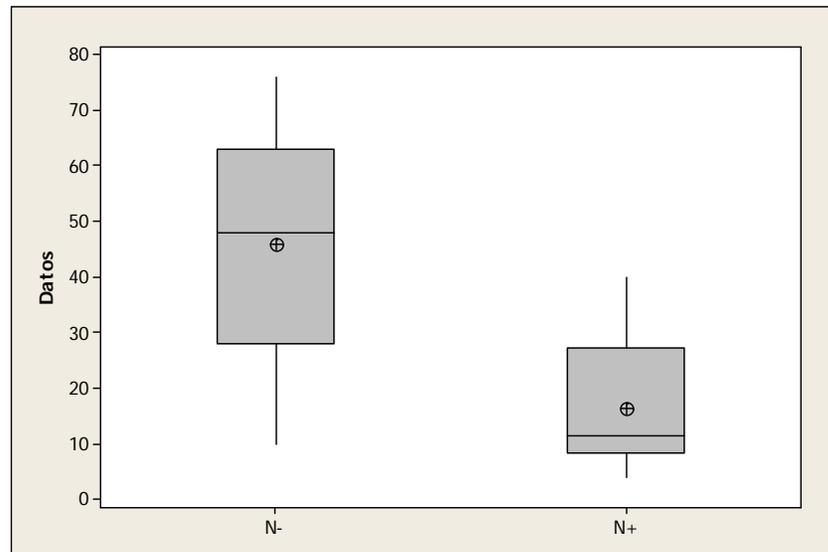


Figura 15. Diferencia de medias para concentración de lípidos (%p/p) en condiciones de equilibrio de nitrógeno (N+) y deficiencia de nitrógeno (N-) (*B. Braunii*).

5.6 Explicaciones bio-metabólicas de las relaciones significativas encontradas en los modelos propuestos.

5.6.1 Concentración de lípidos (%p/p) para las dos microalgas.

El ajuste de datos de concentración de lípidos para las microalgas evaluadas, mostraron comportamientos lineales. La concentración de nitrógeno mostró efecto negativo sobre la concentración de lípidos en todos los modelos para las dos

microalgas. La concentración de CO₂, presentó efecto significativo, con excepción en condiciones de equilibrio de nitrógeno para la microalga *B. braunii* y manifestó interacciones, significativas solo para *Chlorella*. Asimismo, la intensidad de luz fue significativa en las dos microalgas, exclusivamente para las condiciones de equilibrio de nitrógeno (Tabla 10).

Tabla 10. Comparación de los modelos para la concentración de lípidos (%p/p) para las microalgas *Chlorella* y *B. braunii* en las dos condiciones experimentales evaluadas (N+ y N-)

Variable de Respuesta	Condiciones experimentales	<i>Chlorella</i>	<i>B. braunii</i>
CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS (p/p)	Equilibrio de nitrógeno (N+)	$C_{LP} = 14,87 - 0,606 * N_2 + 0,06480 * Luz + 0,09357 * N_2 * CO_2$	$C_{LP} = 45,58 - 1,062 * N_2 - 0,0096 * Luz$
	Deficiencia de nitrógeno (N-)	$C_{LP} = 35,98 - 18,47 * N_2 + 9,664 * CO_2 - 9,920 * N_2 * CO_2$	$C_{LP} = 58,18 - 20,77 * N_2 + 6,489 * CO_2$

Los factores que afectan de manera significativa la concentración de lípidos en las dos microalgas evaluadas son: el nitrógeno, CO₂ y la intensidad de luz. La importancia de cada uno de estos sobre la concentración de lípidos se muestra en la figura 16.

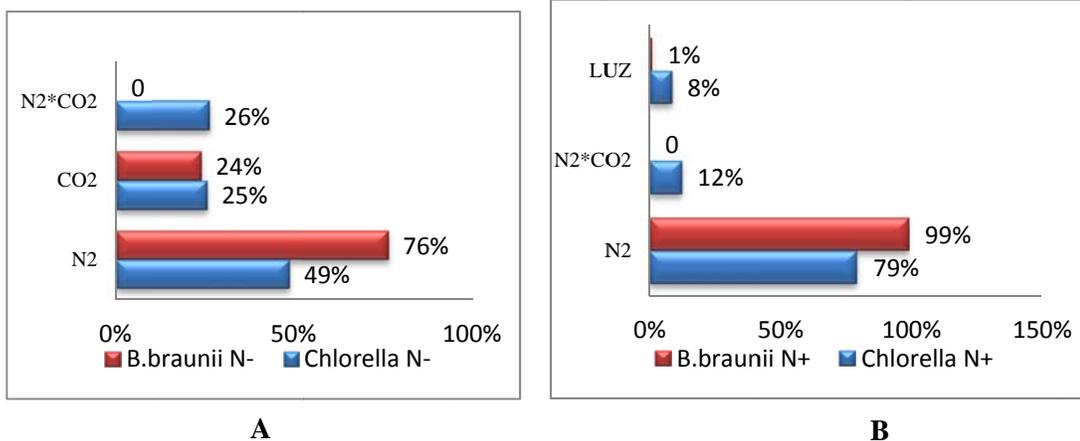


Figura 16. Aporte de cada una de las variables significativas a la variabilidad de la concentración de lípidos para *Chlorella* y *B. braunii*.

A. Condiciones de deficiencia de nitrógeno (N-). B. Condiciones de equilibrio de nitrógeno (N+). El porcentaje indica el peso de la variable experimental sobre la variabilidad de la respuesta, según los modelos seleccionados.

Según los modelos establecidos, la variable experimental que más peso ejerce en la variabilidad de la concentración de lípidos tanto para *Chlorella* como para *B. braunii*, es la **concentración de nitrógeno**, la cual aparece como la variable de mayor porcentaje en las dos condiciones experimentales evaluadas (Deficiencia y equilibrio de nitrógeno). Al respecto, Griffiths & Harrison (2009), establecieron en sus estudios que la mayoría de algas de la división *Chlorophyta* tienen en condiciones normales un contenido de lípidos entre un 20-30% de su peso. Sin embargo, la eliminación del nitrógeno o una disminución de su concentración en el medio de cultivo, generan un cambio importante en la concentración de lípidos, alcanzando valores hasta del 64%.

De acuerdo a lo anterior, el nitrógeno se presenta como uno de los componentes determinantes para maximizar la concentración de lípidos, en las dos microalgas estudiadas, lo que concuerda con lo encontrado por Thompson (1996), quien

describe que las microalgas de la división *Chlorophyta*, presentan una gran capacidad de adaptación a condiciones rápidamente cambiantes y de estrés severo pero que bajo estas condiciones las microalgas evidencian un patrón diverso y algunas veces inusual de lípidos en sus membranas. El cambio en los patrones de lípidos y ácidos grasos también ha sido estudiado por Guschina & Harwood (2006), quienes establecen que ésta alteración está dada principalmente en los lípidos de los cloroplastos.

Como se menciona anteriormente, la deficiencia de nitrógeno no solo favorece la acumulación de lípidos, sino también el tipo de ácidos grasos producidos; lo cual es importante puesto que de los patrones de ácidos grasos obtenidos dependerá el uso final de estas biomoléculas, ya sea para la producción de alimentos o biodiesel. Estudios realizados por Singh et al (2011), determinaron que los principales ácidos grasos en las microalgas incluyen estructuras de cadena media (C10-C14), cadena larga (C16-C18), de cadena muy larga (mayores a C20) y ácidos grasos derivados. Singh et al (2011), establecen que bajo condiciones óptimas de crecimiento las algas sintetizan principalmente ácidos grasos que se ubican en las membranas lipídicas y que pueden representar de un 5 al 20% del peso seco de la célula. Pero cuando se presentan condiciones ambientales desfavorables o condiciones de estrés, muchas microalgas alteran sus rutas de biosíntesis de lípidos para la formación y acumulación de lípidos neutros (20-50% del peso seco de la célula), principalmente en forma de triglicéridos (TG) (Singh et al., 2011).

Lo anterior podría explicarse porque bajo condiciones de estrés, la célula deja de reproducirse por lo tanto no se requieren lípidos estructurales que hagan parte de las membranas celulares de los diferentes organelos como los cloroplastos. Lo que concuerda con lo encontrado por Meng et al (2009), quienes establecen que la síntesis de lípidos se da casi a la misma velocidad del crecimiento celular, por lo tanto, si en un medio de cultivo la limitación de nitrógeno continua, la formación de

lípidos tiene que ser almacenada dentro de las células ya existentes, puesto que la división celular llega hasta un punto donde ya no puede continuar y el crecimiento se detiene (Meng et al., 2009).

Cuando hay deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo, como se ha mencionado, el crecimiento celular se detiene y la célula prioriza por la producción de biomoléculas que le permitan acumular energía para su mantenimiento. Asimismo, el crecimiento puede detenerse porque no existe nitrógeno exógeno que permita el suministro de ion amonio (NH_4^+) que es importante para que se presente la síntesis de diferentes aminoácidos que permite que la célula produzca un gran número de proteínas con propiedades bioquímicas diferentes, tanto catalíticas como estructurales.

Al no existir suministro de nitrógeno externo, la ausencia de ion amonio no permite que este sea unido a intermediarios metabólicos del ciclo del ácido cítrico como el alfa-cetoglutarato y oxalacetato que son los precursores de diversos aminoácidos. El ciclo del ácido cítrico es importante porque permite la producción de succinil-CoA que es necesario para la síntesis del anillo porfirínico de los citocromos, clorofilas y otros compuestos tetrapirrólicos. En este ciclo también es de relevancia el oxalacetato puesto que puede ser convertido en fosfoenolpiruvato y posteriormente a acetil-CoA el cual es el punto de partida para la síntesis de ácidos grasos. A través de este ciclo se producen intermediarios que pueden ser derivados a otras rutas metabólicas para la biosíntesis de varios esqueletos carbonados. Por lo tanto, se puede establecer que el ciclo del ácido cítrico juega dos papeles: bioenergético y biosintético a nivel celular (Madigan et al., 1999).

Según los modelos para las dos condiciones evaluadas (deficiencia y equilibrio de nitrógeno), otro de los factores que resultó significativo fue la **concentración de CO_2** , el cual fue significativo para *Chlorella* en las dos condiciones, mientras que para *B. braunii* solo fue significativo en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

La importancia del suministro de CO₂ está dada porque a través de la fijación de carbono por el ciclo de Calvin se produce el intermediario metabólico gliceraldehido-3- fosfato que puede producir piruvato para luego generar acetil-CoA, iniciador de la síntesis de ácidos grasos.

Lo anterior se lleva a cabo cuando el gliceraldehido-3- fosfato es retirado del ciclo de Calvin y exportado al citoplasma para su consumo, tanto para producir azúcares como para entrar en el ciclo de biosíntesis de ácidos grasos (Yang et al., 2000). La conversión de gliceraldehido-3-fosfato a piruvato se lleva a cabo a través de la ruta glucolítica o glucolisis donde ocurren reacciones de oxidación-reducción que producen enlaces de alta energía en forma de ATP a la vez que se originan dos moléculas de piruvato, el cual puede ser utilizado para la síntesis de aminoácidos en presencia de nitrógeno exógeno y la producción de Acetil-CoA, ésta última es clave en la síntesis de ácidos grasos y otros aminoácidos en la célula (Madigan et al., 1999).

De acuerdo a lo anterior, se podría establecer que la biosíntesis de ácidos grasos se ve favorecida en ausencia de nitrógeno, puesto que la célula prioriza por utilizar la acetil-CoA para producir ácidos grasos ya que no posee fuentes externas de nitrógeno que unidas a los intermediarios metabólicos puedan producir aminoácidos.

En el modelo para *B. braunii* en condiciones de equilibrio de nitrógeno, la concentración de CO₂ no resultó significativa, lo que podría explicarse porque los estudios realizados en esta microalgas se han llevado a cabo en condiciones de deficiencia de nitrógeno y el CO₂ casi siempre se ha mantenido constante en valores que no superan el 4%; mientras que microalgas como *Chlorella* se han estudiado ampliamente con el fin de determinar su potencial para la producción de lípidos asociadas a la asimilación de grandes cantidades de carbono como

estrategia de mitigación de gases de efecto invernadero y unida a la producción de biocombustibles.

