

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris* ENRIQUECIENDO EL MEDIO DE CULTIVO CON FUENTES DE NITRÓGENO

LEIDY JOHANNA MURCIA MORENO
MARIA ALEJANDRA PARRA MORENO

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C
2018

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris* ENRIQUECIENDO EL MEDIO DE CULTIVO CON FUENTES DE NITRÓGENO

LEIDY JOHANNA MURCIA MORENO
MARIA ALEJANDRA PARRA MORENO

Proyecto integral de grado para optar el título de
INGENIERO QUÍMICO

Director
DIEGO RUBIO FERNANDEZ
Biólogo

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTA D.C.
2018

Nota de aceptación

Firma Docente Investigador

Firma Docente Jurado 1

Firma Docente Jurado 2

Bogotá, D.C., Marzo de 2018

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectoría Académica y de Posgrados

Dr. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCÍA-PEÑA

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ

Las directivas de la Universidad de América, los jurados, calificadores y el cuerpo de docentes no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecemos a la Fundación Universidad de América por brindarnos las herramientas y conocimientos necesarios para el desarrollo de este trabajo y dejarnos ser parte del grupo de investigación BIOTECFUA, permitiéndonos ver la oportunidad que existe en la aplicabilidad de microorganismos como las microalgas en la industria.

Agradecemos a nuestro director, Diego Rubio, por brindarnos los consejos y conocimientos adquiridos a lo largo de su experiencia profesional para llevar a buen término este trabajo de investigación

Por último, agradecemos a nuestros padres por su apoyo incondicional y por creer en nosotras, además agradecemos la colaboración de los docentes que atendieron amablemente las consultas e inquietudes, en especial al Ingeniero Químico Diego Nicolás Rodríguez.

CONTENIDO

| | pág. |
|---|------|
| INTRODUCCIÓN | 18 |
| OBJETIVOS | 20 |
| 1. MARCO TEÓRICO | 21 |
| 1.1 METABOLISMO DE MICROORGANISMOS | 21 |
| 1.1.1 Metabolitos primarios | 21 |
| 1.1.2 Metabolitos secundarios | 21 |
| 1.2 MICROALGAS | 22 |
| 1.2.1 Crecimiento de microalgas | 23 |
| 1.3 CONDICIONES DE CULTIVO | 24 |
| 1.3.1 pH | 25 |
| 1.3.2 Luz | 25 |
| 1.3.3 Temperatura | 25 |
| 1.4 NUTRICIÓN MICROALGAL | 25 |
| 1.4.1 Nitrógeno | 26 |
| 1.5 METABOLISMO DE MICROALGAS | 26 |
| 1.5.1 Metabolitos en microalgas | 27 |
| 1.5.2 Proteínas | 28 |
| 1.6 PROTEÍNAS EN LA MICROALGA <i>Chlorella vulgaris</i> | 30 |
| 1.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS | 33 |
| 1.8 FUENTES ORGÁNICAS DE NITRÓGENO | 34 |
| 1.8.1 Harina de sangre | 35 |
| 1.8.2 Harina de maíz | 35 |
| 1.8.3 Harina de pescado | 35 |
| 1.8.4 Harina de soja | 36 |
| 1.8.5 Suero de leche como subproducto de la industria quesera | 37 |
| 1.8.6 Estiércol | 38 |
| 1.8.7 Subproductos del café | 40 |
| 2. METODOLOGÍA | 41 |
| 2.1 FASE TEÓRICA | 41 |
| 2.1.1 Concentración de Nitrógeno para las fuentes orgánicas seleccionadas: | 43 |
| 2.1.2 Cálculo de la concentración de nitrógeno de las fuentes orgánicas seleccionadas | 43 |
| 2.1.3 Diseño de experimentos | 44 |
| 2.2 FASE EXPERIMENTAL | 45 |
| 2.2.1 Preparación del inóculo | 45 |
| 2.3 CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA EXPERIMENTACIÓN | 45 |
| 2.4 RECUENTO CELULAR | 46 |
| 2.5 PRE-EXPERIMENTO 1: ETAPA I | 47 |
| 2.5.1 Pre tratamiento del suero lácteo | 48 |
| 2.5.2 Tratamiento de los datos de la etapa I | 49 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.6 | PRE-EXPERIMENTO 1: ETAPA II | 49 |
| 2.6.1 | Diseño experimental | 49 |
| 2.7 | PRE-EXPERIMENTO 2 | 50 |
| 2.7.1 | Diseño experimental | 50 |
| 2.8 | EXPERIMENTO: | 50 |
| 2.8.1 | Tratamiento de los datos del experimento | 52 |
| 2.9 | PESO SECO, PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA | 52 |
| 2.10 | EVALUACIÓN DE COSTOS DE LA BIOMASA OBTENIDA | 54 |
| 3. | RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS | 55 |
| 3.1 | FASE TEÓRICA | 55 |
| 3.1.1 | Selección de la fuente inorgánica | 55 |
| 3.1.2 | Selección de la fuente orgánica | 55 |
| 3.2 | RESULTADOS DEL PRE-EXPERIMENTO I: ETAPA I | 59 |
| 3.2.1 | Curvas de crecimiento | 60 |
| 3.3 | PREEXPERIMENTO I: ETAPA II | 64 |
| 3.3.1 | Diseño experimental | 66 |
| 3.3.2 | Determinación de la concentración de fuente orgánica | 67 |
| 3.4 | PREEXPERIMENTO II | 69 |
| 3.4.1 | Diseño experimental | 70 |
| 3.4.2 | Determinación de la concentración de la fuente inorgánica | 71 |
| 3.5 | EXPERIMENTO | 73 |
| 3.5.1 | Tratamiento de los datos del experimento | 75 |
| 3.6 | PESO SECO Y PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA | 77 |
| 3.7 | CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA | 79 |
| 3.8 | EVALUACIÓN DE COSTOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y PROTEÍNA | 81 |
| 4. | CONCLUSIONES | 86 |
| 5. | RECOMENDACIONES | 87 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 88 |
| | ANEXOS | 96 |

