



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: EVELYN TATIANA MALDONADO SILVA

TEMA: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MIXOTRÓFICA DE LA
MICROALGA *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersoni*) CON SUSTRATOS
AMILÁCEOS

DIRECTOR: DR. EVER MORALES

CODIRECTOR: ING.-MAT. PEDRO ROMERO

SANGOLQUÍ, MARZO DE 2014

CERTIFICACIÓN

Dr. Ever Morales

Ing.-Mat. Pedro Romero Saker

Certifican:

Que el trabajo titulado “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MIXOTRÓFICA DE LA MICROALGA *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) CON SUSTRATOS AMILÁCEOS”, realizado por la Srta. EVELYN TATIANA MALDONADO SILVA como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a EVELYN TATIANA MALDONADO SILVA que lo entregue a la M.Sc. María Augusta Chávez, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, Marzo de 2014

Dr. Ever Morales Avendaño

DIRECTOR

Ing.-Mat. Pedro Romero Saker

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Evelyn Tatiana Maldonado Silva

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MIXOTRÓFICA DE LA MICROALGA *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) CON SUSTRATOS AMILÁCEOS”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas al pie de página correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Marzo del 2014

Evelyn Tatiana Maldonado Silva

AUTORIZACIÓN

Yo, Evelyn Tatiana Maldonado Silva

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución el trabajo “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MIXOTRÓFICA DE LA MICROALGA *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) CON SUSTRATOS AMILÁCEOS” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Marzo del 2014.

Evelyn Tatiana Maldonado Silva

DEDICATORIA

A Dios por bendecirme todos los días,

A mis padres y mi hermano porque siempre me han apoyado en el transcurso
de mis estudios y me han animado a seguir adelante,

A mi novio por su apoyo incondicional.

Evelyn

AGRADECIMIENTO

A Dios por concederme este triunfo en mi vida. A mis padres por ser mi ejemplo a seguir, felicitarme en mis logros y darme consejos para seguir creciendo personal y profesionalmente, Gracias por brindarme esta oportunidad para un futuro mejor en mi vida, los quiero mucho. A mi hermano Andrés por motivarme siempre a seguir adelante y animarme en los días difíciles. A mi novio Gabriel por escucharme, entenderme y porque en todo momento siempre ha estado apoyándome y dándome ánimos.

A mi director de tesis, Dr. Ever Morales, por su apoyo profesional, su tiempo, y por brindarme parte de su conocimiento producto de su larga experiencia investigativa necesarios para el desarrollo del presente trabajo, gracias doc por su confianza y por toda su colaboración. A mi codirector de tesis, Ing.-Mat. Pedro Romero Saker por su guía profesional durante todo el proyecto y por su paciencia a lo largo de la Investigación.

A mi tío Dr. Patricio Silva, Bioq. Raquel Rosas y a todos los que forman parte de Centro CESAL, por su valioso asesoramiento, atención prestada y por brindarme todas las facilidades durante el tiempo que estuve allí; especialmente a mi tío por su constante colaboración, conocimientos impartidos y además por su gran apoyo hasta el final.

Al Laboratorio de Biotecnología Algal, Ambiental y Producción de Biomasa del La Unidad de Biología de la Universidad Central del Ecuador por permitirme realizar la parte experimental de mi tesis en sus instalaciones.

A mis amigos Mafer, Anita, Giany y Felipe por su apoyo, consejos y momentos compartidos durante el transcurso de la tesis. Gracias por todo su cariño y por hacer divertido cada día en el laboratorio.

A mis amigas Andre, Gaby, Fer y Kary por todo su apoyo, afecto, amistad y gran cariño brindado en todo momento desde que empezamos la universidad.

A mis amigos Santy, Raul, Kathy, Henry, Fercho, Gaby, Víctor y todos los demás con quien compartí los últimos semestres de la universidad, gracias por todas las experiencias vividas y por la amistad que hemos formado.

A todos aquellos que me apoyaron de alguna u otra forma muchas gracias por su apoyo ya que por fin cumplí mi meta.

Evelyn

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	III
AUTORIZACIÓN	IV
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTO.....	VI
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VIII
LISTADO DE TABLAS.....	XIII
LISTADO DE CUADROS	XVI
LISTADO DE FIGURAS.....	XVII
LISTADO DE ANEXOS	XXII
RESUMEN.....	XXIV
ABSTRACT	XXV
CAPÍTULO 1:	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema.....	4
1.3 Objetivos de la investigación	9
1.3.1 Objetivo general	9
1.3.2 Objetivos específicos	10
1.4 Marco teórico.....	10
1.4.1 Características generales de las microalgas.....	10
1.4.2 Generalidades de <i>Chlorella</i>	12

1.4.3	Crecimiento de las microalgas	17
1.4.4	Parámetros de cultivo.....	19
1.4.4	Sistemas de cultivo	27
1.4.5	Tipos de cultivo de microalgas	28
1.4.6	Medios de cultivo de acuerdo a las fuentes de carbono.....	32
1.4.7	Sustratos orgánicos.....	37
1.4.8	Producción de exoenzimas	43
1.5	Sistema de hipótesis.....	45
CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....		46
2.1	Participantes.....	46
2.2	Zona de estudio	46
2.3	Período de tiempo de investigación.....	47
2.4	Diseño.....	47
2.4.1	Fase 1: Determinación de la concentración de Nitrofoska foliar.....	47
2.4.2	Fase 2: Crecimiento de la microalga con extractos solubles obtenidos a partir de arroz, yuca y papa en cultivos discontinuos alimentados.....	49
2.4.3	Fase 3: Crecimiento de la microalga con diferentes almidones comerciales y extractos de papa, yuca, maíz y arroz en cultivos discontinuos alimentados.....	50
2.5	Procedimientos.....	52
2.5.1	Muestra	52

2.5.2	Escalamiento de la cepa para mantenimiento del inóculo.....	52
2.5.3	Ensayo 1: Cinética de crecimiento a diferentes concentraciones de un fertilizante comercial (Nitrofoska)	54
2.5.4	Elaboración de almidones comerciales y de extractos solubles a partir de arroz, yuca, papa y maíz	56
2.5.5	Análisis bromatológicos de los extractos solubles y almidones comerciales.	58
2.5.6	Ensayo 2: Crecimiento de la microalga con extractos solubles obtenidos de arroz, yuca y papa en cultivos discontinuos alimentados (1%).	61
2.5.7	Ensayo 3: Crecimiento de la microalga con diferentes almidones comerciales y extractos de papa, yuca, maíz y arroz en cultivos discontinuos alimentados (0.5%).....	63
2.5.8	Determinación de amilasas	66
2.5.9	Determinación de pigmentos fotosintéticos	67
2.5.10	Análisis de biomasa	68
2.5.11	Producción de biomasa.....	70
2.5.12	Análisis para determinación de proteínas y carbohidratos	76
2.5.13	Análisis de datos	79
	CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	80
3.1	Identificación de la microalga.....	80

3.2	Ensayo 1: Cinética de crecimiento a diferentes concentraciones de un fertilizante comercial (Nitrofoska).....	82
3.2.1	Densidad celular.....	82
3.3	Análisis bromatológicos de los extractos solubles y almidones comerciales.....	84
3.4	Ensayo 2: Crecimiento de la microalga con extractos solubles (1%) obtenidos de arroz, yuca y papa en cultivos discontinuos alimentados.....	86
3.4.1	Densidad celular.....	86
3.5	Ensayo 3: Crecimiento de la microalga con diferentes almidones comerciales y extractos de papa, yuca, maíz y arroz en cultivos discontinuos alimentados (0.5%).....	88
3.5.1	Densidad celular.....	88
3.5.2	Clorofila total	91
3.5.3	Amilasas.....	93
3.5.4	Proteínas y carbohidratos.....	97
	CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	99
4.1	Identificación de la microalga.....	99
4.2	Ensayo 1: Cinética de crecimiento a diferentes concentraciones de un fertilizante comercial (Nitrofoska).....	100
4.3	Análisis bromatológicos de los extractos solubles y almidones comerciales.....	102

4.4	Ensayo 2: Crecimiento de la microalga con extractos solubles (1%) obtenidos a partir de arroz, yuca y papa en cultivos discontinuos alimentados.....	105
4.5	Ensayo 3: Crecimiento de la microalga con diferentes almidones comerciales y extractos de papa, yuca, maíz y arroz en cultivos discontinuos alimentados (0.5%).....	109
4.5.1	Densidad celular.....	109
4.5.2	Clorofila total	113
4.5.3	Amilasas.....	114
4.5.4	Proteínas y carbohidratos.....	116
	CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	119
	CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	122
	CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	124

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1: Clasificación taxonómica de la microalga	15
Tabla 2. 1: Representación de los tratamientos a utilizar en la fase 1.....	48
Tabla 2. 2: Aleatorización de los tratamientos en la fase 1.....	48
Tabla 2.3: Representación de los tratamientos a utilizar en la fase 2.....	49
Tabla 2.4: Aleatorización de los tratamientos en la fase 2.....	50
Tabla 2.5: Representación de los tratamientos a utilizar en la fase 3.....	50
Tabla 2.6: Aleatorización de los tratamientos en la fase 3.....	51
Tabla 2.7: Longitudes de onda empleadas para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos.....	52
Tabla 2.8: Tratamientos y repeticiones implementadas en el ensayo de crecimiento a diferentes concentraciones de Nitrofoska	55
Tabla 2.9: Tratamientos y repeticiones implementadas en el ensayo de cultivos discontinuos alimentados con extractos solubles de papa, yuca y arroz.	61
Tabla 2.10: Tratamientos y repeticiones implementadas en el ensayo de cultivos discontinuos alimentados con almidones comerciales y extractos de papa, yuca, maíz y arroz.....	63
Tabla 2.11: Elaboración curva de calibración de proteínas utilizando BSA como estándar.....	76

Tabla 2.12: Procedimiento para determinación de proteínas según Wiener Lab.....	77
Tabla 2.13: Elaboración curva de calibración de carbohidratos utilizando glucosa como estándar.....	78
Tabla 3.1: Ensayo 1. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable densidad celular (cel.mL^{-1})	82
Tabla 3.2: Ensayo 1. Prueba de Duncan para la variable densidad celular (cel.mL^{-1}).....	82
Tabla 3.3: Velocidades de crecimiento (μ), tiempos de duplicación (Td) y densidad celular máxima (DC) en función de la concentración de Nitrofoska (0.5, 1, 3 mL.L^{-1})	84
Tabla 3.4: Análisis bromatológicos de los extractos solubles y almidones comerciales utilizados como medio de cultivo.	84
Tabla 3.5: Ensayo 2. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable densidad celular (cel.mL^{-1})	86
Tabla 3.6: Ensayo 2. Prueba de Duncan para la variable densidad celular (cel.mL^{-1}).....	87
Tabla 3.7: Velocidades de crecimiento (μ), tiempos de duplicación (Td) y densidad celular máxima (DC) de <i>Graesiella emersonii</i> en cultivos discontinuos alimentados con almidón al 1% (control, papa, yuca, arroz)	88
Tabla 3.8: Ensayo 3. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable densidad celular (cel.mL^{-1}).....	89

Tabla 3.9: Velocidades de crecimiento (μ), tiempos de duplicación (Td) y densidad celular máxima (DC) de <i>Graesiella emersonii</i> en cultivos discontinuos alimentados con almidón 0.5% (control, papa, yuca, maíz, arroz, achira, yuca comercial, maíz comercial).....	91
Tabla 3.10: Resultados promedio de clorofila total ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtenidos con cada tratamiento.....	91
Tabla 3.11: Ensayo 3. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable clorofila total ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) día 25.	92
Tabla 3.12: Ensayo 3. Prueba de Duncan para la variable clorofila total ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) día 25.....	92
Tabla 3.13: Ensayo 3. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable clorofila total ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) día 32.	93
Tabla 3.14: Ensayo 3. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable halos de amilasas (cm).....	96
Tabla 3.15: Contenido de proteínas y carbohidratos según cada fuente de almidón.	97

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1: Composición bioquímica total de la biomasa <i>Chlorella</i> (% de materia seca)	14
Cuadro 1.2: Medio de cultivo C (agar) para <i>Chlorella emersonii</i>	17
Cuadro 1.3: P IV oligoelementos	17
Cuadro 1.4: Características de las diferentes condiciones de cultivo de las microalgas	32
Cuadro 4.1: Análisis bromatológicos de los extractos solubles y almidones comerciales obtenidos de bibliografía.	103

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1:	<i>Chlorella</i> ; A y B: células joven y adulta; C: formación de 4 autoesporas; D: liberación de las autosporas (Des Abbayes <i>et al.</i> , 1989).....	13
Figura 1.2:	<i>Graesiella emersonii</i> (Algae Resource Database)	16
Figura 1.3:	<i>Chlorella emersonii</i> var. <i>globosa</i> (Shihira & Kraus, 1965)	16
Figura 1.4:	Fases de crecimiento en cultivo de microalgas. A: Fase de latencia, B: Fase exponencial, C: Fase de declinación, D: Fase estacionaria, E: Fase de muerte. (González, 2000)	19
Figura 1.5:	Representación esquemática de un cultivo alimentado o “feed-batch” vs un discontinuo o “Batch”. (Prácticas de Bioprocesos, 2007. Universidad Nacional de Quilmes).	31
Figura 1.6:	Distribución de flujo metabólico de las células de <i>Chlorella</i> en cultivos (a) autotrófico, (b) heterótrofo y (c) mixotrófico (Yang <i>et al.</i> , 2000).	36
Figura 2.1:	Escalamiento del cultivo de <i>Graesiella emersonii</i> a 1500 ml en medio Nitrofoska foliar (3 ml/L) (Maldonado, 2013).	53
Figura 2.2:	Escalamiento del cultivo de <i>Graesiella emersonii</i> a 3000 ml en medio Nitrofoska foliar (3 ml/L) (Maldonado, 2013).	53
Figura 2.3:	Escalamiento del cultivo de <i>Graesiella emersonii</i> a 3000 ml en medio Nitrofoska foliar (3 ml/L) en tres réplicas (Maldonado, 2013).	54

Figura 2.4:	Esquema de aleatorización de los cultivos del ensayo de crecimiento a diferentes concentraciones del fertilizante Nitrofoska (Maldonado, 2013).	55
Figura 2.5:	Cultivos de la microalga <i>Graesiella emersonii</i> para evaluación de la cinética de crecimiento y elección de concentración de Nitrofoska foliar. A) día 1 B) día 42 (Maldonado, 2013).	56
Figura 2.6:	Soluciones de almidones comerciales de yuca, maíz y achira (Maldonado, 2013).	57
Figura 2.7:	Extractos solubles obtenidos de productos agrícolas (papa, yuca, maíz y arroz) (Maldonado, 2013).	58
Figura 2.8:	Esquema de aleatorización de los cultivos discontinuos alimentados con extractos solubles de papa, yuca y arroz (Maldonado, 2013).	62
Figura 2.9:	Cultivos mixotróficos de la microalga <i>Graesiella emersonii</i> en presencia de extractos solubles obtenidos de papa, yuca y arroz al 1%. A) día 1 B) día 37 (Maldonado, 2013).	62
Figura 2.10:	Esquema de aleatorización de los cultivos discontinuos alimentados con almidones comerciales y extractos solubles de papa, yuca, maíz y arroz (Maldonado, 2013).	64
Figura 2.11:	Cultivos mixotróficos discontinuos alimentados de la microalga <i>Graesiella emersonii</i> con almidones comerciales de yuca, maíz, achira; y extractos solubles de papa, yuca, arroz y maíz, al 0,5% (día 1) (Maldonado, 2013).	65

Figura 2.12: Cultivos mixotróficos discontinuos alimentados de la microalga <i>Graesiella emersonii</i> con almidones comerciales de yuca, maíz, achira; y extractos solubles de papa, yuca, arroz y maíz al 0,5% (día 39) (Maldonado, 2013).....	65
Figura 2.13: Determinación de amilasas en placas con agar almidón 1.5% (Maldonado, 2013).	66
Figura 2.14: Tinción de placas con lugol para determinación de amilasas (Maldonado, 2013).	67
Figura 2.15: Reglilla de Neubauer de 9 mm ² (Arredondo & Voltolina, 2007)	68
Figura 2.16: Mezcla de cultivos obtenidos del ensayo 1 (medio Nitrofoska) (Maldonado, 2013).....	70
Figura 2. 17: Mezcla de cultivos obtenidos del ensayo 2 (Nitrofoska 3ml/L, papa 1%, yuca 1%, arroz 1%) (Maldonado, 2013).	71
Figura 2.18: Cultivos mezclados de la microalga <i>Graesiella emersonii</i> obtenidos del ensayo 3 (NF 3ml/L, papa 0.5%, yuca 0.5%, maíz 0.5%, arroz 0.5%, maíz comercial 0.5%, yuca comercial 0.5% y achira 0.5%) (Maldonado, 2013).	71
Figura 2.19: Inicio del escalamiento hasta volúmenes de 10L de la microalga <i>Graesiella emersonii</i> . A) Cultivo con NF 3ml/L, B) Cultivo con NF 3ml/L + 0.5% papa, C) Cultivo con NF 3ml/L + 0.5% papa (Maldonado, 2013).....	72
Figura 2.20: Escalamiento a 10L de <i>Graesiella emersonii</i> . A) Cultivo NF 3ml/L, B) Cultivo NF 3ml/L + papa, C) Cultivo NF 3ml/L + papa (Maldonado, 2013).	73

- Figura 2.21: Escalamiento de la microalga *Graesiella emersonii* a 15 litros. A) Cultivo con NF 3ml/L, B) Cultivo con NF 3ml/L + papa 0.5%, C) Cultivo con NF 3ml/L + papa 0.5% (Maldonado, 2013). 73
- Figura 2.22: Cultivos decantados de *Graesiella emersonii* . A) Cultivo con NF 3ml/L, B) Cultivo con NF 3ml/L + papa 0.5%, C) Cultivo con NF 3ml /L + papa 0.5% (Maldonado, 2013)..... 74
- Figura 2.23: Escalamiento de la microalga *Graesiella emersonii* a 9 litros con el precipitado obtenido de la decantación A) Cultivo con NF 3ml/L, B) Cultivo con NF 3ml/L + papa 0.5%, C) Cultivo con NF 3 ml/L + papa 0.5% (Maldonado, 2013)..... 74
- Figura 2.24: Escalamiento de la microalga *Graesiella emersonii* en 8 botellones de 15 litros. A) Cultivos con NF 3ml/L, B) Cultivos con NF 3ml/L + papa 0.5% (Maldonado, 2013)..... 75
- Figura 3.1: Colonias de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) en medio sólido (Maldonado, 2013). 80
- Figura 3.2: Observación al microscopio de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) (Maldonado, 2013)..... 81
- Figura 3.3: Observación al microscopio de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) con la microalga *Desmodesmus sp.* (Maldonado, 2013). 81
- Figura 3.4: Curva de crecimiento ($\times 10^6$ cel.mL⁻¹) en función de la concentración de Nitrofoska (0.5, 1, 3 mL.L⁻¹)..... 83

- Figura 3.5: Curva de crecimiento ($\times 10^6$ cel.mL⁻¹) de *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados con almidón al 1% (Control, papa, yuca, arroz) 87
- Figura 3.6: Curva de crecimiento ($\times 10^6$ cel.mL⁻¹) de *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados con almidón al 0.5% (control, papa, yuca, maíz, arroz, achira, yuca comercial, maíz comercial). Las flechas indican el tiempo al cual fueron añadidos los extractos amiláceos correspondientes a cada tratamiento de los cultivos..... 90
- Figura 3.7: Crecimiento de hongos en medio agar almidón 1.5% (Maldonado, 2013). 94
- Figura 3.8: Observación de halos por presencia de amilasa (Maldonado, 2013)..... 94
- Figura 3.9: Presencia de amilasa en muestras de cultivo de la microalga *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados con diferentes extractos amiláceos en medio sólido. A) Control, B) Papa, C) Yuca, D) Maíz, E) Arroz, F) Achira, G) Yuca comercial, H) Maíz comercial (Maldonado, 2013)..... 95

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo 1: Ensayo 1. Comprobación de los supuestos del modelo variable densidad celular. Prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado. **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 2: Ensayo 1. Comprobación de los supuestos del modelo variable densidad celular. Prueba de hipótesis de Levene. **¡Error! Marcador no d**
- Anexo 3: Ensayo 2. Comprobación de los supuestos del modelo variable densidad celular. Prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado. **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 4: Ensayo 2. Comprobación de los supuestos del modelo variable densidad celular. Prueba de hipótesis de Levene. **¡Error! Marcador no d**
- Anexo 5: Ensayo 3. Comprobación de los supuestos del modelo variable densidad celular. Prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado. **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 6: Ensayo 3. Comprobación de los supuestos del modelo variable densidad celular. Prueba de hipótesis de Levene. **¡Error! Marcador no d**
- Anexo 7: Ensayo 3. Comprobación de los supuestos del modelo variable clorofila total día 25. Prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado. **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 8: Ensayo 3. Comprobación de los supuestos del modelo variable clorofila total día 25. Prueba de hipótesis de Levene. **¡Error! Marcador no n**
- Anexo 9: Ensayo 3. Comprobación de los supuestos del modelo variable clorofila total día 32. Prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado. **¡Error! Marcador no definido.**

- Anexo 10: Ensayo 3. Comprobación de los supuestos del modelo variable clorofila total día 32. Prueba de hipótesis de Levene. **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 11: Ensayo 3. Comprobación de los supuestos del modelo variable halos de amilasas. Prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado. **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 12: Ensayo 3. Comprobación de los supuestos del modelo variable halos de amilasas. Prueba de hipótesis de Levene. **¡Error! Marcador no definido.**

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la capacidad mixotrófica de la microalga autóctona, *Graesiella emersonii* en presencia de sustratos amiláceos en cultivos discontinuos alimentados, en dos bioensayos. En el primer bioensayo se utilizó almidón de arroz, yuca y papa al 1% (p/v) y un control sin adición de almidón. Entre los resultados, se encontró la mayor densidad celular de $38.96 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ ($p < 0.05$), con el almidón de papa, seguido del control, arroz y yuca con 34.10, 32.75 y $31.55 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$; respectivamente. En el segundo bioensayo se determinó el crecimiento, producción de amilasa, clorofila, proteínas y de carbohidratos, utilizando almidones comerciales de yuca, maíz y achira; y extractos obtenidos de papa, yuca, maíz y arroz al 0.5% (p/v), se obtuvo el siguiente orden descendente: 78.76, 71.27, 68.37, 57.01, 56.19, 55.3 y de $51.03 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$, con papa ($p < 0.05$), arroz, maíz, yuca, yuca comercial, maíz comercial y control, respectivamente. La mayor actividad de amilasa, de 2,167cm se produjo con maíz. La condición mixotrófica no incrementó el contenido de clorofila, respecto al control autotrófico. El contenido de proteínas incrementó con papa, maíz, yuca y achira en un 3.8, 3.76, 3.54 y 3%; respectivamente; y el control sólo con 1.57%. Los carbohidratos también aumentaron con extracto de yuca y achira, con 3.11 y 2.36; en relación al 1.45% del control. Estos resultados demostraron que, la microalga *Graesiella emersonii* presenta capacidad mixotrófica de crecimiento y producción de proteínas, carbohidratos y actividad de amilasa, en presencia de sustratos amiláceos y en cultivos discontinuos alimentados.

Palabras clave:

- Mixotrófico
- Microalga
- Sustrato amiláceo
- Cultivo discontinuo alimentado
- *Graesiella emersonii*

ABSTRACT

In the present study the ability of native mixotrophic microalgae *Graesiella emersonii* was evaluated in the presence of starch substrates in fed-batch cultures in two bioassays. In the first bioassay starch of rice, cassava and potato to 1% (w/v) and a control without addition of starch was used. Among the results, the highest cell density $38.96 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ ($p < 0.05$) is found with potato starch, followed by the control, rice and cassava with 34.10, 32.75 and $31.55 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$, respectively. In the second bioassay, growth, amylase production, chlorophyll, proteins and carbohydrates was determined using starch commercial of cassava, corn and achira; and extracts from potato, cassava, corn and rice 0.5% (w/v), the following descending order was obtained: 78.76, 71.27, 68.37, 57.01, 56.19, 55.3 and $51.03 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$, potato ($p < 0.05$), rice, corn, cassava, cassava commercial, corn commercial and control, respectively. The increased activity of amylase of 2,167 cm occurred with corn. The mixotrophic condition did not increase chlorophyll content, relative to the autotrophic control. The protein content increased with potato, corn, cassava and achira by 3.8, 3.76, 3.54 and 3%, respectively, and control only 1.57%. Carbohydrates also increased with yucca extract and achira, with 3.11 and 2.36, compared to 1.45% of the control. These results showed that the microalgae *Graesiella emersonii* presents mixotrophic growth capacity and production of proteins, carbohydrates and amylase activity in the presence of starch substrates and fed batch cultures.

Keywords:

- Mixotrophic
- Microalgae
- Starchy substrate
- Fed-batch culture
- *Graesiella emersonii*

CAPÍTULO 1:

Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) con sustratos amiláceos

1.1 Formulación del problema

Desde la antigüedad las microalgas se han usado como alimento humano, sin embargo es hasta ahora que han atraído la atención para la investigación de su potencial biotecnológico (Garibay *et al.*, 2009). Se han descrito más de 40.000 especies de microalgas, pero menos del 1% ha sido sometido a investigación para la identificación de nuevas sustancias bioactivas o potenciales aplicaciones industriales o agrarias (Mendoza *et al.*, 2011).

En los años cincuenta y sesenta en Alemania surgió el interés por las microalgas al ser consideradas como una fuente abundante de proteína de bajo costo para la nutrición humana. Posteriormente, el interés se extendió hacia otros países y además se dirigió hacia otras aplicaciones como la acuicultura, el tratamiento de aguas residuales, la obtención de sustancias químicas, la producción de farmacéuticos y los procesos de bioconversión energética (Garibay *et al.*, 2009). Esto es debido a que las microalgas constituyen una de las más importantes reservas de nuevos productos y aplicaciones, lo que justifica el alto interés que despiertan en la actualidad (Mendoza *et al.*, 2011).

Las microalgas son microorganismos presentan ventajas de reproducirse en condiciones autotróficas, mixotróficas y en muchos casos heterotróficas

(García, 1988); ya que poseen la capacidad de utilizar diferentes sustratos orgánicos como fuente de carbono y de energía, además de CO₂ y agua (Tandeau de Marsac & Houmard, 1993b). La nutrición con carbono orgánico ha sido estudiada principalmente en los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. Algunas especies de *Chlorella* tienen la capacidad de reemplazar las fuentes carbonadas y la energía utilizada en sistemas autotróficos por compuestos orgánicos como azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos, extracto de levadura y peptonas (Ukeles & Rose, 1976). Además las microalgas poseen un elevado contenido de proteínas, de pigmentos y un metabolismo versátil. Por lo que, su composición bioquímica puede modificarse variando las condiciones de cultivo como temperatura, intensidad luminosa, fotoperiodo, pH, salinidad y edad del cultivo (García, 1988), siendo de gran interés para la producción de compuestos de utilidad comercial, alimentaria, agrícola y farmacológica (Fábregas *et al.*, 1998). En este sentido, el objetivo del cultivo de microalgas no es solo la producción de biomasa como complemento alimenticio, sino también la obtención de compuestos naturales con alto valor biotecnológico en el mercado como: ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, ficobiliproteínas, polisacáridos, vitaminas, esteroides, antioxidantes, compuestos reductores de colesterol, etc. (Olaizola, 2003; Derner *et al.*, 2006).