Aunque el suministro de CO₂ fue significativo en los modelos y se establece que el incremento de CO₂ ejerce un aumento proporcional de la cantidad de lípidos en las microalgas evaluadas, se debe tener en cuenta que los valores de CO₂ no deben ser extralimitados, puesto que se pueden generar cambios de pH en el medio de cultivo, llegando a afectar el metabolismo y crecimiento de las células. Al respecto, estudios realizados por Ge et al. (2011), en *B. braunii* encontraron que la variación del CO₂ en un rango del 2-20% v/v., ocasionó una disminución en el pH de 7,5 a 6,3. Este efecto también fue encontrado por Chiu et al. (2008) con variaciones de 2-15% de CO₂ en *Chlorella sp.* Dayananda et al. (2005), reporta que el pH del cultivo no tiene efecto en el crecimiento y producción de lípidos en *B. braunii*, si se encuentra en un rango de 6.0 a 8.5.

La resistencia de algunas microalgas al cambio de pH, según lo establecido por Suzuki et al. (1995), podría estar relacionada con la osmoregulación que se logra bioquímicamente por la síntesis o catabolismo del glicerol intracelular. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los valores óptimos de pH por lo general son específicos de cada especie e incluso cepa de microalga. Varios autores (Chiu et al., 2008; Yoo et al., 2010) sugieren que concentraciones de CO₂ del 10-20%, que comúnmente presentan los gases de combustión modifican el pH y podrían inhibir el crecimiento celular.

Estudios también demuestran que los lípidos también reaccionan a pH extremos. Así el estrés por pH alcalino conlleva a la acumulación de TG y a una disminución proporcional de los lípidos de las membranas (fosfolípidos) (Guckert & Cooksey, 1990). Lo cual se convierte en una oportunidad que podría ser evaluada adicionalmente para producir el tipo de lípidos de acuerdo al uso industrial que se desee explorar. Al respecto estudios de Tatsuzawa et al (1996), demostraron que

la proporción de TG (como porcentaje de lípidos totales), fue mayor en *Chlamydomonas sp.*, crecida a un pH 1.0 que en las células cultivadas a pH más altos. El incremento en la saturación de los ácidos grasos en los lípidos de la membrana de *Chlamydomonas*, también se ha sugerido por los mismo autores como una reacción de adaptación a un pH bajo para disminuir la fluidez de la membrana lipídica.

Para entender lo anterior se debe destacar que la ruta de biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos esta catalizada por una gran cantidad de enzimas que determinaran los productos finales. La acumulación de lípidos inicia a partir de la acetil-CoA producida en el citoplasma la cual es catalizada por la acetil-CoA-carboxilasa (ACCase, por sus siglas en inglés), para ser convertida a malonil-CoA, una vez sintetizada la malonil-CoA es transferida por malonil-CoA-trasacetilasa a la proteína transportadora acil (ACP, por sus siglas en inglés), del complejo multienzimático de la ácido graso sintasa (FAS, por sus siglas en inglés). La FAS cataliza la elongación de los ácidos grasos mediante la condensación de moléculas de malonil-CoA y acetil-CoA. ACP, una de las subunidades de FAS, contiene un grupo tiol que puede formar malonil-ACP a través de la formación de tioesteres con malonil-CoA. ACP, también puede fijar acetil por la formación de acetil-ACP. De esta manera el grupo acetil se transfiere a otra subunidad del FAS, la Ketoacil-ACPsintasa (KAS, por sus siglas en inglés), la cual cataliza la condensación de malonil-ACP o el crecimiento de la cadena acil para formar ketobutiril-ACP o Ketoacil-ACP. Este compuesto resultante se transforma primero a través de tres reacciones sucesivas: reducción, deshidratación y reducción, y luego son condensados con otro malonil-CoA. Este ciclo es repetido hasta la formación de una cadena saturada de ácido palmítico (C16:0) o una de ácido esteárico (C18:0). Por último, la ACP-tioesterasa se unirá a la cadena acil y liberará el ácido graso. Para obtener cadenas largas o saturadas de ácidos grasos, son requeridas elongasas y desaturasas, las cuales actúan sobre el

palmitato o estearato. Estas enzimas están localizadas en la membrana del retículo endoplasmático y la mitocondria (Courchesne et al., 2009).

Sin embargo, para continuar la síntesis de triglicéridos lo cuales son importantes en la producción de biodiesel, se comienza una nueva ruta donde el primer paso para la síntesis es la condensación de glicerol-3-fosfato con una acetil-CoA para formar lisofosfatidato (LPA, por sus siglas en inglés) el cual es catalizado por acilCoA:glicerol-sn-3-fosfato acil-transferasa (GPAT, por sus siglas en inglés). El LPA es también condensado, catalizado por GPAT con otra acetil-CoA para producir fosfatidato, el cual puede ser desfosforilado por la fosfatídico fosfatasa acida para producir diacilglicerol. Finalmente, la síntesis de triglicéridos es catalizada por la acil-CoA:diacilglicerol acil-transferasa (DGAT, por sus siglas en inglés), la cual incorpora la tercera Acil-CoA dentro de la molécula de diacilglicerol. Esta enzima también conocida como un importante regulador de esta ruta. Los triglicéridos puede ser almacenados en cuerpos lipídicos (Courchesne et al., 2009).

Al ser cada uno de los pasos de biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos dependiente de diversas enzimas, es importante tener en cuenta que cambios generados en pH, junto con modificaciones en la temperatura, concentración de sustrato, concentración de la enzima y la presencia de cofactores pueden generar cambios en la actividad y especificidad de las enzimas haciendo que se afecta la ruta de biosíntesis lo cual puede conllevar a la producción de determinado tipo de ácidos grasos o triglicéridos.

Según los modelos generados, en condiciones de equilibrio de nitrógeno, la **intensidad de la luz** para las dos microalgas fue encontrada como significativa sobre la concentración de lípidos. De manera general se puede establecer que la luz se ha reportado como uno de los factores que afecta de manera directa el metabolismo de las algas. La cantidad y la calidad de la luz, determina la energía

disponible para los organismos fotosintéticos para llevar a cabo sus funciones metabólicas (Latasa, 1995). Sin embargo, el efecto directo de la intensidad de luz, sobre la concentración total de lípidos en las especies estudiadas, principalmente, en *Chlorella* fue poco reportado. Asimismo, no se encontraron estudios que especifiquen de manera clara los cambios metabólicos que ocurren cuando estas dos microalgas son cultivadas en diferentes intensidades de luz.

Se puede determinar de manera global que la importancia de la luz está dada, porque ésta interviene en las reacciones luminosas de la fotosíntesis. El principal papel de las reacciones de luz es proporcionar el poder reductor bioquímico (NADPH_2) y la energía química (ATP) para la asimilación de carbono inorgánico (CO_2). La energía es captada por los pigmentos antena y atrapada en dos complejos proteína-pigmento, PSII y PSI. La fotosíntesis opera como una serie conectada por una cadena transportadora de electrones usualmente visualizada y llamada esquema Z. En este esquema se dan reacciones que van de un menor a un mayor potencial redox. Bajo iluminación, dos electrones son extraídos del agua y transferidos a través de la cadena transportadora de electrones para producir una molécula de NADPH_2 . Simultáneamente, protones son transportados para un espacio externo (estroma) dentro del espacio intratállico (lumen) formando un gradiente de pH. De acuerdo a la hipótesis quimiosmótica de Mitchell, el gradiente maneja la síntesis de ATP, la cual es catalizada por el complejo de proteínas llamado ATP-asa o ATP sintasa, esta reacción es llamada fosforilación (Masojídek et al., 2004).

El NADPH_2 y el ATP, son usados para la fijación de carbono en el ciclo de Calvin, el cual se lleva a cabo en el estroma. El primer paso para la reducción del CO_2 , por el ciclo de Calvin es la reacción catalizada por la enzima Ribulosa bifosfato Carboxilasa (RubisCO) que supone la reacción entre el CO_2 y la ribulosa fosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato. El ATP producido durante las reacciones luminosas cede grupos fosfato a estas moléculas, dando lugar a 1,3-

difosfoglicerato. El NADPH generado durante la fase luminosa cede electrones a estas moléculas de tres carbonos, dando lugar al gliceraldehido-3-fosfato, el cual es clave para iniciar la ruta glucolítica para la producción de piruvato y Acetil-CoA para la biosíntesis de lípidos (Madigan et al., 1999).

Las reacciones fotosintéticas dependientes de la luz son localizadas en las membranas de los tilacoides. La membrana tilacoidal contiene cinco complejos principales que son: los pigmentos antena, el fotosistema II y el fotosistema I (PSII y PSI, respectivamente, por sus siglas en inglés), el citocromo b_6/f y la ATP sintasa, los cuales mantienen el transporte de electrones y la fosforilación (Masjidek et al., 2004).

La luz también es relevante en la síntesis de lípidos puesto que se ha demostrado que en el cloroplasto, la fotosíntesis proporciona una fuente endógena de acetil-CoA. Por lo tanto, el incremento de Mg^{2+} y de NADPH pueden aumentar la actividad de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) (Hu et al., 2008). Al respecto, estudios de Lv et al (2010), bajo condiciones moderadas de CO_2 (1%) e intensidad de luz ($60 \mu E/m^2 \cdot s^{-1}$), encontraron que más clorofila puede ser producida y de acuerdo a esto la actividad de la ACCase puede mejorar, favoreciendo una mayor acumulación de lípidos.

Según los modelos en condiciones de equilibrio de nutrientes la intensidad de la luz es significativa pero en *Chlorella* el efecto que se presenta es positivo, mientras que en *B. braunii* es negativo. De lo anterior, se puede establecer que un incremento en la intensidad de la luz es favorable para la acumulación de lípidos en *Chlorella*; contrario a lo que ocurre con *B. braunii*, donde el aumento de la concentración de lípidos se ve favorecida por bajas intensidades de luz.

Lo anterior se puede explicar con lo establecido por Rasoul-Amini et al (2011), quien afirma que el efecto que causa la intensidad de la luz es considerado, propio

para cada especie de microalga. Puesto que la dispersión y la absorción de luz por diferentes especies de fitoplancton, pueden estar correlacionadas con el desarrollo y la estructura propia de cada organismo.

De manera general se ha establecido que, altas intensidades de luz pueden generar daño oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados. Por otra parte, los cambios cualitativos en los lípidos, como resultado de varias condiciones de luz, son asociadas con alteraciones en el desarrollo de los cloroplastos. Una alta acumulación de TG y un porcentaje reducido de lípidos polares totales, fueron encontrados en células cultivadas a $100 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^1$, con luz continua (Guschina & Harwood, 2009).

Habitualmente, las altas intensidades de luz durante el crecimiento de las microalgas producen acumulación de TG, con altos niveles de ácidos grasos saturados. Por otro lado, bajas intensidades de luz, inducen un incremento en el contenido de lípidos polares, acompañados por un aumento del contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Goss & Wilhelm, 2009).

Según los modelos propuestos para *B. braunii*, en condiciones de equilibrio de nutrientes la luz en intensidades altas no favorece la concentración de lípidos. Yeesang & Cheirsilp (2011), estudiaron varias cepas de *B. braunii* y demostraron que el contenido de lípidos de todas las cepas evaluadas incrementó cuando la intensidad de luz pasó de 33 a $40,5 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^1$, pero decreció cuando la intensidad de luz fue aumentada por encima de $82,5 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^1$.

Por lo tanto, se podría establecer que la luz es importante para los procesos de fotosíntesis a través de la cual se produce poder reductor y energía que intervienen en las diferentes rutas metabólicas para finalmente producir diferentes tipos de lípidos. Sin embargo, el suministro de la luz depende de la microalga con la cual se esté trabajando, ya que por sus diferencias estructurales unas pueden

llegar a ser más susceptibles que otras a diversas intensidades de luz y de no tenerse en cuenta además de modificar el patrón de los ácidos grasos, en casos más críticos se puede llegar a generar daño celular que impide el crecimiento y la producción de los metabolitos de interés.