LISTA DE TABLAS

| | pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Composición general de diferentes algas (% peso seco) | 31 |
| Tabla 2. Porcentaje de proteína obtenida) y eficiencia fotosintética R(%) | 32 |
| Tabla 3. Composición del lactosuero dulce y ácido | 38 |
| Tabla 4. Composición química del estiércol | 39 |
| Tabla 5. Variables de respuesta en la fase experimental | 44 |
| Tabla 6. Convenciones de la figura 6 | 46 |
| Tabla 7. Medios del cultivo con enriquecimiento de fuentes orgánicas | 48 |
| Tabla 8. Composición de los tratamientos enriquecidos con suero lácteo | 49 |
| Tabla 9. Composición de los tratamientos enriquecidos con Nitrato de sodio | 50 |
| Tabla 10. Composición del cultivo con suero lácteo llevado a 3L | 51 |
| Tabla 11. Composición del cultivo con Nitrato de sodio llevado a 3L | 51 |
| Tabla 12. Composición del Medio Control llevado a 3L | 52 |
| Tabla 13. Velocidades específicas de crecimiento promedio | 62 |
| Tabla 14. Análisis estadístico de los datos. Pre-experimento 1, etapa I | 63 |
| Tabla 15. Condiciones de pH iniciales y finales para los medios enriquecidos | 64 |
| Tabla 16. Tasas de crecimiento a diferentes concentraciones de suero lácteo | 66 |
| Tabla 17. ANOVA de un factor para el pre-experimento 2 | 66 |
| Tabla 18. Tasas de crecimiento promedio para los medios enriquecidos con sus respectivos aportes de nitrógeno | 67 |
| Tabla 19. Condiciones de pH iniciales y finales de suero lácteo en el medio | 68 |
| Tabla 20. Tasas de crecimiento para las diferentes concentraciones de NaNO_3 | 70 |
| Tabla 21. ANOVA de un factor para el pre-experimento II | 70 |
| Tabla 22. Tasas de crecimiento, diferentes concentraciones de fuente inorgánica | 72 |
| Tabla 23. Tasas de crecimiento con fuente orgánica, inorgánica y control | 75 |
| Tabla 24. Análisis estadístico de los resultados | 75 |
| Tabla 25. Tasas de crecimiento del experimento final | 76 |
| Tabla 26. Condiciones de pH finales para los tratamientos escalados | 77 |
| Tabla 27. Determinación del peso seco de la fuente inorgánica | 77 |
| Tabla 28. Determinación del peso seco de la fuente orgánica | 77 |
| Tabla 29. Determinación del peso seco del medio control | 77 |
| Tabla 30. Productividad volumétrica de los tratamientos finales | 78 |
| Tabla 31. Costos comunes para el proceso de producción | 81 |
| Tabla 32. Análisis de costo unitario para los diferentes medios de cultivo | 82 |
| Tabla 33. Costo por gramo de biomasa para los medios enriquecidos con fuente orgánica e inorgánica de nitrógeno | 83 |
| Tabla 34. Costo por gramo de proteína producida para los medios enriquecidos con fuente orgánica e inorgánica de nitrógeno | 83 |
| Tabla 35. Costos operativos diferentes a los analizados en las materias primas utilizadas | 84 |

LISTA DE CUADROS

| | pág. |
|--|------|
| Cuadro 1. Criterios de selección para la fuente orgánica de nitrógeno | 43 |
| Cuadro 2. Parámetros para la selección de las fuentes orgánicas de nitrógeno | 56 |

LISTA DE FIGURAS

| | pág. |
|--|------|
| Figura 1. Fases en el ciclo de un microorganismo en un cultivo batch. | 22 |
| Figura 2. Grafica del número de células en función del tiempo. | 24 |
| Figura 3. Estructura general de un aminoácido. | 28 |
| Figura 4. Estructura de las proteínas. | 29 |
| Figura 5. Esquema metodológico. | 41 |
| Figura 6. Montaje utilizado en la experimentación para los medios de cultivo | 46 |
| Figura 7. Cámara de Neubauer. | 47 |
| Figura 8. Recipientes de vidrio para la experimentación. | 51 |
| Figura 9. Diagrama determinación de peso seco. | 53 |
| Figura 10. Zona de aceptación de la hipótesis nula H_0 : | 66 |
| Figura 11. Zona de aceptación de la hipótesis nula H_0 : | 70 |