Mundialmente, la producción de enzimas por parte de microorganismos se está desarrollando a través de estudios de bioprospección de bacterias, hongos, levaduras, e incluso a partir de microalgas, bajo el principio de

optimizar procesos y convertirlos en bioprocesos. Entre las enzimas se encuentra el grupo de las amilasas; las cuales han sido muy estudiadas en este campo debido a su influencia directa en la degradación del almidón, uno de los productos alimentarios mas explotados a nivel mundial (Durango, 2008).

A continuación se indican estudios realizados con diferentes microorganismos como fuente de amilasas:

- **Obtención de amilasas fúngicas a partir de *Aspergillus sp.*, aislado de semillas de lentejas.** Este proyecto se llevo a cabo en Bogotá - Colombia y su objetivo fue aislar microorganismos productores de amilasas para producir enzimas hidrolíticas del almidón (Castro *et al.*, 2008).
- **Producción de amilasas de levaduras floculantes.** Este proyecto desarrollado en Pakistán se destinó en la consecución de seis especies de levaduras productoras de amilasas. Para analizar sus niveles de producción bajo el medio de cultivo agar almidón y como fuente de carbono, se agregó extracto de levadura, almidón y una muestra se suplemento con amilasa salival (Nahvi & Emtiazi, 2003).

En microalgas la producción de amilasas es una característica específica para la mayoría de las especies de *Chlorella*. Por ejemplo *C. fusca var. vacuolata*, *C. soec. 211-30*, y *C. spec. 211-11r*, son capaces de hidrolizar el almidón. Mientras que *C. vulgaris*, *C. fusca var. rubescens*, *C. homosphaera*, *C. kessleri*, entre otras no lo hidrolizan (Kessler, 1978). Las actividades

enzimáticas confinadas a la pared celular se conocen en plantas superiores, hongos y bacterias; pero tales actividades también se encontraron en la pared celular de las microalgas. Por ejemplo, diferentes tipos de fosfatasa ácida y alcalina se reportaron en *Chlamydomonas* (Burczyk & Loos, 1995) y Chlorophyceae. Estas enzimas son excretadas desde las células o confinadas a su superficie según estudios realizados “*in vivo*”. Algunas Chlorophyceae también han presentado la capacidad de hidrolizar agar, almidón, caseína y fosfatos orgánicos (Moronta, 2001).

De esta forma, el gran potencial de las microalgas en biotecnología, comprende la producción de una serie enorme de productos; entre los que se incluyen alimentos saludables, productos químicos industriales y compuestos con aplicaciones terapéuticas, aunque para la mayoría de esas aplicaciones el mercado está todavía en desarrollo y el uso biotecnológico de microalgas se extenderá probablemente a nuevas áreas. (Mendiola *et al.*, 2008).

1.2 Justificación del problema

Los cultivos de muchas especies de microalgas en medios apropiados crecen más rápido en comparación con otras especies vegetales, lo cual permite una mayor productividad, y además ocupan áreas pequeñas de producción. Varias de las limitantes principales de cultivos a escala industrial son los costos de los componentes del medio de cultivo (Chisti, 2007), el aumento en los precios de los fertilizantes inorgánicos y su impacto ambiental

negativo, lo cual ha provocado la búsqueda de fuentes alternativas de nutrientes para los organismos fotosintéticos (microalgas) (Sevrin-Reyssac, 1998).

Con el objetivo de mejorar el costo-beneficio de la producción industrial, diversas microalgas presentan capacidad de ser cultivadas con sustratos orgánicos tales como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, derivados agrícolas o de origen animal, aguas residuales como fuentes de carbono. La utilización simultánea de luz y sustrato orgánico en el crecimiento demuestra la capacidad mixotrófica de las microalgas (Fábregas *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2008). Los cultivos mixotróficos pueden producir una alta cantidad de biomasa en comparación con los obtenidos en autotrofia y heterotrofia, y esto es debido a posible efecto de la energía de la luz y el sustrato orgánico. Por tanto, la atención mundial se ha vuelto hacia el uso de materiales orgánicos de diversos orígenes como son los recursos excedentes agrícolas (Camargo & Alonso, 2006).

La existencia de residuos es inherente al desarrollo de la vida, todo recurso solicitado en la naturaleza acaba convirtiéndose de una u otra forma en residuo. Generalmente se tiende a identificar la generación de residuos con la creación de un problema de contaminación, pero esto no es siempre cierto. La actividad agropecuaria es generadora de residuos de todas las clases, siendo la mayor parte de ellos residuos orgánicos, dentro de los cuales se encuentran principalmente los residuos proporcionados por la agricultura en las cosechas.

Afortunadamente los residuos de las cosechas son reciclables prácticamente en su totalidad, por lo que es evitable que se conviertan en un problema medio ambiental. Una alternativa es su utilización como sustrato para el cultivo de algas, bacterias, levaduras, hongos y setas comestibles, siendo el destino de los cuatro primeros como alimentación animal, y el de setas como consumo humano (Vazquez, 1994).

Es así como, los sustratos de origen vegetal representan fuentes alternativas en el diseño de medios de cultivo para microalgas con capacidad de crecimiento mixotrófico o heterotrófico (Fábregas *et al.*, 1998). Algunos de los derivados de origen vegetal como el almidón de papa, yuca, maíz, y otros, pueden ser utilizados como medios de cultivo enriquecidos a partir de fuentes naturales de almidón para el crecimiento y producción de metabolitos, principalmente del grupo de enzimas de la α -amilasa (Morales, 1996).

Las enzimas amilasas presentan gran demanda en la elaboración de los productos alimentarios mas explotados a nivel mundial (Durango, 2008). Industrias como la panadería, repostería, textilera, cervecera, papel, azucarera entre otras han visto en estas proteínas una gran oportunidad de comercio (Carrera, 2003). Según un estudio realizado, para el año 2003 las enzimas destinadas al procesamiento del almidón (amilasas) y los azúcares componen el sector mas amplio en la industria con un 47.3% (AGROBIO, 2004). Esto se debe a una característica esencial dentro de esta familia de proteínas. La

termoestabilidad de esta enzima, industrialmente, ha hecho que las amilasas tengan gran aplicabilidad en diversos procesos (Carrera, 2003).

Debido a que las aplicaciones industriales de las enzimas requieren que estas sean producidas a gran escala y bajo costo, el empleo de algunas enzimas de origen vegetal y animal ha ido decayendo, a favor de las enzimas de origen microbiano (Carrera, 2003). En cultivos de algunas microalgas se ha demostrado la presencia de amilasas en medios de cultivo con almidón soluble en condiciones heterotróficas y mixotróficas destacando su potencial para la inducción de dichas enzimas de gran importancia industrial y biotecnológica (Moronta, 2001). Por lo tanto, es de interés el uso de sustratos agrícolas como fuente de almidón para inducir la producción de amilasas en microalgas de importancia económica (Rosales, 2005).

Además, considerando la enorme biodiversidad de microalgas que existen, estas representan una importante fuente natural de principios activos de gran valor en el desarrollo de nuevos productos y aplicaciones ya que pueden ser usadas en procesos de bioproducción como suplementos dietéticos o alimenticios. Se han realizado estudios toxicológicos que demuestran su seguridad para el consumo y actualmente estas microalgas ya están catalogadas por la FDA (Food and Drug Administration) norteamericana (Villa, Solbas, & García, 2006).

Las microalgas poseen excelentes cualidades para ser empleadas en la alimentación animal; así como en la humana. La calidad de la biomasa de microalgas viene dada por la ausencia de tejidos y órganos no aprovechables, así como por el bajo contenido en materiales estructurales. Algunas especies no tienen celulosa dura en la pared celular, lo que facilita la digestión y asimilación de las proteínas por el organismo humano y contienen cantidades favorables de ácidos grasos insaturados, muy poco colesterol y una cantidad moderada de carbohidratos, factores que reducen las afecciones coronarias y la obesidad (Durand-Chastel, 1980). Además poseen un alto contenido en proteínas (pudiendo alcanzar valores de proteína bruta del orden del 50 al 70% del peso seco), carbohidratos y lípidos. Es decir, poseen porcentajes comparables e incluso superiores a los de otras fuentes tradicionales de proteínas (Ruiz E. , 2012).

Debido a que en los últimos años, ha existido un especial interés en que los alimentos no sólo tengan un valor nutritivo sino que además aporten un efecto beneficioso para la salud, la caracterización de extractos y compuestos procedentes de estas especies de microalgas aptas para la alimentación humana (e incluso animal), podría ser una buena estrategia en el desarrollo de alimentos funcionales dirigidos y específicos (Villa *et al.*, 2006).

Es por ello que el uso de sustratos amiláceos, los cuales en muchos casos constituyen parte de residuales productos de las cosechas, pueden ser utilizados como fuente de compuestos orgánicos para economizar costos de

producción de biomasa microalgal enriquecida con proteínas, lípidos o carbohidratos y de otros compuestos de interés económico en comparación al uso de medios de cultivos costosos o de fertilizantes comerciales. De tal manera que, en Ecuador puede resultar de suma importancia la producción de microalgas en condiciones mixotróficas con derivados agrícolas ricos en almidones, que generalmente son descartados; y a la vez reducir los costos por consumo de energía eléctrica y uso de nutrientes inorgánicos.

En este contexto, es de suma importancia la realización de estudios sobre el crecimiento de microalgas en diferentes medios de cultivo para identificar las mejores condiciones nutricionales aplicables en la producción de biomasa microalgal con potencial biotecnológico. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del medio de cultivo orgánico con sustratos amiláceos sobre el crecimiento y composición bioquímica de la microalga en condiciones mixotróficas, para la producción de biomasa microalgal con mayor calidad nutricional y de enzimas amilolíticas de interés económico.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad mixotrófica de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) con sustratos amiláceos.

1.3.2 Objetivos específicos

1.3.2.1 Determinar el crecimiento de la microalga a diferentes concentraciones de un fertilizante comercial

1.3.2.2 Comparar el crecimiento de la microalga con extractos solubles obtenidos a partir de arroz, yuca y papa en cultivos discontinuos alimentados.

1.3.2.3 Comparar el crecimiento de la microalga con diferentes almidones comerciales y extractos de papa, yuca, maíz y arroz en cultivos discontinuos alimentados.

1.3.2.4 Determinar la calidad nutricional de los extractos de arroz, yuca, papa, maíz y almidones comerciales.

1.3.2.5 Detectar la capacidad productora de amilasas de la microalga en presencia de los sustratos amiláceos.

1.3.2.6 Evaluar la concentración de proteínas, carbohidratos y pigmentos de los cultivos mixotróficos con sustratos amiláceos y el control.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Características generales de las microalgas

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos en su mayoría fotosintéticos, eucariontes, filamentosos que forman cadenas o colonias (López & Catzim, 2000). Entre los principales grupos se incluyen las

divisiones: Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Prymnesiophyta, Cryptophyta, Heterokontophyta y Dinophyta (Martínez, 2010).

Incluso con las diferencias morfológicas y estructurales, son similares fisiológicamente y poseen un metabolismo análogo al de las plantas (Abalde *et al.*, 1995). Se localizan principalmente en medios acuáticos pero también se encuentran en diversos suelos y adheridos a superficies (Richmond, 2004) bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; se les considera responsables de la producción del 50% de oxígeno y de la fijación del 50% del carbono del planeta (Garibay *et al.*, 2009).

La forma de reproducción de las microalgas puede ser sexual o asexual (fisión, esporulación y liberación de fragmentos nucleados en formas multicelulares), ambos procesos no son excluyentes, es decir los microorganismos los emplean en función de las condiciones del medio o en distintos momentos del ciclo vital (Cubas, 2008). Además poseen pigmentos como clorofilas, ficobilinas y carotenoides, y un alto contenido proteico y lipídico, dependiendo de las condiciones del medio (Arrieta, 2008).

Según Cohen (1986) las ventajas del cultivo de microalgas son:

1. El cultivo de microalgas es un sistema biológico eficiente que utiliza la energía solar para producir materia orgánica, además se obtienen mayores rendimientos que con plantas terrestres.

2. Las microalgas pueden modificar su composición bioquímica variando las condiciones ambientales y/o la composición del medio de cultivo.
3. Muchas especies de microalgas bajo ciertas condiciones pueden acumular compuestos de interés comercial, tales como proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o biopolímeros.

1.4.2 Generalidades de *Chlorella*

El nombre *Chlorella* proviene del griego *Chloros* que significa verde, y del latín *ella* que significa cosa pequeña. Se descubrió en 1890 por el holandés M. W. Beyerinck. Pertenece a la división Chlorophyta y a la clase Chlorophyceae (Infante *et al.*, 2011).

Chlorella pertenece al género clorofíceas, que se caracteriza por presentar un rápido crecimiento y desarrollo en cultivos celulares, además de su capacidad de utilizar como sustrato nutricional compuestos orgánicos e inorgánicos (Wehr & Sheath, 2003) (Xu *et al.*, 2006) (Chinnasamy *et al.*, 2010), por tanto se adapta a diversas condiciones ambientales y nutricionales (Wehr & Sheath, 2003), ya que no todas las especies microalgales pueden crecer mixotróficamente (Abalde *et al.*, 1995).

Su forma es esférica con un tamaño de 2–10 μm de diámetro aproximadamente, su color es verde fuerte debido a su alto contenido de clorofila, lo cual permite que su capacidad de fotosíntesis se multiplique rápidamente requiriendo sólo CO_2 , agua, luz solar y minerales para dividirse en

cuatro células cada 20 horas (Kanno & Kazie, 2005). Es la especie más fácil de cultivar ya que en su proceso de división celular cada célula se divide 1:4, hasta conducir a una proliferación multitudinaria. Se dividen por bipartición o se transforman en esporas o gametos, debido a que sus células aisladas contienen un plasto parietal voluminoso provisto de un pirenoide. Cuando las células alcanzan su tamaño máximo en el interior se forman 4 a 8 células más pequeñas idénticas (autoesporas), que son liberadas por dehiscencia (apertura natural o espontánea) de la pared de la célula madre (Des Abbayes *et al.*, 1989).

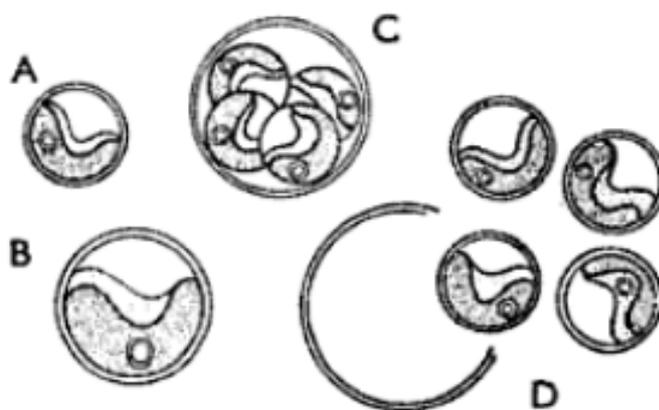


Figura 1.1: *Chlorella*; A y B: células joven y adulta; C: formación de 4 autoesporas; D: liberación de las autoesporas (Des Abbayes *et al.*, 1989).

Se encuentra extensamente en lagos y pantanos formando el 90% aproximadamente del plancton de agua dulce (Moronta *et al.* 2006). Habita sobre la superficie de rocas, madera o en el suelo en condiciones favorables para su crecimiento. Además, *Chlorella* suele cultivarse en estanques de agua

mineral para el consumo humano ya que posee una alta calidad proteica e incluso como medicamento por sus propiedades antitumorales (Alvear *et al.*, 2011). Se realizaron estudios sobre la composición bioquímica de esta microalga cultivada en régimen autotrófico y evaluaron la calidad de la proteína mediante métodos químicos (cuadro 1.1) (Becker, 1994).

Cuadro 1.1: Composición bioquímica total de la biomasa *Chlorella* (% de materia seca)

Componentes	Porcentaje
Pérdidas por desecación	7 – 8
Nitrógeno total	6 – 7
Proteína bruta	51 – 58
Proteína verdadera	32 – 44
Carbohidratos	12 – 17
Fibra cruda	8 – 10
Lípidos	14 – 22
Cenizas	8 – 9
Ácidos nucleicos totales	4 – 5

Fuente: Becker, 1994

1.4.2.1 *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*)

Robert Emerson aisló este microorganismo en 1926 de agua del grifo en Berlín-Dahlem (Alemania). Esta microalga requiere más estudio y las afinidades taxonómicas no son claras en la actualidad debido a la evolución de la biología molecular. En la tabla 1.1 se muestra la taxonomía de la microalga (Guiry in Guiry & Guiry, 2013).

Tabla 1.1: Clasificación taxonómica de la microalga

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Filo	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Chlorellales
Familia	Chlorellaceae
Género	<i>Chlorella</i>

Las células son esféricas de 5-14 micras de diámetro, más cerca de 14 micras cuando se cultivan en medio glucosa. Posee cromatóforos verdes con forma similar a una red hasta que se doren con la edad y cuando el nitrógeno sea deficiente, también se ve como un manto bajo otras condiciones de cultivo. El pirenoide siempre está presente (Guiry in Guiry & Guiry, 2013).



Figura 1.2: *Graesiella emersonii* (Algae Resource Database)

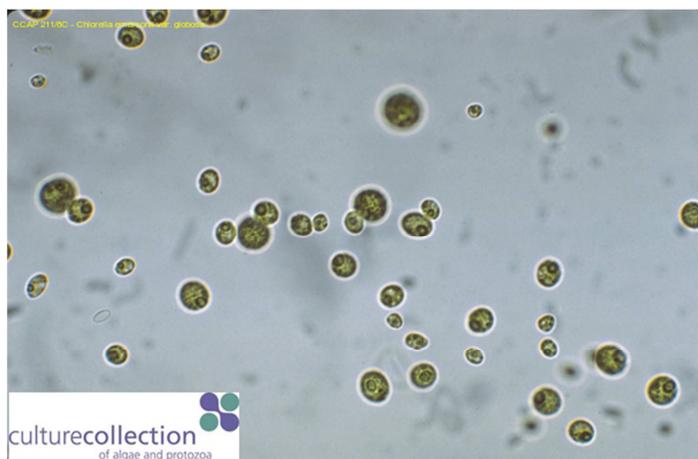


Figura 1.3: *Chlorella emersonii* var. *globosa* (Shihira & Kraus, 1965)

Sus condiciones de cultivo son: temperatura 20°C, intensidad luminosa 8-15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, ciclo 12:12 y medio de cultivo C (tabla 1.2) (Ichimura, 1971). Crece bien en medios inorgánicos con luz. La glucosa estimula el crecimiento en la luz y oscuridad. Mientras que, la manosa y fructosa estimulan el crecimiento en la luz y apoyan un débil crecimiento en la oscuridad; la sacarosa apoya el crecimiento a la luz. En cambio, la galactosa estimula el crecimiento débilmente a la luz, y no hay estimulación en la oscuridad, y el acetato es ineficaz en la oscuridad. Como fuentes de nitrógeno sirven nitrato y NH_3 (Guiry in Guiry & Guiry, 2013).

Cuadro 1.2: Medio de cultivo C (agar) para *Chlorella emersonii*

Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	15 mg
KNO ₃	10 mg
B-Na ₂ Glicerolfosfato · 5 H ₂ O	5 mg
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	4 mg
Vitamina B12	0.01 µg
Biotina	0.01 µg
Tiamina HCl	1 µg
PIV metales (Tabla 1.3)	0.3 ml
Tris (hidroximetil) aminometano	50 mg
Agua destilada	99.7 mL
pH 7.5	
Agregar 1.5 g de agar a 100 mL de medio para preparar medio sólido.	

Cuadro 1.3: P IV oligoelementos

Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	100 mg
FeCl ₃ · 6H ₂ O	19.6 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	3.6 mg
ZnCl ₂ *	1.04 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.4 mg
Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	0.25 mg
Agua destilada	
*En la colección NIES 1.04 mg de ZnCl ₂ se remplazan por 2.2 mg de ZnSO ₄ · 7H ₂ O (Provasoli & Pintner, 1959)	

1.4.3 Crecimiento de las microalgas

Las fases de crecimiento de las microalgas se definen por el número de células presentes a un tiempo determinado (edad) y por las condiciones del cultivo (Uribe, 1994):

- **Fase inicial o de latencia:**

Es la fase de adaptación a las nuevas condiciones de medio. Altas concentraciones de fósforo, calcio o magnesio pueden extender la fase de

latencia. Esta fase puede durar de 1 a 3 días dependiendo del tamaño y estado del inóculo (González, 2000).

- **Fase exponencial:**

La división celular se incrementa en función del tiempo debido a que las células van asimilando los nutrientes y su proceso de reproducción es activo, provocando un incremento en la población. Puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio y extenderse hasta cuatro días. Pero si se controla la dilución del cultivo puede prolongarse por semanas (González, 2000). La actividad metabólica se incrementa, siendo la etapa del crecimiento en la que las células son más efectivas (Negróni, 2009).

- **Fase de declinación de la fase exponencial:**

En esta etapa el tiempo requerido para duplicar la población aumenta, reduciéndose la tasa de crecimiento debido a que los nutrientes han sido consumidos, hay un aumento en la concentración de los metabolitos y una reducción de la actividad fotosintética por el incremento de la densidad de la población, que reduce la disponibilidad de luz por unidad de célula (Alvarez, 1994).

- **Fase estacionaria:**

Las densidades celulares se mantienen relativamente constantes por periodos más o menos prolongados. Esta fase es corta cuando los nutrientes

consumidos no son remplazados (González, 2000). La tasa de crecimiento se compensa con la de la mortalidad celular (Alvarez, 1994).

○ **Fase de muerte o declinación:**

Ausencia de nutrientes y acumulación de metabolitos inhibidores que aprovechan bacterias oportunistas y desplazan a la población. Células viables poco abundantes (Prescott, Harley, & Klein, 2004).

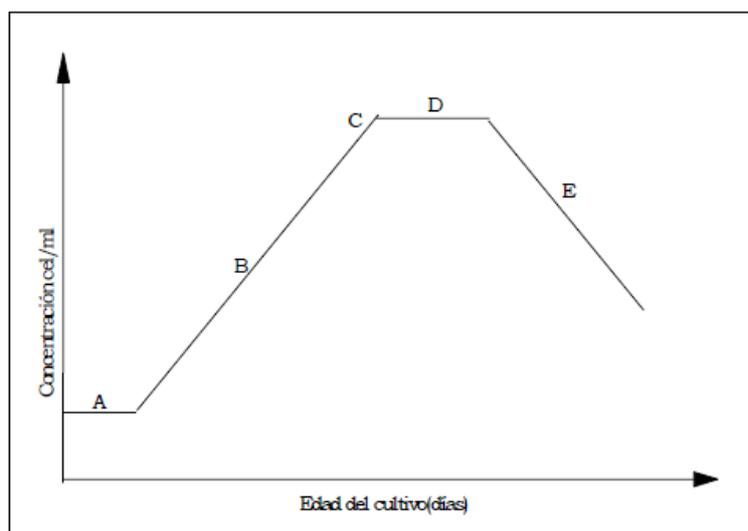


Figura 1.4: Fases de crecimiento en cultivo de microalgas. A: Fase de latencia, B: Fase exponencial, C: Fase de declinación, D: Fase estacionaria, E: Fase de muerte. (González, 2000)

1.4.4 Parámetros de cultivo

1.4.4.1 Luz

Constituye un factor fundamental en el cultivo de microalgas. La luz posee dos propiedades importantes: la calidad espectral y la intensidad (Lee, 1999).

- **Calidad espectral**

Se define por medio del rango de absorción de la clorofila y otros pigmentos fotosintéticos (Rabinowitch, 1961). Depende de la longitud de onda, se utiliza la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, es decir de 350 a 700 nm (Stephens & Ross, 2010). El espectro de la luz emitida a partir de la fuente, el reparto, la distribución de la luz en el cultivo, la dispersión, reflexión, refracción, difracción y atenuación lumínica en el cultivo deben considerarse (Lee, 1999).

- **Intensidad:**

Puede expresarse como la cantidad de energía en una superficie durante un periodo de tiempo (Gliessman, 2002). El crecimiento de microorganismos fotosintéticos y la tasa de fotosíntesis es proporcional a la intensidad de luz siempre que esta se sitúe por debajo del valor máximo (fotolimitación) (Ruiz, 2011). Luego de éste se da la fotoinhibición o fotoinactivación, es decir el descenso de la capacidad fotosintética a elevadas intensidades de luz provocando la fotodestrucción de pigmentos fotosintéticos (Abalde *et al.*, 1995). Se ha reportado que la producción y acumulación de metabolitos de interés comercial se ve afectada por la radiación de luz blanca en algas, hongos y bacterias. Sin embargo, la intensidad y el régimen de la iluminación varían con el género de microalga (Martin, 2010).

- **Fotoperiodo:**

El fotoperiodo (tiempo de exposición a la luz) tiene efecto sobre los ciclos de vida y actividades metabólicas de las microalgas tanto en cultivo como en la naturaleza. En condiciones naturales, la mayoría de las algas se establecen en periodos alternos de luz:oscuridad, sin embargo, en la mayoría de los laboratorios se mantiene constante la iluminación de los cultivos al interior, debido a que esta favorece la división celular en ciertas microalgas. Cuando se llegan a utilizar los ciclos luz:oscuridad es con el fin de simular las condiciones naturales o la de sincronizar los cultivos (Humprey, 1979).

- **Fuentes de luz:**

Puede ser natural (luz solar), la cual no supone un gasto energético pero no es posible controlar intensidad ni fotoperiodo; o artificial con lámparas fluorescentes tubulares (González, 2000).

1.4.4.2 Temperatura

La biomasa microalgal responde continuamente a la temperatura ambiental. Aumenta la tasa de crecimiento cuando aumenta la temperatura, dentro de un rango óptimo, ya que sino se obtiene el efecto contrario. La temperatura y la luz están relacionadas; la temperatura óptima para la fotosíntesis aumenta cuando aumenta la intensidad de luz. La temperatura también influye en la disponibilidad de nutrientes (Mar, 2012). Puede afectar las reacciones celulares,

la naturaleza del metabolismo, requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa. El cultivo de microalgas exhibe tres valores claves de temperatura dependiendo de la microalga: una temperatura mínima (16°C) por debajo de la cual no hay crecimiento; una temperatura óptima (16-27°C) en la que se produce un crecimiento rápido; y una temperatura máxima (35°C) por encima de la cual no es posible crecimiento (Madigan *et al.*, 2004).