Las rutas de biosíntesis para triglicéridos y su relación con el suministro de CO₂, nitrógeno, luz y temperatura que se presentan en una microalga, en condiciones óptimas de crecimiento se muestran de manera general en la figura 17.

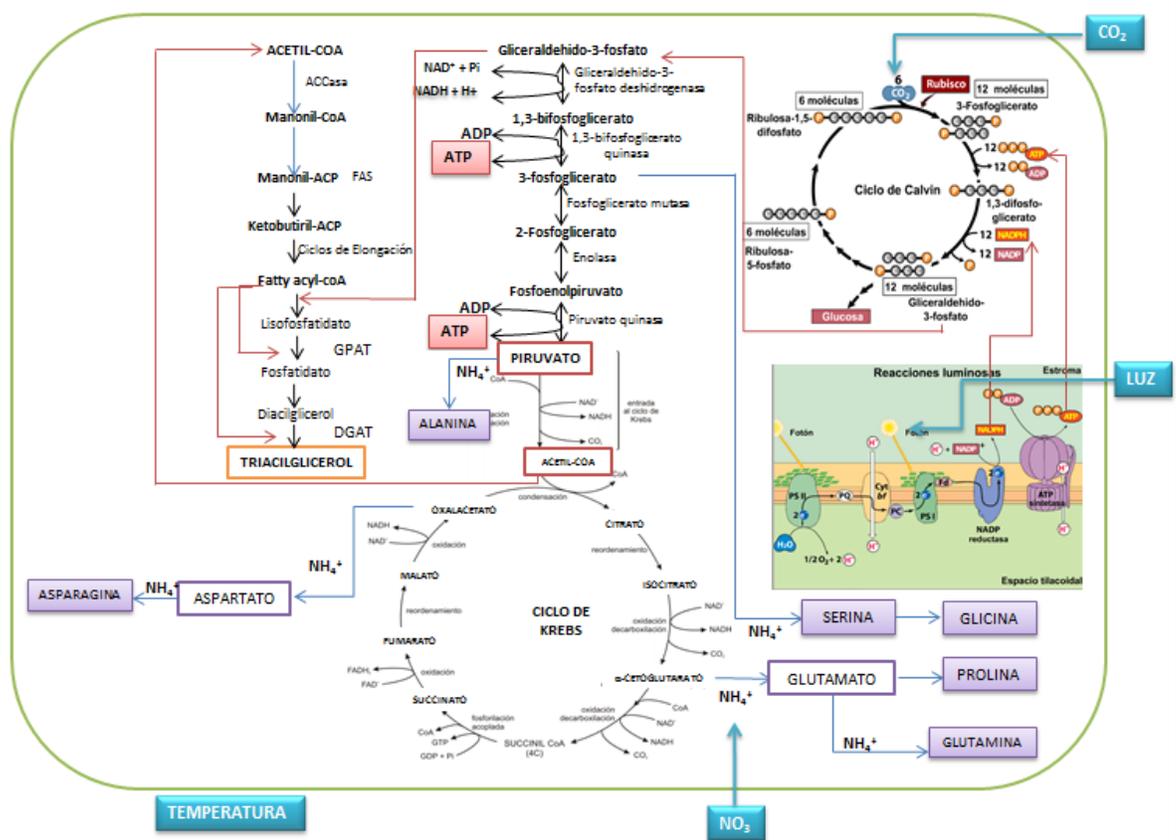


Figura 17. Relación de las rutas metabólicas para la producción de triglicéridos con la intensidad de luz, CO₂ y nitrógeno.

FUENTE: Algunas imágenes fueron tomadas de <http://www.bionova.org.es/animbio/anim/ciclocalvin.swf>

5.6.2 Productividad de lípidos (mg L⁻¹día⁻¹) para *Chlorella*

La productividad de lípidos es la relación entre el contenido de lípidos en las células y la cantidad de biomasa por unidad de tiempo (Chu et al., 1997). Por lo tanto, para maximizar la productividad lipídica, se deben tener en cuenta los factores que incrementan la concentración de lípidos (%p/p), pero también aquellos que maximizan la concentración de biomasa. Un alto contenido de lípidos reportado en ausencia de la velocidad de crecimiento o cantidad de biomasa no permite realizar una selección racional de especies para la producción de lípidos. Para que este proceso sea viable a nivel industrial es necesario buscar altas concentraciones de biomasa pero con alto contenido de lípidos (Lv et al., 2010), puesto que esto mejora la eficiencia de recuperación de estas biomoléculas (Rodolfi et al., 2009).

La productividad de lípidos fue únicamente evaluada en *Chlorella*, puesto que no se encontraron datos suficientes para *B. braunii*, que permitieran modelar su comportamiento. Los datos de productividad en *Chlorella*, se ajustaron a dos modelos diferentes, siendo lineal en equilibrio de nitrógeno y cuadrático para condiciones de deficiencia (Tabla 11).

Tabla 11. Comparación de los modelos para la productividad de lípidos (mg L⁻¹día⁻¹) para *Chlorella* en las dos condiciones experimentales evaluadas (N+ y N-)

Condiciones experimentales	Productividad (mg L ⁻¹ día ⁻¹)
Equilibrio de nitrógeno (N+)	$P_{LP} = 31,88 + 6,35 \cdot CO_2 - 0,048 \cdot N_2 \cdot T^\circ$
Deficiencia de nitrógeno (N-)	$P_{LP} = -28,49 - 1,998 \cdot N_2 \cdot CO_2 - 0,01180 \cdot Luz \cdot Luz + 0,0734 \cdot Luz \cdot T^\circ$

De acuerdo a los modelos propuestos, en las dos condiciones experimentales la concentración de nitrógeno, CO₂, la intensidad de luz y la temperatura, tienen un efecto significativo en la productividad lipídica de *Chlorella*. Esto concuerda con lo establecido por Yeh et al. (2010), quienes afirman que el crecimiento de las microalgas y la composición bioquímica de la biomasa es conocida por ser dependientes del suministro de luz (tipo de fuente e intensidad de luz), de la composición del medio de cultivo (especialmente, carbono y fuentes de nitrógeno) y de las condiciones de crecimiento (pH, temperatura, eliminación de oxígeno, entre otros). La importancia de las variables experimentales sobre la productividad lipídica en la microalga *Chlorella*, se presentan en la figura 18.

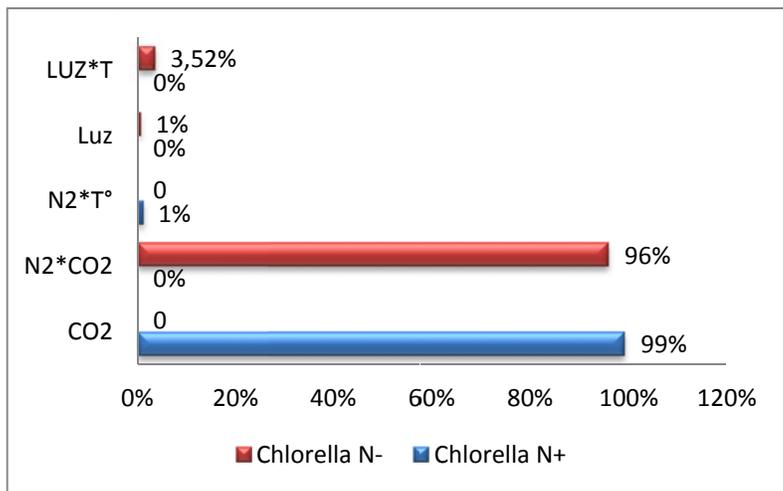


Figura 18. Aporte de cada una de las variables significativas a la variabilidad de la productividad de lípidos para la microalga *Chlorella*.

Condiciones de equilibrio de nitrógeno (N+) y deficiencia de nitrógeno (N-). El porcentaje indica el peso de la variable experimental sobre la variabilidad de la respuesta, según los modelos seleccionados.

La concentración de CO₂ fue significativa, en los dos modelos propuestos. En condiciones de equilibrio el CO₂ presenta un efecto positivo grande, acompañado de un efecto negativo muy bajo ocasionado por la interacción entre la

concentración de nitrógeno y la temperatura. Teniendo en cuenta lo anterior, se puede establecer que altas concentraciones de CO₂ maximizan la productividad de lípidos, cuando van acompañadas de bajas concentraciones de nitrógeno y bajas temperaturas. Estudios realizados por Beardall et al. (1998), encontraron mejores tasas de crecimiento en *Chlorella pyrenoidosa*, cuando una elevada concentración de CO₂, con bajas concentraciones de nitrógeno, fue utilizada. Los autores atribuyen este efecto principalmente a que en altas concentraciones de CO₂ las células pueden compensar las limitaciones de nitrógeno y continuar con sus funciones.

El modelo seleccionado para la productividad lipídica en condiciones de equilibrio de nitrógeno, sugiere que el principal factor que afecta la variable de respuesta es la concentración de CO₂. Estudios realizados por Yang & Gao (2003), demostraron que en condiciones de equilibrio de nitrógeno, concentraciones elevadas de CO₂ pueden incrementar la actividad carboxilante y reprimir la actividad de oxigenación del Rubisco, dando como resultado un incremento en la fotosíntesis. Asimismo, estos autores establecen que el enriquecimiento de CO₂ podría mejorar el transporte de electrones entre los fotosistemas II y I, aumentando el rendimiento de fotones y la energía para la fijación de CO₂. Se debe tener en cuenta que existen unos límites de CO₂ y que la concentración crítica no solo depende del suministro de CO₂ sino también de la afinidad del CO₂ y del tamaño de las células. Células grandes o de rápido crecimiento son más sensibles a la disminución de las concentraciones del CO₂, puesto que requieren una mayor concentración para satisfacer sus demandas de carbono (Burkhardt et al., 1999).

Según los modelos propuestos, el efecto de la concentración de nitrógeno ejerce un efecto negativo sobre la productividad de lípidos, lo cual concuerda con lo establecido por Illman et al. (2000) y Li et al. (2008) quienes demostraron que la productividad de lípidos es más alta en cultivos limitados por nitrógeno. Sin

embargo, es necesario tener en cuenta que en condiciones de deficiencia de nitrógeno se han observado bajas tasas de crecimiento celular, puesto que se disminuyen las proteínas y la clorofila, presentándose una restricción en la capacidad para mantener las funciones de fotosíntesis (Merzlyak et al., 2007). El nitrógeno como nutriente, interviene en el proceso de síntesis de aminoácidos para la construcción de las estructuras de las proteínas, de esta manera si se suministra este elemento en forma de nitrato, este es reducido a amonio antes de iniciar el ciclo de asimilación. (Yang et al., 2000). Por lo tanto, a nivel experimental se deberán analizar no solo la productividad lipídica sino también la productividad en biomasa, con el fin de evidenciar de manera clara los efectos de las modificaciones de nitrógeno en los sistemas de cultivo.

La temperatura también es propuesta a través de los modelos, como uno de los factores importantes en la productividad de lípidos. Estudios de Converti et al. (2009) demostraron que *C. vulgaris* a 35°C, exhibió una disminución del crecimiento, mientras que a 38°C presentó una interrupción del crecimiento con posterior muerte celular, generando un cambio de color visible de verde a marrón. Altas temperaturas pueden inducir la formación de radicales activos del oxígeno en las células algales, generando estrés oxidativo. Asimismo, se ha determinado que se requiere más carbono y nutrientes para producir una célula, a una temperatura no óptima (Hu, 2004). Si bien, la temperatura es considerada como un factor esencial no solo en el crecimiento, sino también en las actividades metabólicas de las células microalgales (Li et al., 2011), no se encontraron suficientes estudios que explicaran de manera clara la relación y efecto que tiene la modificación de los niveles de temperatura sobre la productividad lipídica.