LISTA DE GRAFICAS

| | pág. |
|---|------|
| Gráfica 1. Curvas de crecimiento para fuentes orgánicas de nitrógeno rep. 1 | 61 |
| Gráfica 2. Curvas de crecimiento para fuentes orgánicas de nitrógeno rep. 2 | 61 |
| Gráfica 3. Curvas de crecimiento para fuentes orgánicas de nitrógeno rep. 3 | 61 |
| Gráfica 4. Linealización de la concentración celular respecto al tiempo | 62 |
| Gráfica 5. Velocidad específica de crecimiento en medios con fuentes orgánicas | 63 |
| Gráfica 6. Curva del crecimiento celular, primera repetición | 65 |
| Gráfica 7. Curva del crecimiento celular, segunda repetición | 65 |
| Gráfica 8. Curva del crecimiento celular, tercera repetición | 65 |
| Gráfica 9. Logaritmo natural del medio enriquecido con suero lácteo | 67 |
| Gráfica 10. Velocidad específica de crecimiento en medios enriquecidos con Suero lácteo | 68 |
| Gráfica 11. Curva de crecimiento celular en fuente inorgánica, repetición 1 | 69 |
| Gráfica 12. Curva de crecimiento celular en fuente inorgánica, repetición 2 | 69 |
| Gráfica 13. Curva de crecimiento celular en fuente inorgánica, repetición 3 | 70 |
| Gráfica 14. Linealización del crecimiento celular para concentraciones de Nitrato de sodio. | 72 |
| Gráfica 15. Velocidad específica de crecimiento en medios enriquecidos con Nitrato de sodio. | 72 |
| Gráfica 16. Crecimiento celular del experimento final, repetición 1 | 73 |
| Gráfica 17. Crecimiento celular del experimento final, repetición 2 | 74 |
| Gráfica 18. Crecimiento celular del experimento final, repetición 3 | 74 |
| Gráfica 19. Linealización de las concentraciones celulares | 75 |
| Gráfica 20. Velocidad específica de crecimiento para la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> evaluada en medios enriquecidos y medio control | 76 |

LISTA DE ECUACIONES

| | pág. |
|--|------|
| Ecuación 1.Crecimiento celular | 23 |
| Ecuación 2.Tasa intrínseca de crecimiento | 23 |
| Ecuación 3.Productividad volumétrica | 24 |
| Ecuación 4.Factor de conversión proteína bruta | 43 |
| Ecuación 5.Cantidad de Harina de Sangre | 44 |
| Ecuación 6.Cantidad de Harina de Soya | 44 |
| Ecuación 7.Concentración celular en cámara de Neubauer | 47 |
| Ecuación 8.Hipótesis Nula | 49 |
| Ecuación 9.Hipótesis Alterna | 49 |
| Ecuación 10. Determinación peso seco | 53 |
| Ecuación 11. Determinación productividad volumétrica | 54 |

LISTA DE ANEXOS

| | pág. |
|--|------|
| Anexo A. Preparación del suero lácteo | 97 |
| Anexo B. Fertilizante agrícola foliagro | 99 |
| Anexo C. Concentraciones celulares pre-experimento 1: etapa I | 100 |
| Anexo D. Concentraciones celulares para el pre-experimento 1: etapa II | 101 |
| Anexo E. Concentraciones celulares pre-experimento 2 | 102 |
| Anexo F. Concentraciones celulares experimento | 103 |
| Anexo G. Protocolo para determinación de peso seco | 104 |
| Anexo H. Cuantificación de proteínas por el método Kjeldal | 105 |
| Anexo I. Resultados de la cuantificación de proteínas por el método Kjeldahl | 106 |

GLOSARIO

AMINOÁCIDOS: son biomoléculas con un grupo amino y un grupo carboxilo que se unen a un carbono con un hidrógeno y un grupo que varía y se denomina radical, los aminoácidos se unen mediante enlaces peptídicos para dar origen a moléculas más complejas, llamadas proteínas, necesarias para la vida.

ANÁLISIS CUALITATIVO: rama de la química analítica que busca identificar las sustancias presentes en una muestra y no la cantidad de estas.

ANÁLISIS CUANTITATIVO: en química se utiliza para la determinación absoluta o relativa de una, varias o todas las sustancias presentes en una muestra, representada muchas veces como concentración de estas sustancias, esta rama de la química analítica si busca cuantificar las sustancias.

BIOFERTILIZANTE: fertilizante de origen biológico, pueden ser microorganismos que aumentan la fertilidad de los suelos, mediante la fijación de nitrógeno.

BIOMASA: materia orgánica o producto originado en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable para su transformación en energía.

CÁMARA DE NEUBAUER: instrumento o herramienta utilizada para realizar conteos de esporas y células en un medio líquido.

CROMÓFORO: parte, estructura o conjunto de átomos de una molécula que son responsables del color.

CULTIVO AUTOTRÓFICO: forma de metabolismo en la que los organismos obtienen todos los elementos necesarios para el crecimiento de compuestos inorgánicos y la energía la toman de la luz del sol (fotoautótrofos) o de compuestos inorgánicos o iones (quimioautótrofos).

CULTIVO HETEROTRÓFICO: en este los microorganismos obtienen los nutrientes y la energía necesaria para la vida de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos.

