

Uso de residuos agroindustriales para fabricar proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*

Use of Agroindustrial Waste to Produce Proteins from the Microalgae *Chlorella vulgaris*

María Alejandra Parra¹, Leidy Johanna Murcia², Diego Rubio Fernández³, Juan Sandoval Herrera⁴

¹Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia, maria.parra@estudiantes.uamerica.edu.co

²Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia, leidy.murcia@estudiantes.uamerica.edu.co

³Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia, diego.rubio@investigadores.uamerica.edu.co. <https://orcid.org/0000-0003-0760-9567>

⁴Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia, juan.sandoval@profesores.uamerica.edu.co <https://orcid.org/0000-0001-8957-1421>

Fecha de recepción: 08/03/2019 Fecha de aceptación del artículo: 18/08/2019



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-No comercial-SinObraDerivada 4.0 internacional.

DOI: doi.org/10.18041/1794-4953/avances.1.4316

Como citar: Parra, M. A., Murcia, L. J., Rubio Fernández, D., & Sandoval Herrera, J. (2019). Uso de residuos agroindustriales para fabricar proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*. *Avances: Investigación En Ingeniería*, 16(1). <https://doi.org/10.18041/1794-4953/avances.1.4316>

Resumen

El nitrógeno, factor limitante del crecimiento microalgal, se emplea para la síntesis de proteínas. Encontrar fuentes económicas y no convencionales de nitrógeno para los cultivos puede favorecer el rendimiento y la viabilidad del proceso. En este proyecto, primero, se realizó una selección teórica de los potenciales residuos que se iban a evaluar; luego, se evaluó el crecimiento del cultivo, productividad de biomasa microalgal y rendimiento de proteína en cultivos de *Chlorella vulgaris* enriquecidos con fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, suero lácteo y NaNO₃, con fotoperiodos de 12 h de luz: 12 h de oscuridad a 20 ± 1 °C, durante 7 días. Las mayores tasas de crecimiento del cultivo se dieron a concentraciones de 0,041 gL⁻¹ de nitrógeno enriquecido para la fuente orgánica, con una productividad de biomasa de 0,07828 gL⁻¹d⁻¹. La mayor fracción proteica se obtuvo para el cultivo con suero lácteo: 55,63% en biomasa seca. Se concluye que el enriquecimiento con esta fuente orgánica de nitrógeno y carbono permitió un incremento celular y de proteína.

Palabras claves: fuentes de nitrógeno, microalgas, productividad, rendimiento de proteína, tasa de crecimiento.

Abstract

Nitrogen, a limiting factor of microalgal growth, is used for synthesis of proteins. Finding low-cost and unconventional sources of nitrogen for the crops, can enhance the yield and viability of the process. In this project, first at all, a theoretical selection of the potential wastes to be evaluated was carried out; then, the growth of the crop, productivity of the biomass and yield of the protein in the cultures of *Chlorella vulgaris* enriched with sources of organic and inorganic nitrogen, milk serum and NaNO₃, with photoperiods of 12h light:12h darkness at 20±1 °C, for 7 days, were evaluated. The highest growth rates of the crop were obtained with 0,041 gL⁻¹ of nitrogen enriched with organic source, with a productivity of 0,07828 gL⁻¹d⁻¹. The most of the protein was obtained for the culture with whey: 55,63% in dry biomass, concluding that the enrichment with this source allowed a cellular and protein increase.

Keywords: nitrogen sources, growth rate, microalgae, productivity, protein yield.

Introducción

Las microalgas son alternativas promisorias para fabricar diferentes metabolitos, como lípidos, proteínas y pigmentos. Los procesos mediados por microalgas son eficientes y sostenibles, por su capacidad de utilizar contaminantes, lo que permite la remediación del agua y el aire [1], mientras se cultiva biomasa, para extraer metabolitos [2].