La luz aparece en condiciones de deficiencia de nutrientes como una de las variables significativas, sin embargo presentó un efecto cuadrático, que indicó que por encima de ciertos valores, puede generar efecto negativo en la productividad de lípidos. Solovchenko et al. (2008), establecen que principalmente

bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno algunas células son más susceptibles al fotodaño ocasionado por altas irradianzas. Estos autores afirman que la limitación de nitrógeno no permite la síntesis de proteínas y esto afecta el funcionamiento de los sistemas de detoxificación de oxígeno y procesos de reparación del aparato fotosintético.

Estudios realizados por Amini Khoeyi et al. (2011) en *C. vulgaris* demostraron que el incremento de la intensidad de luz hasta $65.5 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}^1$ aumentó la cantidad de biomasa, sin embargo cuando se incrementó a $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}^1$ la biomasa disminuyó. Resultados similares se han encontrado en estudios realizados por Kitaya et al. (2005). Asimismo, es importante resaltar que la luz puede producir cambios en el pH, Mg^{+2} y NADPH en el estroma, lo que lograría modular la actividad de las enzimas claves en la síntesis de ácidos grasos (Lv et al., 2010).

De manera general se puede establecer que para darse la acumulación de lípidos es necesario que se presente el proceso de fotosíntesis y la fijación de carbono con el fin de producir acetil-CoA que es el iniciador de la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos. De acuerdo a los modelos planteados, cuando las condiciones de nitrógeno son estándar, se presenta acumulación de lípidos como parte de las biomoléculas importantes para el crecimiento y viabilidad celular, sin embargo este porcentaje se incrementa cuando el nitrógeno es eliminado o está en baja cantidad en los nutrientes suministrados. Lo anterior, puede estar relacionado con que la ausencia de nitrógeno impide y dificulta la división y el mantenimiento celular al no darse la síntesis de aminoácidos como parte estructural de las proteínas, por lo tanto las células priorizan por la acumulación de energía usando toda la acetil-CoA para la síntesis de triglicéridos como parte de supervivencia a condiciones de estrés.

Estudios realizados por Lv et al. (2010) demostraron que la limitación de nitrógeno, manteniendo un nivel de CO_2 en 1% y baja intensidad de luz ($60 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) induce

a un incremento de clorofila, al respecto estos autores establecen que este suceso puede proporcionar un pH alcalino, más Mg^{2+} y NADPH mejorando la actividad de la enzima ACCasa y por lo tanto la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos.

5.7 Potencial industrial de los ácidos grasos presentes en *Chlorella* y *B. braunii*

Con la base de datos de la literatura revisada para para el presente estudio, se decidió realizar una revisión adicional con el fin de identificar los ácidos grasos con potencial industrial presentes en las dos microalgas evaluadas. Los estudios se clasificaron en dos grupos, aquellos en donde se reportaron experimentos con deficiencia de nitrógeno y los reportados en condiciones de equilibrio de este nutriente. Se escogieron estas condiciones, ya que fue donde más se encontró información disponible.

La comparación del perfil de ácidos grasos de las dos microalgas en condiciones de equilibrio de nutrientes, mostró una mayor cantidad de ácidos grasos de las cadenas C16 a C18. La mayor proporción de C18, se presentó en *B. braunii*, sin embargo esta especie no mostró dentro de su perfil, ácidos grasos C15, C19 y muy bajas cantidades de C20, con respecto a *Chlorella* (Figura 19). Según lo reportado por Hu et al. (2008); bajo condiciones óptimas de crecimiento la composición general de las microalgas de la división *Chlorophyta*, es básicamente ácidos grasos de cadena corta (C10-14), de cadena larga (C16-18) y especies de cadena larga ($\geq 20C$).

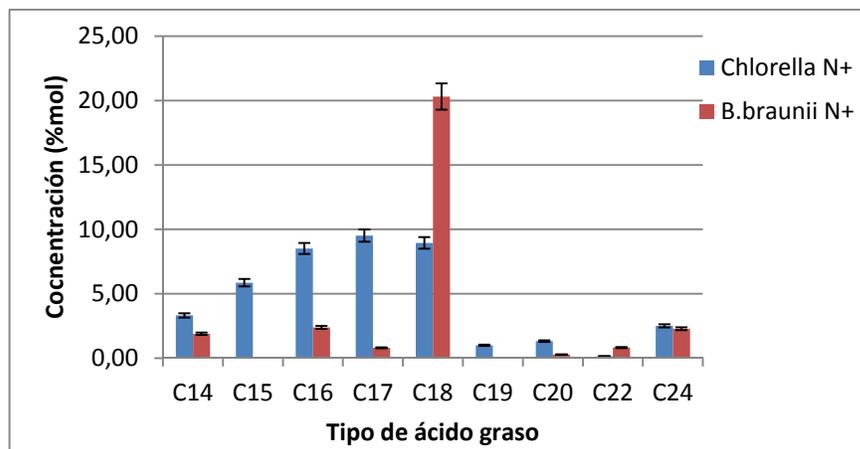


Figura 19. Perfil de ácidos grasos de las dos microalgas, bajo condiciones de equilibrio de nitrógeno.

En condiciones de deficiencia de nitrógeno, los perfiles de las dos microalgas cambiaron de manera visible. Para ambas, la presencia de C16 y C18 incrementa con respecto a las encontradas en condiciones de equilibrio de nutrientes. El ácido graso C17, disminuye su concentración de manera significativa en *Chlorella* y en *B. braunii* no fue detectado (Figura 20).

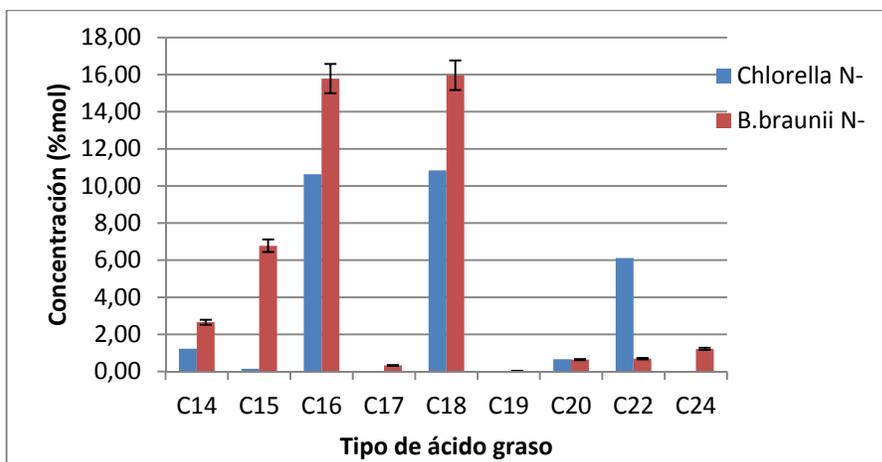


Figura 20. Perfil de ácidos grasos de las dos microalgas, bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno.

Con el fin de evaluar el potencial de los ácidos grasos presentes en las dos microalgas, estos también se analizaron de acuerdo al número de dobles enlaces presentes en su cadena. Para esto, se evaluó la cantidad de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, en condiciones de equilibrio y estrés de nitrógeno.

La mayor cantidad de ácidos grasos presentes en *Chlorella* en condiciones de equilibrio de nitrógeno fueron los saturados (54% del total de ácidos grasos), mientras que en *B. braunii*, en estas condiciones solo el 9% del total de ácidos grasos fueron de este tipo. En esta especie la mayor proporción de ácidos grasos fueron los monoinsaturados con un 83% del total de ácidos grasos. *Chlorella* presentó un 27% y 19% de poliinsaturados y monoinsaturados, respectivamente. Mientras que en *B. braunii* fueron solo del 9% poliinsaturados y 8% saturados. Cuando las condiciones fueron de deficiencia de nitrógeno, el cambio más marcado se presentó en la distribución de ácidos grasos de *B. braunii*, donde el 31% fueron saturados, 35% monoinsaturados y 34% poliinsaturados. En *Chlorella*, descendió la cantidad de saturados al 45% y monoinsaturados al 17%, e incrementó la proporción de poliinsaturados al 38%.

De acuerdo a lo anterior *Chlorella* se presenta como una microalga potencial, para la producción de biodiesel, puesto que en las dos condiciones experimentales, su contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados fue mayor al 60%. Además, esta microalga presentó ácidos grasos C14-C18, principalmente, ácido palmítico y esteárico, considerados importantes dentro de la elaboración de biodiesel (Rasoul-Amini et al., 2011). Sin embargo en *Chlorella* también se identificaron ácidos grasos poliinsaturados, lo cual es importante tener en cuenta, puesto que la presencia de este tipo de ácidos grasos en los aceites genera un biodiesel susceptible a la oxidación durante el almacenamiento y reduce su aceptabilidad comercial (Chisti, 2007).

La norma estándar europea EN 12214 limita el contenido del metiléster del ácido linolénico (C18:3 n-3) contenido en el biodiesel para uso en vehículos al 12%. La norma anterior junto con la EN 12213 también limita el contenido de metilésteres con 4 o más dobles enlaces al 1% mol. Teniendo en cuenta la composición de los aceites de microalgas, muchos de ellos no cumplen con lo especificado con los estándares europeos para biodiesel, pero según lo señalado por Chisti (2007), esto no necesariamente se puede convertir en una limitación, puesto que la extensión de los ácidos grasos insaturados en el aceite de microalgas, y su contenido de más de 4 dobles enlaces puede ser reducido fácilmente por hidrogenación catalítica parcial del aceite, con la misma tecnología que es comúnmente usada en la elaboración de margarina de aceite vegetal.

B. braunii, presentó gran cantidad de ácidos grasos monoinsaturados y solo el 9% de ácidos grasos saturados, en condiciones de equilibrio de nitrógeno, los cuales incrementaron cuando las condiciones fueron de deficiencia de nitrógeno. Estudios realizados en esta especie, demostraron que bajo condiciones de limitación de nitrógeno, ocurre un cambio en la proporción de ácidos grasos incrementando el ácido oleico (C18:1) y ácidos grasos saturados (Zhila et al., 2005). Kalacheva et al. (2002), también encontraron que en la composición típica de los lípidos intracelulares de esta especie predominan los ácidos grasos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), lo cual la convierte en una cepa potencial para la producción de biodiesel, con la ventaja de tener menos cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), que facilita el cumplimiento de las normas establecidas para este tipo de producto.

Las dos microalgas también presentan ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), lo que es considerado de importancia industrial, puesto que este tipo de biomoléculas son de gran beneficio a nivel de salud y nutrición. El ácido linoléico (C18:2 ω 6) y el ácido α -linolénico (C18:3 ω 3) son los ácidos grasos esenciales que dan origen a las familias de ácidos grasos ω 6 y ω 3, respectivamente. El ácido

docosahexanoico (DHA), es considerado importante en el desarrollo y funcionamiento del cerebro, la retina y los tejidos reproductivos en niños y adultos. Éstos también han sido investigados en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, incluyendo problemas cardiovasculares, diversos tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias (Hejasi & Wijffels, 2004).

6. CONCLUSIONES

- La selección de cinco microalgas de la división *Chlorophyta*, permitió identificar a *Chlorella*, *B. braunii*, *Scenedesmus*, *N. oleoabundans*, *P. incisa* como las microalgas con mayores concentraciones de lípidos potenciales para uso industrial.
- En los modelos propuestos, la concentración de nitrógeno fue una de las variables significativas y con más efecto sobre la concentración de lípidos, la cual es utilizada de manera frecuente como principal factor de estrés en microalgas de la división *Chlorophyta*.
- El ajuste de datos experimentales utilizados por los diferentes autores, permitió identificar además del factor de estrés, otras variables de proceso significativas y con efecto directo sobre la concentración de lípidos en las microalgas *Chlorella* y *B. braunii*.
- Se evidenció que el incremento del CO₂ es determinante para maximizar la concentración de lípidos en las dos microalgas estudiadas, cuando estas se encuentran en estrés por nitrógeno.
- Para *Chlorella* en condiciones de equilibrio de nitrógeno, la concentración de nitrógeno debe ser la mínima (3mM) y bajo estas condiciones se requiere incrementar la intensidad de luz y la concentración de CO₂ con el fin de obtener mayor porcentaje de lípidos.
- Para *Chlorella* en condiciones de deficiencia de nitrógeno, el incremento en la concentración de CO₂ solo favorece el incremento de lípidos si el nitrógeno en el medio de cultivo ha alcanzado valores de cero.