CULTIVO STOCK: o cultivo semilla, se le conoce al cultivo stock como una estrategia para el manejo de la colección de cultivos, de donde se obtienen las alícuotas.

INÓCULO: es la cantidad o número de microorganismos introducidos accidental o voluntariamente que se han adaptado para reproducirse en tejidos vivos o en medios de cultivos especiales.

METABOLITO: es cualquier molécula utilizada o producida durante el metabolismo, es decir es elaborada o usada para la descomposición de alimento o nutrientes.

NITRÓGENO INORGÁNICO: es un nutriente mineral, generalmente se encuentra naturalmente en forma de iones nitritos (NO_2^-), Nitratos (NO_3^-), o Amonio (NH_4^+)

NITRÓGENO ORGÁNICO: es nitrógeno químicamente ligado a moléculas orgánicas como proteínas o aminas.

PROTEÍNA NATIVA: cuando la proteína no ha sufrido ningún cambio en su estructura tridimensional y conformación.

SPC: (Single Cell Protein), proteína unicelular obtenida de la biomasa microbiana de microalgas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos, cultivados en condiciones apropiadas y controladas.

RESUMEN

La proteína de la microalga *Chlorella vulgaris* posee un alto valor nutricional, su producción requiere de condiciones óptimas de cultivo para alcanzar altos rendimientos y permitir producciones a gran escala, para lo cual se requieren tanto de altas densidades celulares como de la acumulación de las proteínas en las células. Se conoce que el nitrógeno es un limitante en el crecimiento, siendo utilizado por la microalga en sus procesos metabólicos, principalmente en la síntesis de las proteínas, esta investigación evaluó el crecimiento, productividad de biomasa y rendimiento de proteína en cultivos enriquecidos con fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico.

Se realizaron cultivos con una fuente orgánica e inorgánica previamente seleccionadas, suero lácteo y nitrato de sodio respectivamente, a diferentes concentraciones con fotoperiodos de 12h luz: 12h oscuridad a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, determinando la mayor tasa de crecimiento de la microalga en 0.041 g/L de nitrógeno enriquecido para la fuente orgánica y a 0.044 g/L para la fuente inorgánica, encontrando la mayor productividad en el cultivo enriquecido por la fuente orgánica con 0,07828 g/L*d de biomasa, guardando una amplia diferencia con el cultivo control y con la fuente inorgánica, 0.04841 g/L*d y 0.02559 g/L*d respectivamente. En cuanto al costo de producción a nivel laboratorio, el suero lácteo tuvo un costo adicional de elaboración para enriquecer el medio cultivo, sin embargo éste obtuvo un rendimiento de biomasa de 54,08%, con una fracción proteica de 55,63% en biomasa seca, el más alto de todos los tratamientos, por tal razón se concluyó que enriquecer el medio de cultivo con esta fuente orgánica de nitrógeno y carbono permitió un incremento celular y de proteína con respecto al medio control y la fuente inorgánica.

Palabras clave: Fuentes de nitrógeno, microalgas, productividad, rendimiento de proteína, tasa de crecimiento.

INTRODUCCIÓN

Los procesos a partir de las microalgas pueden convertirse en procesos eficientes y sostenibles que no solo cumplan la demanda de una amplia gama de productos, sino que además limpien el aire y el agua mediante sus procesos metabólicos.

Para emplear estos procesos a nivel industrial se requieren mayores productividades, es decir, mayores concentraciones celulares en el tiempo de cultivo, por lo que se analizan las condiciones y sistemas de crecimiento adecuados para este microorganismo¹. El estudio de las mejores condiciones de estas variables para la microalga *Chlorella vulgaris*, buscan la obtención de una mayor cantidad de biomasa, principal producto de interés, para la posterior separación de metabolitos como lípidos, proteínas, pigmentos, entre otros, y con ello impulsar bioprocesos rentables.

Se considera que la calidad de la proteína de esta microalga tiene una mayor calidad si se compara con las fuentes de proteína para alimentación establecidas en un patrón de la FAO, por el perfil balanceado de aminoácidos que contiene y su biodisponibilidad². Así mismo *Chlorella vulgaris* es una fuente potencial de proteína unicelular (SCP), un término aplicado a un amplio rango de algas unicelulares y filamentosas³, producidas bajo condiciones controladas para su uso en alimentación humana y animal, pero su uso también puede extenderse a la absorción de nutrientes en plantas como biofertilizantes.

Por otra parte, la microalga *Chlorella vulgaris* como fuente de proteína presenta ventajas respecto a las fuentes convencionales de plantas y animales, debido a que este metabolito puede llegar a más del 50% de su biomasa total⁴, posee un tiempo de generación corto⁵ y pueden aprovechar para su crecimiento sustratos y nutrientes que son contaminantes del aire y el agua.

Se conoce que la cantidad de proteína producida por las especies de microalgas está influenciada por los macronutrientes del medio de cultivo, la intensidad de luz y la temperatura, siendo el nitrógeno uno de los nutrientes limitantes del crecimiento y la acumulación de proteínas en las microalgas⁶.

¹ DURAN, S. Linda; BARAJAS S. Andrés; GONZALES D. Ángel. Influencia de la relación Carbono/Nitrógeno en la producción de proteínas totales en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. Universidad Industrial de Santander, Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales pp 49-58.

² BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein, 2007, pág 207-210

³ FAO, Macrofitas acuáticas vasculares. [citado el 25 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/AB492S09.htm>

⁴ BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. Revista Bioresource Technology, Pág 210 ,2007

⁵ Ibid.

⁶ TONGHUI, Xie; YUN, Xia; YU, Zeng; LI, Xingrui, Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. Revista Bioresource Technology pp.247-255.febrero de 2017

El nitrógeno en el medio de cultivo para microalgas generalmente tiene estructura química inorgánica, la forma química en la que las microalgas son capaces de utilizar es el nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) o urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), formas comunes que se encuentran en la naturaleza. Sin embargo, otras formas moleculares pueden ser utilizadas como fuente de nitrógeno orgánico, tales como subproductos agrícolas a base de estiércol como gallinaza, equinaza y humus de lombriz, que al suministrarse a las microalgas permiten alcanzar altos porcentajes de proteína y valores de concentración celular elevados⁷. Esto posiblemente debido a que las fuentes de nitrógeno orgánico aportan así mismo carbono, elemento fundamental para el metabolismo de los microorganismos.

Estos cultivos son heterotróficos, es decir, estas fuentes orgánicas presentan no sólo nitrógeno sino también carbono, que es utilizado por las microalgas como sustrato, generando mayores densidades celulares, aunque se acumulan menores cantidades de proteína⁸.

Dado que recientemente se han probado algunas fuentes de nitrógeno para mejorar la productividad de los cultivos de microalgas con buenos resultados, se busca proponer nuevas fuentes que tengan el potencial de aportar nitrógeno orgánico e inorgánico a los cultivos microalgales. Esta investigación busca comparar la producción de biomasa y proteínas utilizando medios de cultivo con enriquecimiento de nitrógeno orgánico e inorgánico, evaluando además la condición autotrófica y heterotrófica de los cultivos y la conveniencia en cuanto al proceso de utilizar una fuente u otra a partir de fuentes de nitrógeno orgánico de bajo costo.

⁷ MUÑOZ, Marcela; RAMIREZ, Juan. Effect of culture medium on growth and protein content of *Chlorella vulgaris*, Revista colombiana de ciencias pecuarias, vol 25.2011

⁸ TONGHUI, Xie; YUN, Xia; YU, Zeng; LI, Xingrui, Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. Revista Bioresource Technology pp.247-255. febrero de 2017

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de proteínas de *Chlorella vulgaris* enriqueciendo el medio de cultivo con nitrógeno orgánico e inorgánico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las curvas de crecimiento correspondientes a tres concentraciones diferentes de cada fuente de nitrógeno
- Cuantificar la cantidad de proteína presente en la biomasa de los cultivos con mayor crecimiento
- Evaluar los costos del proceso de obtención de la proteína a escala laboratorio

1. MARCO TEÓRICO

1.1 METABOLISMO DE MICROORGANISMOS

El metabolismo se refiere a todas las reacciones catalizadas enzimáticamente que se dan en las células y que permiten cumplir los procesos necesarios para el ciclo de vida de los microorganismos, como es mantener sus estructuras para crecer y reproducirse. El metabolismo se lleva a cabo cuando los microorganismos tienen un medio con los nutrientes necesarios y generan los productos finales o metabolitos primarios, pero cuando el medio tiene alguna condición limitante estos productos finales son metabolitos secundarios.⁹

El metabolismo se divide por ello en metabolismo primario y secundario, el metabolismo primario genera la energía necesaria para el crecimiento y envuelve procesos catabólicos y anabólicos, aunque este último se refiere al gasto de energía para la síntesis de biomoléculas ya que igual son procesos que están muy relacionados.¹⁰

Dependiendo de la fuente de energía utilizada por los microorganismos se pueden encontrar una gran variedad de procesos metabólicos, como aquellos en los que la fuente de energía es un compuesto químico, estos microorganismos se llaman quimiotrofos y aquellos en los que lo es la luz se llaman fotótrofos que es el caso de las microalgas y cianobacterias.¹¹

1.1.1 Metabolitos primarios. Los metabolitos primarios derivan directamente del catabolismo, es decir con la descomposición de moléculas para la generación de energía ya que todas las células necesitan de esta para así poder realizar los procesos asociados con el crecimiento, el transporte y movimiento, lo que indica que los productos del metabolismo primario como proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas y la biomasa² se dan durante el crecimiento exponencial, periodo en el cual el microorganismo crece, consume el sustrato y se da la formación del producto casi simultáneamente.

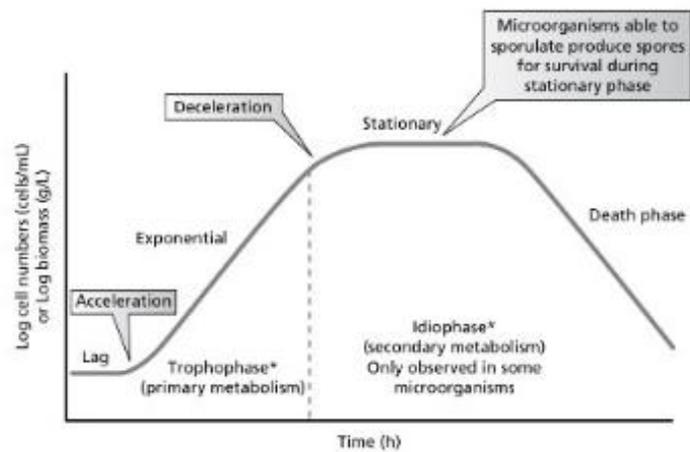
⁹ ARGENBIO, Consejo Argentino para la información y el Desarrollo de la Biotecnología. (Consultado el 31 de agosto de 2016). Disponible en: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=136>

¹⁰ WAITES; MORGAN, L. Industrial Microbiology: An Introduction (2001)

¹¹ Lopez, P. G. (2006). Estudio de toxinas y otros metabolitos de origen marino.