1.4.4.3 pH

Determina la solubilidad del CO₂ y de los minerales, además de la distribución relativa de las formas orgánicas del carbono, e influye en el metabolismo de las microalgas. (Abalde *et al.*, 1995). El rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7. Un pH óptimo en el cultivo es generalmente mantenido gracias a la aeración con aire enriquecido con CO₂. Por lo general soluciones amortiguadoras son añadidas a los medios de cultivo para ajustar y mantener el pH. El pH incrementa conforme la edad del cultivo es mayor, esto es debido a la acumulación de minerales y a la oxidación de nutrientes (Benavente *et al.*, 2012).

1.4.4.4 Salinidad

Es un factor abiótico importante porque afecta el crecimiento y densidad celular de las microalgas en cultivo como en el ambiente marino, además determina su distribución e influye en la densidad, temperatura y gases

disueltos del agua marina, lo cual ocasiona una respuesta de las microalgas a cambios en la salinidad regulado por cambios rápidos en el volumen celular y ajuste osmótico. La variación en la salinidad provoca que la célula libere iones, sintetice compuestos orgánicos, disminuya la fijación de CO₂ y afecte el metabolismo del nitrógeno (Kirst, 1989).

El crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica está afectado por la concentración de sales inorgánicas disueltas. La tolerancia a la sal varía según las especies, en general las microalgas marinas pueden tolerar un amplio rango de salinidades (Fábregas *et al.*, 1985).

1.4.4.5 Agitación

Es el requisito más importante para la obtención de altos rendimientos de biomasa microalgal (Richmond & Becker, 1986). Algunos de los efectos que produce la agitación son: (Richmond, 1986) (Laing & Ayala, 1990) (Becker, 1994).

- Asegura la distribución homogénea de células y nutrientes dentro del cultivo, ocasionando una mayor disponibilidad de los nutrientes para las células.
- Mejora la distribución de la luz asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas, ya que la agitación evita el efecto de ensombrecimiento.

- Evita que las células se sedimenten en el fondo del recipiente de cultivo, estimulando el metabolismo celular.
- Previene una estratificación termal.

1.4.4.6 Nutrientes

Para obtener un crecimiento óptimo se suministra nutrientes en cantidades adecuadas al cultivo. Los requerimientos nutritivos varían dependiendo la especie y de las condiciones ambientales (Abalde *et al.*, 1995). Hay algunos elementos principales necesarios para la formación de compuestos orgánicos dentro de las algas, estos son carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P), potasio (K), sodio (Na), calcio (Ca), magnesio (Mg) y cloro (Cl) (Geider & MacIntyre, 2002). El nitrógeno y el fósforo son los dos elementos que normalmente podrían agotarse durante el crecimiento y pueden limitar la producción de biomasa. Los elementos traza necesarios para el crecimiento son hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), cobalto (Co) y molibdeno (Mo) (Bark, 2012). A continuación se detallan algunos nutrientes (Ruiz A. , 2011):

- **Carbono:**

Es el macronutriente más importante ya que constituye el 50% de la biomasa microalgal. La fuente principal de carbono es el CO₂ presente en la atmósfera (cultivo fotoautotrófico), así como los iones bicarbonato (HCO₃⁻) con la ayuda de la enzima anhidrasa carbónica (Ruiz, 2011). Algunas microalgas

pueden utilizar solutos orgánicos (glucosa, acetato) como fuente de carbono (cultivos heterotróficos y mixotróficos) (Abalde *et al.*, 1995). Las microalgas pueden vivir bajo altas concentraciones de dióxido de carbono, los gases de invernadero, el dióxido de nitrógeno y contaminantes en la atmósfera siendo nutrimentos suficientes para las microalgas (Van Beilen, 2010).

- **Nitrógeno:**

En la biomasa puede haber desde 1% hasta más del 10% de nitrógeno dependiendo de la disponibilidad y tipo de fuente de nitrógeno que puede ser orgánica como: las amidas, urea, glutamina y asparagina; o inorgánica como: amonio, nitrato, nitrito, nitrógeno gas y óxidos de nitrógeno (NO_x) (Ruiz, 2011).

Existe una preferencia del amonio sobre el nitrato en las microalgas debido a que la incorporación de nitrato necesita un gasto de energía ya que debe ser reducido a amonio por la célula, mientras que el amonio entra a formar parte directamente de las moléculas orgánicas incorporándose en aminoácidos (Bertl *et al.*, 1984).

- **Fósforo:**

Interviene en la mayoría de los procesos celulares de transferencia de energía y de síntesis de ácidos nucleicos. Como fuente de fósforo se usa fosfato inorgánico. Una baja concentración disminuye la síntesis de ácidos nucleicos, ATP y clorofila (Boney, 1989).

La relación N:P en el medio de cultivo influye en la toma de nutrientes por parte de las microalgas, de modo que habrá mayor crecimiento cuanto más próxima esté a la composición de los microorganismos (Ruiz, 2011).

Las microalgas requieren para su crecimiento otros macronutrientes como azufre, calcio, magnesio y potasio, así como de micronutrientes como molibdeno y hierro (Ruiz, 2011). El azufre puede ser proporcionado por sulfato inorgánico y es crucial para la formación de aminoácidos esenciales como metionina y cisteína. El calcio es necesario para la preservación de las membranas citoplasmáticas. El magnesio es el átomo central de la molécula de la clorofila cosecha luz necesaria para todas las especies de algas fotosintéticas; la deficiencia conduce a la división celular alterada. El potasio es crucial para todas las algas y la falta de este elemento produce fotosíntesis y crecimiento lento. El potasio tiene varias funciones tales como co-factor para un número de enzimas, participa en la síntesis de proteínas y también tiene una función en la regulación osmótica. El hierro es involucrado en el metabolismo y es necesaria para la asimilación de nitrógeno y afecta a la síntesis de clorofila y ficocianina. Los elementos traza están en el rango de micro o nanogramos y afectan a la síntesis de proteínas y el crecimiento (Bark, 2012).

1.4.4.7 Fertilizante comercial Nitrofoska

Es un fertilizante foliar que incluye macro y micronutrientes de elevada eficiencia de asimilación y acción. Contiene una mezcla de nitrógeno, fósforo,

potasio, cobre, boro, magnesio, hierro, manganeso, molibdeno y zinc altamente concentrados. Los microelementos contenidos en su formulación se encuentran bajo la forma quelatizada, con lo cual se favorece su asimilación y transporte. Su reacción en el medio es ácida (Compo Expert).

Entre los trabajos realizados con cultivos de varias especies de microalgas y el fertilizante comercial Nitrofoska se pueden citar: Brito (2000) utilizó para el crecimiento de *Nitzschia cf. closterium*; Ponne (2001) para el cultivo de *Tetraselmis chuii*; Andrade (2009) en *Scenedesmus sp.*; Portilla (2010) en el crecimiento de *Chlorella sp.*; Brito (2013) en cultivo mixto de las microalgas *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*; entre otros.

1.4.4 Sistemas de cultivo

Se suelen clasificar según su configuración y tipo de funcionamiento en:

1.4.4.1 Cultivos abiertos:

Es el sistema más común utilizado para la producción comercial de microalgas (Pulz & Scheinbenbogan, 1998). Consiste en realizar cultivos en aguas superficiales naturales como estanques, lagunas y lagos, y estaques artificiales o canales de unos 20 a 50 centímetros de profundidad, lo cual permite una difusión con la atmósfera para obtener el CO₂ necesario para el crecimiento (Ruiz, 2011).

La producción mediante el sistema abierto es barata en comparación con el sistema cerrado, pero existe contaminación biológica que dificulta mantener una sola especie de microalga, para lo cual se deben controlar las condiciones ambientales tomando valores altos siempre y cuando sean algas extremófilas (Ruiz, 2011).

1.4.4.2 Cultivos cerrados:

Se basa en el cultivo de microalgas en reactores transparentes de vidrio o plástico, con diversas geometrías como tubulares, planas o cilíndricas. La ventaja principal de este sistema es la facilidad de mantener un monocultivo lo que proporciona un producto de pureza para su procesamiento en la industria. La productividad que se obtiene es mucho mayor que en sistemas abiertos pero también el costo de inversión, operación y mantenimiento (Ruiz, 2011).

1.4.5 Tipos de cultivo de microalgas

Para González (2000) el desarrollo de un método de cultivo de microalgas puede clasificarse:

Según su naturaleza en:

1.4.5.1 Cultivos intensivos

Los factores de crecimiento se mantienen bajo control, obteniéndose una alta producción de la población.

1.4.5.2 Cultivos extensivos

Solo se controlan las variables de manejo técnico como la luz, la densidad del cultivo y las características químicas del medio.

Según la forma de cosecharlo se clasifican en:

1.4.5.3 Cultivo continuo

Se mantiene en fase exponencial durante un periodo de tiempo largo. Además se mantienen constantes la temperatura, luz y las características químicas del medio, para lo cual se añaden continuamente nutrientes en la misma medida en que son retirados. Una de las ventajas es que las muestras tomadas a distintos tiempos son idénticas.

1.4.5.4 Cultivo semicontinuo

Al final de la fase exponencial se recoge parte del volumen para su utilización y se reemplaza con la misma cantidad de medio fresco.

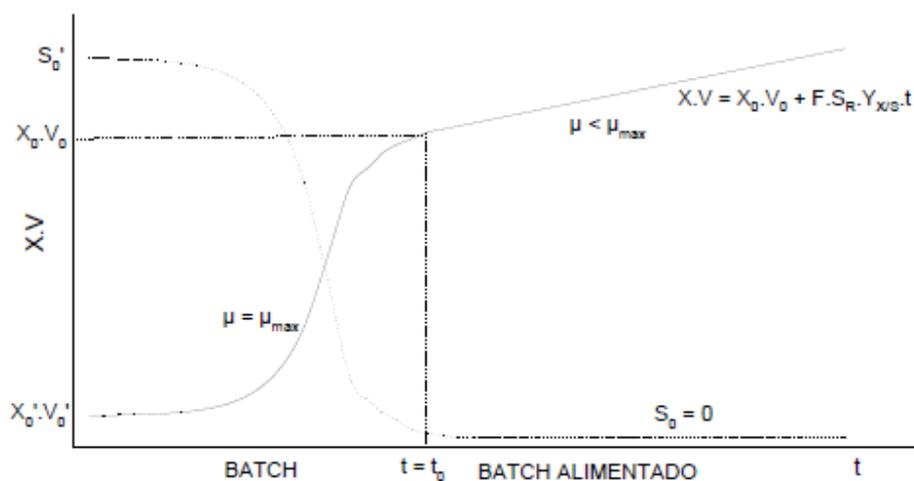
1.4.5.5 Cultivo discontinuo (Batch)

La población pasa por las diferentes fases de crecimiento ajustándose a una función logística (Schanz & Zahler, 1981). Es de fácil manejo y adecuado para el estudio de parámetros que inciden en el crecimiento celular. Las cargas de nutrientes y luz son proporcionadas al inicio del cultivo, por lo que el volumen permanece constante y solo las condiciones ambientales del medio son

controladas (pH, temperatura, etc.). El proceso termina cuando todo el sustrato es consumido por la biomasa.

1.4.5.6 Cultivo discontinuo alimentado o fed batch

Es un cultivo discontinuo al cual se le añade secuencialmente medio fresco o alguno de sus componentes sin la eliminación de cultivo crecido. Por lo que el volumen aumenta con el tiempo. Permite controlar la velocidad de crecimiento del microorganismo cuando el nutriente que se alimenta es el limitante del crecimiento (Tovar, 2012). De tal manera que se induce una extensión de la fase exponencial y en consecuencia se produce un aumento en la densidad celular del microorganismo en fase estacionaria en relación con el cultivo discontinuo convencional. Es útil en procesos en los que el crecimiento celular y/o formación de producto son sensibles a la concentración del sustrato limitante, es decir cuando el rendimiento celular o productividad de biomasa se ven afectados. Es así como este método se usa cuando se quiere evitar inhibición por sustrato y se requiere una alta concentración de biomasa (Crueger & Crueger, 1993).



Donde $F(t)$: caudal de alimentación
 $S_r(t)$: concentración de sustrato de la alimentación
 V_f : volumen final de trabajo
 V_0 : volumen al inicio de la alimentación
 X_0 : concentración de biomasa al inicio de la alimentación
 S_0 : concentración de sustrato limitante al inicio de la alimentación

Figura 1.5: Representación esquemática de un cultivo alimentado o “feed-batch” vs un discontinuo o “Batch”. (Prácticas de Bioprocesos, 2007. Universidad Nacional de Quilmes).

El cultivo alimentado (feed-batch) se inicia a partir de un cultivo discontinuo (batch), por lo que el volumen al inicio de la alimentación (V_0), la concentración de biomasa al inicio de la alimentación (X_0) y concentración de sustrato limitante al inicio de la alimentación (S_0) son las condiciones finales de dicho batch (Jonte, 2008).

Según la pureza del cultivo pueden ser:

1.4.5.7 Cultivo axénico

Se mantiene libre de bacterias, requiere un trabajo cuidadoso.

1.4.5.8 Cultivo mono específico

Contiene un solo tipo de microalga. Se inicia a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos tengan la misma composición genética. Pero además se encuentra con una pequeña carga bacteriana pues la bacteria excreta sustancias que pueden ser utilizadas por las microalgas creando una interacción beneficiosa. Sin embargo una elevada carga bacteriana puede inhibir el crecimiento algal.

1.4.6 Medios de cultivo de acuerdo a las fuentes de carbono

La nutrición de las microalgas es por absorción iónica de C, H, O, N, S, K, Mg, Fe, P, Ca y por cantidades traza de Zn, Mn, B, Co, Cu y Mo (López & Catzim, 2000). El principal macronutriente para el crecimiento y productividad de las microalgas es el carbono, por lo cual es necesario evaluar las diferentes fuentes de carbono orgánico e inorgánico en cultivos de microalgas (Bermúdez *et al.*, 2003). Algunas cepas de *Chlorella*, *Haematococcus* pueden adoptar un metabolismo autotrófico, heterotrófico o mixotrófico (cuadro 1.4) (Magazine, 2010).

Cuadro 1.4: Características de las diferentes condiciones de cultivo de las microalgas.

Condiciones de cultivo	Fuente de energía	Fuente de carbono
Fotoautótrofo	Luz	Inorgánico
Fotoheterótrofo	Luz	Orgánico
Heterótrofo	Carbono orgánico	Orgánico
Mixotótrofo	Luz y carbono orgánico	Orgánico e inorgánico

1.4.6.1 Medio inorgánico (fotoautótrofo)

El medio inorgánico se utiliza para demostrar capacidad fotoautotrófica de crecimiento. Los organismos fotoautótrofos utilizan la luz como fuente de energía y el dióxido de carbono como fuente principal de carbono (Tortora *et al.*, 2007). Las microalgas obtienen la energía de la luz solar y el carbono de compuestos inorgánicos como las sales (Ruiz, 2011). La producción fotoautótrofa de biomasa microalgal es actualmente la técnica económicamente más viable a gran escala (Brenan & Owende, 2010).

1.4.6.2 Medio orgánico

La nutrición orgánica está relacionada con la utilización de CO₂ y energía luminosa, además de los compuestos orgánicos asimilados (Van Baalen & Pulich, 1973). Algunas microalgas son capaces de reemplazar las fuentes de carbono y energía, utilizadas en sistemas autotróficos, por compuestos orgánicos como alcoholes, azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, extracto de levadura y peptonas (Nielson *et al.*, 1973). El medio orgánico se utiliza para evaluar el crecimiento mixotrófico, cuando la microalga es expuesta a luz y al CO₂, en cambio, cuando el cultivo no es iluminado, se trata de la condición heterotrófica de crecimiento.

- **Cultivo heterotrófico**

La condición heterotrófica en microalgas es capaz de mantener un crecimiento estable y sostenido en presencia de algún sustrato orgánico en ausencia de iluminación (Van Baalen & Pulich, 1973). En las microalgas, el proceso de respiración en ausencia de luz es importante porque sirve como la única fuente de energía para el mantenimiento y biosíntesis en un entorno oscuro, y porque proporciona el carbono esencial para el metabolismo en cualquier condición de crecimiento (Rojas *et al.*, 2011). La producción heterótrofa tiene la ventaja de no utilizar luz y por ende no se produce foto-inhibición (Myers & Burr, 1940). Usan compuestos orgánicos como fuente de carbono tales como azúcares y ácidos carboxílicos (Liang *et al.*, 2009), también pueden utilizar etanol, glicerol y fructosa dependiendo de la especie utilizada (Yodochi *et al.*, 1998).

- **Cultivo mixotrófico**

Se manifiesta cuando la microalga utiliza simultáneamente para su crecimiento luz y sustratos orgánicos como fuente de energía, y como fuente de carbono CO₂ y sustratos orgánicos (Van Baalen & Pulich, 1973), con buenas condiciones de esterilidad, buen coeficiente de suministro de luz y buenas características de transferencia de masa con la óptima concentración de la fuente de carbono, pues una mayor concentración resulta inhibitoria para las células (Liang *et al.*, 2009). La fuente de carbono puede ser almidón hidrolizado

de yuca, hidrolizado de fécula de maíz, acetato, glicerol, etanol, ácidos orgánicos, azúcares, subproductos de procesos industriales como alpechín y glucosa (Sánchez *et al.*, 2001).

La asimilación oxidativa de los compuestos orgánicos y de CO₂ a través de las reacciones fotosintéticas ocurre simultáneamente, resultando una estimulación del crecimiento comparada con otras condiciones de cultivos. Es decir, la microalga es capaz de mantener su crecimiento utilizando un componente autotrófico, a partir de dióxido de carbono y luz, y un componente heterotrófico a partir de un compuesto orgánico (Lee & Erickson, 1987). Los cultivos mixotróficos tienen una mayor productividad en cuanto al crecimiento microalgal comparada a las obtenidas en autotrofia y heterotrofia, y ello se debe posiblemente al efecto energético de la luz y del sustrato orgánico (Morris *et al.*, 1999).

En la figura 1.6 se muestra los flujos estimados de cultivos autótrofos, heterótrofos y mixotróficos. Estos valores representan las distribuciones de flujo de la fase de crecimiento exponencial en los cultivos autótrofos (11h), mixotróficos (35h) y el primer período de oscuridad durante el cultivo cíclico autótrofos/heterótrofos (48h). Las tasas de crecimiento específicas son casi las mismas para los tres sistemas (aproximadamente 0.066 h⁻¹). Los valores de flujo se expresan en mmol metabolitos producidos por gramo de células por unidad de tiempo (mmol/g/h). Los cultivos autótrofos mostraron actividades

comparables de vía glicolítica y ciclo de Krebs con los cultivos heterótrofos (Yang *et al.*, 2000).

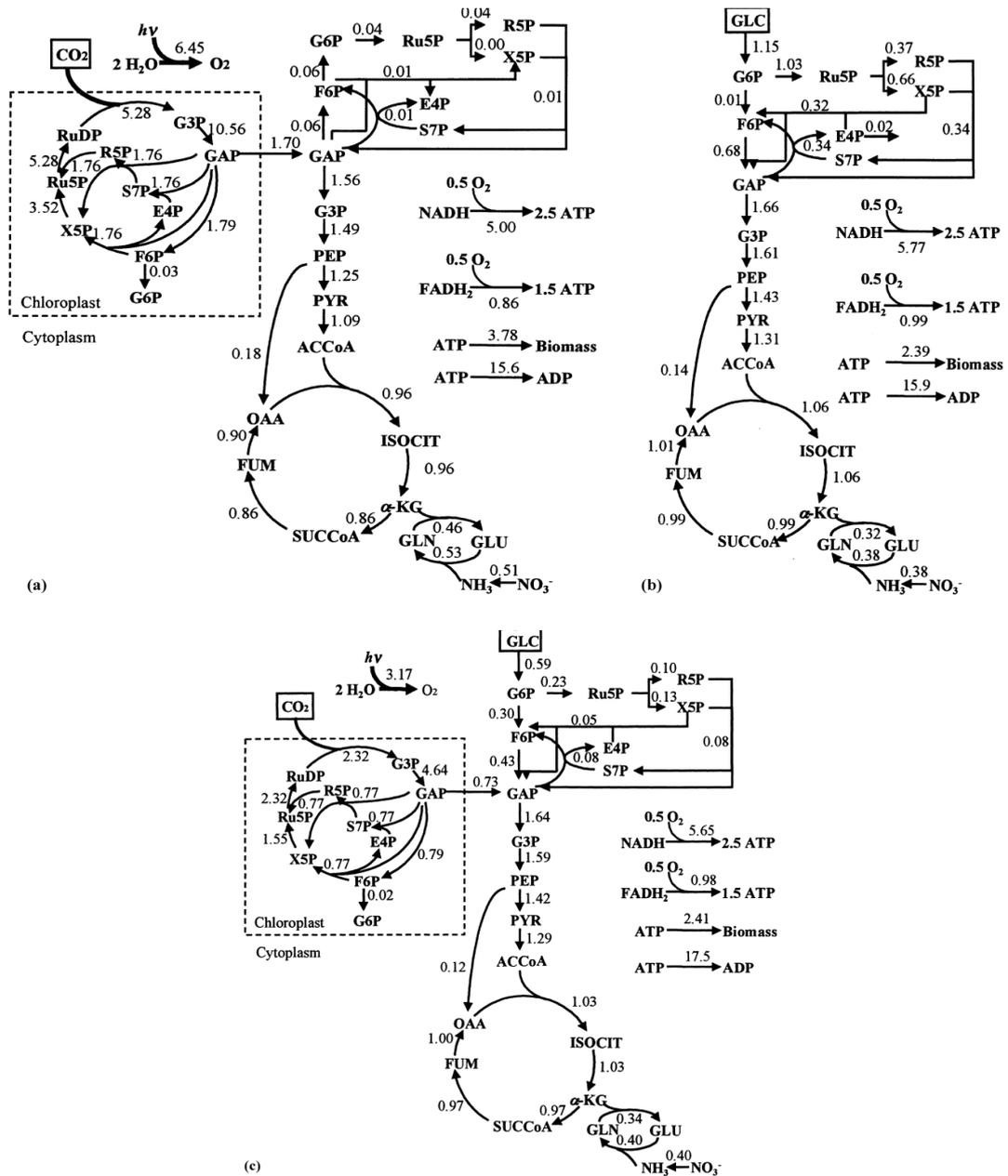


Figura 1.6: Distribución de flujo metabólico de las células de *Chlorella* en cultivos (a) autotrófico, (b) heterótrofo y (c) mixotrófico (Yang *et al.*, 2000).

1.4.7 Sustratos orgánicos

Independientemente del sustrato orgánico suministrado a las microalgas, las tasas de crecimiento se ven reforzadas por los niveles de aireación (Rojas *et al.*, 2011). Algunos de los sustratos orgánicos son:

1.4.7.1 Glucosa

Es la fuente de carbono más comúnmente usada para cultivos heterotróficos de microalgas, como es el caso de varias especies microbianas. Estudios muestran que se obtienen mayores índices de crecimiento con la glucosa que con cualquier otro sustrato (azúcares, alcoholes de azúcar, fosfatos de azúcar, ácidos orgánicos y alcoholes monovalentes) debido a que la glucosa posee más energía contenido por mol en comparación con otros sustratos (Rojas *et al.*, 2011).

1.4.7.2 Almidón

Es un homopolisacárido de glucosa, utilizado como reserva alimenticia predominante en las plantas, y proporciona el 70-80% de calorías consumidas por los humanos. Está formado por dos componentes: 70% de amilopectina ramificada y 30% de amilosa lineal. Para poder utilizarlo se necesita una exoenzima llamada amilasa que hidroliza enlaces glucosídicos alfa 1-4, liberando maltosa e isomaltosa (Rodríguez *et al.*, 2005). El almidón se encuentra en semillas, raíces y tubérculos, también en tallos, hojas frutos e

incluso polen (Días, 1997). Ha sido utilizado como fuente de carbono en cultivos de *Chlorella sorokiniana* en condiciones mixotróficas y heterotróficas (Moronta, 2001). Su concentración varía con el estado de madurez (Badui, 1999). Algunas fuentes de almidón son:

- **Papa (*Solanum tuberosum*):** La papa es una planta dicotiledónea, herbácea y de carácter anual, que también puede ser considerada como perenne debido a su capacidad de reproducirse vegetativamente por medio de tubérculos. Las plantas presentan una parte aérea en la que se produce el crecimiento de tallos, hojas, flores y frutos, y una parte subterránea que comprende el tubérculo semilla, los rizomas, los tubérculos y las raíces (Contreras, 1997). Constituye un producto básico en la alimentación, debido a su alto contenido de hidratos de carbono, vitaminas y minerales. Su aporte energético es dos a cuatro veces superior al del maíz, y seis a diez veces superior al de los restantes cereales (Faiguenbaum, 1987). Se ha utilizado la fracción soluble de papa como medio de cultivo en cultivos mixotróficos de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* (Morales, 1996).
- **Yuca (*Mannihot sculenta*):** Es el cuarto producto básico más importante después del arroz, trigo y maíz. Entre sus características se destacan su gran potencial para la producción de almidón, su tolerancia a la sequía y a los suelos degradados y su gran flexibilidad en la plantación y la cosecha. Sus raíces son fuente de hidratos de carbono y sus hojas fuentes de proteínas, minerales y vitaminas (Aristizábal *et al.*, 2007).

- **Arroz (*Oryza sativa*):** Es un cereal que ofrece diversas variedades, se caracteriza por disponer gránulos de almidón con una digestibilidad en el tracto intestinal bastante lenta, por lo que da lugar a una respuesta glucémica reducida después de su ingestión. El pequeño tamaño de sus gránulos convierte al almidón de arroz en un ingrediente muy útil como alternativa al empleo de grasas en alimentos hipocalóricos (Bello, 2000). Las proteínas del arroz constituyen entre un 6-10% del peso total del grano y forman una red que rodea el gránulo del almidón (Cheftel & Cheftel, 1978).
- **Maíz (*Zea mays*):** Es uno de los granos alimenticios más antiguos, pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas) y tiene una gran variabilidad en el color del grano, la textura, la composición y la apariencia (Paliwal, 2001). La composición química y el contenido de humedad de los granos, expresados en forma porcentual aproximada es: 12-14% de humedad, 10-12% de proteínas, 70-75% de carbohidratos, 4-8% de grasa y 2-2.5% de fibra (Fauguenbaum, 1987). El endospermo del grano de maíz es la zona más importante de almacenamiento de carbohidratos y de las proteínas sintetizadas fotosintéticamente eficiente (Paliwal, 2001). Se han realizado estudios utilizando maíz como medio de cultivo con la microalga *Phaeodactylum tricornutum* (Fábregas *et al.*, 1996) (Fábregas *et al.*, 1997).
- **Achira (*Canna Indica*):** Se extrae a partir de los tubérculos de las plantaciones de achira. Produce los gránulos de almidón mas grandes (30-100micras de diámetro) de todas las especies vegetales conocidas (Maíz, trigo, yuca y papa entre 10-30 micras de diámetro) por lo que es digerido

fácilmente por el organismo y posee un alto grado de proteína. El almidón de achira tiene mejores propiedades fisicoquímicas y resiste más a los procesos estresantes (procesos industriales) que los almidones provenientes de fuentes cereales (maíz y trigo). Por no utilizarse insecticidas para el manejo de plagas en el cultivo, se considera un producto orgánico (Rodríguez *et al.*, 2013).