De la composición bioquímica de la microalga *Chlorella vulgaris* se conoce que el contenido de proteína promedio está entre el 51 y el 58% en peso seco, incluso porcentajes mayores según algunas investigaciones que han variado las condiciones de cultivo [3]. Además, contiene aminoácidos esenciales para el cuerpo humano y es fuente de proteína de alta calidad según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [4]. La composición bioquímica de la biomasa microalgal depende de las condiciones específicas de cultivo. Para la elaboración de proteínas, por ejemplo, se deben controlar parámetros como luz, temperatura y nutrientes [5]. Dentro de la composición del medio de cultivo, el nitrógeno es un nutriente limitante del crecimiento, debido a que la microalga lo convierte en proteínas [6], [7], esenciales para su funcionamiento.

La mayoría de las microalgas puede usar distintas especies químicas como fuentes inorgánicas: nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-) o sales de amonio (NH_4^+) [8]. Se ha informado que para cultivos heterotróficos la fuente de nitrógeno de mayor asimilación por la microalga *C. vulgaris* es el nitrato de sodio [6].

También se han usado fuentes orgánicas, como la urea [9], al igual que residuos industriales de procesos, como los del ablandamiento del grano de soya, que contienen aminoácidos aprovechables [10] y permiten alcanzar altos valores de densidad celular.

Por otra parte, se ha evaluado el crecimiento celular de la microalga *C. vulgaris* en medios enriquecidos con compuestos orgánicos, como lixiviados de estiércol [11], humus de lombriz y excremento de caballo, en relación con fertilizantes tradicionales, y se ha concluido que las densidades celulares alcanzadas fueron menores respecto al medio enriquecido con un fertilizante complejo NPK [11]. De la evaluación del suero lácteo se obtuvieron $0,076 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ de biomasa seca con el cultivo enriquecido; mientras que el medio control produjo $0,05 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ [12].

Según tales resultados, en este trabajo se buscó enriquecer el medio de cultivo con residuos agrícolas o industriales como fuentes orgánicas, a efectos de producir proteínas a partir de *C. vulgaris*. Para ello, a partir de [13], inicialmente, se realizó una selección teórica de las fuentes orgánicas. Luego, se obtuvieron las curvas y las tasas intrínsecas de crecimiento para los cultivos. Por último, se cuantificó la proteína en la biomasa seca de los cultivos, con el fin de establecer no solo la fuente que generó mayor densidad celular, sino la de mayor acumulación de proteína, que permitirá reducir los costos en un proceso a escala industrial.

1. Metodología

1.1. Preparación del inóculo y condiciones de cultivo

Se partió de un cultivo base de *C. vulgaris* al que se le añadió fertilizante foliar [14]. Luego se siguió la técnica aséptica descrita por Malajovich [15], y como fuente de luz se empleó una cinta LED roja (figura 1, icono 2) de 14,4 W, con longitud de onda 600-680 nm [15] y un fotoperiodo de

12 h de luz y 12 h de oscuridad [16], controladas con un temporizador Completel TS-WU3 (figura 1, icono 3). Para la agitación se usaron bombas de aire Shark RS-610 (figura 1, icono 4), con un caudal de 4 L/min, conectadas directamente a cada recipiente de vidrio de 250 mL (figura 1, icono 5), por medio de mangueras de 1/16 de plástico. El recipiente también tenía una manguera de salida, para desgasificar (figura 1, icono 6).