1.1.2 Metabolitos secundarios. Son aquellos que se generan en la fase estacionaria de algunos microorganismos, debido a que estos metabolitos no están asociados al crecimiento, sino que se dan después, bajo condiciones específicas o de estrés. La generación de MS se da durante condiciones no tan comunes de pH, luz, temperatura, concentración de nutrientes, entre otros, generando una condición de estrés que permite sintetizar (anabolismo) ciertas moléculas, Figura 1, y confieren ventajas, que son de gran importancia industrial como alcaloides, antibióticos, toxinas y pigmentos¹²

Figura 1. Fases en el ciclo de un microorganismo en un cultivo batch.



Fuente: WAITES & L. MORGAN, Industrial Microbiology: An Introduction.2011

1.2 MICROALGAS

Las microalgas son microorganismos eucariotas unicelulares que poseen clorofila u otras estructuras necesarias para realizar la fotosíntesis oxigénica, son consideradas actualmente como una fuente promisoría de metabolitos o compuestos importantes industrialmente, capaces de elevar el contenido nutricional de los alimentos tradicionales además porque presentan grandes ventajas respecto a fuentes actuales. Una de estas ventajas va orientada al cuidado del medio ambiente, ya que reciclan contaminantes de medios líquidos y gaseosos haciéndolos parte de su metabolismo, para la generación de biomasa, metabolitos primarios y bajo ciertas condiciones secundarios, reduciendo residuos de la industria.¹³

¹² WAITES & L. MORGAN, L. Industrial Microbiology: An Introduction (2001)

¹³ PÉREZ, A. H. Microalgas, cultivo y beneficio. *Revista de biología marina y oceanografía* (2014).

1.2.1 Crecimiento de microalgas. El crecimiento de un cultivo de microalgas está expresado como el incremento de biomasa, sea determinado por número de células, peso seco u otros, que pueden ser estimados mediante diversos métodos de cuantificación, sin embargo, uno de los más utilizados es el recuento celular en cámara de Neubauer, por ser un método sencillo, económico. Las microalgas se reproducen principalmente por división celular, esto representa un crecimiento rápido cuando se encuentran en un medio sin limitaciones, como por ejemplo deficiencia de ciertos nutrientes o luz.

La edad del cultivo influye en la velocidad de crecimiento, es por ello por lo que las diferentes fases de crecimiento, pueden brindarnos parámetros como la velocidad específica de crecimiento, conocida también como tasa de crecimiento (μ) o el tiempo de duplicación (t_g), para observar la forma en que cambia la concentración celular.¹⁴

Cuanto mayor es el número de microorganismos, es mayor la velocidad a la cual se está utilizando determinado sustrato como alimento¹⁵, esta velocidad se conoce como velocidad específica de crecimiento (μ) y relaciona la concentración de biomasa, dada en unidad de masa sobre un volumen determinado, con el tiempo.

El crecimiento en función de la velocidad específica es una forma de representar la cinética de crecimiento, determinando el incremento del número de células (dN) en un intervalo de tiempo (dt).

$$(1) \quad \frac{dN}{dt} = \mu N$$

Esta ecuación indica que el incremento celular por unidad de tiempo tiene una constante de proporcionalidad asociada al número de células en el cultivo, y esta se refiere a la velocidad de crecimiento o tasa de crecimiento (μ).

La integración y modificación de esta ecuación permite calcular esta tasa de crecimiento a partir de medidas experimentales del incremento o número de células en el medio de cultivo.¹⁶

$$(2) \quad \ln N = \ln N_0 + \mu t$$

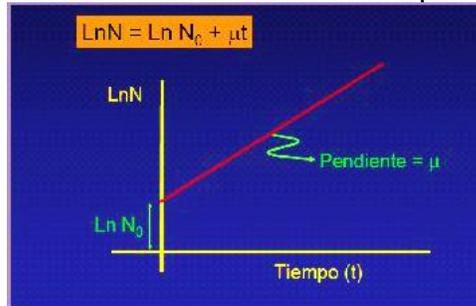
Donde N es el número de células al cabo del tiempo t y N_0 es el número inicial de células.

¹⁴ ARREDONDO, Bertha ; VOLTOLINA, Domenico. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. Capítulo 2, pag 25.

¹⁵ CINÉTICA DE CRECIMIENTO BIOLÓGICO, Ingeniería de tratamiento de aguas residuales. [en línea] citado el 9 de septiembre de 2017. Disponible en: <http://www.oocities.org/edrochac/residuales/cinetica3.pdf>

¹⁶ SALVUCCI, Emiliano. Hacia una nueva Biología, Crecimiento microbiano [en línea] citado el 9 de septiembre de 2017. Disponible en: <https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/>

Figura 2. Grafica del número de células en función del tiempo.