- Para conseguir la máxima productividad lipídica en condiciones equilibradas de nitrógeno para *Chlorella*, es necesario trabajar con la mínima concentración de nitrógeno (3mM) y temperatura constante, para que el incremento de CO₂ favorezca el incremento de la productividad.
- En condiciones de deficiencia de nitrógeno cuando este nutriente se mantiene en cero, mayor concentración de CO₂, temperatura y luz, incrementan la productividad de lípidos en *Chlorella*; siempre que la intensidad de luz no supere los 172 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}^1$
- Para *B. braunii* en condiciones de equilibrio de nutrientes, la luz ejerce un efecto negativo, que indica que un incremento de luz puede disminuir la concentración de lípidos, asociado a la sensibilidad de muchas de las cepas de esta especie a altas intensidades de luz. En condiciones de deficiencia de nitrógeno, la ausencia de este nutriente favorece la acumulación de lípidos si se acompaña con un incremento de CO₂
- Las explicaciones metabólicas de las variables significativas en los modelos seleccionados permitieron establecer de manera clara el rol de cada una de las variables dentro de los procesos de producción fotoautótrofa de microalgas con potencial para la producción de lípidos.
- El nitrógeno junto con el carbono y la luz determinan el metabolismo, puesto que son necesarios para la fotosíntesis y la fijación de CO₂ importante para la producción de Acetil-CoA necesaria para dar inicio a la síntesis de ácidos grasos.
- Los modelos permitieron establecer las variables significativas en la concentración de lípidos de dos microalgas de la división *Chlorophyta*. Los modelos servirán de herramienta para establecer los valores experimentales

que más favorecen la producción de lípidos, contribuyendo a una mejor comprensión del bioproceso.

- En el perfil de ácidos grasos de las dos microalgas, predominaron los ácidos grasos C14:C18, saturados y monoinsaturados, los cuales se consideran importantes en la producción de biodiesel. En *Chlorella* también se identificaron ácidos grasos poliinsaturados, los cuales tienen un alto potencial de aplicación en la industria alimentaria. Por lo tanto, de acuerdo a los requerimientos industriales se tendrá que evaluar la especie de microalga a utilizar y las condiciones a emplear para la producción de este tipo de biomoléculas de acuerdo al interés de uso comercial.
- El presente estudio sirve como modelo para que muchos autores tengan en cuenta que para asegurar el máximo valor de los resultados de sus investigaciones experimentales, es necesario presentar la relación de todas las variables del proceso en unidades estándar que permitan evaluar la viabilidad de producción de las biomoléculas de interés. Esto se evidenció en el presente estudio ya que valores del contenido de lípidos, productividades en biomasa y lípidos a pesar de ser clave para la producción de biodiesel y ácidos grasos de interés alimentario, con el fin de asegurar su viabilidad, no se reportaron en muchos de los estudios revisados.

7. PROPUESTAS PARA INVESTIGACIONES FUTURAS

Teniendo en cuenta los modelos seleccionados para *Chlorella* y *Botryococcus braunii* se propone para investigaciones futuras, realizar diseños experimentales para validar y retroalimentar el modelo; con el fin de establecer herramientas matemáticas que permitan el ajuste de parámetros relevantes en el escalamiento de la producción de lípidos de interés industrial a partir de microalgas.

Asimismo, se propone utilizar la metodología planteada en la presente investigación junto a la validación experimental, para proponer modelos en otras especies de microalgas consideradas como potenciales para la producción de lípidos y para el estudio de otras biomoléculas presentes en estos microorganismos, las cuales se consideran de alto valor comercial.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahlgren, G. & Hyenstrand, P. (2003). Nitrogen limitation effects of different nitrogen sources on the nutritional quality of two freshwater organisms, *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) and *Synechococcus* sp. (Cyanophyceae). *Journal of Phycology*, 39 (5), 906–917.
2. Albarracin, I. (2007). La producción de Biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. XV Simposio electrónico internacional. 1-16.
3. Amini Khoeyi, Z., Seyfabadi, J. & Ramezanpour, Z. (2011). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, DOI 10.1007/s10499-011-9440-1.
4. Atalah, E., Araya, M., Rosselot, G., Araya, H., Vera, G., Andreu, R. et al. (2009). Efecto de una bebida láctea con DHA en la composición de ácidos grasos del glóbulo rojo, de la leche materna y en el recién nacido. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59 (3), 271-277.
5. Badui, S. (1993). *Química de los Alimentos*. (3ª ed.). México D.F: Person.
6. Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. & Benerjee, U.C., 2002. *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*. 22 (3), 245–279.
7. Basova, M.M. (2005). Fatty acid composition of lipids in microalgae. *International Journal on Algae*, 7 (1), 33–57.
8. Beardall, J., Johnston, A. & Raven, J.A. (1998). Environmental regulation of CO₂-concentrating mechanism in microalgae. *Canadian Journal of Botany*, 76 (6), 1010-1017.
9. Belarbi, E., Molina, E. & Chisti, Y. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme and Microbiology Technology*, 26 (7), 516-529

10. Ben-Amotz, A., Fishler, R. & Schneller, A. (1987). Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Marine Biology*, 95 (1), 31-36.
11. Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I. & Cohen, Z. (2002). Accumulation of arachidonic acid-rich triacylglycerols in the microalga *Parietochloris incisa* (*Trebuxiophyceae, Chlorophyta*). *Phytochemistry*, 60 (2), 135–143.
12. Borowitzka, M. A. (1992). Algal biotechnology products and processes—matching science and economics. *Journal of Applied Phycology*, 4 (3), 267–279.
13. Bozbas K. (2008). Biodiesel as an alternative motor fuel: production and policies in the European Union. *Renewable & Sustainable Energy Review*, 12 (2), 542–52.
14. Brennan, L. & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2), 557-577.
15. Burja, A.M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J.G. & Wright, P.C. (2001). Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57 (47), 9347-9377.
16. Burkhardt, S., Zondervan, I. & Riebesell, U. (1999). Effects of CO₂ concentration on C:N:P ratio in marine phytoplankton: a species comparison. *Limnology and Oceanography*, 44 (3), 683–690.
17. Cao, Z., Gao, H., Liu, M. & Jiao, P. (2006). Engineering the acetyl-CoA transportation system of *Candida tropicalis* enhances the production of dicarboxylic acid. *Biotechnology Journal*, 1 (1), 68–74.
18. Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcao, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P. et al. (2007). Metabolites from algae with economic impact. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C146 (1-2), 60-78.
19. Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26 (3), 126-131.

20. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. (2007). *Biotechnology Advances*, 25 (3), 294–306.
21. Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Chen, C.H., Kuan, T.C., Ong, S.C. & Lin, C.S. (2008). Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, 99 (9), 3389–3396.
22. Chu, W.L., Phang, S.M., & Goh, S.H. (1997). Environmental Effects on Growth and Biochemical Composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. *Journal of Applied Phycology*, 8 (4-5), 389–396.
23. Cleber, F., Sant'Anna, E., Villela da Costa, B. M. & Barcelos J. (2006). Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *Grasas y Aceites*, 57 (2), 270-274.
24. Coleman, R.A. & Lee, D.P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research*, 43 (2), 134–176.
25. Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y. Perego, P. & Borghi, M.D. (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.
26. Courchesne, N.M.D., Parisien, A., Wang, B. & Lan, C.Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*, 141 (1-2), 31–41.
27. Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.O., Carvalho, J.C.M. & Sato, S. (2004). Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 26 (4), 29–335.
28. Dayananda, C., Sarada, R., Bhattacharya, S. & Ravishankar, G.A. (2005). Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production from *Botryococcus braunii*. *Process Biochemistry*, 40 (9), 3125–3131.
29. Dijkstra, A.J. (2006). Revisiting the formation of trans isomers during partial hydrogenation of triacylglycerol oils. *European Journal Lipid Science Technology*, 108 (3), 249-264.

30. Dismukes, G., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G. & Posewitz, M. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. (2008). *Current Opinion in Biotechnology*, 19 (3), 235-240.
31. García, C.J. M & García, L.J.A. (2006). Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol. Informe de vigilancia tecnológica., Madrid. España., de, http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt4_biocarburantes_liquidos_biodiesel_y_bioetanol.pdf. Consultado 2011.
32. Garibay-Hernández, A. R., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez-Saavedra, M.P., Serrano-Carreón, L. & Martínez –Jiménez, A. (2009). Biodiesel a partir de Microalgas. *Biotecnología*, 13 (3), 38-61.
33. Ge, Y., Liu, J. & Tian, G. (2011). Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. *Bioresource Technology*, 102 (1), 130–134.
34. Goss, R. & Wilhelm, C. (2009). Lipids in Algae, Lichens and Mosses. En: H. Wada and N. Murata (eds.), *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions* (pp. 117–135). Springer Science, Paises Bajos.
35. Gouveia, L. & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 36 (2), 269–274.
36. Griffiths, M.J. & Harrison, S.T.L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21 (5), 493-507.
37. Guckert, J.B. & Cooksey, K.E. (1990). Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition. *Journal of Phycology*, 26 (1), 72 – 79
38. Guschina, I.A. & Harwood, J.L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45 (2), 160–186.
39. Guschina, I.A. & Harwood, J.L. (2009). Algal Lipids and Effect of the Environment on their Biochemistry. En M.T. Arts et al. (eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems* (pp. 1-24). Springer, New York.

40. Gutierrez, R. (2008). Análisis de Clúster. Estadística multivariada. Universidad de Granada. España., de, http://www.ugr.es/~ramongs/sociologia/tema6_cluster.pdf. Consultado 2011.
41. Harwood, J. L. & Guschina, I.A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91 (6), 679-684
42. Hejasi, A. & Wijffels, R. (2004). Milking of microalgae. *Trends in Biotechnology*, 22 (4), 189-194.
43. Hernández, A. (2004). Metabolismo y actividad biológica de los ácidos grasos omega-3. *Nutrición y dietética hospitalaria*, 24 (6), 49-54.
44. Hinzpeter, I., Shene, C. & Masson, L. (2006). Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. *Grasas y aceites*, 57 (3), 336-342.
45. Hsueh, H.T., Li, W.J., Chen, H.H. & Chu, H. (2009). Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus sp.* CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95 (1), 33–39.
46. Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition. En: Richmond A (ed), *Handbook of microalgal mass, culture: biotechnology and applied phycology* (pp. 83–93). CRC Press, Blackwell Publishing Company, Oxford.
47. Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. et al. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54 (4), 621-39.
48. Huang, G.H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X.W. & Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87 (1), 38–46.
49. Illman, A.M., Scragg, A.H. & Shales, S.W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27 (8), 631–635.
50. Jang, E.S., Jung, M.Y. & Min, D.B. (2005). Hydrogenation for low trans and high conjugated fatty acids. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 4 (1), 22-30.