1.4.7.3 Acetato

Es otra fuente de carbono común para muchos microorganismos incluyendo las microalgas. Cuando el nivel de acetato es bajo, algunas microalgas lo pueden utilizar como su única fuente de carbono. Esto es especialmente importante porque el acetato es un sustrato fácilmente disponible y procede de muchas aplicaciones industriales y su uso no impide severas restricciones al cultivo de microalgas (Rojas *et al.*, 2011).

1.4.7.4 Glicerol o glicerina

Es una fuente de carbono orgánica no fermentable que se origina como subproducto del proceso de producción de biodiesel. Está compuesto por ácidos grasos libres, metil esterres de ácidos grasos y algunas trazas de sales (Posada *et al.*, 2011). El glicerol es responsable de desencadenar el crecimiento en microalgas a través de la síntesis de poliaminas (ruta ornitina), ruta activa fundamentalmente en procesos de división celular (Marián, 2002).

1.4.7.5 Desechos animales

En su forma líquida tienen una larga historia de uso como fuente de fósforo, nitrógeno y carbono para el crecimiento microalgal, siendo de particular interés los desechos de la avicultura y porcicultura por sus grandes volúmenes y constante producción (Knud-Hanses, 1998).

- **Gallinaza:** Es un abono orgánico de excelente calidad. Está compuesto por eyecciones de las aves de corral y del material usado como cama, que por lo general es la cascarilla de arroz mezclada con cal en pequeña proporción. En un preciado fertilizante orgánico, relativamente concentrado y de rápida acción. Se diferencia de todos los demás estiércoles en que su contenido de nutrientes es más alto pero su composición es variable dependiendo de varios factores como: almacenamiento, número de camas, etc. Además presenta un alto contenido de calcio que alcanza valores de 6% en promedio (Hernández & Cruz, 1993).
- **Bioabono líquido:** Corresponde a excretas de animales (vaca, borrego) ya sea en forma directa o fermentados que contienen cantidades importantes de macro y micronutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, cobre, zinc y magnesio (Taiganides, 1978). El bioabono líquido posee una mayor cantidad de nitrógeno que la materia prima original en base seca, con un 85% de materia orgánica, 2.6% de nitrógeno, 1.5% de fósforo y 1% de potasio; de tal manera que representa una alternativa importante para reducir los costos de producción sin alterar la forma y calidad de las células en cultivo ya que se

obtienen producciones tan altas como aquellas alcanzadas con el uso de fertilizantes químicos (Mandujano *et al.*, 1981).

- **Ensilado biológico de pescado:** Se obtiene de residuos de pescado resultantes del fileteado, así como aquellos peces impropios para el consumo. En su elaboración se usa un fermento biológico en base a vegetales ricos en bacterias lácticas que fermentan los azúcares y producen ácido láctico. Como consecuencia hay preservación del residuo evitándose el deterioro y produciéndose la hidrólisis parcial de las proteínas. Tiene un elevado valor nutricional y puede ser utilizado para disminuir los costos de producción (Padilla, 1996).

1.4.7.6 Aguas residuales

La razón por la cual es factible que se utilicen aguas de desecho como materia orgánica para elaborar medios de cultivo es su contenido de nitrógeno, fósforo y carbono orgánico.

- **Alpechín:** Es el residuo acuoso proveniente de los procesos de transformación de la oliva en aceite. Los países mediterráneos producen un gran volumen de estas aguas residuales industriales que se caracterizan por ser muy contaminantes debido a su alto contenido de materia orgánica. Esta agua residual industrial contiene como media 4% de sólidos totales, 1% de azúcares totales y 0.5% de sales minerales, los cuales pueden ser utilizados como nutrientes para la producción de biomasa algal con una composición

bioquímica equilibrada en proteínas, carbohidratos y una fracción lipídica rica en ácidos grasos poliinsaturados (Hodaifa *et al.*, 2004).

1.4.8 Producción de exoenzimas

La producción de enzimas extracelulares, tales como: amilasa, proteasa, lipasa, celulasa y fosfatasa constituye una propiedad bien conocida en microalgas y cianobacterias, por ser utilizadas con carácter taxonómico para identificación a nivel de especies (Rodríguez, 2010).

1.4.8.1 Amilasas

Las cadenas de almidón están compuestas por dos sub-cadenas: amilosa y amilopectina. La α -amilasa es una endoenzima que actúa sobre los enlaces α (1-4) glucosídicos degradando la amilosa en maltosa y pequeños compuestos de glucosa; sin embargo degrada parcialmente la amilopectina y el glucógeno debido a que no es capaz de desdoblar los enlaces glicosídicos 1-6 ubicados en los puntos de ramificación de la cadena del polisacárido. La β -amilasa es una exoenzima presente en plantas y bacterias. También degrada los enlaces α (1-4) glucosídicos liberando maltosa pero comienza por el extremo libre no reductor del almidón. La hidrólisis se detiene en los puntos de ramificación de la amilopectina y el residuo se conoce como dextrina límite. La pululanasa o isoamilasa, también perteneciente a la esta familia, hidroliza los enlaces 1,6-alfa-glicosídicos quitando las ramas de la amilopectina o las dextrinas. Si existe

un acompañamiento general del complejo de las amilasas se puede lograr efectiva una degradación total del almidón (Carrillo, 2003).

1.4.8.2 Aplicación de las enzimas

Las enzimas tienen un alto grado de especificidad y adaptabilidad, además vuelven los procesos eficientes y menos costosos ya que logran más material procesado con el mismo equipo y menos consumo de energía. Al utilizar enzimas en la industria alimentaria nos ofrece la ventaja de:

- Reducir viscosidad (hidrólisis).
- Mejorar extracciones (degradación de pectina).
- Hacer bioconversiones (glucosa a fructosa).
- Causar separaciones (separación del suero en queso).
- Sustitución de ingredientes y coadyuvantes en procesos.
- Ahorro con procesos más eficientes obteniendo menos subproductos indeseados y mayor capacidad de planta con un incremento de rendimiento de producto.
- Ganancia: mejora propiedades deseables obteniendo un producto único (jarabe de alta concentración de fructosa) (Mundo Alimentario, 2005).

Las enzimas amilasas debido a su actividad hidrolítica han tenido gran importancia en las últimas décadas en diversas industrias (panadera, repostería, alimenticia, textilera, cervecera, papel, azucarera, etc.) que han visto la forma

de optimizar procesos aplicando técnicas biotecnológicas basadas en enzimas (Asgher *et al.*, 2006).

1.5 Sistema de hipótesis

La microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*), al ser cultivada en condiciones mixotróficas con diferentes sustratos amiláceos, incrementa la producción de biomasa enriqueciéndola con pigmentos, proteínas, carbohidratos y produce actividad de amilasas extracelulares.

CAPITULO 2:

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El presente proyecto “Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) con sustratos amiláceos” fue financiado por el Proyecto PROMETEO-SENESCYT, a nombre del Dr. Ever Morales. Se utilizaron materiales e insumos del Laboratorio de Biotecnología Algal, Ambiental y Producción de Biomasa del Instituto de Ciencias Básicas (ICB) Unidad de Biología de la Universidad Central del Ecuador y del Centro de Soluciones Analíticas Integrales (CESAL), cuyo Director Técnico es el Doctor Patricio Silva, quien junto a la Bioq. Raquel Rosas aportaron en la realización de los análisis bromatológicos realizados para el presente trabajo de investigación.

Como director de tesis formó parte el Dr. Ever Darío Morales Avendaño, de igual manera se contó con el aporte del Ing.-Mat. Pedro Romero Saker, en calidad de co-director de tesis.

2.2 Zona de estudio

Los ensayos que implican el proyecto de investigación se realizaron en el laboratorio de Biotecnología Ambiental, Algal y Producción de Biomasa del

Instituto de Ciencias Básicas (ICB) de la Unidad de Biología de la Universidad Central del Ecuador. Latitud: 99°785'61,3606" (m), Longitud: 50°02'78,1484" (m). Altura elipsoidal: 2811.647 (m), y en el Centro de Soluciones Analíticas Integrales (CESAL) ubicado en la Avenida América N31-232 y Mariana de Jesús.

2.3 Período de tiempo de investigación

La investigación comenzó en febrero y finalizó en noviembre de 2013.

2.4 Diseño

Para la evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga con diferentes sustratos amiláceos se realizaron los ensayos experimentales descritos a continuación:

2.4.1 Fase 1: Determinación de la concentración de Nitrofoska foliar

El tipo de diseño que se empleó es un diseño completamente al azar (DCA) con un solo factor (medio de cultivo) y un nivel (concentración). Se utilizó el medio de cultivo Nitrofoska foliar a diferentes concentraciones (0.5ml/L, 1ml/L, 3ml/L) como se muestra a continuación (tabla 2.1):

Tabla 2. 1: Representación de los tratamientos a utilizar en la fase 1.

Medio de Cultivo	Concentración del medio de cultivo								
	0.5 ml.L ⁻¹			1 ml.L ⁻¹			3 ml.L ⁻¹		
Nitrofoska foliar	T1R1	T1R2	T1R3	T2R1	T2R2	T2R3	T3R1	T3R2	T3R3

Para este ensayo se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento con dos observaciones por cada repetición. Se trabajó con un total de nueve (9) unidades experimentales que consistieron en frascos de vidrio de 500 ml de capacidad, a los cuales se les adicionaron 250 ml de medio de cultivo Nitrofoska a diferentes concentraciones. Estas unidades de cultivo fueron ubicadas al azar y mantenidas a un flujo fotónico de $115 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura (21 ± 2 °C), fotoperiodo 12:12 y agitación mediante aireación continua, provista por un compresor para pecera de dos salidas (tabla 2.2).

Tabla 2. 2: Aleatorización de los tratamientos en la fase 1.

Aleatorización de las unidades experimentales								
8	5	3	4	2	7	1	9	6

Variable de respuesta:

- **Densidad celular:** Se define como el número de células presentes en cada mililitro de medio de cultivo. Se determinó empleando cámara Neubauer hasta alcanzar la fase estacionaria.

2.4.2 Fase 2: Crecimiento de la microalga con extractos solubles obtenidos a partir de arroz, yuca y papa en cultivos discontinuos alimentados.

Para este experimento se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con un solo factor (medio de cultivo) y un nivel (fuentes de almidón). Se utilizó el medio de cultivo Nitrofoska foliar 3ml/L con 3 diferentes fuentes de almidón al 1% (papa, yuca, arroz) como se muestra a continuación (tabla 2.3):

Tabla 2.3: Representación de los tratamientos a utilizar en la fase 2.

Medio de Cultivo	Fuentes de almidón											
	Control			Papa			Yuca			Arroz		
Nitrofoska foliar 3ml.L ⁻¹ + almidón 1%	T1	T1	T1	T2	T2	T2	T3	T3	T3	T4	T4	T4
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3

Para este ensayo se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento con dos observaciones por cada repetición. Se trabajó con un total de doce (12) unidades experimentales que consistieron en botellas de plástico de 1000 ml de capacidad, las cuales contaron con 250 ml de medio de cultivo Nitrofoska 3ml/L y las diferentes fuentes de almidón, que fueron ubicadas al azar y mantenidas a las mismas condiciones de luz ($115 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), temperatura ($21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), fotoperiodo 12:12h y agitación continua (tabla 2.4).

Tabla 2.4: Aleatorización de los tratamientos en la fase 2.

Aleatorización de las unidades experimentales											
3	13	6	9	14	1	5	15	2	7	4	8

Variables de respuesta:

- **Densidad celular:** Se define como el número de células presentes en cada mililitro de medio de cultivo. Se determinó empleando cámara Neubauer hasta alcanzar la fase estacionaria.

2.4.3 Fase 3: Crecimiento de la microalga con diferentes almidones comerciales y extractos de papa, yuca, maíz y arroz en cultivos discontinuos alimentados.

Para este experimento se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con un solo factor (medio de cultivo) y un nivel (fuentes de almidón). Se utilizó el medio de cultivo Nitrofoska foliar 3ml/L con 7 diferentes fuentes de almidón al 0.5% (almidón comercial de: yuca, achira, maíz y extractos solubles de papa, yuca, arroz, maíz) como se muestra a continuación (tabla 2.5):

Tabla 2.5: Representación de los tratamientos a utilizar en la fase 3.

Medio de cultivo	Fuentes de almidón																							
	Control			Yuca comercial			Achira comercial			Maíz comercial			Papa			Yuca			Arroz			Maíz		
NF 3ml/L + almd 0.5%	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	8	8	8
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3

Para este ensayo se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento con dos observaciones por cada repetición. Se trabajó con un total de veinticuatro

(24) unidades experimentales que consistieron en envases de plástico de 1000 ml de capacidad, los cuales contaron con 500 ml de medio de cultivo Nitrofoska 3ml/L y las diferentes fuentes de almidón, que fueron ubicadas al azar y mantenidas a las mismas condiciones de luz ($115 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), temperatura ($21\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), fotoperiodo 12:12 y agitación continua (tabla 2.6).

Tabla 2.6: Aleatorización de los tratamientos en la fase 3.

Aleatorización de las unidades experimentales																							
13	20	6	16	19	9	15	14	4	22	17	21	24	5	2	8	23	18	10	3	7	12	1	11

Variables de respuesta:

- **Densidad celular:** Se define como el número de células presentes en cada mililitro de medio de cultivo. Se determinó empleando cámara Neubauer hasta alcanzar la fase estacionaria.
- **Amilasas:** Pertenecen los valores medidos de los halos de producción de la enzima, reconocidos por el área no pigmentada por el lugol, como producto de la hidrólisis total del almidón, en cada pozo de la caja Petri.
- **Pigmentos fotosintéticos:** Corresponde a los valores de absorbancia resultantes de la medición en espectrofotómetro de 2 mL de cultivo fresco más 2 mL dimetilsulfóxido, las longitudes de onda empleadas fueron (tabla 2.7):

Tabla 2.7: Longitudes de onda empleadas para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos

PIGMENTO	LONGITUD DE ONDA (NM)
Clorofila <i>a</i>	665
Clorofila <i>b</i>	647

2.5 Procedimientos

2.5.1 Muestra

La cepa de la microalga fue aislada de una muestra de una planta ornamental cultivada en una recipiente de forma casera en Quito en la provincia de Pichincha. La muestra fue proporcionada por el Doctor Ever Morales y fue reaislada para demostrar la obtención de un cultivo monoespecífico de la microalga. Además esta microalga fue evaluada para confirmar su ubicación taxonómica a nivel de género y especie, debido a que actualmente se están realizando estudios sobre biología molecular para verificar dicha microalga, que está seleccionada previamente como *Chlorella emersonii*.

2.5.2 Escalamiento de la cepa para mantenimiento del inóculo

Se utilizó un matraz Erlenmeyer de 2000 ml de capacidad, al cual se le añadió 1000 ml de medio de cultivo Nitrofoska (3 ml/L), y como inóculo se empleó la muestra proporcionada anteriormente. El cultivo se mantuvo a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, a un flujo fotónico de $77 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo de 12:12h y agitados manualmente varias veces al día (figura 2.1).



Figura 2.1: Escalamiento del cultivo de *Graesiella emersonii* a 1500 ml en medio Nitrofoska foliar (3 ml/L) (Maldonado, 2013).

Luego se preparará una botella de plástico de 6000 ml con 1500 ml de medio de cultivo Nitrofoska 3 ml/L y como inóculo el cultivo anterior. El cultivo se mantuvo a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, a un flujo fotónico de $77 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de 12:12h y con agitación constante mediante aireación (figura 2.2).



Figura 2.2: Escalamiento del cultivo de *Graesiella emersonii* a 3000 ml en medio Nitrofoska foliar (3 ml/L) (Maldonado, 2013).

A partir del escalamiento de 3000 ml se distribuyeron 1000 ml de este cultivo a botellas de 6000 ml de capacidad con 2000 ml de medio de cultivo Nitrofoska (3 ml/L). Estos se mantuvieron en aireación continua, a una temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, a un flujo fotónico de $115\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo de 12:12h (figura 2.3).



Figura 2.3: Escalamiento del cultivo de *Graesiella emersonii* a 3000 ml en medio Nitrofoska foliar (3 ml/L) en tres réplicas (Maldonado, 2013).

2.5.3 Ensayo 1: Cinética de crecimiento a diferentes concentraciones de un fertilizante comercial (Nitrofoska)

Se utilizaron 9 frascos de vidrio de 500 ml de capacidad con 250 ml de agua destilada autoclavada y se añadió el fertilizante comercial Nitrofoska foliar $0.5\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$, $1\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ y $3\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$. Se trabajó con tres repeticiones por cada concentración (tabla 2.8) y se colocaron de forma aleatoria (figura 2.4).

Tabla 2.8: Tratamientos y repeticiones implementadas en el ensayo de crecimiento a diferentes concentraciones de Nitrofoska

Nitrofoska (ml.L ⁻¹)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
0,5	1	2	3
1	4	5	6
3	7	8	9

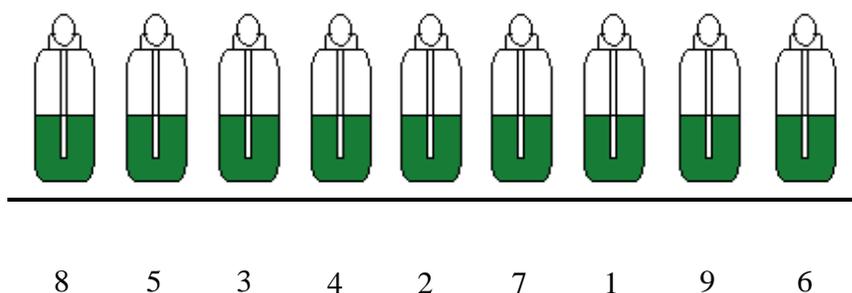


Figura 2.4: Esquema de aleatorización de los cultivos del ensayo de crecimiento a diferentes concentraciones del fertilizante Nitrofoska (Maldonado, 2013).

Los cultivos se iniciaron con un inóculo de 2×10^6 células/ml, a un flujo fotónico de $115 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $21 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, fotoperiodo 12:12h y agitación constante. Se determinó la cinética de crecimiento mediante densidad celular en la cámara de Neubauer realizando recuento cada 3 y 4 días (figura 2.5).



Figura 2.5: Cultivos de la microalga *Graesiella emersonii* para evaluación de la cinética de crecimiento y elección de concentración de Nitrofoska foliar. A) día 1 B) día 42 (Maldonado, 2013).

2.5.4 Elaboración de almidones comerciales y de extractos solubles a partir de arroz, yuca, papa y maíz

Para la preparación de las soluciones de almidones comerciales se pesaron 10 gramos de cada almidón comercial (yuca, maíz, achira) y se adicionaron 400 ml de agua. Luego cada muestra fue calentada a fuego lento hasta que la mezcla fue compacta y luego enfriada para ser colocadas en frascos de vidrio (figura 2.6).



Figura 2.6: Soluciones de almidones comerciales de yuca, maíz y achira (Maldonado, 2013).

Para la obtención de los extractos de los productos agrícolas: papa (*Solanum tuberosum*) y yuca (*Mannihot sculenta*) se procedió a descartar las cáscaras de ambas, luego cortadas y homogenizadas en una licuadora a una proporción de 50 gr/L con agua. Posteriormente fueron tamizadas y mantenidas en reposo, con la finalidad de extraerles el sobrenadante para ser autoclavado. Para el caso de los granos de arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*) solo fueron homogenizados directamente en una licuadora a una relación de 50 gr/L, luego tamizados y el sobrenadante obtenido fue autoclavado. Todos los sobrenadantes o fracciones solubles obtenidos a partir de la papa, yuca, arroz y maíz fueron utilizados para los cultivos mixotróficos de la microalga (figura 2.7).



Figura 2.7: Extractos solubles obtenidos de productos agrícolas (papa, yuca, maíz y arroz) (Maldonado, 2013).

2.5.5 Análisis bromatológicos de los extractos solubles y almidones comerciales.

Se realizó los siguientes análisis a los extractos solubles de papa, yuca, arroz, maíz, y a los almidones comerciales de yuca, maíz y achira, para luego establecer comparaciones en cuanto a su composición:

- **Humedad**

Se colocaron cápsulas en la estufa a 130°C por una hora, después se ubicaron en el desecador para que se enfríen. Luego se pesó la cápsula y se pesó 5 gr de muestra. Se colocó en la estufa a 130°C por media hora, se puso en el desecador y se pesó la cápsula con la muestra seca. Los datos se remplazaron en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(C + M) - (C + M \text{ sec } a)}{\text{gr}M} \times 100$$

- **Grasa**

Se pesó el dedal vacío y se pesó el dedal con la muestra que se utilizó en la humedad. Luego se colocó el dedal más la muestra en el equipo de Soxhlet con hexano como solvente. Se destiló por aproximadamente 1 hora y media y luego se colocó el dedal en la estufa hasta que se secó. Finalmente se pesó. Los datos se remplazaron en la siguiente fórmula:

$$\% \text{grasa} = \frac{(Dedal + M) - (Dedal + M \text{ sin grasa})}{grM} \times 100$$

- **Ceniza**

Se colocó los crisoles en la estufa a 135°C por 1 hora, se puso en el desecador para que se enfríen, luego se pesó el crisol vacío y con 1 gr de muestra. Se calentó en la cocineta a llama baja hasta que se quemó, después se puso en la mufla hasta que se formaron cenizas y finalmente se pesó. Los datos se remplazaron en la siguiente fórmula:

$$\% \text{cenizas} = \frac{(C + M_{\text{ceniza}}) - \text{Crisol}}{grM} \times 100$$

- **Proteína**

Se colocó 5 ml de la muestra en los tubos de destilación con 2 ml de ácido sulfúrico, media tableta de Kjeldahl y 3 ml de peróxido de hidrógeno con lo cual

se realizó la digestión. Luego se colocó en el equipo de destilación y se anotó el volumen de titulación. Los datos se remplazaron en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ proteínas} = \frac{\text{Vol}_{H_2SO_4} \times N_{H_2SO_4} \times 0,014 \times 6,35}{grM} \times 100$$

- **Fibra**

En un matraz se colocó 0.5 gr de muestra seca y sin grasa con 100 ml de ácido sulfúrico 1.2% y se hirvió por 30 minutos. Se filtró y se lavó con agua caliente. Luego se devolvió la muestra al matraz con 100ml de NaOH 1.2% y se hirvió por 30 minutos. Se filtró con papel filtro tarado y pesado. Luego se lavó con agua caliente y se recogió lo del papel filtro en una cápsula que se puso en la estufa. Finalmente se pesó. Los datos se remplazaron en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ fibra} = \frac{(P + M\text{fibra}) - P}{grM} \times 100$$

- **Carbohidratos**

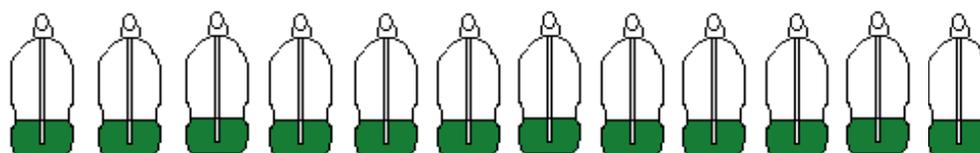
Del 100% se restó el porcentaje de humedad, grasa, ceniza, proteína y fibra obtenidos anteriormente.

2.5.6 Ensayo 2: Crecimiento de la microalga con extractos solubles obtenidos de arroz, yuca y papa en cultivos discontinuos alimentados (1%).

Se prepararon 12 frascos cada uno con 250 ml de medio de cultivo Nitrofoska (NF) a 3 ml/L y un inóculo de 2×10^6 células/ml, de los cuales 3 fueron controles (solo NF), 3 con 1% de almidón de arroz, 3 con 1% de almidón de yuca y 3 con 1% de almidón de papa (tabla 2.9). Los cultivos se colocaron de forma aleatoria (figura 2.8) a un flujo fotónico de $115 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ generado por una lámpara fluorescente dispuesta lateralmente a los cultivos, fotoperiodo 12:12h, $21 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, y agitación constante mediante aireación.

Tabla 2.9: Tratamientos y repeticiones implementadas en el ensayo de cultivos discontinuos alimentados con extractos solubles de papa, yuca y arroz.

Almidón (1%)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Control	1	2	3
Papa	4	5	6
Yuca	7	8	9
Arroz	10	11	12



3 13 6 9 14 1 5 15 2 7 4 8

Figura 2.8: Esquema de aleatorización de los cultivos discontinuos alimentados con extractos solubles de papa, yuca y arroz (Maldonado, 2013).

Cada 7 días se colocó 1% (v/v) de almidón a cada frasco. Mientras que la cinética de crecimiento se determinó cada 3 y 4 días mediante recuento celular en cámara de Neubauer (figura 2.9).



Figura 2.9: Cultivos mixotróficos de la microalga *Graesiella emersonii* en presencia de extractos solubles obtenidos de papa, yuca y arroz al 1%. A) día 1 B) día 37 (Maldonado, 2013).

2.5.7 Ensayo 3: Crecimiento de la microalga con diferentes almidones comerciales y extractos de papa, yuca, maíz y arroz en cultivos discontinuos alimentados (0.5%).

Se utilizaron 24 frascos de 1000 ml de capacidad con 250 ml de medio de cultivo Nitrofoska 3 ml/L, un inóculo de 2×10^6 células/ml y una concentración del 0.5% de 7 fuentes de almidón diferentes para cada frasco con tres repeticiones por cada fuente de almidón (tabla 2.10). Las fuentes de almidón fueron: extracto soluble de papa, yuca, arroz y maíz. Además de los almidones comerciales de yuca, maíz y achira. El control correspondió al cultivo con solo el fertilizante comercial Nitrofoska a 3 ml/L.

Tabla 2.10: Tratamientos y repeticiones implementadas en el ensayo de cultivos discontinuos alimentados con almidones comerciales y extractos de papa, yuca, maíz y arroz.

Almidón (1%)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Control	1	2	3
Papa	4	5	6
Yuca	7	8	9
Maíz	10	11	12
Arroz	13	14	15
Achira	16	17	18
Yuca comercial	19	20	21
Maíz comercial	22	23	24

Los cultivos se colocaron de forma aleatoria (figura 2.10) a un flujo fotónico de $115 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, fotoperiodo 12:12h, $21 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, y agitación constante. Cada 7 días se colocó 0.5% de almidón a cada cultivo (figura 2.11). En el día 30 se colocó otra lámpara en posición bilateral con respecto a la

primera, a fin de incrementar el flujo de fotones para inducir una mayor producción de biomasa (figura 2.12).

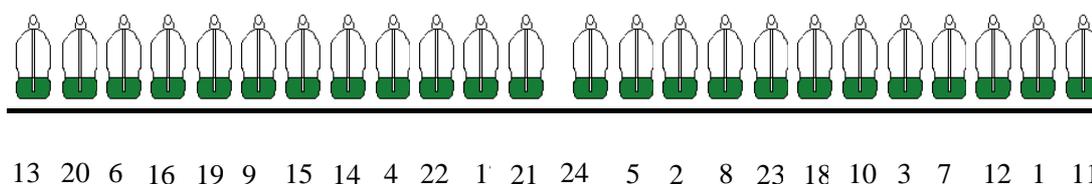


Figura 2.10: Esquema de aleatorización de los cultivos discontinuos alimentados con almidones comerciales y extractos solubles de papa, yuca, maíz y arroz (Maldonado, 2013).