Fuente: Crecimiento microbiano. Citado el 9 de septiembre de 2017. Disponible en: <https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/>

La productividad volumétrica (P_b) también es una variable del crecimiento, que mide la generación de biomasa en un volumen y en un tiempo específico, esta variable puede obtenerse mediante el cociente del incremento en la concentración de biomasa sobre un incremento de tiempo.¹⁷

$$(3) \quad P_b = \frac{\Delta C_b}{\Delta t}$$

1.3 CONDICIONES DE CULTIVO

Para la utilización de la biomasa de microalgas y en este caso de las proteínas, se debe tener en cuenta que la concentración de nutrientes, la composición del medio de cultivo, así como la temperatura y la intensidad de luz, son factores de los cuales depende la composición bioquímica de la biomasa y son los que se deben manipular para mejorar la producción y las características de las proteínas.¹⁸ Rangos adecuados de pH, temperatura e iluminación, mejoran las tasas de crecimiento celular, lo que produce una mayor cantidad de metabolitos primarios, es decir, una mayor cantidad de proteína.

¹⁷ Ingeniería de bioprocesos aplicada a la biotecnología de microalgas, Cuantificación del crecimiento y la productividad. [en línea] citado el 9 de septiembre de 2017. Disponible en: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-4-crecimiento-y-productividad.html>

¹⁸ MARÍN RUIZ, Alejandro. Características fotosintéticas y crecimiento de *Scenedesmus obliquus* inmovilizada en alginato, 2012. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000300004

1.3.1 pH. El crecimiento óptimo de las microalgas a condiciones normales de la mayoría de los cultivos se da entre un pH de 7 a 9¹⁹, sin embargo, algunas especies de microalgas resisten amplios rangos de pH, como la especie *Chlorella vulgaris*, que es capaz de crecer a pH extremos de alcalinización y acidificación²⁰.

1.3.2 Luz. Las microalgas pueden utilizar para la fotosíntesis la energía lumínica proveniente de la luz solar en un ciclo natural de día y noche, luz artificial o ambas, realizando periodos continuos mediante luz artificial o periodos discontinuos alternando con periodos de oscuridad, también con luz artificial.²¹ Para que la luz artificial sea eficaz se debe utilizar una con longitudes de onda entre los 600 y 700 nm.²²

1.3.3 Temperatura. La mayoría de especies de microalgas no varían demasiado en un rango amplio entre los 16°C y los 27°C, es decir, en condiciones de temperatura mesófilas, teniendo como temperatura óptima para el género *Chlorella* ,25°C, sin embargo, temperaturas por encima de los 35 °C provocarían que la mayoría de las microalgas colapsaran.²³

1.4 NUTRICIÓN MICROALGAL

El carbono, nitrógeno y fósforo son considerados los nutrientes limitantes para el crecimiento microalgal en aplicaciones biotecnológicas.²³ Para cumplir con un buen crecimiento celular que puede favorecer también los metabolitos de interés, las microalgas deben contar con macronutrientes que son los nutrientes presentes en mayor proporción en el medio de cultivo, como gramos por litro²⁴.

Los macronutrientes son los componentes principales a nivel morfológico y metabólico para el crecimiento como son además el magnesio, siendo este un componente básico de la clorofila e indispensable para la fotosíntesis, hidrógeno, oxígeno, calcio, potasio y azufre que se incorpora a aminoácidos y coenzimas.

También son requeridos micronutrientes o trazas en miligramos por litro o microgramos por litro y suelen estar naturalmente como contaminantes en los macronutrientes, entre ellos están el manganeso como estimulante del crecimiento, el hierro que interviene como cofactor de enzimas, el cobre presente en la cadena

19 FAO. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Cultivo de microalgas. [en línea]. Citado el 16 de noviembre de 2017. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S02.htm>

²⁰ ALYABYEV, Alexander. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2011.

²¹ PIÑERA, Abril Karim, Manual para el cultivo de microalgas Universidad Autónoma de Baja California Sur, 2002. [en línea] citado el 30 de agosto de 2016. Disponible en: <http://biblio.uabcs.mx/tesis/TE1366.pdf>

²² BENAVENTE-VALDÉS, J. R. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores, Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, Departamento de ingeniería química. México, 2012.

²³ SILVA, Ana margarita. Evaluación de fertilizantes agrícolas, Universidad de Costa Rica, mesoamerican journal of agronomy ,agriculture and livestock 2015

²⁴ WAITES; MORGAN, L. Industrial Microbiology: An Introduction ,2001

respiratoria pero que en una cantidad mayor es perjudicial y el cobalto además de algunas vitaminas.