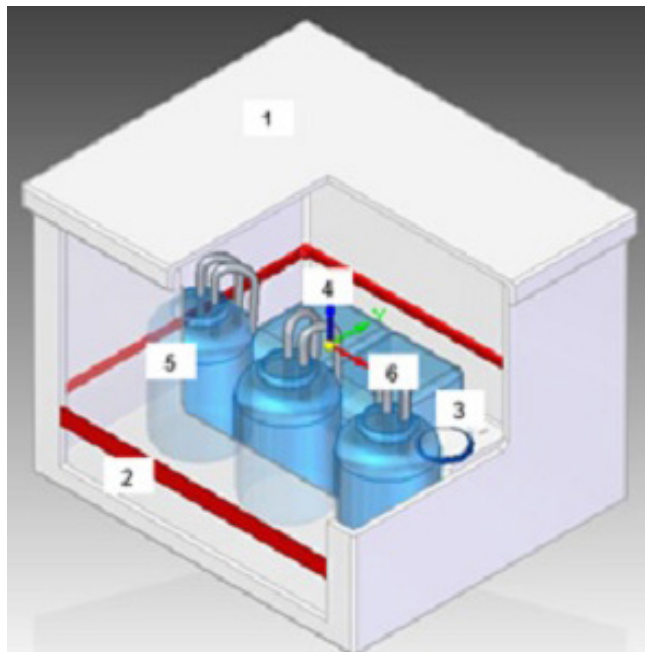


Figura 1. Montaje utilizado en la experimentación para los medios de cultivo

1.2. Selección teórica de las fuentes orgánicas

Los diferentes tipos de subproductos provenientes de procesos industriales o agrícolas se compararon mediante una matriz de selección, con los criterios de relación de porcentaje de nitrógeno a costo, susceptibilidad a contaminación y disponibilidad. El primer criterio se refiere a la cantidad de nitrógeno en porcentaje teórico de cada fuente que puede aportar al medio de cultivo [14], dividido entre el costo por gramo de cada una en el mercado.

Este criterio se evaluó definiendo tres rangos de relación: bajo, de 0 a 0,3; medio, de 0,3 a 5, y alto, mayor a 5. La susceptibilidad a la contaminación se tomó en cuenta, dado que no todas las fuentes tienen la misma carga de microorganismos, materia orgánica y contenido de agua; por ello, se evaluó este criterio para determinar si es necesario realizar algún pretratamiento a dichas fuentes. En la evaluación del criterio de disponibilidad se buscaron fuentes de fácil adquisición en Bogotá (zona de realización del ensayo experimental), para evitar costos adicionales de transporte y que no compitieran con la alimentación humana.

1.3. Cálculo de la concentración denitrógeno de las fuentes orgánicas seleccionadas

Después de seleccionar tres fuentes orgánicas potenciales para el cultivo, se determinaron las concentraciones de experimentación.

No se encontró información sobre el uso de la harina de sangre ni de la de soya; pero sí del suero de la leche [12]. En la literatura sobre el tema [12], [13], [17] se consultaron los valores de la proteína bruta en el suero lácteo, la harina de sangre y la harina de soya (7 %, 10 % y 7,04 %), y ya que esta es una medida indirecta de la cantidad de nitrógeno, con el factor mostrado en la ecuación 1 se realizaron las conversiones de proteína bruta a nitrógeno.

$$N_{total} = \text{Proteína bruta} / 6,25 \quad (1)$$

Este factor se basa en la suposición de que aproximadamente un 16 % de nitrógeno está presente en la proteína promedio [18].

1.4. Seguimiento a cultivos

Para el seguimiento a los cultivos se utilizó el método de recuento celular en la cámara de Neubauer [16], [19] y se halló la concentración celular por medio de la ecuación 2.

$$= \# \text{Cél. totales} * FD * 50.000 \quad (2)$$

FD es el factor de dilución. Para evaluar la cinética de crecimiento, se usó la ecuación 3, según la cual el incremento celular por unidad de tiempo es proporcional al número de células en el cultivo, y la constante de proporcionalidad es la tasa de crecimiento (μ) [17], [19], [20].

$$dN/dt = \mu N \quad (3)$$

Con las concentraciones celulares se graficaron las curvas de crecimiento, que, linealizadas, permitieron determinar las tasas intrínsecas de crecimiento de la microalga en cada medio, gracias a la ecuación 4.

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t \quad (4)$$

Donde N es el número de células al cabo del tiempo t y N_0 es el número inicial de células [21].