Se determinó la cinética de crecimiento mediante recuento celular en cámara de Neubauer cada 3 y 4 días. En fase estacionaria se determinó las amilasas, y en fase exponencial se determinó la clorofila total, para ello se seleccionó el solvente orgánico o mezcla, que mejoró la eficiencia de extracción de estos pigmentos liposolubles (Wellburn, 1994).



Figura 2.11: Cultivos mixotróficos discontinuos alimentados de la microalga *Graesiella emersonii* con almidones comerciales de yuca, maíz, achira; y extractos solubles de papa, yuca, arroz y maíz, al 0,5% (día 1) (Maldonado, 2013).



Figura 2.12: Cultivos mixotróficos discontinuos alimentados de la microalga *Graesiella emersonii* con almidones comerciales de yuca, maíz, achira; y extractos solubles de papa, yuca, arroz y maíz al 0,5% (día 39) (Maldonado, 2013).

2.5.8 Determinación de amilasas

Se preparó placas de agar al 1.5% con almidón al 1%, luego de mantenerlas a temperatura ambiente, se les hondaron 5 pozos a cada placa con agar-almidón, utilizando varillas de vidrio estériles, removiendo el agar por succión, después se inocularon las muestras a examinar. Luego de inoculado cada pozo con el cultivo de la microalga se mantuvieron a un flujo fotónico de $96 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante 3 días (figura 2.13). A fin de revelar presencia de actividad amilasa, se procedió a rociar toda la superficie del agar con una solución de lugol (figura 2.14). La hidrólisis del almidón se manifestó por la aparición de un halo claro alrededor del pozo de crecimiento, mientras que el resto de la placa se tiñó de color azul oscuro, como signo de ausencia de la actividad amilasa (Rodríguez, 2010). La actividad amiolítica se consideró mayor mientras más amplia fue la zona clara (Aguilar, Morlon-Guyot, Trejo-Aguilar, & Guyot, 2000) (Moronta, 2001).



Figura 2.13: Determinación de amilasas en placas con agar almidón 1.5% (Maldonado, 2013).

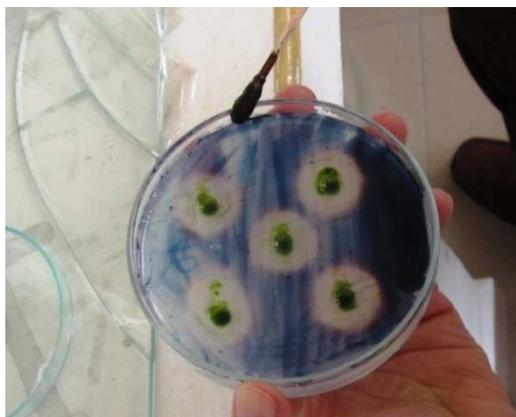


Figura 2.14: Tinción de placas con lugol para determinación de amilasas (Maldonado, 2013).

2.5.9 Determinación de pigmentos fotosintéticos

Se extrajo 2 mL de cultivo para cada uno de los tratamientos, se centrifugó por 15 minutos a 5500 RPM. El sobrenadante se desechó y se colocó 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al pellet, las muestras se resuspendieron y se guardaron por 24 h a 4°C. Este procedimiento se realizó por dos ocasiones para la extracción completa del pigmento, además se realizó con poca luz para evitar la foto oxidación de la clorofila.

Para la medición las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 5500 RPM y el sobrenadante se colocó en una celda para espectrofotómetro. Los valores de absorbancia (DO) son 665 nm para clorofila a y 649 nm para clorofila b.

La concentración de clorofila *a* y *b* se determinó a partir de las ecuaciones propuestas Wellburn, A. (1994).

$$C_a \text{ ug/mL} = \frac{\{[(12,47 * A665) - (3,11 * A649)] * vol.extracto(mL)\}}{vol.muestra(mL)}$$

$$C_b \text{ ug/mL} = \frac{\{[(25,06 * A649) - (6,5 * A665)] * vol.extracto(mL)\}}{vol.muestra(mL)}$$

$$C_{Total} \text{ ug/mL} = C_a + C_b$$

2.5.10 Análisis de biomasa

2.5.10.1 Densidad celular

El crecimiento de los cultivos de microalgas se determinó mediante recuento celular (cel/ml) cada 3 o 4 días hasta llegar a fase estacionaria, el conteo se realizó con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer (figura 2.15).

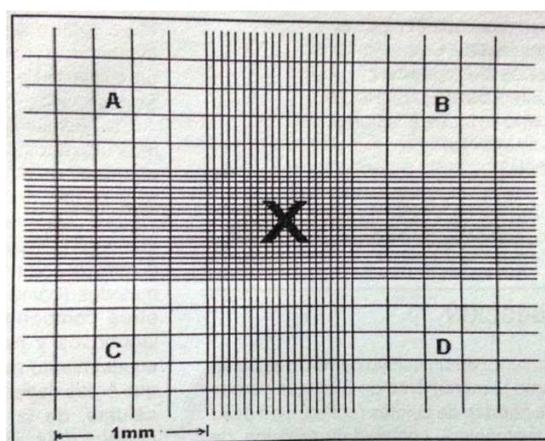


Figura 2.15: Reglilla de Neubauer de 9 mm² (Arredondo & Voltolina, 2007)

Los cultivos se agitaron para obtener una muestra homogénea, se tomó 1 ml y cuando el cultivo estuvo muy concentrado se diluyó con agua destilada. Se

succionó una muestra con pipeta Pasteur y se llenó la cámara, se colocó en el microscopio y se contaron todas las células presentes en los 4 cuadros marcados como A, B, C y D (figura 13) (Arredondo & Voltolina, 2007). La densidad celular se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$DC = \frac{C \times 10^4 \times Fd}{\text{Número de cuadrantes}}$$

Donde:

DC = Células por mililitro

C = Número de células observadas

Fd = Factor de dilución

2.5.10.2 Determinación del μ y t_d

La velocidad de crecimiento (μ) fue calculada mediante la ecuación propuesta por Lobban *et al.* 1988.

$$\mu = \frac{\ln_{x_1} - \ln_{x_2}}{t_1 - t_2}$$

Donde:

t_1, t_0 = tiempo final e inicial.

x_1, x_0 = densidad celular final e inicial en fase logarítmica

El tiempo de duplicación (t_d) fue calculado de acuerdo a la ecuación propuesta por Lobban *et al.* 1988.

$$t_d = \frac{\ln_2}{\mu}$$

2.5.11 Producción de biomasa

A partir de los ensayos realizados anteriormente se realizaron varias mezclas de los cultivos mixotróficos obtenidos y dependiendo de cada tratamiento. Es decir, del ensayo 1 se obtuvo una mezcla con 2250 ml de medio NF (figura 2.16), del ensayo 2 se obtuvieron 4 cultivos mezclados de 750 ml por cada tratamiento (figura 2.17), y del ensayo 3 se obtuvieron 8 cultivos mezclados con 750 ml por cada tratamiento (figura 2.18).



Figura 2.16: Mezcla de cultivos obtenidos del ensayo 1 (medio Nitrofoska) (Maldonado, 2013).



Figura 2. 17: Mezcla de cultivos obtenidos del ensayo 2 (Nitrofoska 3ml/L, papa 1%, yuca 1%, arroz 1%) (Maldonado, 2013).



Figura 2.18: Cultivos mezclados de la microalga *Graesiella emersonii* obtenidos del ensayo 3 (NF 3ml/L, papa 0.5%, yuca 0.5%, maíz 0.5%, arroz 0.5%, maíz comercial 0.5%, yuca comercial 0.5% y achira 0.5%) (Maldonado, 2013).

Luego se tomaron los 3 cultivos de *Graesiella emersonii* en medio Nitrofoska foliar 3 ml/L provenientes del escalamiento a 3000 ml (figura 2.3)

como inóculo en un botellón de vidrio de 20 litros de capacidad, al cual se le añadió 3 litros de medio Nitrofoska 3 ml/L (figura 2.19A). También se tomaron los 3 cultivos de Nitrofoska 3 ml/L procedentes de los pulls de los ensayos 1, 2 y 3 y se le añadió 3 litros de medio Nitrofoska 3 ml/L y 0.5% de almidón papa (figura 2.19B). Y finalmente se tomaron los 2 cultivos con almidón de papa que se obtuvieron de los pulls del ensayo 2 y 3 y se les añadió 1 litro de medio Nitrofoska 3 ml/L y 0.5% de almidón papa (figura 19C).



Figura 2.19: Inicio del escalamiento hasta volúmenes de 10L de la microalga *Graesiella emersonii*. A) Cultivo con NF 3ml/L, B) Cultivo con NF 3ml/L + 0.5% papa, C) Cultivo con NF 3ml/L + 0.5% papa (Maldonado, 2013).

Después de unos días se llegó a 10 litros cada cultivo (figura 2.20) agregando a cada uno su medio correspondiente.



Figura 2.20: Escalamiento a 10L de *Graesiella emersonii*. A) Cultivo NF 3ml/L, B) Cultivo NF 3ml/L + papa, C) Cultivo NF 3ml/L + papa (Maldonado, 2013).

Finalmente se escaló a 15 litros colocando 5 litros de cada medio en su cultivo correspondiente (figura 2.21).



Figura 2.21: Escalamiento de la microalga *Graesiella emersonii* a 15 litros. A) Cultivo con NF 3ml/L, B) Cultivo con NF 3ml/L + papa 0.5%, C) Cultivo con NF 3ml/L + papa 0.5% (Maldonado, 2013).

Para obtener mayor producción de biomasa algal se extrajo 7 litros de cada cultivo (figura 2.21) y se dejó decantar (figura 2.22).

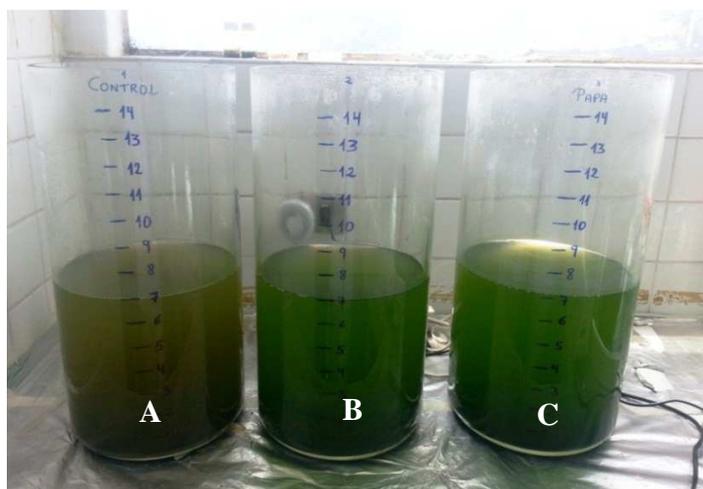


Figura 2.22: Cultivos decantados de *Graesiella emersonii*. A) Cultivo con NF 3ml/L, B) Cultivo con NF 3ml/L + papa 0.5%, C) Cultivo con NF 3ml /L + papa 0.5% (Maldonado, 2013).

Se descartó el sobrenadante y el precipitado se colocó en botellones con 5 litros del medio correspondiente (figura 2.23).



Figura 2.23: Escalamiento de la microalga *Graesiella emersonii* a 9 litros con el precipitado obtenido de la decantación A) Cultivo con NF 3ml/L, B) Cultivo con NF 3ml/L + papa 0.5%, C) Cultivo con NF 3 ml/L + papa 0.5% (Maldonado, 2013).

A partir del botellón inicial con el medio Nitrofoska se extrajeron 6 litros que se colocaron en dos botellones con 3 litros de medio de cultivo, con lo cual se obtuvo un total de 8 botellones: 4 con medio de cultivo Nitrofoska 3 ml/L y 4 con medio de cultivo NF 3ml/L + papa 0.5% (figura 2.24).



Figura 2.24: Escalamiento de la microalga *Graesiella emersonii* en 8 botellones de 15 litros. A) Cultivos con NF 3ml/L, B) Cultivos con NF 3ml/L + papa 0.5% (Maldonado, 2013).

Cada 7 días se agregó el medio de cultivo correspondiente para incrementar la producción de biomasa hasta obtener 15 litros en cada botellón.

2.5.12 Análisis para determinación de proteínas y carbohidratos

- **Proteínas**

Se utilizó la metodología descrita por (Lowry, Rosenbrough, Farr, & Randall, 1951) y el método colorimétrico de Wiener Lab.

Elaboración de la curva de calibración con BSA:

Se preparó una solución concentrada de 300 µg/mL de suero albúmina de bovino (BSA), a partir del cual se hizo un gradiente de concentración desde 0 a 250 µg/mL (tabla 2.11). Una vez que se tuvieron las diferentes concentraciones de BSA, se continuó la curva con los reactivos que se describen a continuación.

Tabla 2.11: Elaboración curva de calibración de proteínas utilizando BSA como estándar.

Tubo	Volumen BSA (300 ug/ml) (ul)	Volumen de agua destilada (ul)	Concentración de BSA (ug/ml)
Blanco	0	1000	0
1	50	950	15
2	100	900	30
3	150	850	45
4	200	800	60
5	250	750	75

Se pesó 5 mg de muestra seca y se agregó 5 ml de NaOH 0.1 N. Se colocó en baño María por 1 hora a 90 – 100°C. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos y se extrajo el sobrenadante. Después las muestras, blanco y estándares se trataron como indica el método colorimétrico para determinación de proteínas de Wiener Lab (tabla 2.12).

Tabla 2.12: Procedimiento para determinación de proteínas según Wiener Lab.

	Blanco	Standard	Muestra
Agua destilada	50 ul	-	-
Standard	-	50 ul	-
Muestra	-	-	50 ul
Reactivo A	3.5 ml	3.5 ml	3.5 ml
EDTA/Cu 13 mmol/L en hidróxido de sodio 875 mmol/L y alquil aril poliéter (AAP)			

Se mezcló e incubó a 15 minutos por 37°C y se leyó en el espectrofotómetro a 540 nm calibrando el equipo con el blanco.

- **Carbohidratos**

Se utilizó el método de (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956).

Elaboración de la curva de calibración con glucosa:

Se preparó una solución concentrada de glucosa 120 ug/ml a partir del cual se hizo un gradiente de concentración desde 0 a 500 µg/mL (tabla 2.13). Una vez obtenidas las diferentes concentraciones de glucosa, se continuó la curva con los reactivos que se describen a continuación.

Tabla 2.13: Elaboración curva de calibración de carbohidratos utilizando glucosa como estándar.

Tubo	Solución glucosa (300 ug/ml) (ul)	Volumen de agua destilada (ul)	Concentración de glucosa (ug/ml)
Blanco	0	1000	0
1	100	900	12
2	200	800	24
3	300	700	36
4	400	600	48
5	500	500	60

Se agregó 1 ml de H₂SO₄ 1.0 M a la muestra y se sonicó por 5 minutos, luego se agregó 4 ml de H₂SO₄ 1.0 M (en total 5 ml de H₂SO₄ 1.0 M). Se colocó en un termo-baño a 90 - 100°C durante 1 hora. Se dejó en reposo hasta alcanzar temperatura ambiente y se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos. Luego se separó el sobrenadante y se tomó 1 ml al cual se realizó la dilución necesaria, y se agregó 1 ml de fenol al 5%. Se dejó reposar 40 minutos y se agregó 5 ml de H₂SO₄ concentrado, se dejó enfriar y se leyó a 485 nm.

2.5.13 Análisis de datos

Los datos obtenidos en cada uno de los ensayos fueron analizados utilizando el software estadístico InfoStat¹.

¹ Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

CAPÍTULO 3:

RESULTADOS

3.1 Identificación de la microalga

Luego de 7 días de cultivo en medio sólido agar 1% y Nitrofoska 1ml.L^{-1} , se obtuvieron colonias de color verde, lisas y semiesféricas como se puede observar en la figura 3.1.



Figura 3.1: Colonias de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) en medio sólido (Maldonado, 2013).

Se realizaron observaciones en el microscopio de la muestra de la microalga proporcionada por el Doctor Ever Morales (figura 3.2), su forma es elipsoidal con un pirenoide bien diferenciado. Fue evaluada para confirmar su taxonomía, siendo catalogada previamente como *Chlorella emersonii* (Comunicación personal Doctora Gloria Garduño, Presidenta de la Sociedad Mexicana de Ficología).

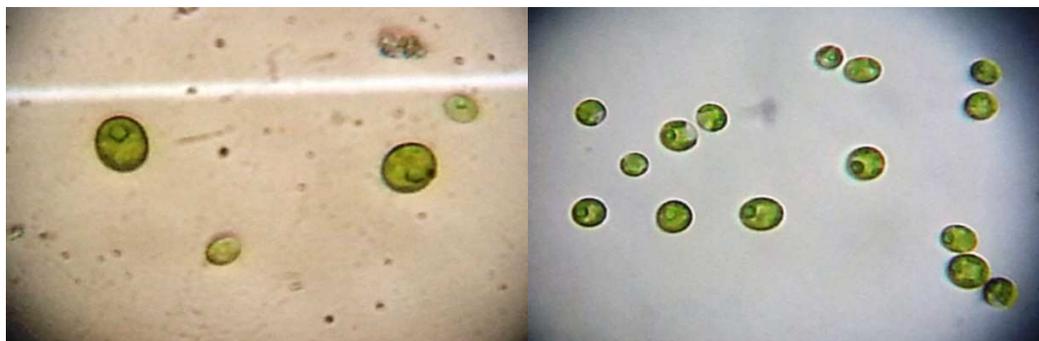


Figura 3.2: Observación al microscopio de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) (Maldonado, 2013).

En el proceso de escalamiento se observó la presencia la microalga *Desmodesmus sp.* (figura 3.3), la cual fue desapareciendo paulatinamente.



Figura 3.3: Observación al microscopio de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) con la microalga *Desmodesmus sp.* (Maldonado, 2013).

3.2 Ensayo 1: Cinética de crecimiento a diferentes concentraciones de un fertilizante comercial (Nitrofoska).

3.2.1 Densidad celular

Se realizó un análisis de varianza ANOVA, para los valores de densidad celular obtenidos durante los días de monitoreo (tabla 3.1).

Tabla 3.1: Ensayo 1. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable densidad celular (cel.mL^{-1})

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo.	1982.79	2	991.39	17,88	<0.0001
[NF]	1982.79	2	991.39	17,88	<0.0001
Error	2328.73	42	55.45		
Total	4311.52	44			

Se presentó un valor de significancia $p < 0.0001$ que indica que por lo menos uno de los tratamientos es diferente. Por lo que, se realizó la prueba de Duncan (tabla 3.2), donde se observan dos subconjuntos, siendo el B que corresponde a la concentración de 3 mL.L^{-1} de Nitrofoska, el más adecuado para promover el crecimiento de la microalga.

Tabla 3.2: Ensayo 1. Prueba de Duncan para la variable densidad celular (cel.mL^{-1})

Alfa=0.05		Error: 55.4460		gl: 42	
[NF] (mL.L^{-1})	Medias	n	E.E.	Subconjunto	
0.5	35.41	9	2.48	A	
1.0	39.86	19	1.71	A	
3.0	51.70	17	1.81	B	

Además, se comprobaron los supuestos del modelo (anexo 1 y 2). En la figura 3.4 se presenta la curva de crecimiento para cada concentración de Nitrofoska, y en la tabla 3.3 los valores de tiempo de duplicación y densidad celular al finalizar la fase exponencial.

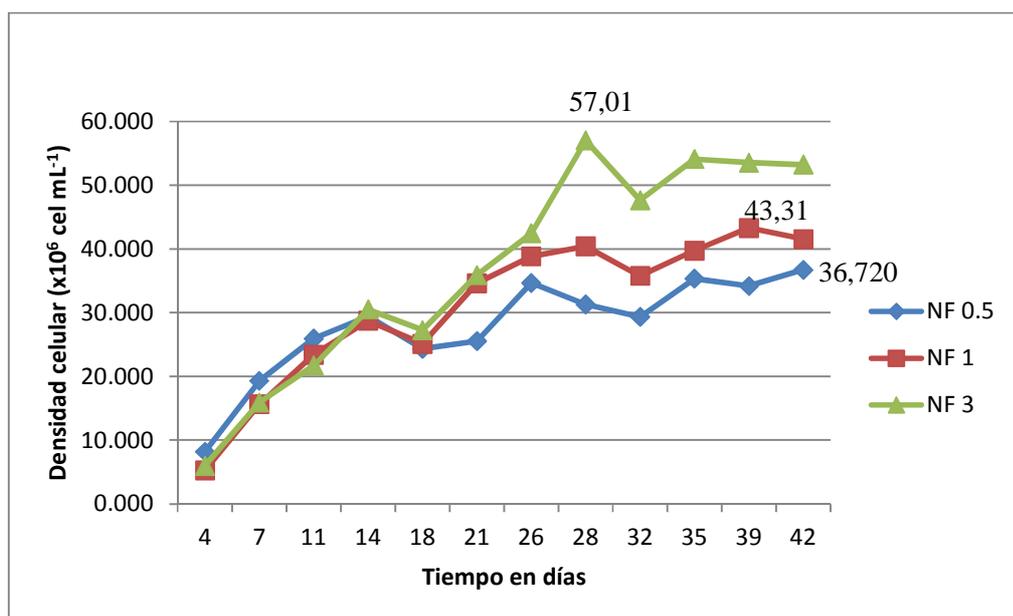


Figura 3.4: Curva de crecimiento ($\times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$) en función de la concentración de Nitrofoska (0.5, 1, 3 mL.L^{-1})

En la figura 3.4 se observa que la fase exponencial comienza en el día 4 para todas las concentraciones de Nitrofoska. Mientras que los valores de densidad celular máxima para las diferentes concentraciones fueron las siguientes: a 0.5 mL.L^{-1} de $36.720 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ y con un $T_d=17.554\text{h}$; para 1 mL.L^{-1} de $43.312 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ con un $T_d=11.494\text{h}$ y para 3 mL.L^{-1} de $57.017 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ con un $T_d=7.371\text{h}$ (tabla 3.3).

Tabla 3.3: Velocidades de crecimiento (μ), tiempos de duplicación (Td) y densidad celular máxima (DC) en función de la concentración de Nitrofoska (0.5, 1, 3 mL.L⁻¹)

NF (mL.L ⁻¹)	μ	Td (h)	DC (x10 ⁶ cel.mL ⁻¹)
0.5	0.039	17.554	36.720
1	0.060	11.494	43.312
3	0.094	7.371	57.017

3.3 Análisis bromatológicos de los extractos solubles y almidones comerciales.

En la tabla 3.4 se observan los resultados obtenidos con el análisis bromatológico realizado a cada extracto soluble y almidón comercial utilizados como medio de cultivo.

Tabla 3.4: Análisis bromatológicos de los extractos solubles y almidones comerciales utilizados como medio de cultivo.

	Extracto de papa	Extracto de yuca	Extracto de arroz	Extracto de maíz	Yuca comercial	Achira comercial	Maíz comercial
HUMEDAD (%)	96.52	97.80	98.42	98.37	96.39	95.94	95.47
CENIZAS (%)	0.08	0.06	0.14	0.39	0.03	0.02	0.03
PROTEINAS (%)	0.31	0.06	0.04	0.66	0.30	0.22	0.22
CARBOHIDRATOS (%)	3.09	2.09	1.41	0.57	3.28	3.83	4.28
ENERGIA (Kcal/100g)	13.60	8.58	5.78	4.94	14.32	16.19	17.99

El extracto de maíz, presentó el mayor contenido de cenizas, seguido del extracto de arroz, mientras que los almidones comerciales, presentaron bajos niveles de cenizas. Es decir, el extracto de maíz superó al extracto de almidón comercial de achira, y al de maíz y yuca en 19.5 y 13.0 veces, respectivamente.

En cuanto a proteínas, también se obtuvo el contenido más elevado en el extracto de maíz, con 0.66% y en relación al resto de los sustratos; incluso superando al extracto de arroz (con el menor contenido de proteínas), en 16.5 veces. Mientras que, el contenido de proteínas en papa y en los almidones comerciales, estuvo entre 0.31 y 0.22%; los cuales fueron superados por el extracto de maíz, entre un 2.12 y 3.0 veces; respectivamente.

El incremento del contenido de carbohidratos se detectó en los almidones comerciales, con el mayor porcentaje de 4.28% en maíz; seguido del almidón comercial de achira y de yuca. Entre los extractos, el contenido más alto se obtuvo en papa. En cambio, el menor contenido se registró en el extracto de maíz. Se destaca que, el almidón comercial del maíz superó al extracto de maíz obtenido en el laboratorio en 7.5 veces.

La energía corresponde al aporte calórico de los macronutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos) presentó un mayor porcentaje en los almidones comerciales obteniendo valores entre 14.32 y 17.99%; seguido por el extracto de papa con 13.60%. Mientras que en el resto de extractos se obtuvo porcentajes bajos estando entre 4.94 y 8.58%.

3.4 Ensayo 2: Crecimiento de la microalga con extractos solubles (1%) obtenidos de arroz, yuca y papa en cultivos discontinuos alimentados

3.4.1 Densidad celular

Se realizó un análisis de varianza ANOVA, para los valores de densidad celular obtenidos durante los días de monitoreo (tabla 3.5), y se obtuvo un valor de significancia $p = 0.0001$ que indica que por lo menos uno de los tratamientos es diferente. En la prueba de Duncan (tabla 3.6), se observan dos subconjuntos, donde el B que corresponde al medio almidón papa 1% es el más adecuado. Esto significa que, la microalga cultivada con almidón de papa, produjo el mayor promedio de densidad celular, de $38.86 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ con respecto a los cultivos con arroz, yuca y al control.

Tabla 3.5: Ensayo 2. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable densidad celular (cel.mL^{-1})

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo.	339.67	3	113.22	8.94	0.0001
Almidón	339.67	3	113.22	8.94	0.0001
Error	620.66	49	12..67		
Total	960.34	52			

Tabla 3.6: Ensayo 2. Prueba de Duncan para la variable densidad celular (cel.mL^{-1})

Alfa=0.05		Error: 12.666		gl: 49
Almidón (1%)	Medias	n	E.E.	Subconjunto
Arroz	32,57	14	0.95	A
Control	32,81	13	0.99	A
Yuca	35,36	13	0.99	A
Papa	38,86	13	0.99	B

También se comprobaron los supuestos del modelo (anexo 3 y 4), y en la figura 3.5 se presenta la curva de crecimiento para cada medio almidón al 1%, donde las flechas indican la adición de 1% de almidón (cultivo discontinuo alimentado). Además, en la tabla 3.7 se muestra los valores de tiempo de duplicación y densidad celular al finalizar la fase exponencial.