51. Kalacheva, G.S, Zhila, N.O. & Volova, T.G. (2002). Lipid and hydrocarbon compositions of a collection strain and a wild sample of the green microalga *Botryococcus*. *Aquatic Ecology*, 36 (2), 317–330.
52. Kalogeropoulos, N., Chiou, A., Gavala, E., Christea, M. & Andrikopoulos, N.K. (2010). Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (carotenoids, tocopherols, sterols and squalene) of raw and roasted chicken fed on DHA-rich microalgae. *Food Research International*, 43 (8), 2006–2013
53. Kitaya, Y., Azuma, H. & Kiyota, M. (2005). Effects of temperature, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis*. *Advances in Space Research*, 35 (9), 1584–1588.
54. Knothe, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. (2005). *Fuel Processing Technology*, 86 (10), 1059–1070.
55. Lassing, M., Mårtensson, P., Olsson, E. & Svensson, M. Biodiesel Production from Microalgae. A Feasibility Study. (2008). Oslo, Noruega. Lund University, Faculty of Engineering-Statoil Hydro. ASA
56. Latasa, M. (1995). Pigment composition of *Heterocapsa sp.* and *Thalassiosira weissflogii* growing in batch cultures under different irradiances. *Scientia Marina*, 59 (1), 25-37.
57. Li, Y. & Qin, J.G. (2005). Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. *Journal of Applied Phycology*, 17 (6), 551–556.
58. Li, Y., Wang, B., Wu, N. & Lan, C.Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81 (4), 629–36.
59. López, D., Belarbi, E.H., Rodriguez-Ruiz, J., Segura, C.I. & Gimenez, A. (1998). Acyl Lipids of Three Microalgae. *Phytochemistry*, 47 (8), 1473- 1481.
60. Lv, J.M., Cheng, L.H., Xu, X.H., Zhang, L. & Chen, H.L. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, 101 (17), 6797–6804
61. Ma, X., Chen, K.W. & Lee, Y.K. (1997). Growth of *Chlorella* outdoors in a changing light environment. *Journal of Applied Phycology*, 9 (5), 425–430.

62. Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. (1999). Brock: Biología de los Microorganismos. (8ª ed.). Madrid: Prentice Hall.
63. Masojídek, J., Koblizek, M. & Torzillo, G. (2004). En: Richmond A (ed), Handbook of microalgal mass, culture: biotechnology and applied phycology (pp. 20–39). CRC Press, Blackwell Publishing Company, Oxford.
64. Mata, T., Martins, A. & Caetano, N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. (2010). Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14 (1), 217–232.
65. Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy, 34 (1), 1–5
66. Merzlyak, M. N., Chivkunova, O. B., Gorelova, O. A., Reshetnikova, I. V., Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I. et al. (2007), Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid Content of the unicellular green alga *Parietochloris Incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Journal of Phycology, 43 (4), 833–843
67. Metz, J.G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M. et al. (2001). Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. Science, 293 (5528), 291-293.
68. Metzger, P. & Largeau, C. (2005). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. Applied Microbiology and Biotechnology, 66 (5), 486–496.
69. MSDN. (2008). Conceptos de minería de datos (Analysis Services - Minería de datos)., de, <http://msdn.microsoft.com/es-es/library/ms174949.aspx>. Consultado 2011
70. Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A. & Bux, F. (2011). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. Bioresource Technology, 102 (1), 57–70.
71. Norsker, N.H., Barbosa, M. J., Vermuë, M.H. & Wijffels R.H. (2011). Microalgal production - A close look at the economics. Biotechnology Advances, 29 (1), 24–27

72. Ördög, V., Stirk, W.A., Lenobel, R., Bancírová, M., Strnad, M., Van Staden, J. et al. (2004). Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *Journal of Applied Phycology*, 16 (4), 309-314.
73. Phatarpekar, P.V., Sreepada, R.A., Pednekar, C. & Achuthankutty, C.T. (2002). A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. *Aquaculture*, 181 (1-2), 141–155.
74. Quevedo., H.A., García, H., Salas J, Domínguez M.A. & Esquivel V.H. (2007). Análisis estadístico de ozono a nivel del suelo. *Cultura Científica y tecnológica: Modelos estadísticos*, 43 (4), 35-43.
75. Rajakumari, S., Grillitsch, K. & Daum, G. (2008). Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Progress in Lipid Research*, 47 (3), 157–171.
76. Rasoul-Amini, S., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher, M.A., Hoseini-Alhashemi, S. & Ghasemi, Y. (2011). *Chlorella sp.*: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. *Applied Energy*, 88 (10), 3354-3356.
77. Rawlings, J.O., Pantula, S.G. & Dickey, D.A. (1998). *Applied Regression Analysis. A Research Tool* (2^a ed.). USA: Springer.
78. Richmond, A. (2004). Biological principles of mass cultivation. En: Richmond A (ed), *Handbook of microalgal mass, culture: biotechnology and applied phycology* (pp. 566). CRC Press, Blackwell Publishing Company, Oxford.
79. Richmond, A.E. & Soeder, C.J. (1986). Microalgaculture. *Critical Reviews in Biotechnology*, 4 (4), 369-438.
80. Rittmann, B. E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and bioengineering*, 100 (2), 203-212.
81. Rivero, M., Santamaría, M. & Rodríguez-Palmero, M. (2005). La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles. *Nutrición Hospitalaria*, 20 (2) 135-146

82. Rodolfi, L., Chini, Z.G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. et al. (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.
83. Roeselers, G., Van Loosdrecht, M.C.M. & Muyzer, G. (2008). Phototrophic biofilms and their potential applications. *Journal of Applied Phycology*, 20 (3), 227-235.
84. Rosenberg, J.N, Oyler, G.A., Wilkinson, L. & Betenbaugh, M.J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 19 (5), 430-436.
85. Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., De Diego, S.M., Sanz, M.T. & Carballido, J.R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11 (1), 1–12
86. Sasaki, Y. & Nagano, Y. (2004). Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68 (6), 1175–1184.
87. Satyanarayana, K.G., Mariano, A.B. & Vargas, J.V.C. (2010). A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*, 35 (4), 291–31.
88. Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C. et al. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenergy Research*, 1 (1), 20-43.
89. Shahidi, F. (2009). Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, 20 (9), 376-387.
90. Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. & Roessler, P. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from Algae. (1998). Golden, Colorado. U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development.

91. Silva, C. & Salinas, M. (2006). Modelos de Regresión y Correlación. Ciencia & Trabajo, 8 (22), 185-189.
92. Silva, C. & Salinas, M. (2007). Modelos de Regresión y Correlación II. Regresión lineal múltiple. Ciencia & Trabajo, 9 (23), 39-41.
93. Simopoulos, A.P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. The American Journal of Clinical Nutrition, 70 (3), 560S–569S.
94. Singh, A., Nigam, P.S. & Murphy, J.D. (2011). Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. Bioresource Technology, 102 (1), 26–34.
95. Solovchenko, A. E., Merzlyak, M. N., Chivkunova, O. B., Reshetnikova, I. V., Khozina-Goldberg, I. et al. (2008) . Effects of illumination and nitrogen starvation on accumulation of arachidonic acid by the microalga *Parietochloris incise*. Moscow University Biological Sciences Bulletin, 63 (1), 44-48.
96. Spolaore, P., Joanniss-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience a Bioengineering, 101 (2), 87-96.
97. Subrahmanyam, S. & Cronan Jr., J.E. (1998). Overproduction of a functional fatty acid biosynthetic enzyme blocks fatty acid synthesis in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 180 (17), 4596–4602.
98. Sukenik, A. & Livne, A. (1991). Variations in lipid and fatty acid content in relation to acetyl CoA carboxylase in the marine *Prymnesiophyte Isochrysis galbana*. Plant Cell Physiology, 32 (3), 371–378.
99. Suzuki, T., Matsuo, T., Ohtaguchi, K. & Koide, K. (1995). Gas-sparged bioreactors for CO₂ fixation by *Dunaliella tertiolecta*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 62 (4), 351–358.
100. Takagi, M., Karseno. & Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101 (3), 223–226.
101. Tatsuzawa , H., Takizawa, E., Wada, M. & Yamamoto, Y. (1996). Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas* sp . Journal of Phycology, 32 (4), 598 – 601.

102. Thompson, G.A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1302 (1), 17–45.
103. U.S. DOE (2010). National Algal Biofuels Technology Roadmap. U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program.
104. Ugwu, C.U., Aoyagi, H. & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99 (10), 4021–4028.
105. Veldt Larsen, P. (2008). Selecting regression models. En *Master of Applied Statistics. Regression and analysis of variance (Modulo 8).*, de, <http://statmaster.sdu.dk/courses/st111/>. Consultado 2011.
106. Verma, N. M., Mehrotra, S., Shukla, A. & Mishra, B.N. (2010). Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *African Journal of Biotechnology*, 9 (10), 1402-1411.
107. Villardón, J.L.V. (2008). Introducción al análisis de Clúster., de, <http://biplot.usal.es/ALUMNOS/CIENCIAS/2ESTADISTICA/MULTIVAR/cluster.pdf>. Consultado 2011.
108. Weldy, C.S. & Huesemann, M. (2007). Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. *US Department of Energy Journal of Undergraduate Research*, 7(1), 115–22.
109. Widjaja, A., Chien, C. C. & Ju, Y.H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40 (1), 13–20.
110. Xu, H., Miao, X. & Qingyu, W. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126 (4), 499-507.
111. Yang, Y & Gao, K. (2003). Effects of CO₂ concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 15 (5), 379-389.

112. 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.
113. Yeesang, C. & Cheirsilp, B. (2011). Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology*, 102 (3), 3034–3040.
114. Yeh, K.L., Chang, J.S. & Chen, W.M. (2010). Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Engineering in Life Sciences*, 10 (3), 201–208.
115. Yoo, C., Jun, S.Y., Lee, J.Y., Ahn, C.Y. & Oh, H.M. (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*, 101 (1), 71–74.
116. Zhila, N.O., Kalacheva, G.S. & Volova, T.G. (2005). Effect of Nitrogen Limitation on the Growth and Lipid Composition of the Green Alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52 (3), 311–319.

ANEXOS

ANEXO 1. Análisis de conglomerados jerárquicos para *Chlorella*.

Distancia del coeficiente de correlación absoluto, Enlace de promedios
Pasos de amalgamación

Paso	Número de grupos	Nivel de semejanza	Nivel de distancia	Grupos incorporados	Nuevo grupo	Número de obs. en el grupo nuevo
1	5	94,2836	0,057164	4	6	4
2	4	81,2899	0,187101	4	5	4
3	3	60,1285	0,398715	2	4	2
4	2	32,2935	0,677065	1	2	1
5	1	15,8624	0,841376	1	3	1

Partición final

Grupo 1: N2 (mM)

Grupo 2: Luz ($\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)

Grupo 3: T° (°C)

Grupo 4: CO2 (%) Concentración lípidos. (%p/p) Prod Lípidos (mg L-1day-1)

ANEXO 2. Modelo de regresión múltiple lineal inicial para la concentración de lípidos en equilibrio de nitrógeno (N+) para *Chlorella*

La ecuación de regresión es

$$\% \text{ lípidos. (\%p/p)} = 24,0 - 0,243 \text{ N2 (mM).} + 0,0217 \text{ Luz } (\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})) - 0,366 \text{ T}^\circ. (\text{°C}) + 0,912 \text{ CO2 (\%).}$$

Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P
Constante	24,004	6,656	3,61	0,005
N2 (mM).	-0,2430	0,1505	-1,62	0,137
Luz ($\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$).	0,02175	0,04232	0,51	0,618
T°. (°C)	-0,3658	0,2092	-1,75	0,111
CO2 (%).	0,9120	0,3096	2,95	0,015

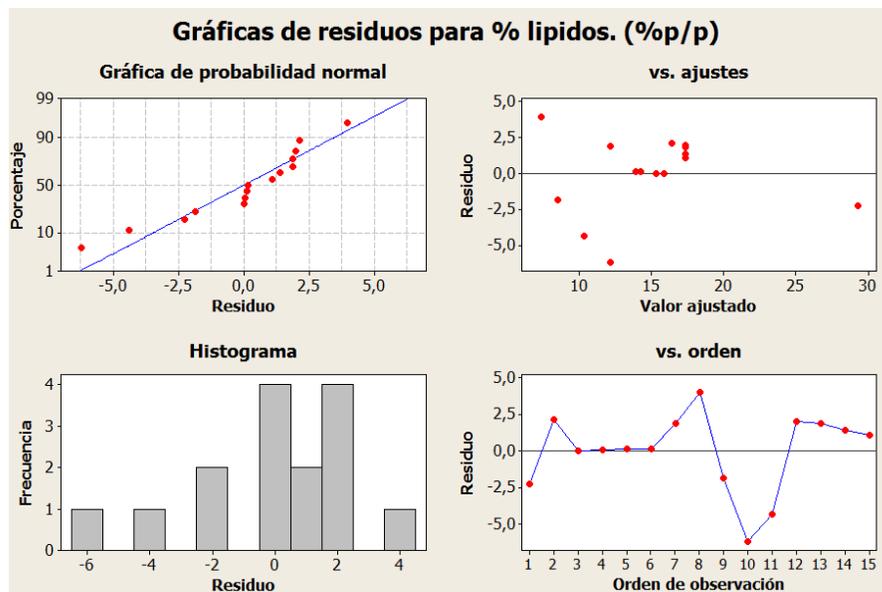
S = 3,17415 R-cuad. = 78,6% R-cuad.(ajustado) = 70,0% PRESS = 590,311 R-cuad.(pred) = 0,00%

Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	4	369,88	92,47	9,18	0,002
Error residual	10	100,75	10,08		
Total	14	470,63			

Fuente	GL	SC sec.
N2 (mM).	1	101,27
Luz ($\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$).	1	163,39
T°. (°C)	1	17,82
CO2 (%).	1	87,40

Estadístico de Durbin-Watson = 1,27435



ANEXO 3. Modelo de Regresión lineal múltiple con interacciones para la concentración de lípidos en condiciones de equilibrio de nitrógeno (N+) (*Chlorella*)

<i>Summary</i>	
R	0,935
R ²	0,874
R ² adjusted	0,839
Standard Error	2,324
# Points	15
PRESS	86,45
R ² for Prediction	0,816
Durbin-Watson d	1,313
First Order Autocorrelation	0,341
Collinearity	0,754
Coefficient of Variation	15,538
Precision Index	12,505

ANOVA						
<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>SS%</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F Signif</i>	<i>df</i>
Regression	411,20	87	137,07	25,37	3,04353E-05	3
Residual	59,43	13	5,403			11
LOF Error	3,857	1 (6)	0,964	0,1215	0,970	4
Pure Error	55,57	12 (94)	7,939			7
Total	470,63	100				14

<i>%_lipidos_(%p/p) = b0 + b1*N2_(mM). + b2*Luz_(μE/(m2·s1). + b3*N2_(mM).*CO2_(%).</i>						
			Std			
		P value	Error	-95%	95%	t Stat
b0	14,87	6,33331E-05	2,382	9,625	20,11	6,242
b1	-0,606	9,41951E-05	0,102	-0,830	-0,382	5,963
b2	0,06480	0,01832	0,02342	0,01326	0,116	2,767
b3	0,09357	0,000291	0,01797	0,05403	0,133	5,208

ANEXO 4. Modelo de regresión lineal para Productividad de lípidos en condiciones de equilibrio de nitrógeno, para *Chlorella*

Análisis de regresión

La ecuación de regresión es

$$\text{Lipids productivity (mg L}^{-1}\text{day}^{-1}) = 45,4 - 1,34 \text{ N}_2 \text{ (mM)} + 6,45 \text{ CO}_2 \text{ (\%)} + 0,0092 \text{ Luz} \text{ (\mu E / (m}^2 \cdot \text{s)}^{-1}) - 0,528 \text{ T}^\circ \text{ (}^\circ\text{C)}$$

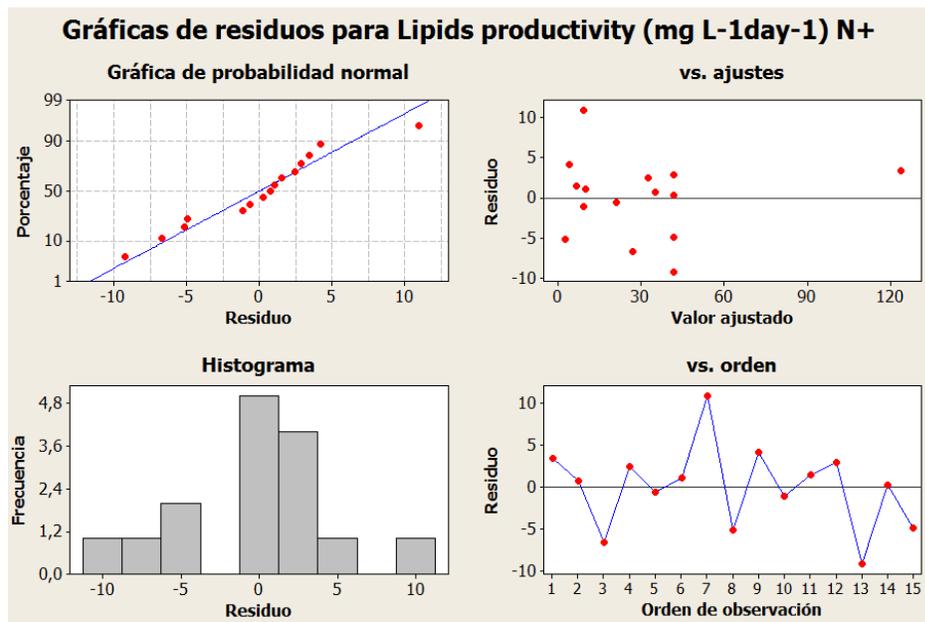
Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P
Constante	45,42	12,39	3,67	0,004
N ₂ (mM)	-1,3399	0,2800	-4,79	0,001
CO ₂ (%)	6,4502	0,5763	11,19	0,000
Luz (μE/(m ² ·s))	0,00920	0,07876	0,12	0,909
T° (°C)	-0,5279	0,3894	-1,36	0,205

S = 5,90759 R-cuad. = 97,3% R-cuad. (ajustado) = 96,3%

PRESS = 2658,69 R-cuad. (pred) = 79,65%

Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	4	12714,3	3178,6	91,08	0,000
Error residual	10	349,0	34,9		
Total	14	13063,2			



ANEXO 5. Modelo seleccionado para productividad de lípidos condiciones equilibradas de nitrógeno (*Chlorella*)

Summary	
R	0,987
R ²	0,974
R ² adjusted	0,969
Standard Error	5,346
# Points	15
PRESS	758,17
R ² for Prediction	0,942
Durbin-Watson d	2,374
First Order Autocorrelation	-0,259
Collinearity	0,914
Coefficient of Variation	17,886
Precision Index	47,723

ANOVA						
<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>SS%</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F Signif</i>	<i>df</i>
Regression	12720,2	97	6360,1	222,50	3,27745E-10	2
Residual	343,01	3	28,58			12
LOF Error	176,48	1 (51)	25,21	0,7569	0,645	7
Pure Error	166,53	1 (49)	33,31			5
Total	13063,2	100				14

<i>Lipids productivity (mg L-1day- = b0 + b1*CO2 (%) + b2*N2 (mM). *T° (°C)</i>						
	<i>P value</i>	<i>Std Error</i>	<i>-95%</i>	<i>95%</i>	<i>t Stat</i>	
b0	31,88	9,75082E-07	3,501	24,25	39,51	9,106
b1	6,352	6,88836E-10	0,364	5,558	7,145	17,43
b2	-0,04805	4,41446E-05	0,00772	-0,06487	-0,03123	-6,225

ANEXO 6. Regresión lineal múltiple para la concentración de lípidos en deficiencia de Nitrógeno (*Chlorella*).

$$\% \text{ lipidos (\%p/p)} = 67,8 - 24,4 N_2 \text{ (mM)} - 0,0469 \text{ Luz} (\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})) - 0,99 T^\circ (\text{°C}) - 0,040 \text{ CO}_2 \text{ (\%)}$$

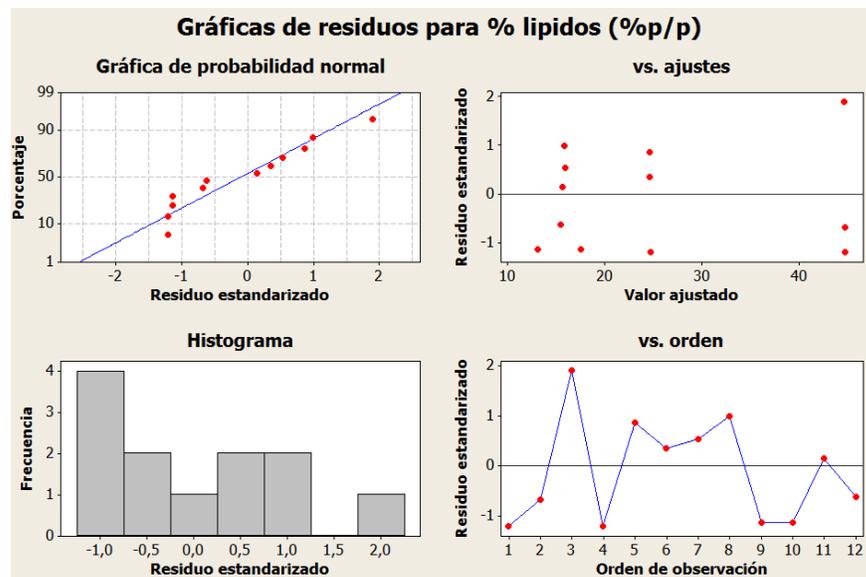
Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P
Constante	67,82	33,62	2,02	0,083
N ₂ (mM)	-24,390	4,735	-5,15	0,001
Luz ($\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)	-0,04686	0,06890	-0,68	0,518
T° (°C)	-0,987	1,591	-0,62	0,555
CO ₂ (%)	-0,0404	0,4592	-0,09	0,932

S = 4,75578 R-cuad. = 91,5% R-cuad. (ajustado) = 86,6%
 PRESS = 631,677 R-cuad. (pred) = 65,99%

Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	4	1699,19	424,80	18,78	0,001
Error residual	7	158,32	22,62		
Total	11	1857,51			

Fuente	GL	SC sec.
N ₂ (mM)	1	1656,70
Luz ($\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)	1	31,96
T° (°C)	1	10,35
CO ₂ (%)	1	0,18



ANEXO 7. Modelo de Regresión lineal con interacciones para la concentración de lípidos en condiciones deficiencia de nitrógeno (*Chlorella*).

<i>Summary</i>	
R	0,971
R ²	0,943
R ² adjusted	0,922
Standard Error	3,629
# Points	12
PRESS	157,34
R ² for Prediction	0,915
Durbin-Watson d	1,632
First Order Autocorrelation	0,180
Collinearity	0,006
Coefficient of Variation	14,434
Precision Index	14,275

ANOVA						
<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>SS%</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F Signif</i>	<i>df</i>
Regression	1752,1	94	584,05	44,35	2,4888E-05	3
Residual	105,36	6	13,17			8
LOF Error	63,55	3 (60)	10,59	0,5067	0,781	6
Pure Error	41,81	2 (40)	20,90			2
Total	1857,5	100				11

%_lipidos_(%p/p) = b0 + b1*N2_(mM) + b2*CO2_(%) + b3*N2_(mM)*CO2_(%)							
		<i>P value</i>	<i>Std Error</i>	<i>-95%</i>	<i>95%</i>	<i>t Stat</i>	<i>VIF</i>
b0	35,98	2,16984E-05	4,085	26,56	45,40	8,809	
b1	-18,47	0,00333	4,479	-28,79	-8,138	-4,123	3,127
b2	9,664	0,03207	3,730	1,063	18,27	2,591	136,22
b3	-9,920	0,02944	3,749	-18,57	-1,274	-2,646	147,70

ANEXO 8. Regresión lineal múltiple para la productividad de lípidos en condiciones de deficiencia de nitrógeno (*Chlorella*)

La ecuación de regresión es

$$\text{Product Lip (mg L}^{-1}\text{day}^{-1}) = -105 + 0,4 \text{ N}_2 \text{ (mM)} + 0,065 \text{ Luz } (\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})) + 5,10 \text{ T}^\circ \text{ (}^\circ\text{C)} - 0,79 \text{ CO}_2 \text{ (\%)}$$

Predictor	Coef	Coef.		
		de EE	T	P
Constante	-104,99	74,80	-1,40	0,203
N ₂ (mM)	0,41	10,53	0,04	0,970
Luz ($\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)	0,0648	0,1533	0,42	0,685
T° (°C)	5,098	3,540	1,44	0,193
CO ₂ (%)	-0,787	1,022	-0,77	0,466