1.5. Experimento

Los cultivos microalgales se enriquecieron [14] con la fuente orgánica e inorgánica de nitrógeno a concentraciones definidas previamente. Después de ello se compararon con un ensayo experimental de control, con fertilizante foliar. Los parámetros de evaluación fueron: peso seco, rendimiento de la biomasa, productividad volumétrica y fracción proteica. El volumen total de trabajo en los experimentos fue de 3 L.

1.6. Análisis de los datos

Se evaluó la influencia de la concentración de suero lácteo y de la concentración del NaNO_3 , mediante análisis de varianza (Anova) de un factor, para determinar si afectaba significativamente la tasa intrínseca de crecimiento en los cultivos, con un nivel de significancia, $\alpha = 0,1$.

1.7. Determinación de peso seco y productividad volumétrica

Se empleó el protocolo basado en: métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal [22]. Las muestras se secaron en un horno marca Nabertherm-TR120, variando su temperatura gradualmente hasta 50 °C durante 18 h para muestras de 50 mL.

Después, se llevaron las muestras a un desecador por 3 h y se pesaron en una balanza analítica de 5 dígitos hasta peso constante.

Por último, se determinó el peso seco mediante la ecuación 5, y la productividad volumétrica, mediante la ecuación 6.

$$PST=(PSFM-PSF)/VF \quad (5)$$

Donde PST es el peso seco total, PSFM y PSF son los pesos del filtro con muestra y del filtro sin muestra, respectivamente, y VF es el volumen de muestra filtrado.

$$Productividad=PST/Vc \cdot t \quad (6)$$

Donde PST es el peso seco de la biomasa, Vc es el volumen total de cultivo y t es el tiempo de cultivo en días.

1.8. Cuantificación de proteína

Previo al envío para análisis, la muestra se secó en un horno Challenger GH/DOR 120V/E, a 100 °C durante 12 h para muestras de 280 mL. Se dispuso de 0,53 g de biomasa seca de cada uno de los tratamientos para enviar a análisis de cuantificación de proteínas por el método Kjeldahl estándar de la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), 2001.11 (2005)/NTC 4657 (1999), al Laboratorio Certificado de Alta Complejidad de la Universidad de La Salle, en la ciudad de Bogotá.

2. Resultados

2.1. Selección de fuentes de nitrógeno

Como fuente inorgánica se eligió el nitrato de sodio (NaNO₃), debido a que en diferentes investigaciones consultadas [23]-[25] se ha visto que la microalga *C. vulgaris* puede metabolizar este nutriente y lograr altas densidades celulares, a diferencia de otras fuentes, como los nitritos.

Como fuente orgánica se eligió el suero lácteo, por ser un subproducto con alta disponibilidad, pues cerca del 90% [26] se obtiene de la elaboración de quesos y presenta alta relación costo-beneficio (costo: \$1,16/g; beneficio: 7% de nitrógeno teórico, relación 6,03). La harina de soya se eligió por ser de fácil manipulación y tener baja susceptibilidad a la contaminación, además de presentar la mejor relación costo-beneficio (7,04% de nitrógeno y \$1,05/g). Finalmente, se seleccionó la harina de sangre, porque a pesar de tener la más baja relación costo-beneficio (0,23) no se encontraron investigaciones anteriores con este subproducto como fuente de nutrientes para cultivos microalgales. Los datos de los precios de dichos residuos se obtuvieron consultando las respectivas empresas generadoras.

Para seleccionar la mejor fuente orgánica, se realizó la prueba de adaptación de la microalga *C. vulgaris*, cuyos resultados se ven en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados prueba de adaptación

	Suero lácteo	Harina de soya	Harina de sangre
$\mu(d-1)$	0,3753	0,2725	0,2545

2.2. Influencia de la concentración de la fuente orgánica

Con base en los resultados mostrados en la tabla 1, se evaluó la influencia de la concentración del suero lácteo, partiendo del mejor rango de crecimiento presentado en literatura [4]. Se muestran los promedios de tres réplicas en la figura 2.