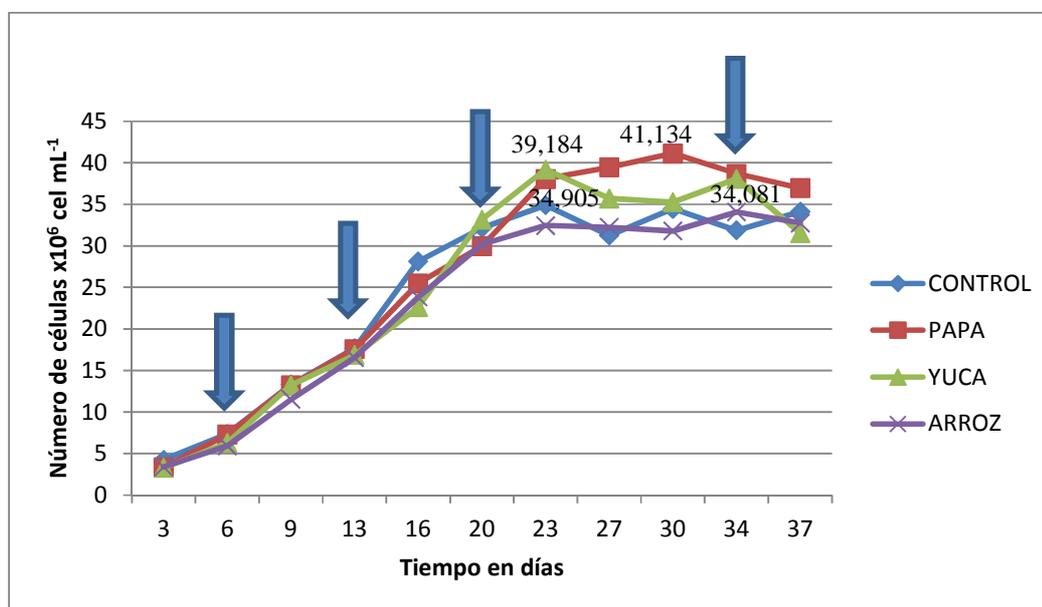


Figura 3.5: Curva de crecimiento ($\times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$) de *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados con almidón al 1% (Control, papa, yuca, arroz)

En la figura 3.5 se observa que la fase exponencial comienza en el día 3 para todos los tratamientos con medio de cultivo almidón al 1%. Mientras que, los máximos valores de densidad celular fueron para el medio papa, de $41.134 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ con un $T_d=7.457\text{h}$; para yuca de $39.184 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ con un $T_d=5.597\text{h}$, para el control de $34,905 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ con un $T_d=6.578\text{h}$, y para el arroz de $34.081 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ con un $T_d=9.296\text{h}$ (tabla 3.7).

Tabla 3.7: Velocidades de crecimiento (μ), tiempos de duplicación (T_d) y densidad celular máxima (DC) de *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados con almidón al 1% (control, papa, yuca, arroz)

Almidón (1%)	μ	T_d (h)	DC ($\times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$)
Papa	0.093	7.457	41.134
Yuca	0.124	5.597	39.184
Control	0.105	6.578	34.905
Arroz	0.075	9.296	34.081

3.5 Ensayo 3: Crecimiento de la microalga con diferentes almidones comerciales y extractos de papa, yuca, maíz y arroz en cultivos discontinuos alimentados (0.5%)

3.5.1 Densidad celular

Se comprobaron los supuestos del modelo (anexo 5 y 6), y se vio que estos no cumplían con la condición de igualdad de varianzas, por lo cual se aplicó estadística no paramétrica para los valores de densidad celular obtenidos durante los días de monitoreo (tabla 3.8).

Tabla 3.8: Ensayo 3. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable densidad celular (cel.mL^{-1})

Variable	Almidón	N	Medias	D.E.	Medianas	H	P
DC	Achira	14	42.73	6.62	41.04	35.10	<0.0001
DC	Arroz	12	55.54	15.51	48.70		
DC	Control	12	50.05	3.76	50.31		
DC	Maíz	11	65.27	10.14	66.00		
DC	Maíz com.	11	49.92	6.98	46.38		
DC	Papa	12	65.55	14.09	66.86		
DC	Yuca	14	49.97	6.33	50.58		
DC	Yuca com.	10	51.52	9.37	52.27		

Trat.	Ranks	
Achira	20.46	A
Maíz comercial	42.64	B
Yuca	43.32	B
Control	44.75	B
Yuca comercial	46.55	B
Arroz	48.88	B
Papa	71.58	C
Maíz	76.91	C

Se presentó un valor de significancia $p < 0.0001$ que indica; que por lo menos uno de los tratamientos es diferente, y se observan tres subconjuntos, siendo el C, el que corresponde al medio de cultivo con almidón de maíz y papa los mejores ya que sus medias no son significativamente diferentes ($p > 0.05$), pero el más adecuado es el medio de cultivo con almidón maíz al 0.5%.

En la figura 3.6 se presenta la curva de crecimiento para cada medio de cultivo con almidón al 0.5%, donde las flechas indican la adición de 0.5% de almidón (cultivo discontinuo alimentado).

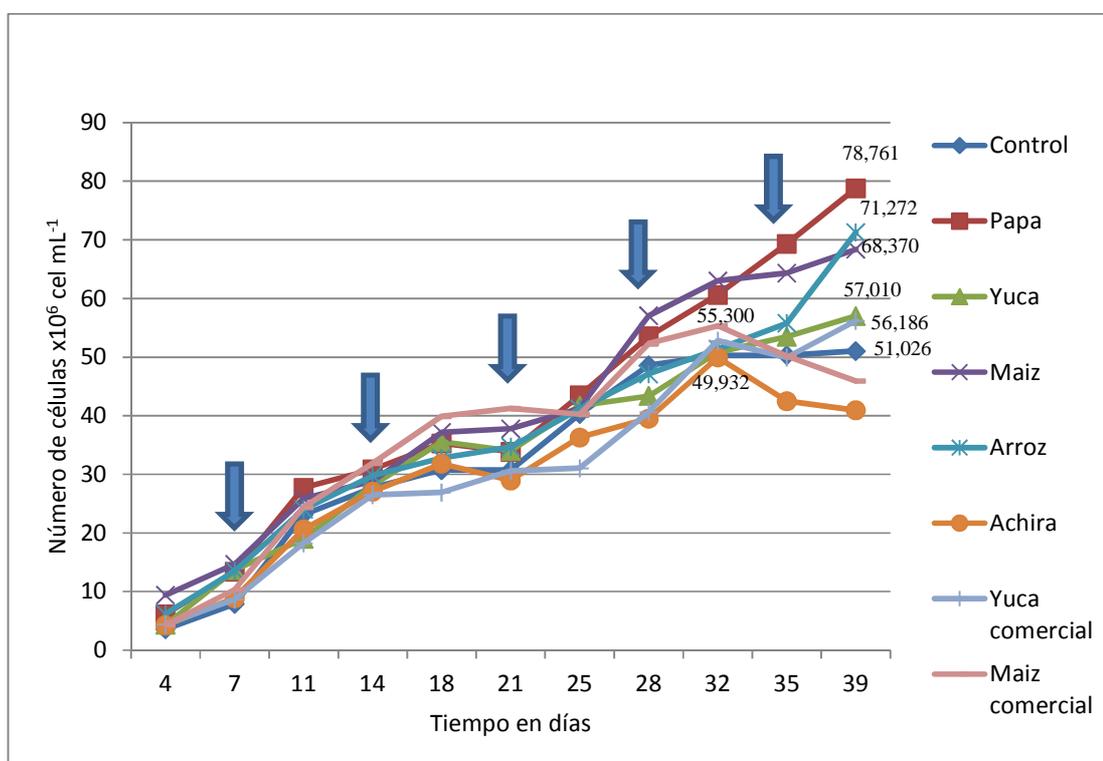


Figura 3.6: Curva de crecimiento ($\times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) de *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados con almidón al 0.5% (control, papa, yuca, maíz, arroz, achira, yuca comercial, maíz comercial). Las flechas indican el tiempo al cual fueron añadidos los extractos amiláceos correspondientes a cada tratamiento de los cultivos.

En la figura 3.6 se observa que la fase exponencial comienza en el día 4 para todos los tratamientos con almidón al 0.5%; y en la tabla 3.9 los valores de tiempo de duplicación y densidad celular al finalizar la fase exponencial.

Tabla 3.9: Velocidades de crecimiento (μ), tiempos de duplicación (Td) y densidad celular máxima (DC) de *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados con almidón 0.5% (control, papa, yuca, maíz, arroz, achira, yuca comercial, maíz comercial)

Almidón (0.5%)	μ	Td (h)	DC ($\times 10^6$ cel.mL⁻¹)
Papa	0.073	9.500	78.761
Arroz	0.070	9.923	71.272
Maíz	0.057	12.226	68.370
Yuca	0.073	9.431	57.010
Yuca comercial	0.073	9.530	56.186
Maíz comercial	0.091	7.599	55.300
Control	0.076	9.157	51.026
Achira	0.088	7.885	49.933

3.5.2 Clorofila total

En la tabla 3.10 se presentan los resultados promedios obtenidos en la determinación de pigmentos fotosintéticos.

Tabla 3.10: Resultados promedio de clorofila total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) obtenidos con cada tratamiento.

	Clorofila total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	Día 25	Día 32
CONTROL	29.443	30.637
PAPA	26.299	31.549
YUCA	25.955	29.352
MAIZ	26.930	29.894
ARROZ	23.019	25.814
ACHIRA	26.329	28.074
YUCA COMERCIAL	24.046	28.523
MAIZ COMERCIAL	28.637	30.047

Se comprobaron los supuestos del modelo (anexo 7, 8, 9 y 10). Para el día 25 se realizó un análisis de varianza (tabla 3.11), donde se obtuvo un valor de

significancia $p = 0.0269$, indicando que por lo menos uno de los tratamientos es diferente. Se realizó la prueba de Duncan (tabla 3.12), donde se observan dos subconjuntos, siendo el B el que corresponde al medio de cultivo con almidón de maíz comercial y al control, los mejores; ya que sus medias no son significativamente diferentes ($p > 0.05$), aunque el más adecuado fue el cultivo control con una media igual a 29.44. No obstante, el cultivo control, apenas superó al cultivo mixotrófico con maíz comercial en solo 1.0. Mientras que, en presencia de yuca, papa, achira y maíz fue de 1.1. En cambio el cultivo con arroz y yuca, fue superado en 1.22 y 1.28 veces.

Tabla 3.11: Ensayo 3. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable clorofila total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) día 25.

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	95.09	7	13.58	3.16	0.0269
Almidón	95.09	7	13.58	3.16	0.0269
Error	68.84	16	4.30		
Total	163.93	23			

Tabla 3.12: Ensayo 3. Prueba de Duncan para la variable clorofila total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) día 25.

Alfa=0.05 Error: 4.3027 gl: 16					
Almidón (0.5%)	Medias	n	E.E.	Subconjunto	
Arroz	23.02	3	1.20	A	
Yuca comercial	24.05	3	1.20	A	
Yuca	25.95	3	1.20	A	B
Papa	26.30	3	1.20	A	B
Achira	26.33	3	1.20	A	B
Maíz	26.93	3	1.20	A	B
Maíz comercial	28.6	3	1.20	B	
Control	29.44	3	1.20	B	

Para el día 32 se vio que los resultados no cumplían con la condición de igualdad de varianzas. Por lo cual, se aplicó estadística no paramétrica (tabla 3.13), donde se obtuvo un valor de significancia de $p = 0.6000$; lo que indica que no existe diferencia significativa entre tratamientos.

Tabla 3.13: Ensayo 3. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable clorofila total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) día 32.

Variable	Almidón	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
CT	Achira	3	28.07	1.19	27.70	5.49	0.6000
CT	Arroz	3	25.81	3.75	26.39		
CT	Control	3	30.64	3.00	29.28		
CT	Maíz	3	29.89	4.11	30.95		
CT	Maíz comercial	3	30.05	1.00	29.95		
CT	Papa	3	31.55	6.56	28.72		
CT	Yuca	3	29.35	2.27	30.50		
CT	Yuca comercial	3	28.52	0.65	28.85		

3.5.3 Amilasas

Se observó que las muestras que se inocularon y crecieron durante 3 días en las cajas petri tuvieron la presencia de hongos en el medio (figura 3.7), además como se muestra en la figura 3.8 se puede observar el halo de amilasa que se formó alrededor de los pozos donde se sembró las muestras.



Figura 3.7: Crecimiento de hongos en medio agar almidón 1.5% (Maldonado, 2013).

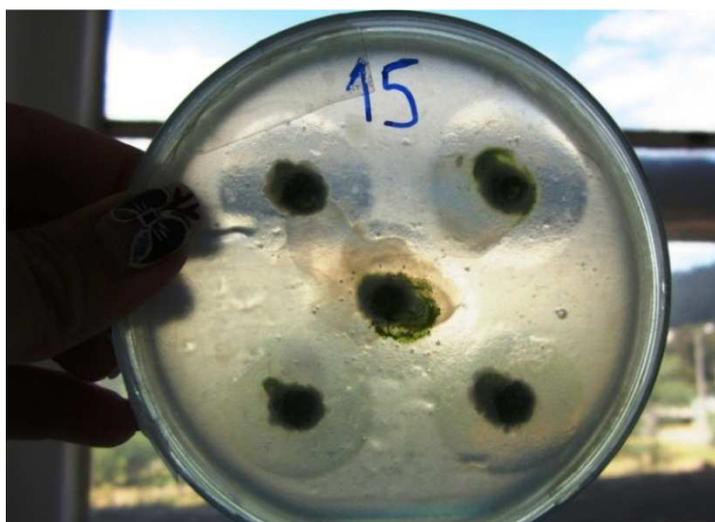


Figura 3.8: Observación de halos por presencia de amilasa (Maldonado, 2013).

Luego de la tinción con lugol (figura 3.9) se midieron los halos y con los datos obtenidos se comprobaron los supuestos del modelo (anexo 11 y 12), donde se vio que estos no cumplían con la condición de normalidad e igualdad de varianzas. De tal manera que, se aplicó estadística no paramétrica. Se

realizó una prueba de Kruskal-Wallis (tabla 3.14), donde se obtuvo un valor de significancia $p = 0.001$ indicando que por lo menos uno de los tratamientos es diferente.

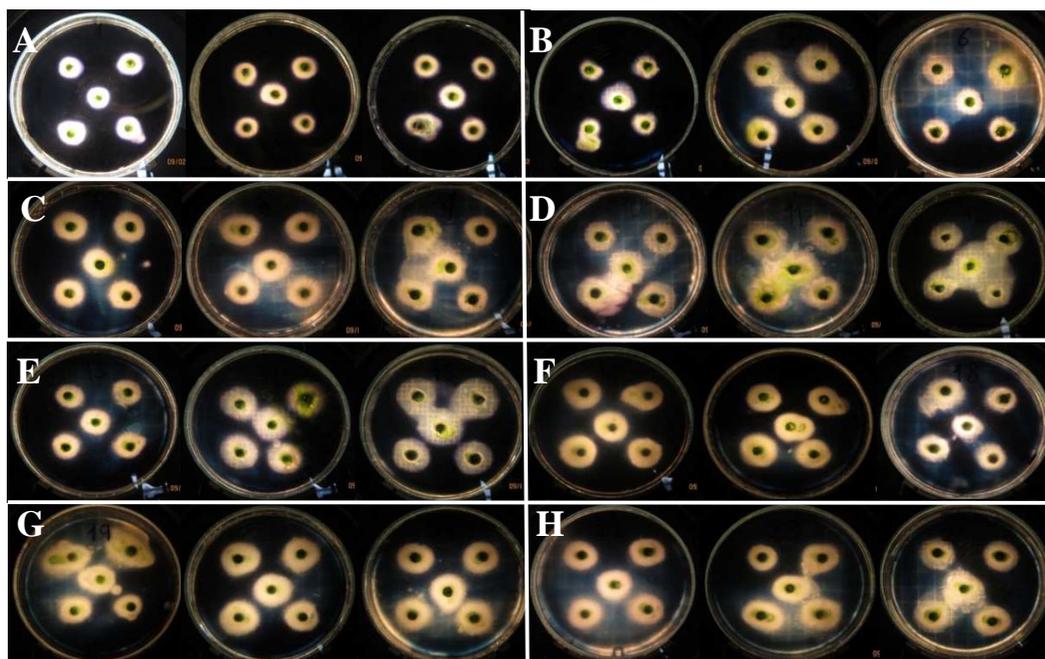


Figura 3.9: Presencia de amilasa en muestras de cultivo de la microalga *Graesiella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados con diferentes extractos amiláceos en medio sólido. A) Control, B) Papa, C) Yuca, D) Maíz, E) Arroz, F) Achira, G) Yuca comercial, H) Maíz comercial (Maldonado, 2013).

Tabla 3.14: Ensayo 3. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable halos de amilazas (cm)

Variable	Almidón	N	Medias	D.E.	Medianas	H	P
DH	Achira	15	1.79	0.20	1.80	29.17	0.0001
DH	Arroz	15	2.01	0.35	2.10		
DH	Control	15	1.59	0.22	1.60		
DH	Maíz	15	2.17	0.34	2.10		
DH	Maíz com.	15	1.81	0.20	1.80		
DH	Papa	15	1.81	0.40	1.70		
DH	Yuca	15	1.95	0.27	1.90		
DH	Yuca com.	15	1.83	0.21	1.90		

Trat.	Ranks	
Control	28.27	A
Achira	52.50	A B
Maíz comercial	53.70	B
Papa	55.63	B
Yuca comercial	57.90	B
Yuca	71.23	B C
Arroz	75.30	B C
Maíz	89.47	C

Se observan tres subconjuntos, siendo el C que corresponde al medio de cultivo con almidón maíz, arroz y yuca los mejores ya que sus medias no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). No obstante, el más adecuado fue el medio de cultivo con almidón maíz al 0.5% con una media de 2.17 cm. El mayor diámetro de los halos estuvo en el siguiente orden descendente: maíz > arroz > yuca > yuca comercial > papa y maíz comercial > achira > control.

3.5.4 Proteínas y carbohidratos

La tabla 3.15 muestra los resultados que se obtuvieron en los análisis de proteínas según el método de Lowry, Rosenbrough, Farr & Randall (1951) y el método colorimétrico de Wiener Lab.; y carbohidratos según el método de Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith (1956), a cada una de las muestras con medio de cultivo almidón al 0,5%.

Tabla 3.15: Contenido de proteínas y carbohidratos según cada fuente de almidón.

Fuente de Almidón	% Proteínas	% Carbohidratos
Control	1.57	1.45
Papa	3.80	0.84
Yuca	3.54	3.11
Maíz	3.76	1.08
Arroz	1.00	0.78
Achira	3.00	2.36
Yuca Comercial	1.49	0.87
Maíz Comercial	1.02	0.88

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 3.15, la biomasa obtenida en cultivos discontinuos alimentados con extracto de papa y de maíz, registraron el mayor contenido de proteínas con un 3.80 y 3.76%, seguida de la biomasa microalgal producida con extracto de yuca, con 3.54%. En este caso, la productividad mixotrófica de proteínas con extracto de papa, superó a la autotrófica (control) en 2.42 veces. No obstante, la productividad de proteínas en condiciones autotróficas, fue mayor que en los cultivos mixotróficos con arroz, almidón de maíz y de yuca comercial.

En cuanto al contenido de carbohidratos obtenido en condiciones mixotróficas con el extracto de yuca, se obtuvo el mayor porcentaje con 3.11%, el cual incrementó en 2.1; 3.7 y 3.99; respecto al control autotrófico, papa y arroz. De tal manera que, el aumento del contenido de carbohidratos en la biomasa microalgal estuvo en el siguiente orden decreciente: yuca>achira>control>maíz>maíz comercial ~yuca comercial >papa>arroz.

Estos resultados también indican que, la adición de extracto de yuca favorece la producción de biomasa rica en proteínas y en carbohidratos, en relación al control autotrófico. Mientras que el extracto de papa y de maíz contribuyen a incrementar el contenido de proteínas de la biomasa microalgal.

CAPÍTULO 4:

DISCUSIÓN

4.1 Identificación de la microalga

La identificación de microalgas mediante clave microscópica en condiciones naturales, es generalmente complicada y los criterios que se emplean para la determinación de especies se basan en caracteres observables que habitualmente presentan una elevada variabilidad, por lo que resulta difícil su determinación precisa (Alba-Lois *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente estudio se utilizaron los lineamientos disponibles para establecer una identificación confiable.

Los estudios filogenéticos han demostrado que las relaciones genéticas en ocasiones generan problemas con la clasificación morfológica (Lyra *et al.*, 2001). Para una identificación más específica y para poder ubicar la microalga de este estudio se envió una muestra a México y se determinó que la microalga corresponde a *Graesiella emersonii*, sinónimo de *Chlorella emersonii*, *Chlorella fusca* var. *vacuolata*, *Graesiella vacuolata* (Kudo & Ichihara, 2012).

La observación de la microalga *Chlorella emersonii* (Shihira et R. W. Krauss, 1965) en el microscopio evidenció la presencia de células vegetativas unicelulares inmóviles, de forma esférica-elipsoidal con un pirenoide diferenciado. Según John, Whitton, & Brook (2002) son células de 3-17 um de

ancho, esféricas o subesféricas, solitarias o agrupadas, con su cloroplasto inicialmente en forma de hoyo, más tarde en forma de banda y que cubre la mayor parte de la pared, con fisuras. Además con un pirenoide grande rodeado de 2 a 4 granos de almidón y con 2, 4 u 8 autoesporas elipsoidales en cada esporangio.

4.2 Ensayo 1: Cinética de crecimiento a diferentes concentraciones de un fertilizante comercial (Nitrofoska).

Según Nieves *et al.* (1994) los medios de cultivos hechos con fertilizantes de uso común en agricultura son utilizados para el crecimiento de microalgas por ser más baratos y de semejante rendimiento que los medios de cultivo con base en sales puras químicamente. Los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de microalgas son nitrógeno, fósforo, magnesio, manganeso, potasio, hierro, zinc, sodio, boro, entre otros (Richmond, 2004); y de acuerdo a las proporciones atómicas N:P óptimas para microalgas de agua dulce; el cual es de 6-10:1 (Wang *et al.*, 2009), el fertilizante agrícola Nitrofoska foliar se encuentra dentro de este rango (Portilla, 2010). Además, se conoce que ya se han realizado cultivos de varias especies de microalgas con este fertilizante, como es el caso de Brito (2000) quien lo utilizó para el crecimiento de *Nitzschia cf. Closterium*; a su vez empleado para el cultivo de *Tetraselmis chuii* por Ponne (2001) y para el cultivo de *Chlorococcum sp.* por Carvajal (2013).

Según BASF (1978), el fertilizante comercial Nitrofoska Foliar presenta mayor solubilidad que los de más fertilizantes foliares, proporcionándole a los vegetales los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo. Los nutrientes en este fertilizante se encuentran en forma quelatizada, lo que permite una absorción rápida y directa por las microalgas a través del estroma.

A pesar de las ventajas que presentan los fertilizantes agrícolas, aún se desconocen las concentraciones exactas que se deben utilizar. Así como también los efectos secundarios causados por su uso (Mcanallys *et al.*, 1992). En este estudio se evaluó el fertilizante agrícola Nitrofoska foliar como medio de cultivo a diferentes concentraciones (0.5, 1 y 3 mL.L⁻¹). Al realizar el ANOVA (tabla 3.1) se presentó un valor de significancia $p < 0.0001$ indicando que existe diferencia estadística significativa, donde la concentración 3 mL.L⁻¹ resultó la mejor con $57.017 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ Td=7.371h y $\mu = 0.094 \text{ h}^{-1}$ (tabla 3.3). En la investigación realizada por Portilla (2010) se determinó que la densidad celular máxima de *Chlorella sp.* a una concentración de 1mL.L⁻¹ de fertilizante Nitrofoska foliar fue de $4.392 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ y la tasa de crecimiento $\mu = 0.17 \text{ h}^{-1}$. Al igual que Brito *et al.* (2006) determinó densidad celular máxima de *Chlorella vulgaris* con una concentración de 0.4 mL.L⁻¹ del medio Nitrofoska fue de $3.45 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$. Con lo que se demuestra que los resultados obtenidos con *Chlorella emersonii* son mayores que los obtenidos en esas investigaciones. En los datos obtenidos se observa que mientras mayor es la concentración del

fertilizante mayor es la concentración celular; aun cuando en algunos casos puede haber inhibición a elevadas concentraciones de estos fertilizantes.

En el estudio realizado por Brito *et al.* (2013) las microalgas en el medio nitrofoska requirieron más tiempo para la duplicación celular, posiblemente como mecanismo de adaptación a las condiciones ambientales expuestas para lograr al final del ensayo una densidad celular similar a los otros medios de crecimiento. Los fertilizantes inorgánicos resultan fuentes nutritivas adecuadas para la producción masiva de estas especies y son más económicos en comparación con los medios tradicionales. Sin embargo, cabe señalar la influencia del medio de cultivo y de la fase de crecimiento en la composición bioquímica y calidad nutricional de las células microalgales, factores a considerar para lograr su adecuada utilización (Newmark *et al.*, 1989; Herrero *et al.*, 1991).

4.3 Análisis bromatológicos de los extractos solubles y almidones comerciales.

Maynard *et al.* (1989) indican que el análisis proximal o bromatológico de los alimentos corresponde al esquema químico más empleado para la descripción de alimentos, y comprende seis fracciones: humedad, extracto etéreo, proteína cruda, cenizas, fibra cruda y extracto no nitrogenado, correspondiendo la suma de los dos últimos al total de los carbohidratos del alimento.

Los siguientes datos mostrados en el cuadro 4.1 acerca de los extractos fueron obtenidos de FUNIBER (2012) para papa; Rosales & Tang (1996) para yuca, maíz y arroz, mientras que los datos de almidones comerciales se obtuvieron de cada empaque, excluyendo el de achira obtenido de Espín *et al.* (2001).

Cuadro 4.1: Análisis bromatológicos de los extractos solubles y almidones comerciales obtenidos de bibliografía.

	Extracto de papa	Extracto de yuca	Extracto de arroz	Extracto de maíz	Yuca comercial	Achira comercial	Maíz comercial
CENIZAS (%)	-	2.22	5.03	1.43	-	10.54	-
PROTEINAS (%)	0.10	3.18	11.81	10.02	0.4	4.43	1
CARBOHIDRATOS (%)	80.30	92.08	68.14	78.79	29	75.8	3
FIBRA (%)	0.1	1.54	7.45	3.07	-	8.10	-
GRASA (%)	0.20	0.98	7.57	6.69	0.2	1.13	-
ENERGIA (Kcal/100g)	333	-	-	-	0.35	-	0.35

Fuente: FUNIBER (2012), Rosales & Tang (1996), Espín *et al.* (2001)

Es importante resaltar que los datos obtenidos en el cuadro 4.1 para los extractos solubles son valores de harinas, por lo tanto son más elevados, ya que los valores de extractos siempre serán menores por ser solo la fracción soluble de cada fuente y se descartan una gran cantidad almidón y otros componentes de la harina.