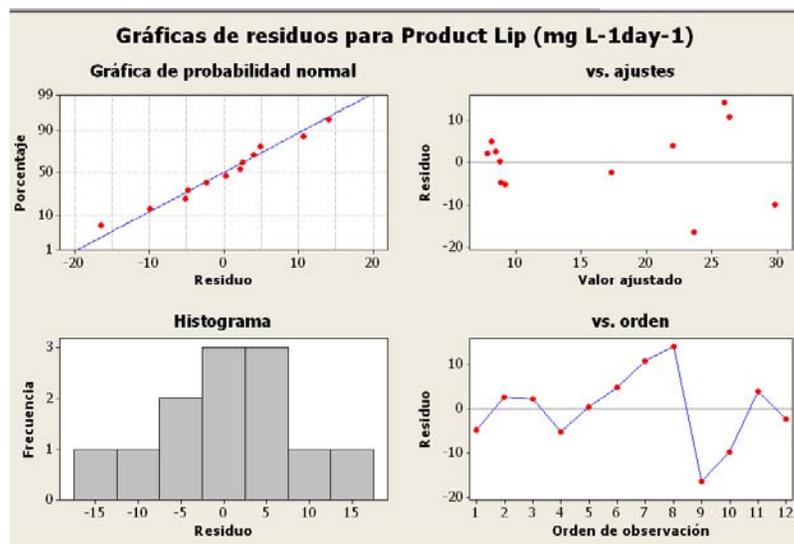
S = 10,5798 R-cuad. = 51,4% R-cuad. (ajustado) = 23,7%

PRESS = 6995,84 R-cuad. (pred) = 0,00%

Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	4	829,4	207,3	1,85	0,224
Error residual	7	783,5	111,9		
Total	11	1612,9			

Fuente	GL	SC sec.
N ₂ (mM)	1	385,4
Luz ($\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)	1	197,3
T° (°C)	1	180,2
CO ₂ (%)	1	66,5



ANEXO 9. Modelo de regresión cuadrático para la productividad de lípidos en condiciones de deficiencia de nitrógeno (*Chlorella*).

<i>Summary</i>	
R	0,966
R ²	0,934
R ² adjusted	0,909
Standard Error	3,661
# Points	12
PRESS	633,43
R ² for Prediction	0,607
Durbin-Watson d	1,104
First Order Autocorrelation	0,305
Collinearity	0,041
Coefficient of Variation	22,363
Precision Index	14,454

ANOVA						
<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>SS%</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F Signif</i>	<i>df</i>
Regression	1505,7	93	501,89	37,45	4,67456E-05	3
Residual	107,21	7	13,40			8
LOF Error	78,54	5 (73)	13,09	0,9133	0,607	6
Pure Error	28,67	2 (27)	14,33			2
Total	1612,9	100				11

		P value	Std Error	-95%	95%	t Stat
b0	-28,49	0,000210	4,456	-38,77	-18,22	-6,394
b1	-1,998	0,000905	0,390	-2,897	-1,098	-5,122
b2	-0,01180	2,46515E-05	0,00136	-0,01495	-0,00866	-8,656
b3	0,07348	1,04598E-05	0,00756	0,05606	0,09091	9,724

ANEXO 10. Diferencia de medias de la concentración de lipidos de *Chlorella* N+ vs N-

Prueba T e IC de dos muestras: N-. N+

T de dos muestras para N- vs. N+

	N	Media	Desv.Est.	Media del Error estándar
N-	12	25,1	13,0	3,8
N+	15	14,96	5,80	1,5

Diferencia = $\mu(N-) - \mu(N+)$

Estimado de la diferencia: 10,18

IC de 95% para la diferencia: (1,52. 18,84)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = 2,52 Valor P = 0,024 GL = 14

ANEXO 11. Diferencia de medias para la productividad de lípidos de *Chlorella* N+ vs N-

Prueba T e IC de dos muestras: N-. N+

T de dos muestras para N- vs. N+

	N	Media	Desv.Est.	Media del Error estándar
N-	15	11,8	10,0	2,6
N+	15	29,9	30,5	7,9

Diferencia = $\mu(N-) - \mu(N+)$

Estimado de la diferencia: -18,13

IC de 95% para la diferencia: (-35,73. -0,53)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -2,18 Valor P = 0,044 GL =

16

ANEXO 12. Análisis de conglomerados jerárquicos para *B. braunii*

Distancia del coeficiente de correlación absoluto, Enlace de promedios
Pasos de amalgamación

Paso	Número de grupos	Nivel de semejanza	Nivel de distancia	Grupos incorporados	Nuevo grupo	Número de obs. en el grupo nuevo
1	4	57,7626	0,422374	1	5	1
2	3	34,1612	0,658388	1	4	1
3	2	17,5000	0,825000	1	2	1
4	1	9,4669	0,905331	1	3	1

Partición final

Grupo 1
Nitrogeno (mM) Conc. lípidos (%p/p)

Grupo 2
Luz ($\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)

Grupo 3
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

Grupo 4
CO₂ (%)

ANEXO 13. Análisis de regresión múltiple para la concentración de lípidos en condiciones estándar de nitrógeno (*B. braunii*).

La ecuación de regresión es

$$\% \text{ lipids (\%w/w)} = 13,7 - 1,37 \text{ Nitrogen (mM)} + 1,43 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)} - 0,103 \text{ Ligth (\mu E/(m}^2 \cdot \text{s}^{-1}\text{))} + 0,191 \text{ Carbon dioxide (\%)}$$

Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P
Constante	13,74	19,64	0,70	0,507
Nitrogen (mM)	-1,3732	0,3045	-4,51	0,003
Temperature (°C)	1,4262	0,8589	1,66	0,141
Ligth (μE/(m ² ·s ¹))	-0,10290	0,01659	-6,20	0,000
Carbon dioxide (%)	0,1906	0,3431	0,56	0,596

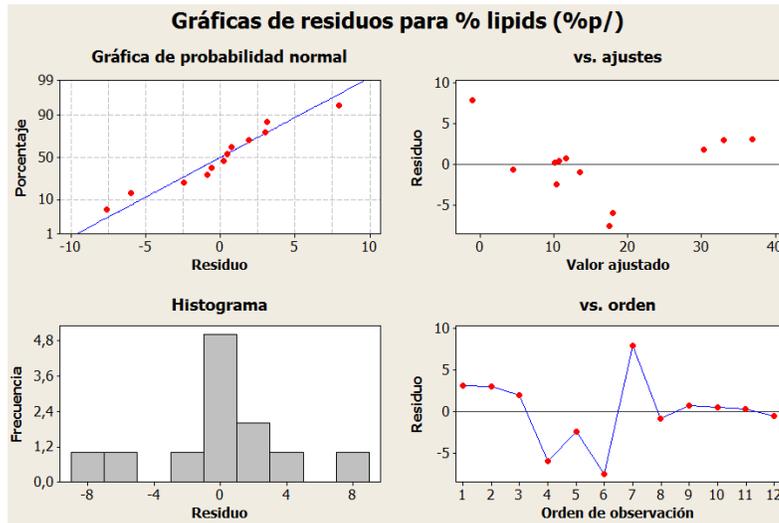
S = 5,15696 R-cuad. = 88,8% R-cuad.(ajustado) = 82,3%

PRESS = 668,309 R-cuad.(pred) = 59,64%

Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	4	1469,66	367,41	13,82	0,002
Error residual	7	186,16	26,59		
Total	11	1655,82			

Fuente	GL	SC	sec.
Nitrogen (mM)	1	327,03	
Temperature (°C)	1	13,74	
Ligth (μE/(m ² ·s ¹))	1	1120,68	
Carbon dioxide (%)	1	8,21	



ANEXO 14. Modelo para concentración de lípidos con las variables significativas en condiciones estándar de nitrógeno (*B. braunii*).

<i>Summary</i>	
R	0,918
R ²	0,843
R ² adjusted	0,808
Standard Error	5,371
# Points	12
PRESS	650,37
R ² for Prediction	0,607
Durbin-Watson d	1,519
First Order Autocorrelation	0,211
Collinearity	0,937
Coefficient of Variation	32,888
Precision Index	50,817

ANOVA						
<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>SS%</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F Signif</i>	<i>df</i>
Regression	1396,2	84	698,10	24,20	0,000239	2
Residual	259,61	16	28,85			9
LOF Error	248,14	15 (96)	62,03	27,0382	0,00139	4
Pure Error	11,47	1 (4)	2,294			5
Total	1655,8	100				11

%_lipids_(%w/w) = b0 + b1*Nitrogen_(mM) + b2*Ligth_(μE/(m2·s1))						
	<i>P value</i>	<i>Std Error</i>	<i>-95%</i>	<i>95%</i>	<i>t Stat</i>	
b0	45,58	3,11195E-06	4,482	35,44	55,72	10,17
b1	-1,062	0,000987	0,222	-1,563	-0,560	-4,790
b2	-0,09622	0,000182	0,01580	-0,132	-0,06047	-6,088

ANEXO 15. Análisis de regresión múltiple *B. braunii* para la concentración de lípidos en condiciones deficiencia de nitrógeno.

La ecuación de regresión es

$$\% \text{ lipids (\%w/w)} = 65,1 - 18,7 \text{ Nitrogen (mM)} - 0,0106 \text{ Ligth (\mu E/(m}^2 \cdot \text{s1))} \\ - 0,17 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)} + 6,27 \text{ Carbon dioxide (\%)}$$

Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P
Constante	65,05	30,66	2,12	0,060
Nitrogen (mM)	-18,668	5,053	-3,69	0,004
Ligth ($\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s1})$)	-0,010607	0,008374	-1,27	0,234
Temperature ($^\circ\text{C}$)	-0,173	1,186	-0,15	0,887
Carbon dioxide (%)	6,266	1,919	3,27	0,009

S = 11,7005 R-cuad. = 76,1% R-cuad.(ajustado) = 66,5%

PRESS = 2943,27 R-cuad.(pred) = 48,59%

Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	4	4355,9	1089,0	7,95	0,004
Error residual	10	1369,0	136,9		
Total	14	5724,9			

Fuente	GL	SC sec.
Nitrogen (mM)	1	2517,5
Ligth ($\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s1})$)	1	314,9
Temperature ($^\circ\text{C}$)	1	64,0
Carbon dioxide (%)	1	1459,5

ANEXO 16. Modelo seleccionado para *B. braunii* con las variables significativas en condiciones de deficiencia de nitrógeno

<i>Summary</i>	
R	0,850
R ²	0,722
R ² adjusted	0,676
Standard Error	11,51
# Points	15
PRESS	2273,42
R ² for Prediction	0,603
Durbin-Watson d	0,692
First Order Autocorrelation	0,619
Collinearity	1,000
Coefficient of Variation	25,068
Precision Index	11,191

ANOVA						
<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>SS%</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F Signif</i>	<i>df</i>
Regression	4133,9	72	2067,0	15,59	0,000461	2
Residual	1591,0	28	132,58			12
LOF Error	499,57	9 (31)	83,26	0,4577	0,818	6
Pure Error	1091,4	19 (69)	181,90			6
Total	5724,9	100				14

%_lipids_(%w/w) = b0 + b1*Nitrogen_(mM) + b2*Carbon_dioxide_(%)						
	<i>P value</i>	<i>Std Error</i>	<i>-95%</i>	<i>95%</i>	<i>t Stat</i>	
b0	58,17	3,63243E-07	5,825	45,48	70,86	9,987
b1	-20,77	0,000831	4,697	-31,01	-10,54	-4,423
b2	6,489	0,00445	1,858	2,440	10,54	3,492

ANEXO 17. Diferencia de medias para la concentración de lípidos en *B. braunii*

Prueba T e IC de dos muestras: N- N+

T de dos muestras para N- vs. N+

	N	Media	Desv.Est.	Media del Error estándar
N-	15	45,9	20,2	5,2
N+	12	16,3	12,3	3,5

Diferencia = $\mu(N-) - \mu(N+)$

Estimado de la diferencia: 29,60

IC de 95% para la diferencia: (16,55. 42,65)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = 4,69 Valor P = 0,000 GL = 23