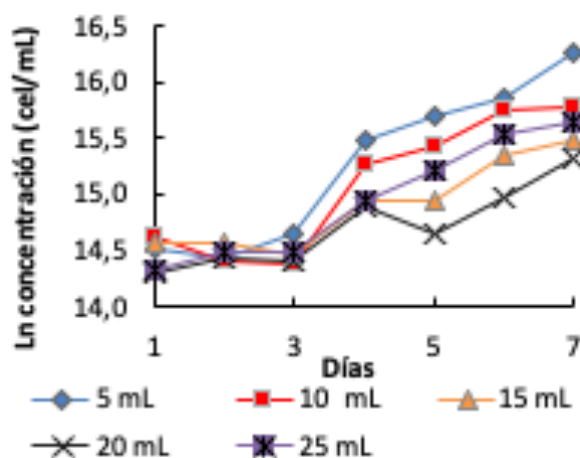


Figura 2. Crecimiento celular de *C. vulgaris* a cinco dosificaciones de suero lácteo

La dosificación a la cual la microalga *C. vulgaris* creció más rápido fue 5 mL de suero lácteo, correspondiente a una concentración de 0,041 gL⁻¹ de enriquecimiento de nitrógeno.

2.3. Influencia de concentración de NaNO₃

En la figura 3 se observan las curvas de crecimiento variando la concentración de NaNO₃ (1,0; 1,25 y 1,5 gL⁻¹). Son los promedios de tres réplicas.

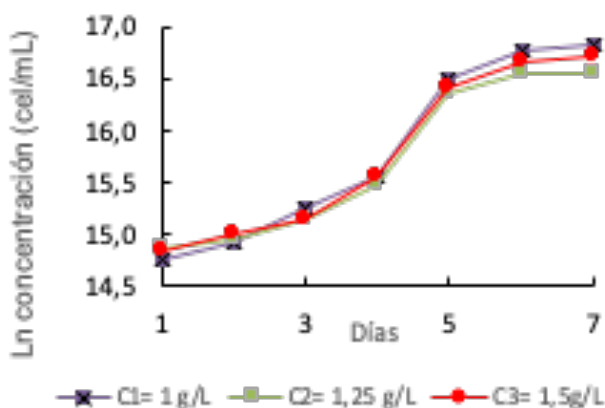


Figura 3. Influencia de la concentración de NaNO₃

Las tasas de crecimiento resultantes fueron: $\mu = 0,4127 \text{ d}^{-1}$, $\mu = 0,3366 \text{ d}^{-1}$ y $\mu = 0,3794 \text{ d}^{-1}$, respectivamente, muy cercanas entre sí. No obstante, para la concentración de 1 gL⁻¹ de NaNO₃, el factor de correlación es más cercano a uno, $R^2 = 0,9577$, por lo cual se seleccionó para determinar la proteína. Por otro lado, se realizó el Anova de un factor indicando que a 0,05 de significancia, cualquiera de estas 3 concentraciones no representa un cambio significativo en la variable respuesta.

2.4. Influencia de la fuente

Se comparó el crecimiento con el suero lácteo, y con el NaNO_3 , contra un medio control, sin fuente de nitrógeno adicional, a un volumen final de 3 L. Se partió de las concentraciones que dieron los mejores resultados para cada fuente. Las curvas promedio, de tres réplicas, se presentan en la figura 4.