Comparando los resultados obtenidos en el análisis bromatológico de las muestras (tabla 3.4) con los valores reportados en el cuadro 4.1 encontramos que en cuanto a los porcentajes elevados de humedad obtenidos se deben a

que los análisis de extractos y almidones se realizaron en disoluciones, ya que era necesario utilizar la fracción soluble como medio de cultivo para la microalga. Además, no se reportaron valores de fibra y grasa, indicando que las muestras son pobres en porción no digerible de alimentos y en contenido de lípidos o ésteres de los ácidos grasos, fosfolípidos, lecitinas, esteroides, ácidos grasos libres y ceras (Cortés *et al.*, 2010). En cuanto a las cenizas, éstas corresponden al contenido de sales de metales como Ca, Fe, Mn, Co, Mg, etc.

El porcentaje de proteínas obtenido varía dependiendo cada muestra, el mayor valor se obtuvo en extracto de maíz y esto pudo deberse a que algunas variedades de maíz tienen el endospermo harinoso que puede influir en mayores valores de proteína, lo cual está influenciado por la constitución genética (Méndez *et al.*, 2005). En las muestras de papa y yuca comercial no se presentan diferencias, ya que se obtuvo 0.31 y 0.30% respectivamente; estos resultados aunque varían a la mitad de los encontrados con Alvis *et al.* (2008) que son 0.6% para yuca y 0.62% para papa, presentan la misma diferencia entre muestras.

Para los carbohidratos, cuyos componentes principales son el almidón y los azúcares distribuidos de manera particular en cada especie (Espín *et al.*, 2004), los valores más altos se obtuvieron con los almidones comerciales seguidos del extracto de papa. Esto puede deberse que la extracción de almidones en industrias requiere la adición de aditivos directos o indirectos que puede afectar directa o indirectamente a las características del alimento, mientras que el

extracto de papa elaborado de forma casera no contiene ningún aditivo. Fábregas *et al.* (1997b) realizaron análisis a la fracción soluble de papa cruda, y obtuvieron que ésta era rica en carbono orgánico (32.5 mg atom/l). Además, tenía un alto contenido de aminoácidos libres (5.07 mM), glutamina + histidina fueron las más abundantes en el 20,3% del total, seguida por glicina y arginina. En un estudio se realizó un análisis HPLC de la composición de carbohidratos de un hidrolizado de almidón de yuca, obteniendo la relación 25:5:1 de glucosa:maltosa:maltotriosa. Es decir, su porcentaje relativo en el hidrolizado final es 80.65, 16.13 y 3.23% respectivamente. Además, indica que se puede utilizar como fuente de carbono para cultivos mixotróficos y heterotróficos (Wei *et al.*, 2009).

4.4 Ensayo 2: Crecimiento de la microalga con extractos solubles (1%) obtenidos a partir de arroz, yuca y papa en cultivos discontinuos alimentados

Los costos de los componentes del medio de cultivo, que generalmente contiene fertilizantes inorgánicos derivados del petróleo, y los problemas de contaminación ocasionados por el uso de estos fertilizantes se han convertido en una de las principales limitantes de los cultivos de microalgas a escala industrial (Chisti, 2007), por lo tanto con el objetivo de mejorar el costo-beneficio de la producción industrial, diversas microalgas presentan capacidad de ser cultivadas con sustratos orgánicos tales como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, derivados agrícolas o de origen animal, aguas residuales como

fuentes de carbono orgánico y en condiciones mixotróficas (Sánchez *et al.*, 2008). Es así como los sustratos de origen vegetal representan fuentes alternativas en el diseño de medios de cultivo para microalgas con capacidad de crecimiento mixotrófico o heterotrófico (Fábregas *et al.*, 1998).

Los sustratos de origen vegetal, como harinas o extractos líquidos derivados de productos agrícolas, como se ha mencionado anteriormente, representan fuentes alternativas de nutrientes para los medios de cultivo de microalgas con capacidad de crecimiento organotrófico (Fábregas *et al.*, 1998). Pero según Abubakar *et al.* (2012) y Shah (2012) se requieren cultivos puros y una óptima concentración de las sustancias orgánicas para un cultivo saludable de microalgas, de lo contrario habría posibilidad de competición o contaminación de otras especies de microalgas (Mohamad, 2012).

En cultivos mixotróficos y heterotróficos de microalgas, las condiciones de saturación de carbono son de 3 a 5 mM de glucosa; mientras que concentraciones de almidón superiores a 2 g.L⁻¹ inhiben el crecimiento de microalgas (Martínez *et al.*, 1997 y Chojnacka & Noworyta 2004). El almidón es una forma química de depósito de carbono común en la naturaleza, además de una materia prima adecuada para el crecimiento de microorganismos (Cuaresma *et al.*, 2010) y dada su alta disponibilidad para su uso, mediante amilasas, su adición sostiene el crecimiento de microalgas por más tiempo, por lo tanto se puede utilizar como fuente de carbono para el cultivo de *Chlorella emersonii*.

En estudios anteriores (Fábregas *et al.*, 1996a) (Fábregas *et al.*, 1996b) realizados con cultivos mixotróficos con derivados agrícolas, el extracto soluble de papa ha demostrado ser una excelente fuente de nutrientes para el cultivo de microalgas por su alto contenido de aminoácidos, amonio, nitrato, fosfato y carbono. Además, la disponibilidad de nutrientes del extracto de papa depende de la edad del tubérculo, lugar de siembra y las condiciones de almacenamiento (Miedzobrodzka *et al.*, 1992 y Morales, 1996).

En este estudio se evaluó el crecimiento de la microalga *Chlorella emersonii* en cultivos discontinuos alimentados y en condiciones mixotróficas, con diferentes sustratos amiláceos derivados, a partir de extractos obtenidos artesanalmente (papa, yuca, maíz, arroz) como de almidones comerciales (maíz, yuca, achira). Y entre los resultados obtenidos, se confirmó el valor nutritivo del extracto soluble de papa, al aumentar la densidad celular en relación al control autótrofo.

Basándose en los datos obtenidos en la tabla 3.7, se observa que la densidad celular más alta se produjo con papa $41.134 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, seguida de la yuca $39,184 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, control $34.905 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ y arroz $34.081 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$. Lo cual puede ser justificado por la composición de los extractos; ya que el valor nutritivo de la fracción soluble de papa, yuca y arroz es fuertemente dependiente del método de extracción (Fábregas *et al.*, 1996a), y además de la disponibilidad de nutrientes para la microalga depende de la flora bacteriana

asociada e implicada en la biodegradación de cada harina y en la composición química de esta (Fábregas *et al.*, 1996b).

Según los análisis bromatológicos realizados (tabla 3.4), el extracto de papa tiene menor cantidad de humedad, mayor cantidad de proteínas y carbohidratos. Mientras que, el extracto de arroz es todo lo contrario, lo cual proporciona menor cantidad de energía a la microalga para su crecimiento. Por lo tanto, la densidad de células más elevada fue causada por un suministro adecuado de nutrientes. Estos resultados también sugieren que *Graesiella (Chlorella) emersonii* fue capaz de utilizar los extractos solubles como fuente de carbono, nitrógeno y fosfato (Fábregas *et al.*, 1997).

Estos resultados demuestran que el aumento de densidad celular se vio influenciado por el uso de extractos solubles en cultivos discontinuos alimentados y en relación al control, ya que como se puede observar en la figura 3.5, los días en que se agregó medio de cultivo la densidad celular aumentaba considerablemente, mientras que en el día 27 que no se agregó medio de cultivo, el crecimiento fue leve. Aunque con el extracto de arroz no se observaron diferencias, lo cual pudo ser causado por el autoclavado del extracto, ya que probablemente ocasionó la pérdida de nutrientes y/o precipitación de otras sustancias solubles (Fábregas *et al.*, 1996b).

4.5 Ensayo 3: Crecimiento de la microalga con diferentes almidones comerciales y extractos de papa, yuca, maíz y arroz en cultivos discontinuos alimentados (0.5%)

4.5.1 Densidad celular

En este ensayo se cultivó la microalga *Graesiella (Chlorella) emersonii* en condiciones mixotróficas con sustratos amiláceos provenientes de origen vegetal y comercial a una concentración menor que el ensayo anterior. *Chlorella* debido quizás a su pequeño tamaño (3-6 μm) y su alta tasa de crecimiento le permite aprovechar mejor las condiciones de cultivo empleadas (Gómez *et al.*, 2011). Conviene acotar que en este caso los resultados no son comparables con otros autores debido a que no existe bibliografía sobre el crecimiento microalgal con los sustratos amiláceos utilizados y de la microalga usada.

Basándose en los resultados obtenidos como se muestra en la tabla 3.8, estadísticamente se consiguió un mejor resultado con el almidón de maíz seguido por papa sin diferencias significativas, pero como muestra la tabla 3.9 la densidad celular máxima se obtuvo con papa $78.761 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, seguida de arroz $71.272 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, maíz $68.370 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, yuca $57.010 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, yuca comercial $56.186 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, maíz comercial $55.3 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, control $51.026 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ y achira $49.933 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$. Comparando los resultados obtenidos de los extractos de papa, yuca y arroz al 0.5% con los reportados anteriormente al 1%, sugieren que la inducción de diferente concentración de

los extractos afecta el crecimiento microalgal (Wang *et al.*, 2009), ya que se obtuvieron mayores densidades celulares.

Con respecto a los demás sustratos utilizados, como se observa en figura 3.5, en cada tratamiento no se observa un periodo de adaptación (aclimatación), que es necesario para desarrollar los sistemas de transporte específicos necesarios ante las fuentes de carbono de absorción (Pérez *et al.*, 2011). Esto ocurrió debido a que los medios de tratamiento (extractos solubles) fueron relativamente iguales a los medio utilizados anteriormente con las mismas condiciones ambientales, causando que ocurra más rápidamente la fase exponencial (Wan *et al.*, 2012). Según Salih & Haase (2012) las células de microalgas al obtener una adecuada nutrición se pueden dividir hasta 3 veces al día.

Según los análisis bromatológicos realizados (tabla 3.4), el extracto de maíz proporciona la mayor cantidad de proteínas, seguido por la papa y la yuca comercial; mientras que la mayor cantidad de carbohidratos se encuentran en los almidones comerciales, como ya se explico anteriormente. Fábregas *et al.* (1996a) indican que la papa cruda constituye la fuente más rica de nutrientes entre todos los productos agrícolas, aunque el nitrógeno y contenido de fosfato no son suficientes para explicar las altas densidades celulares obtenidas en comparación con el control autotrófico, la presencia de cualquier sustancia termoestable promotora del crecimiento podría ser responsable. Además el efecto de esterilización en autoclave de los extractos probablemente aumentó la

cantidad de hidratos de carbono disponibles como resultado de la hidrólisis de almidón, aunque la presencia de sustancias inhibidoras termolábiles no se pueden descartar (Fábregas *et al.*, 1996b).

En un estudio realizado por Grobbelaar (2007) *Chlorella sorokiniana* creció mixotróficamente durante las horas de luz utilizando glucosa y CO₂, y durante las horas de oscuridad sólo crecía con glucosa. De esta manera, se obtuvieron mayores densidades celulares en menor tiempo.

El crecimiento mixotrófico de *Chlorella emersonii* puede ser influenciado por la disponibilidad y calidad de los nutrientes empleados (Ortiz *et al.*, 2011), como fuentes de nitrógeno y de fosfato orgánicos e inorgánicos, y también otros nutrientes en los extractos solubles y almidones comerciales utilizados en presencia de CO₂. Además, la presencia de la especies de nitrógeno como nitrato, nitrito, amonio y aminoácidos libres que se ha descrito previamente en *S. tuberosum* (Kapoor *et al.*, 1975) (Miedzobrodzka *et al.*, 1992). Ya que si se emplean sustancias fácilmente metabolizables por la microalga, y en el control autotrófico bajos niveles de nitrógeno y fósforo en consecuencia el crecimiento será favorecido en el medio de cultivo mixotrófico (Xu *et al.*, 2006) (Kumar *et al.*, 2010).

La disponibilidad de nutrientes en los extractos solubles también depende del disolvente utilizado para la extracción, siendo mayor cuando se realiza con agua destilada. Cuando no se realiza una buena disolución se produce

conjugados insolubles entre algunas moléculas orgánicas del extracto y sales precipitantes o haciéndose no disponible para la microalga y las bacterias asociadas (Fábregas *et al.*, 1996b). Esto explica la baja densidad celular obtenida con el almidón de achira, maíz comercial y yuca comercial, ya que aunque todos los extractos se realizaron con agua destilada, estos dos almidones no tuvieron una buena solubilidad.

La absorción de nutrientes se produce principalmente por difusión molecular. La tasa de transporte de difusión depende de: el gradiente de concentración, el coeficiente de difusión de los nutrientes y el espesor de la capa límite de difusión. Estos parámetros pueden ser afectados por la microalga, ya que las células pueden controlar las concentraciones de nutriente en la superficie celular, por lo tanto controlan el gradiente de concentración (Riebesell & Wolf-Gladrow, 2002). También se conoce que las altas concentraciones de nutrientes inhiben el crecimiento al inicio de los cultivos (Kong *et al.*, 2009).

En general, en cultivos mixotróficos donde el cultivo es provisto de luz y una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo orgánico, se obtienen concentraciones celulares y velocidades de crecimiento mucho más altas que en cultivos autotróficos (Yang *et al.*, 2000).

4.5.2 Clorofila total

Como se comprobó anteriormente los cultivos mixotróficos alcanzan mayores productividades celulares, pero éstos producen menores cantidades de pigmentos liposolubles (Yang *et al.*, 2000). El uso de una fuente carbonada diferente al CO₂ puede disminuir la tasa fotosintética, lo que produce una disminución de los pigmentos. Además, el aumento de turbidez del medio de cultivo disminuye la fotoinhibición y fotooxidación provocando una disminución en la producción de carotenoides (Tandeau de Masarc & Houmard, 1993a).

La producción clorofila *a* va a depender directamente de la asimilación de nitrógeno (Lehninger, 2005) y de otros nutrientes esenciales como el hierro y el magnesio. De esta manera, la síntesis y acumulación de clorofila puede ser inhibida por la deficiencia de hierro, nitrógeno y magnesio al igual que por la alta intensidad luminosa y abundancia de carbono orgánico en el medio (Abalde *et al.*, 1995). Por lo tanto los bajos valores de clorofila total encontrados en este estudio podrían atribuirse a algunos de estos factores. Al igual que en un estudio realizado por Lewitus & Caron (1991) con *Potriochromonas malhamensis*, donde la adición de glucosa, glicerol y etanol a los cultivos indujo un aumento del crecimiento microalgal, pero una disminución en la concentración de la clorofila; por lo que se propuso un efecto inhibitorio de la síntesis de clorofila debido a la presencia de sustratos orgánicos en el medio de cultivo.

Por otro lado, se ha evidenciado el aumento de los pigmentos fotosintéticos durante el crecimiento mixotrófico en microalgas como *Chlorella*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Spirulina* (*Arthrospira*), pero a bajas concentraciones de los compuestos utilizados como fuente orgánica de nutrientes (Olguín *et al.*, 2001) (Cerón *et al.*, 2005). Esto significa que el efecto de compuestos orgánicos puede variar dependiendo de la microalga, condiciones de cultivo, fuente y concentración de carbono empleada (Pestana & Pestana, 2012). Es decir, la abundancia de carbono orgánico en el medio puede inhibir o estimular la formación clorofila en algunas microalgas (Abalde *et al.*, 1995).

En el presente estudio, aun cuando hubo un ligero incremento del contenido de clorofila en el cultivo control autotrófico, tanto en el día 25 como en el 32 (Tabla 3.10), este cultivo control, apenas superó al cultivo mixotrófico entre 1.0 y 1.1 veces, lo cual sugiere que la síntesis de clorofila en presencia de los sustratos amiláceos utilizados, no es disminuida de una manera significativa; y por lo tanto, el uso de estos extractos de yuca, papa, arroz, maíz mantienen los niveles de clorofila aportando en la biomasa microalgal, también estos pigmentos de importancia económica y medicinal.

4.5.3 Amilasas

Existen factores como la concentración de sustrato, tipo y concentración de la enzima utilizada, y otras condiciones del proceso tales como la temperatura,

el pH, la velocidad de agitación, etc, influyen en el grado de hidrólisis del almidón (Wei *et al.*, 2009). Se ha descrito presencia de actividad de amilasa en condiciones mixotróficas y heterotróficas de *Chlorella sorokiniana*, lo cual demostró la elevada capacidad de esta microalga en condiciones axénicas de expresar una amilasa inducible a la presencia de almidón en el medio de cultivo (Moronta, 2001).

Los resultados sobre la detección de amilasa que se muestran en la tabla 3.14, indican que el mayor halo se produjo con el extracto de maíz como medio de cultivo con 2.17 cm, seguido del arroz con 2.01 cm y yuca de 1.95 cm; no siendo significativamente diferentes. Mientras que con el control autotrófico se obtuvo el menor halo 1.59 cm. Rodríguez (2010) reportó halos de amilasa para *Chlorella* para 3 cepas diferentes: *Chlorella sp 1* con 2.11 cm; *Chlorella sp 2* con 6.9 cm y *Chlorella sp 3* con 1.35 cm,.

Debido al crecimiento fúngico obtenido en las cajas Petri, no se puede asegurar que la expresión de amilasa sea por actividad intrínseca de la microalga, ya que pudo ser por su flora bacteriana asociada, debido a que cultivos mixotróficos de microorganismos fotosintéticos no axénicos, el crecimiento de la flora bacteriana asociada se estimula por la fuente alternativa de carbono en el medio, en este caso los sustratos amiláceos. Por lo que, se establece una competencia interespecífica entre ambos organismos (Ortega *et al.*, 2004).

La inducción de la actividad de exoamilasas constituye otro aporte biotecnológico en el presente trabajo; puesto que la adición de sustratos amiláceos al medio de cultivo induce la producción de estas hidrolasas para la degradación del almidón hasta glucosa y así ser utilizada por la microalga en condiciones mixotróficas (figura 1.6). De tal manera, que se mantiene expresada la amilasa en el cultivo, como para ser aislada o producir sobrenadantes para ser utilizados como fuente de esta enzimas en la industria.

4.5.4 Proteínas y carbohidratos

El valor nutricional de cualquier especie de microalga depende del tamaño de la célula, digestibilidad, producción de componentes tóxicos y la composición bioquímica (Toro, 1989); aunque existen diferencias en la composición entre especies de microalgas, la proteína es siempre el mejor constituyente orgánico (Lavens & Sorgeloos, 1996). Según Whyte (1987) la variación del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos depende del medio nutritivo y de las condiciones de cultivo.

En la tabla 3.14 se observan los resultados que se obtuvieron en este estudio, los cuales representan la importancia que tienen las proporciones de los diferentes macro y micronutrientes en el medio de cultivo. Las menores concentraciones de proteínas obtenidas fueron con arroz 1%, maíz comercial 1.02%, yuca comercial 1.49% y el control autotrófico 1.57%; lo que permite suponer sus deficiencias en concentración de nitrógeno; ya que el nitrógeno es

el principal constituyente de la estructura de las proteínas, y su asimilación por la microalga depende de la salinidad y temperatura (Fábregas *et al.*, 1985). Erazo *et al.* (1989) indican que un bajo contenido de proteínas puede ser atribuido a una deficiencia de nutrientes, específicamente nitratos. Además según estudios realizados con diferentes especies de microalgas (Fábregas *et al.*, 1989), se determinó que el contenido de proteínas se ve afectado por las concentraciones de nutrientes utilizados en los cultivos. Por lo tanto los extractos solubles de papa, maíz, yuca y achira (3.80%, 3.76%, 3.54%, 3.0% de proteínas respectivamente) tienen una fuente de nitrógeno adecuada. Según Fábregas *et al.* (1997b) el extracto de patata contiene fosfato y nitrógeno en forma de ácidos nitrato, nitrito, amonio y aminoácidos, además también era rica en carbono orgánico aunque el contenido de glucosa es bajo. Cabe destacar que la condición no axénica de los cultivos, pudo favorecer el incremento de proteínas por carga bacteriana ante la adición de los sustratos amiláceos (Jonte *et al.*, 2007).

En cuanto a los resultados de carbohidratos obtenidos, se observó que el mayor porcentaje se obtuvo con extracto de yuca 3.11%, seguido de achira 2.36% y el control con 1.45%. Morris *et al.* (1983) indican cambios en el contenido de hidratos de carbono, lípidos y proteínas de fitoplancton cuando existe una limitación de nutrientes. Morales (1996) sugiere que un aumento de la disponibilidad de nutrientes no induce un aumento en la producción de carbohidratos, tal como ocurrió con la microalga *Phaeodactylum tricornutum* al

cultivarla en altas concentraciones de fracción soluble de papa (FSP). Según Harrison *et al.* (1990) una baja concentración de nitrógeno aumenta el porcentaje de hidratos de carbono y reduce el porcentaje de proteínas, lo cual corrobora lo dicho anteriormente.

En un estudio realizado por Ricketts (1966) se demostró que cuando la microalga se cultiva previamente con oscuridad se registra una disminución en el contenido de carbohidratos (el contenido de hidratos de carbono es sólo la mitad de la de las células cultivadas en constante iluminación); además de un descenso en los lípidos. Por lo que parece probable que la mayor parte de hidratos de carbono en cultivos con periodos de luz y oscuridad no esté disponible como alimento de reserva.

El haberse logrado un incremento en el contenido de proteínas en la biomasa microalgal con papa, yuca y maíz y de carbohidratos cuando es adicionado el extracto de yuca, en relación al control, sugiere un aporte o valor agregado a la biomasa microalgal producida en condiciones mixotróficas, por lo cual se recomienda el uso de fuentes amiláceas, incluso de residuales para la producción de biomasa con potencial como complemento alimenticio.

CAPÍTULO 5:

CONCLUSIONES

1. Se determinó mediante clave microscópica que la microalga aislada de una muestra de una planta ornamental cultivada en una recipiente de forma casera en Quito en la provincia de Pichincha corresponde a *Graesiella emersonii* sinónimo de *Chlorella emersonii*.
2. El fertilizante comercial Nitrofoska se encuentra dentro de las proporciones atómicas N:P óptimas para el crecimiento de microalgas de agua dulce. Con la concentración 3mL.L^{-1} se obtuvo la densidad celular máxima con $57.017 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, en relación con las concentraciones 0.5 mL.L^{-1} y 1 mL.L^{-1} donde se obtuvo $36.720 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ y $43.312 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ respectivamente ($p < 0.0001$).
3. Los medios de cultivo enriquecidos con extracto solubles al 1% (v/v) en cultivos discontinuos alimentados indicaron que se produce la densidad celular máxima ($p = 0.0001$) con extracto soluble de papa y yuca ($41.134 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ y $39.184 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ respectivamente) en relación con el control autotrófico ($34.905 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$), mientras que con el arroz se obtuvo la menor densidad celular ($34.081 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$).

4. Una óptima concentración de sustancias orgánicas es importante para el cultivo microalgal, por lo que se probó condiciones mixotróficas con sustratos amiláceos provenientes de origen vegetal y comercial a 0.5% obteniendo la densidad celular máxima ($p < 0.0001$) con papa $78.761 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, seguida de arroz $71.272 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, maíz $68.370 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, yuca $57.010 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, yuca comercial $56.186 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, maíz comercial $55.3 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, control autotrófico $51.026 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ y achira $49.933 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$.
5. Los resultados del análisis proximal indicaron que el mayor porcentaje de proteínas se obtuvo con el extracto de maíz 0.66%, seguido por papa 0.31%, yuca comercial 0.30%, y achira y maíz comercial con 0.22%; mientras que en carbohidratos el mayor porcentaje se obtuvo en maíz comercial 4.28%, seguido de achira 3.83%, yuca comercial 3.28% y papa 3.09%.
6. La microalga *Graesiella emersonii* demostró actividad amilasa en presencia de sustratos amiláceos, obteniendo el mayor halo (2.17 cm) con el cultivo de extracto soluble de maíz al 0.5%.
7. El hecho de que el cultivo control, apenas superó al cultivo mixotrófico entre 1.0 y 1.1 veces; sugiere que la síntesis de clorofila en presencia de los

sustratos amiláceos utilizados, no es disminuida de una manera significativa.

8. La concentración de proteínas y carbohidratos obtenida con cultivos mixotróficos fue superior a la obtenida con el cultivo autotrófico. Para proteínas se obtuvieron los siguientes resultados: papa 3.80%; maíz 3.76%; yuca 3.54%; achira 3% y control 1.57%; mientras que para carbohidratos fueron yuca 3.11%, seguido de achira 2.36% y el control con 1.45%.

9. Se demuestra que la microalga *Chlorella emersonii* es capaz de crecer mixotróficamente en cultivos discontinuos alimentados con sustratos amiláceos, para la producción de biomasa microalgal enriquecida con proteínas y con actividad de amilasas extracelulares.

CAPÍTULO 6:

RECOMENDACIONES

1. Realizar análisis moleculares para confirmar que la microalga utilizada corresponde a *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*).
2. Evaluar el potencial de *Chlorella emersonii* para crecer en condiciones de heterotrofia con sustratos amiláceos analizando diferentes ciclos de luz/oscuridad (6:18, 0:24) para corroborar el comportamiento heterotrófico del cultivo y la posibilidad de aumentar las productividades
3. Evaluar la composición bioquímica y proximal de la biomasa producida con cada medio de cultivo enriquecido con sustratos amiláceos, para determinar las proporciones de proteínas, carbohidratos, lípidos, cenizas, entre otros.
4. Determinar las bacterias asociadas en los cultivos autotróficos, mixotróficos, en los extractos solubles y almidones comerciales.
5. Realizar análisis de carbono, nitrógeno y fósforo a los extractos solubles y almidones comerciales.

6. Determinar de manera cualitativa y cuantitativa la cantidad de almidón presente en los cultivos.
7. Realizar pruebas de toxicidad para utilizar esta microalga como suplemento alimenticio.
8. Al trabajar con cultivos mixotróficos con sustratos amiláceos se recomienda utilizar cultivos discontinuos alimentados, para obtener una mayor producción celular.
9. Realizar más estudios sobre la producción, extracción y purificación de amilasas de esta microalga.
10. Utilizar esta microalga para estudios de biorremediación, ya que se conoce su capacidad mixotrófica, por lo tanto es posible su crecimiento en efluentes.
11. Realizar estudios de esta microalga para la producción de biocombustibles, debido a que existen muchas especies de este género que son utilizadas de forma organotrófica para este fin.

CAPÍTULO 7:

BIBLIOGRAFÍA

AGROBIO. (Junio de 2004). Recuperado el 8 de Abril de 2013, de www.agrobio.org/bioboletines.php?id=34

Abalde, A., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., & Herrero, C. (1995). *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. Departamento de Biología Celular y Molecular. Universidad de Da Coruña.

Abubakar, L., Mutie, A., Kenya, E., & Muhoho, A. (2012). Characterization of algae oil (oilgae) and its potential as biofuel in Kenya. *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation*1, 147-153.

Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., & Guyot, J. (2000). Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010, an amyolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27:406-413.

Alba-Lois, L., Rodarte, B., Osorio, K., Segal, C., Leon-Tejera, H., & Montejano, G. (2008). *Caracterización Molecular de Cianobacterias de la Región Central de México*. México : Facultad de Ciencias, UNAM. Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria.

- Alvarez, H. (1994). Introducción al método ficológico. Folleto de Algas. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Alvear, M., Castillo, C., & Henao, D. (2011). Evaluación del pH y concentración del nitrógeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella* nativa como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel. Cartagena de Indias.
- Alvis, A., Vélez, C., Villada, H., & Rada, M. (2008). Análisis Físico-Químico y morfológico de almidones de ñame, yuca y papa y determinación de la viscosidad de las pastas. Información Tecnológica Vol. 19 N° 1, 19-28.
- Aristizábal, J., Sánchez, T., & Mejía, D. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Roma, Italia: Boletín de servicios agrícolas de la FAO.
- Arredondo, B., & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Baja California Sur: Edgar Yuen Sánchez.
- Arrieta, E. (2008). Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, Volumen 14.

- Asgher, M., Javaid, M., Rahman, S., & Legge, R. (2006). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 950.
- Badui, S. (1999). *Química de los alimentos*. Mexico: Alhambra Mexicana.
- Bark, M. (2012). Cultivation of eleven different species of freshwater microalgae using simulated flue gas mimicking effluents from paper mills as carbon source. Gothenburg, Suecia.
- BASF. (1978). *Abonado Foliar con Nitrofoska Foliar*. Folleto de Fertilizantes. BASF Aktiengesellschaft. Ludwigshafen. República Federal de Alemania, pp. 19.
- Becker, E. (1994). *Biotechnology and Microbiology*. 293. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bello, J. (2000). Almidón de arroz. En *Ciencia bromatológica*. Principios generales de los alimentos. Madrid: Díaz de Santos.
- Benavente, J., Montañez, J., Aguilar, C., Méndez, A., & Valdivia, B. (2012). *Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores*. Saltillo, Coahuila, Mexico: Acta Química Mexicana.
- Bermúdez, J. L., Sánchez, G., Fuenmayor, G., & Morales, E. (2003). Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de pigmentos de

la microalga marina *Chroomonas* sp. CIENCIA. Laboratorio de Bioquímica y Microorganismos Fotosintéticos, Dpto de Biología, Universidad de Zulia. Maracaibo-Venezuela.

Bertl, A., Felle, H., & Bentrup, F. (1984). Amine transport in *Riccia fluitans*. *Plant Physiol*, 76:75-78.

Boney, A. (1989). *Phytoplankton*. London: Edward Arnold. pp 118.

Brenan, M., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577.

Brito. (2000). Efecto de dos salinidades y dos temperaturas en el crecimiento y composición química proximal de *Nitzchia* cf. *closterium* (Bacillariophyceae) cultivada con un fertilizante agrícola comercial. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente. Boca del Río, Venezuela.

Brito, D., Castro, A., Colivet, J., Gómez, E., Mora, R. (2013). Cinética de crecimiento de un cultivo mixto de las microalgas *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*. *INTERCIENCIA*. Vol. 38 N° 08: 605-608.

Brito, D., Milani, N., Pereira, G., González, M., & Morán, R. (Diciembre de 2006). Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska. Venezuela.

- Burczyk, J., & Loos, E. (1995). Cell wall-bound Enzymatic Activities in *Chlorella* and *Scenedesmus*. *J. Plant Physiol*, 146:748-750.
- Camargo, J., & Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32: 831-849.
- Carrera, J. (2003). Producción y aplicación de las enzimas industriales. *Revista de Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 10-11.
- Carrillo, L. (2003). *Microbiología Agrícola*. Universidad Nacional de Salta.
- Carvajal, A. (2013). Aislamiento y evaluación de la producción de carotenoides de la microalga *Chlorococcum sp.* en cultivo discontinuo con diferentes medios y fuentes de nitrato. Sangolquí, Ecuador: Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE.
- Castro, C., Navas, C., Caro, O., & Piñeros, Y. (2008). Obtención de amilasas fúngicas a partir de *Aspergillus sp.* aislado de semillas de lentejas. Bogotá, Colombia: Universidad Jorge Tadeo Lozano.
- Cerón, M., Sánchez, A., Fernández, J., Molina, E., & García, F. (2005). Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricomutum*. Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Proc. Biochem*, 40:297-305.

- Cheftel, J., & Cheftel, H. (1978). Granos vegetales. En *Introducción a la bioquímica y tecnología de alimentos* (pág. 99). Zaragoza: Acribia.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R., & Das, K. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Biosource Technology*, 101: 3097-3105.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances.*, 25: 294-306.
- Chojnacka, K., & Noworyta, A. (2004). Evaluation of *Spirulina sp.* growth in photoautotrophic heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb Technol*, 34:461-465.
- Cohen, Z. (1986). Products of Microalgae. *Handbook of Microalgae Mass Culture*, 41, 453.
- Compo Expert. Nitrofoska Foliar PS. Recuperado el 15 de Febrero de 2014, de http://www.compoexpert.com/fileadmin/user_upload/compo_expert/ar/documents/pdf/nitrofoska_foliar_ps_25-10-17.5.pdf
- Contreras, A. (1997). Producción de papa-semilla para pequeños agricultores del sur de Chile. Chile: 2° ed. Valdivia.
- Cortés, C., Quiñones, L., & Hernández, C. (14 de Diciembre de 2010). Caracterización fitoquímica y bromatológica de *Dichapetalum*

spruceanum vell.affinis planta silvestre de la Orinoquia Colombiana y sus potencialidades de uso. Recuperado el 21 de Diciembre de 2013, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89622691005>

Crueger, W., Crueger, A. (1993) *Biotechnologia. Manual de microbiología Industrial*. Zaragoza. España. Editorial Acribia.

Cuaresma, M., Casal, C., Forján, E., & Vilchez, C. (2010). Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems. España: International Centre for Environmental Research (CIECEM).

Cubas, P. (2008). Algas eucariotas. *Botánica*, págs. 3, 6.

Derner, R., Ohse, S., Villela, M., DeCarvalho, S., & Fett, R. (2006). *Ciencia Rural*. 1959-1967.

Des Abbayes, H., Gaussen, H., Chadefaud, M., Grassé, P., Feldmann, J., & Prévot, A. (1989). *BOTANICA vegetales inferiores*. (págs. 266-267). Barcelona: Editorial reverté.

Devore, J. (2008). *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias*. México: Cengage Learning Editores.

- Días, L. (1997). Rendimiento y caracterización de almidón de frutos de castaño y araucaria. 53. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Durand-Chastel, H. (1980). *Algae Biomass*. Amsterdam: Elsevier/North-Jolland Biomedical Press.
- Durango, E. (Junio de 2008). Producción de enzima amilasa microbiana mediante fermentación en sustrato líquido. Monteiro, Cordoba: Universidad Pontificia Bolivariana.
- Erazo, S., Prosa, P., Viani, M., & Muller, K. (1989). Estudio de la biomasa y de los pigmentos carotenoides en una especie nativa de la microalga *Dunaliella salina* sp. *Rev. Agroquím. Tecnología de Alimentos*, 29(4): 538-547.
- Espín, S., Brito, B., Villacrés, E., Rubio, A., Nieto, C., & Grijalva, J. (2001). Composición química, valor nutricional y usos potenciales de siete especies de raíces y tubérculos andinos. *Acta Científica Ecuatoriana*, Volumen 7 Número 1, p. 49. Ambato, Ecuador.

- Espín, S., Villacrés, E., & Brito, B. (2004). Caracterización físico-química, nutricional y funcional de raíces y tubérculos andinos. Raíces y tubérculos andinos, alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Barrera, B.
- Fábregas, J., Abalde, J., & Herrero, C. (1989). Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentration as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, 83: 289-304.
- Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J., & Cabezas, B. (1985). Growth chlorophylla and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 50:1-11.
- Fábregas, J., Morales, E., Arán, J., & Otero, A. (1998). Germinated *Solanum tuberosum* an agricultural product for marine microalgae culture. *Biores Technol*, 66:19-24.
- Fábregas, J., Morales, E., García, D., Cabezas, B., & Otero, A. (1997a). The soluble fraction of *Solanum tuberosum* enhances growth and pigmentation of the microalga *Tetraselmis suecica* under Photoheterotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 263-266.

- Fábregas, J., Morales, E., Lamela, T., Cabezas, B., & Otero, A. (1997b). Mixotrophic Productivity of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* cultured with soluble fractions of fye, wheat and potato. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 349-351.
- Fábregas, J., Morales, E., Polanco, N., Patiño, M., & Otero, A. (1996a). Soluble fractions of *Solanum tuberosum* enhance cell and pigment production of semi-continuous cultures of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Microbiology*, 23: 223-226.
- Fábregas, J., Morales, E., Polanco, N., Patiño, M., Otero, A., & Tobar, J. (1996b). Use of agricultural surpluses for production of biomass by marine microalgae. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12:47-49.
- Faiguenbaum, H. (1987). *Producción de cultivos en Chile*. Chile: Torrelodones.
- FUNIBER. (2012). Base de datos internacional de composición de alimentos. Composición nutricional. Recuperado el 21 de Diciembre de 2013, de Fundación Universitaria Iberoamericana: <http://www.funiber.org.ec/>
- García, D. (1988). *Productos biotecnológicos de microalgas marinas*. Tesis Doctoral. Universidad Santiago de Compostela. España, pp 181.

- Garibay, A., Vázquez, R., Sánchez, M. d., Serrano, L., & Martínez, A. (2009). Biodiesel a Partir de Microalgas. *BioTecnología.*, 42-44. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Geider, R., & MacIntyre, H. (2002). Chapter 3 Physiology and Biochemistry of Photosynthesis and Algal Carbon Acquisition. *Phytoplankton Productivity Carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems*, pp. 44-77. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Gliessman, S. (2002). Agroecología: Procesos ecológicos en agricultura sostenible. Turrialba. C.R.: CATIE, 47, 359.
- Gómez, O., Rodríguez, R., & Subero, S. (2011). Cultivo polialgal (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella sp.* y *tetraselmis chuii*) en medios nutritivo sno convencionales. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela.
- González, M. (2000). Alternativas en el cultivo de microalgas. Guayaquil, Guayas, Ecuador.
- Grobbelaar, J. (2007). Algal Nutrition, Mineral Nutrition. *Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology*, pp. 97-115. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Guiry in Guiry, M., & Guiry, G. (26 de Mayo de 2013). AlgaeBase. Recuperado el Mayo de 2013, de

http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=46099&-session=abv4:BA2E309F0cd8538743RXN3AEF23C

Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. México: Mc Graw Hill.

Harrison, P., Thompson, P., & Calderwood, G. (1990). Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *J. Appl. Phycol*, 2: 45-56.

Hernández, J., & Cruz, A. (1993). Boletín informático sobre el uso de subproductos: Gallinaza. 5. San José, Costa Rica: Ministerio de Agricultura y Ganadería.

Herrero, C., Cid, A., Fábregas, J. (1991). Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacult. Eng.* 10:99-110.

Hodaifa, G., Pacheco, R., Martínez, M. E., & Sánchez, S. (2004). Aprovechamiento de alpechines en la producción de biomasa de *Scenedesmus obliquus*. Disminución del efecto inhibitor. Universidad de Jaén.

Humphrey, G. F. (1979). Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light-dark regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 40:63-70.

- Ichimura, T. (1971). Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. Proceedings of the Seventh International Seaweed Symposium, p. 208-214. Tokyo: University of Tokyo Press.
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J., Barrios, F., & Zapata, C. (20 de 07 de 2011). Propagación de la microalga *Chlorella sp.* en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. Barranquilla, Colombia.
- John, D., Whitton, B., & Brook, A. (2002). The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae, p. 335. Madrid, España: Cambridge.
- Jonte, L., Morales, E., Martinez, M. (Marzo de 2008). Producción de exopolisacáridos y pigmentos a partir de cultivos de la cianobacteria *Phormidium sp.* Maracaibo, Venezuela.
- Jonte, L., Rosales, N., Yépez, M., Briceño, B., & Morales, E. (Marzo de 2007). Respuesta de la cianobacteria *Synechocystis minúscula* a sustratos orgánicos en condiciones mixotróficas. Maracaibo, Venezuela.
- Kanno, T., & Kazie, U. (2005). *Chlorella vulgaris* and *Chlorella vulgaris* extract (CVE): The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. Woodland Publishing.

- Kapoor, A., Desborough, S., & Li, P. (1975). Extraction of nonprotein nitrogen from potato tuber and its amino acid composition. *Potato Research*, 18, 582-587.
- Kessler, E. (1978). Physiological and Biochemical Contributions to the Taxonomy of the Genus *Chlorella*. *Arch. Microbiol.*, 119, 13-16.
- Kirst, G. O. (1989). Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40:21-53.
- Knud-Hanses, C. (1998). Pond fertilization: Ecological approach and practical application. Pond dynamics/aquaculture collaborative research support program. State University of Oregon.
- Kong, Q., Li, L., Martinez, B., Chen, P., & Ruan, R. (2009). Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Wastewater for Biomass Feedstock Production. *Appl Biochem Biotechnol* 160, 9-18.
- Kudo, T., & Ichihara, M. (27 de Junio de 2012). Copyright Japan Society for Culture Collections (JSCC). Recuperado el 21 de Diciembre de 2013, de <http://www.nbrc.nite.go.jp/jsccl/idb/strains?Snt=0&Sn=Chlorella+emersonii>
- Kumar, M., Miao, Z., & Wyatt, S. (2010). Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in

digested piggery effluent culture medium. *Bioresource Technology*, 101 (15): 6012-6018.

Laing, I., & Ayala, F. (1990). Commercial mass culture techniques for producing microalgae. En *Introduction to Applied Phycology* (págs. 447-477). SPB Academic Publishing.

Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1996). Manual on the production and use of live food aquaculture. Editado por Food and Agriculture Organization of the United Nations, 375 pp. Belgium, Bélgica.

Lee, C. (1999). Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors. *Biotechnol. Bioprocess Eng*, 4, 78-81.

Lee, H., & Erickson, L. (1987). *Biotechnol Bioeng*. 476-481.

Lehninger, A. (2005). *Principios de Bioquímica*. 4ta ed. 1119 pp. Barcelona, España: Ediciones Omega.

Lewitus, A., & Caron, D. (1991). *Plant cell Physiol*. 32(5): 671-680.

Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett*, 31:1043-1049.

López, S., & Catzim, L. (2000). *Microalgas dulceacuícolas*. Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán.

- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-272.
- Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundman, P., Paulin, L., y otros. (2001). Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. 51, 513-526. *Internat.J.Syst.Evol.Microbiol.*
- Madigan, M; Martinko, J; Parker, J (2004). Brock, *Biología de los microorganismos (Vol II)*. Madrid: Pearson Prentice Hall.
- Magazine. (2010). *Microalgas para la producción de biocombustibles y otras aplicaciones: una revisión*. Panaroma acuícola.
- Mandujano, A. M., Feliz, A. A., & Martínez, A. M. (1981). *Biogas. Energía y fertilizantes a partir de desechos orgánicos*. Manual el promotor de la tecnología. OLADE: Serie Publicaciones Especiales No. 6, 41.
- Mar, M. d. (23 de Abril de 2012). *Ingeniería Química de las Microalgas. Cultivo de microalgas*. Mexico.
- Marián, F. (2002). *Mixotrofia y actividad biosintética de ácidos grasos e interacción poliaminas-glicerol durante el crecimiento y desarrollo de macroalgas marinas in vitro*. España: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

- Martin, F. (2010). Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. Tesis de Maestría en Ingeniería. Singapur: National University of Singapore.
- Martínez, A. (Enero de 2010). Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta: Volvocales) cultivada en diferentes medios. México.
- Martínez, M., Camacho, F., Jiménez, J., & Espínola, J. (1997). Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of *Chlorella pyrenoidosa* mixotrophic growth. *Process Biochem*, 32:93-98.
- Maynard, L. (1989). *Nutrición Animal*. 7ma. Edición. México: Editorial Mc GRAW-HILL. 640 pp.
- Mcanallys, L., Ocampo, F., & García, L. (1992). Efecto de la microalga *Pavlova lutheri* (Drop) Hibberd cultivada con fertilizantes agrícolas en el crecimiento y supervivencia de las post-larvas de mejillón *Mytilus edulis*. *Cs. Mar.*, 18 (4): 57-74.
- Méndez, G., Solorza, F., Velásquez, V., Gómez, M., Paredes, L., & Bello, P. (2005). Composición química y caracterización calorimétrica de híbridos y variedades de maíz cultivadas en México. *Agrociencia*, 39:267-274.

- Mendiola, J., Rodríguez, I., Seliráns, F., Reglero, G., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2008). Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry, 3301-3309.
- Mendoza, H., Jara, A., & Portillo, E. (Marzo de 2011). Planta piloto de cultivo de microalgas. Desarrollo potencial de nuevas actividades económicas asociadas a la biotecnología en Canarias. Santa Cruz de Tenerife.
- Miedzobrodzka, A., Cieslik, E., Sikora, E., & Leszczynska, T. (1992). The effect of environment conditions on the level of nitrates and nitrites in various varieties of potato. Pol. J. Food Nutr. Sci., 1, 45-56.
- Mohamad, A. (2012). Heterotrophic growth of *Ankistrodesmus* sp. for lipid production using cassava starch hydrolysate as a carbon source. The International Journal of Biotechnology, 2(1): 42-51.
- Morales, E. (1996). Productos agrícolas para el cultivo de microalgas marinas. España: Tesis Doctoral, Universidad Santiago de Compostela.
- Moronta, R. (Noviembre de 2001). Caracterización bioquímica y fisiológica de la microalga autóctona *Chlorella* sp. en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas estudio de su flora microbiana asociada. Maracaibo, Venezuela.

- Moronta, R., Mora, R., & Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. Scielo, 1-19.
- Morris, H., Quintana, M., Almarales, A., & Hernández, L. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. Rev. Cubana Aliment. Nutr., 13(2): 123-128.
- Morris, R., McCartney, M., & Robinson, G. (1983). Studies of a spring phytoplankton bloom in an enclosed experimental ecosystem. Biochemical changes in relation to the nutrient chemistry of water. J. Exp.Mar. Bio. Ecol., 70: 249-262.
- Mundo Alimentario. (2005). Aplicación de las enzimas en la producción industrial. Recuperado el 25 de Junio de 2013, de http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MA002_enzimas4WSF.pdf
- Myers, J., & Burr, G. (1940). Studies on photosynthesis, some effects of light of high intensity on *Chlorella*. J Gen Physiol, 24:45-67.
- Nahvi, I., & Emtiazi, G. (2003). Production of Amylase by Flocculant Yeast. Pakistan Journal of Biological Sciences.

- Negrón, M. (2009). Crecimiento bacteriano. En *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica* (págs. 46-48). Argentina: Médica Panamericana S.A.
- Newmark, F., Criales, M., Blanco, J. (1989). Estandarización del cultivo de seis cepas de microalgas con cuatro medios de crecimiento. Mem. III Reunión Red Nacional de Acuicultura. Cali, Colombia. pp. 149-161.
- Nielson, A., Blankley, F., & Lewin, R. (1973). *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, 275-285.
- Nieves, M., Cortés, R., Gutiérrez, C., & Pacheco, M. (1994). Producción de fitoplancton a bajo costo. Aislamiento y cultivo de *Monoraphidium* sp (*Chlorophyceae*) en un sistema estático en medio F y cuatro a base de fertilizantes agrícolas. México: Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.
- Olaizola, M. (2003). *Biomolecular Engineering*. 459-466.
- Olguín, E., Galicia, S., Angulo, O., & Hernández, E. (2001). The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spitulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Biores. Technol*, 77:19-24.
- Orellana, L. (2001). *Estadística Descriptiva*. 1: 1-64.

- Ortega, J., Moronta, R., & Morales, E. (2004). Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella sp.* Ciencia, 12:25-31.
- Ortiz, M., Cortés, C., Sánchez, J., Padilla, J., & Otero, A. (2011). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. Villavicencio, Meta, Colombia.
- Padilla, P. (1996). Técnica de ensilado biológico de residuos de pescado para ración animal. Folia Amazónica.
- Paliwal, R. (2001). El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Roma, Italia.
- Pérez, O., Escalante, F., de-Bashan, L., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Water Res., 45(1): 11-36.
- Pestana, R., & Pestana, R. (2012). Producción de microalgas *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 usando como sustrato glicerol residual a escala laboratorio. Bucaramanga , Colombia.
- Ponne, G. (2001). Crecimiento y asimilación de compuestos nitrogenados y fosfatos de *Tetraselmis chuii* cultivada con el fertilizante agrícola

comercial Nitrofoska foliar. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente.
Boca del Río, Venezuela.

Portilla, A. (2010). Evaluación del rendimiento de producción de aceite en cuatro Microalgas nativas de las Provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha en diferentes condiciones de luminancia y de medio de cultivo a nivel de laboratorio. Sangolquí, Ecuador: Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE.

Posada, J., Naranjo, J., Lopez, J., Higueta, J., & Cardona, C. (2011). Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*, 310-317.

Prescott, Harley, & Klein. (2004). Crecimiento bacteriano. En *Microbiología*. McGraw-Hill Interamericana.

Provasoli, L., & Pintner, I. (1959). Artificial media for fresh-water algae: problems and suggestions. *The Ecology of Algae*, p. 84-96. Pittsburgh: Tryon C. A., Jr. & Hartmann, R. T., Pymatuning Laboratory of Field Biology University of Pittsburgh.

Pulz, O., & Scheinbenbogan, K. (1998). Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 59, 123-152.

- Rabinowitch, E. (1961). Spectral efficiency of photosynthesis. En *Medical and Biological Aspects of the Energies of Space* (págs. 274-298). New York, NY: Campbell, P. A.
- Richmond, A. (1986). Outdoor mass cultures of microalgae. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Florida: CRC Press Inc. Boca Raton.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science.
- Richmond, A., & Becker, E. (1986). Technological aspects of mass cultivation. *Handbook of Microalgal Mass Culture.*, 25-44.
- Ricketts, T. (1966). On the chemical composition of some unicellular algae. *Phytochem*, 5: 67-76.
- Riebesell, U., & Wolf-Gladrow, D. (2002). Chapter 5 Supply and Uptake of Inorganic Nutrients. *Phytoplankton Productivity Carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems*, pp. 109-140. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & García, J. (2005). *Bacteriología General. Principios y prácticas de laboratorio*. Universidad de Costa Rica.

- Rodríguez, G., García, H., Camacho, J., & Arias, F. (Julio de 2013). Almidón de Achira o Sagú (*Canna edulis*, Ker). Manual Técnico para su elaboración. Tibaitatá, Colombia.
- Rodríguez, S. (Julio de 2010). Evaluación de microalgas y de bacterias asociadas productoras de exoenzimas para tratamiento de aguas residuales de una extractora de aceite de palma. Maracaibo, Venezuela.
- Rojas, J., Chalá, V., & Rendon, L. (2011). Producción de proteína a partir de algas. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia.
- Rosales. (Febrero de 2005). Producción de amilasas por *Chlorella sorokiniana* utilizando derivados de productos agrícolas. Maracaibo, Venezuela.
- Rosales, J., Tang, T. (1996). Composición química y digestibilidad de insumos alimenticios de la zona de Ucayali. Floia Amazónica. Vol. 8 (2).
- Ruiz, A. (Abril de 2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Valencia, España.
- Ruiz, E. (14 de Febrero de 2012). Obtención y purificación de ficoeritrina mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido. Escalado del proceso, caracterización fisicoquímica y aplicación como colorante natural. Linares, España: Universidad de Jaén.

- Salih, F., & Haase, R. (2012). Potentials of microalgal biofuel production. *Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels*, 3, 1-4.
- Sánchez, H., Juscamaita, J., Vargas, J., & Oliveros, R. (10 de Julio de 2008). Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. Lima.
- Sánchez, S., Martínez, M. E., Espejo, M. T., Pacheco, R., Espinola, F., & Hodaifa, G. (2001). Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium. *Journal of Applied Phycology*, 13:443-449.
- Schanz, F., & Zahler, U. (1981). Prediction of algal growth in batch cultures. *Schweiz z. Hydrobiol*, págs. 43: 103-113.
- Sevrin-Reyssac, J. (1998). Biotreatment of swine manure by production of aquatic valuable biomasses. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 68:177-186.
- Shah, D. (2012). Effect of glucose supplementation on nighttime biomass loss and productivity of microalgae *Chlorella*, submitted in partial fulfillment of requirements for the degree. Masters of Science in Chemical Engineering at the Cleveland State University.
- Stephens, E., & Ross, I. (2010). Future prospects of microalgal biofuels production systems,. *Trends in plant science*, 15, 554-564.

- Taiganides, E. P. (1978). Principles and techniques of animal waste management and utilization. *FAO Soils Bulletin*, 36:341-362.
- Tandeau de Marsac, N., & Houmard, J. (1993a). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol Rev.*, 104:119-190.
- Tandeau de Marsac, N., & Houmard, J. (1993b). Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. *Methods Enzymol*, 167:318-328.
- Toro, J. (1989). The growth rate of two species of microalgae used in shellfish hatcheries cultured under two light regimes. *Aquac. Fish Manag.*, 20:249-254.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buena Aires - Argentina: Médica Panamericana.
- Tovar, F. (31 de Octubre de 2012). Análisis de procesos microbiológicos. Cultivo Industrial de Microorganismos. Recuperado el Marzo de 2013, de [WordPress.com: http://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/10/31/cultivo-industrial-de-microorganismos-tipos-de-cultivo/](http://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/10/31/cultivo-industrial-de-microorganismos-tipos-de-cultivo/)
- Ukeles, R., & Rose, W. (1976). Observations on organic carbon utilization by photosynthetic marine microalgae. *Marine Biology*, 37:11-28.

- Uribe, E. (1994). Tecnología de Cultivo de microalga. 7º Curso Internacional, Cultivo de Moluscos. Coquimbo, Chile.
- Van Baalen, C., & Pulich, W. (1973). Critical Reviews in Microbiology. 229-255.
- Van Beilen, J. (2010). Why microalgal biofuels won't save the internal combustion machine. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4:41-52.
- Vazquez, J. (1994). Los residuos orgánicos y la actividad agropecuaria. *Medio Ambiente*, 82-84.
- Villa, M., Solbas, A., & García, J. (2006). Nuevos alimentos funcionales a partir de microalgas. Departamento de Ingeniería y Procesos.
- Wan, J., Fu, R., & Pei, G. (2012). A study on lipid production of the mixotrophic microalgae *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 1041-1047.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Liu, Y., & Wang, Y. (2009). Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. USA: Springer Science.
- Wehr, J., & Sheath, R. (2003). Freshwater algae of North America: Ecology and classification. Aquatic Ecology Series. San Diego: Academic Press.
- Wei, A., Zhang, X., Wei, D., & Chen, G. (2009). Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic

microalgae *Chlorella protothecoides*. *Microbiol Biotechnol*, 36:1383-1389.

Wellburn, A. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol*, 144 (3):307-313.

Whyte, J. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60: 231-241.

Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126:499-507.

Yang, C., Hua, Q., & Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mmixotrophic and cyclic light-autotrophic/darkheterotrophic conditions. *Biochem. Eng. J.*, 6:87-102.

Yodochi, T., Honda, D., Higashihara, T., & Nakahara, T. (1998). OptimisationSR21 of decosahexaeonic acid production by *Schizochytrium limacimum* . *Appl Microbiol Biotechnol*, 49:72-76.