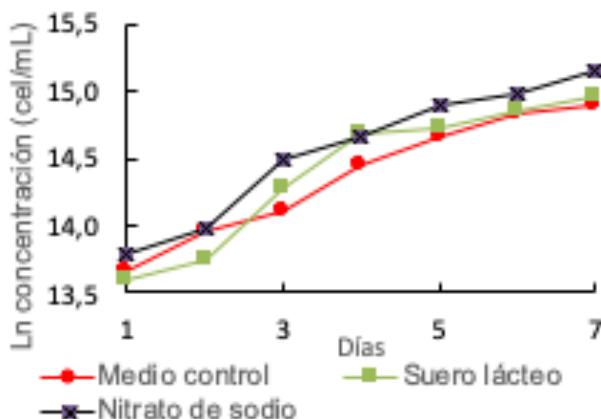


Figura 4. Influencia de la fuente de nitrógeno

Según la figura 4, al enriquecer el medio de cultivo con una fuente de nitrógeno, aumentan las tasas de crecimiento promedio, respecto al medio control como se resume en la tabla 2. No obstante, la mayor correlación se da con la fuente inorgánica.

Tabla 2. Tasas de crecimiento y factor de correlación del experimento final

Fuente	PSF	PSFM	PST (mg/mL)
Suero lácteo	1,233	1,5116	0,5480
NaNO_3	1,181	1,3620	0,3389
Control	1,151	1,2406	0,1792

Entre las dos fuentes evaluadas, el medio enriquecido con suero lácteo fue el que presentó una mayor tasa de crecimiento.

2.5. Peso seco y productividad volumétrica

Se evaluó el peso seco total (PST). En la tabla 3 se muestran los resultados.

Tabla 3. Determinación del peso seco

	μ (d ⁻¹)	R2
Control	0,2164	0,9684
Suero lácteo	0,2411	0,9077
NaNO_3	0,2348	0,9535

PSF: peso sin filtro; PSFM: peso sin filtro con muestra; PST: peso seco total.

El mayor rendimiento de biomasa seca se obtuvo en el tratamiento enriquecido con suero lácteo (54,80%), seguido del tratamiento enriquecido con NaNO_3 (33,89%). Así, se confirmó que los cultivos heterotróficos, generalmente, presentan una mayor productividad de biomasa respecto a los autotróficos [6].

En la tabla 4 se muestran los resultados de la productividad de los cultivos.

Tabla 4. Productividad volumétrica de los tratamientos finales

	Productividad (gL ⁻¹ d ⁻¹)
Suero lácteo	0,0783
NaNO₃	0,0484
Control	0,0256

El suero lácteo dio una productividad de 0,0783 gL⁻¹d⁻¹, muy superior a los otros tratamientos evaluados, mayor que el reportado por [12] (0,076 gL⁻¹d⁻¹) y mucho mayor a los resultados obtenidos por [27] (0,038 gL⁻¹d⁻¹). Por el contrario, la productividad con NaNO₃ alcanzada en este trabajo, 0,0484 gL⁻¹d⁻¹, es inferior a otras referencias [6] y [28], aunque en este último el mejor resultado se consiguió con una mezcla con acetato de sodio como fuente de carbono orgánico.

2.6. Cuantificación de la proteína

El método Kjeldahl estándar de la AOAC, realizado en el Laboratorio de Alta Complejidad de la Universidad de La Salle, en Bogotá, determinó un porcentaje de proteína bruta para el tratamiento enriquecido con suero lácteo del 55,63%, siendo este el mayor entre los tratamientos evaluados. Para el medio control se obtuvo un 45,05% y, por último, un valor del 39,54% para el cultivo enriquecido con NaNO₃.

Lo observado permite sugerir que el enriquecimiento con el suero lácteo no ayuda a alcanzar mayores concentraciones celulares, sino que favorece la fracción proteica de esta biomasa, a diferencia de lo reportado en la literatura, que expresa que los cultivos heterotróficos tienen menor acumulación de proteínas [6]. No hay estudios sobre evaluaciones de la fracción de proteína de la microalga al adicionar suero lácteo como nutriente; sin embargo, este porcentaje es similar al obtenido en otros estudios, en los que se ha enriquecido el medio de cultivo con fuentes orgánicas, como humus de lombriz, el cual obtuvo una fracción proteica del 56,8% [11].

El porcentaje obtenido en el medio control fue del 45,05%, similar al de otra investigación [29], con un valor del 44,56% de proteína al evaluar la composición bioquímica de la microalga *C. vulgaris* cultivada autotróficamente.

El medio de cultivo autotrófico enriquecido con NaNO₃ obtuvo la menor cantidad de proteínas, con un 39,54% en peso seco en este trabajo, e inferior a valores obtenidos en otras investigaciones, como un 44,3% [6] y porcentajes cercanos al 46% [25]. Finalmente, en otro estudio similar, el rango de rendimientos de proteínas estuvo entre el 34% y el 60% [30].

Conclusiones

Según las curvas de crecimiento para tres concentraciones de la fuente de nitrógeno inorgánica y cinco concentraciones para la fuente de nitrógeno orgánica seleccionada, las mejores velocidades específicas de crecimiento (μ) fueron: en la fuente inorgánica (NaNO₃) a 1 gL⁻¹, o un enriquecimiento de nitrógeno teórico de 0,044 gL⁻¹, con un valor de $\mu = 0,365$ d⁻¹. Con la fuente orgánica la mejor dosificación fue 5 mL de suero lácteo, es decir, un enriquecimiento de nitrógeno teórico proporcionado al cultivo de 0,041 gL⁻¹ con un valor de $\mu = 0,329$ d⁻¹.

La comparación entre la fuente orgánica e inorgánica de nitrógeno confirmó la mayor densidad celular en cultivos heterotróficos, es decir, en el cultivo enriquecido con suero lácteo. Se halló que la fuente con mayores productividades volumétricas y velocidades específicas de crecimiento fue la orgánica, con 0,078 gL⁻¹d⁻¹ de biomasa seca y un valor de $\mu = 0,241$ d⁻¹; por su parte, la fuente inorgánica dio una productividad de 0,048 gL⁻¹d⁻¹ de biomasa seca y velocidad, $\mu = 0,235$ d⁻¹.

El enriquecimiento de nitrógeno con fuentes orgánica e inorgánica de nitrógeno en los cultivos de *C. vulgaris* generó un incremento en el rendimiento de biomasa del 54,80% y del 33,89%, respectivamente, comparado con el medio control (17,92%). El medio enriquecido con suero lácteo aumentó en 10% el porcentaje de proteína, y mejoró tanto la productividad de biomasa como la acumulación de proteínas, en biomasa seca: 55,63%.

Agradecimientos

A la Fundación Universidad de América, específicamente al Departamento de Investigación.

Referencias

- [1] A. H. Pérez, "Microalgas, cultivo y beneficio", Rev. Biol. Mar. Oceanog., vol. 49, n.º 2, pp. 157-173, 2014.
- [2] M. A. Borowitzka, "High-value products from microalgae—their development and commercialization", J. App. Phycol., vol. 25, n.º 3, pp. 743-756, 2013.
- [3] A. G. Waghmare y M. K. Salve, "Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*", Bioresour. Bioprocess., vol. 3, n.º 1, p. 16, 2016.
- [4] E. Becker, "Microalgae as a source of protein", Biotech. Adv., vol. 25, n.º 2, pp. 207-210, 2007.
- [5] A. Marín Ruiz, "Características fotosintéticas y crecimiento de *Scenedesmus obliquus* inmovilizada en alginato", Agrociencia, vol. 45, n.º 3, pp. 303-313, 2017.
- [6] T. Xie, Y. Xia, Y. Zeng, X. Li y Y. Zhang, "Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy", Bioresour. Technol., vol. 233, pp. 247-255, 2017.
- [7] A. Barka y C. Blecker, "Microalgae as a potential source of single-cell proteins: a review", BASE, vol. 20, n.º 3, pp. 427-436, 2016 [en línea]. Disponible: <https://popups.uliege.be/443/1780-4507/index.php?id=13132>.
- [8] P. F. Paredes, "Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno", Universidad de la Coruña, pp. 22-26, 1995.
- [9] A. K. Piñera, Manual para el cultivo de microalgas. s. l.: Universidad Autónoma de Baja California, 2002.
- [10] L. Gómez Luna y R. Rivero, "Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético", Rev. Colomb. Biotecnol., vol. 13, n.º 2, pp. 27-38, 2011.
- [11] M. Muñoz-Peñuela, J. A. Ramírez-Merlano, A. M. Otero-Paternina, V. V. Medina Robles, P. E. Cruz Casallas y Y. M. Velasco-Santamaría, "Effect of culture medium on growth and protein content of *Chlorella vulgaris*", Rev. Colomb. Cienc. Pecu., vol. 25, n.º 3, pp. 438-449, 2012.
- [12] G. Chaparro, Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio. Bogotá: Fundación Universidad de América, 2017.
- [13] L. J. Murcia M. y M. A. Moreno P., Producción de proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* enriqueciendo el medio de cultivo con fuentes de nitrógeno. Bogotá: Fundación Universidad de América, 2018.

- [14] AGROFERCOL, 20 Agosto 2017. [En línea]. Disponible: <https://www.agrofercol.com/?product=efe-agro>
- [15] M. Malajovich, "Introducción a las técnicas microbiológicas. Biotecnología: enseñanza y divulgación", 2016 [en línea]. Disponible: https://bteduc.com/roteiros_es/2015_Tecnicas_microbiologicas.pdf
- [16] J. Álvarez, Cultivo de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) con iluminación mediante LEDs (Light Emitting Diodes). Madrid: Universidad Politécnica de Madrid, 2012.
- [17] M. J. Waites, N. L. Morgan y J. S. Rockey, "Microbial growth and nutrition", en *Industrial Microbiology: An Introduction*. London: School of Applied Science, South Bank University, 2001, p. 25.
- [18] FAO, "Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición: métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos", 2017 [en línea].
- [19] S. B. Luis, "Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiésel", tesis de maestría, Univ. Nacional de Colombia, Bogotá, 2012.
- [20] B. O. A. Vega y D. Voltolina, "Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento", en *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. México: Conacyt, 2017, pp. 17-25.
- [21] E. Salvucci, "Hacia una nueva biología, crecimiento microbiano", en *Hacia una nueva biología [blog]*. [En línea]. Disponible: <https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/>
- [22] B. O. Arredondo Vega, B. Cordero Esquivel y D. Voltolina, "Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico", en *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. México: Conacyt, 2017.
- [23] J. A. López-Elías et al., "Efecto de la concentración y fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de la microalga *Chaetoceros muelleri*", *Phyton* (Buenos Aires), vol. 84, n.º 2, pp. 331-337, 2015.
- [24] L. M. Gómez L., "Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba", tesis de doctorado, Univ. de La Coruña, España, 1997.
- [25] L. Durán et al., "Influencia de la relación carbono/nitrógeno en la producción de proteínas totales en *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803", *Revista Especializadas en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, vol. 6, pp. 49-58, 2012 [en línea].
- [26] E. Valencia et al., *La industria de la leche y la contaminación del agua*. México: Instituto Tecnológico de Puebla, 2009 [en línea].
- [27] D. Rubio-Hernández y G. Alejandro-Hernández, "Evaluación de las incidencias de salinidad y pH sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana", *Itekne*, vol. 13, n.º 1, pp. 44-56, 2016.
- [28] C. M. Pardo, Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la generación de proteínas presentes en *Chlorella vulgaris* para la valorización de biomasa. Bucaramanga: Escuela de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander, 2012.
- [29] M. Q. Humberto, "Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*", *Rev. Cubana Aliment. Nutr.*, vol. 13, n.º 2, pp. 123-128, 1999.
- [33] A. D. Delgado, D. A. González Barajas y A. M. Ardila A., "Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (*Chlorellales*: *Chlorellaceae*) a través del diseño de medios de cultivo selectivos", *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecuaria*, vol. 18, n.º 3, pp. 451-46, 2017. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num3_art:736