1.4.1 Nitrógeno. El nitrógeno después del carbono es uno de los nutrientes más importantes que contribuyen a la biomasa seca de las células microalgales. Éste elemento es frecuentemente un nutriente limitante para el crecimiento de las microalgas porque les permite realizar sus procesos metabólicos y de fotosíntesis. La mayoría de las microalgas pueden utilizar distintas especies químicas como fuente de nitrógeno, tanto inorgánicas como orgánicas. Entre las fuentes inorgánicas, las microalgas tienen la capacidad de utilizar nitrógeno en forma de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) o amonio (NH_4^+)²⁵; y como fuente orgánica el compuesto más utilizado es la Urea, numerosos aminoácidos e incluso otros compuestos tales como las purinas guanina, adenina, xantina o hipoxantina.²⁷

Gran número de especies de microalgas son capaces de utilizar el nitrógeno en forma de nitrito, aunque no es tan abundante en la naturaleza como las otras formas de nitrógeno inorgánico. Además, el nitrito en altas concentraciones puede inhibir el crecimiento.²⁷

Los resultados de algunos estudios, particularmente aquellos en los que están implicadas interacciones nitrato-amonio, sugieren que el amonio es la fuente de nitrógeno preferida por las microalgas²⁷ y que su concentración en el medio de cultivo está directamente relacionada con el porcentaje de proteínas de la microalga, ya que los aminoácidos que conforman las cadenas polipeptídicas contienen un grupo amino formado por nitrógeno.

Se encuentra reportado que, para cultivos heterotróficos, la fuente de nitrógeno preferida por la microalga *Chlorella vulgaris* es el nitrato de sodio, siendo asimilado y convertido especialmente en proteínas²⁶.

1.5 METABOLISMO DE MICROALGAS

Las microalgas son consideradas como los productores primarios de biomoléculas sintetizadas a partir de energía lumínica que transforman en energía química. Existe una gran diversidad de microalgas y dependiendo de su pared celular, clorofila y pigmentos pueden variar sus procesos metabólicos.²⁷

²⁵ PAREDES, Pablo Fidalgo. Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno, Facultad de ciencias, Universidad de la Coruña, 1995, pág. 22-26.

²⁶ TONGHUI, Xie; YUN, Xia; YU, Zeng; LI, Xingrui, Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. Revista Bioresource Technology pp.247-255. Febrero de 2017

²⁷ PIÑERA, Abril Karim, Manual para el cultivo de microalgas, 2002. [en línea] citado el 30 de agosto de 2016. Disponible en: <http://biblio.uabcs.mx/tesis/TE1366.pdf>

La mayoría de las microalgas se clasifican como microorganismos fotótrofos porque obtienen la energía de los fotones de la luz y como autótrofos ya que utilizan el CO₂ como fuente de carbono para sintetizar ellos mismos las moléculas esenciales de su metabolismo, sin embargo, las microalgas responden con alteraciones fisiológicas a las condiciones ambientales en las cuales crecen²⁸ es decir como respuesta pueden favorecer algunas rutas metabólicas.

Algunas especies son heterótrofas debido a que no necesitan la luz como fuente de energía sino la toman de compuestos químicos orgánicos como azúcares y ácidos, además algunas especies mixotróficas pueden obtener simultáneamente energía para sus procesos metabólicos de la luz y de sustratos orgánicos, desarrollarse en presencia de luz u oscuridad²⁹, siendo esta una ventaja al no depender de esta.³⁰

1.5.1 Metabolitos en microalgas. Las microalgas tienen gran importancia a nivel económico y comercial debido a que ellas son productoras de una amplia variedad de compuestos químicos de alto valor que poseen en cantidades apreciables, como carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos poliinsaturados, así como antioxidantes (carotenos) y algunas tienen un contenido aminoacídico en sus proteínas superior al presentado por alimentos convencionales.³¹

Una aplicación de los metabolitos en las microalgas son los carotenoides, los cuales son pigmentos que cumplen una función de protección frente a los rayos UV, como los β-carotenos, utilizados en la industria alimenticia, producidos en especial por *Dunaliella salina*. Las astaxantinas son otro pigmento producido especialmente por la microalga *Haematococcus pluvialis*, este es utilizado en la coloración del salmón³² y por otro lado están los pigmentos ficobilínicos, producidos por algas rojas, *Porphyridium*, que pueden ser utilizados como colorantes para su uso en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica³³.

Los ácidos grasos insaturados que contienen las microalgas son otro de los metabolitos de interés, por su aplicación biotecnológica, en especial el ácido docosahexaenoico (DHA) perteneciente a la serie omega 3 utilizado en la industria alimenticia, producido por las especies de microalga *Cryptheconidium cohnii* y *Schyzochytrium*, alcanzando en la primera un 40-50% en peso seco³⁴. La obtención

²⁸ CHIA, Mathias A.; LOMBARDI, Ana T. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media, 2013.

²⁹ MALDONADO, Evelyn; MORALES, Ever, Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) con sustratos amiláceos, Ingeniería en biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas.

³⁰ PIÑERA, Abril Karim, Manual para el cultivo de microalgas, 2002. [en línea] citado el 30 de agosto de 2016. Disponible en: <http://biblio.uabcs.mx/tesis/TE1366.pdf>

³¹ QUEVEDO, Catalina; MORALES, Sonia P. Crecimiento de *Scenedesmus* sp, VITAE, Revista de la facultad de química farmacéutica, 2008.

³² ARRIETA B. Esteban, Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas, Revista del Colegio de microbiólogos y químicos clínicos de Costa Rica. Vol 14, 2008.

³³ BOROWITZKA, Michael A. High-value products from microalgae—their development and commercialization, Journal of Applied Phycology, 2013.

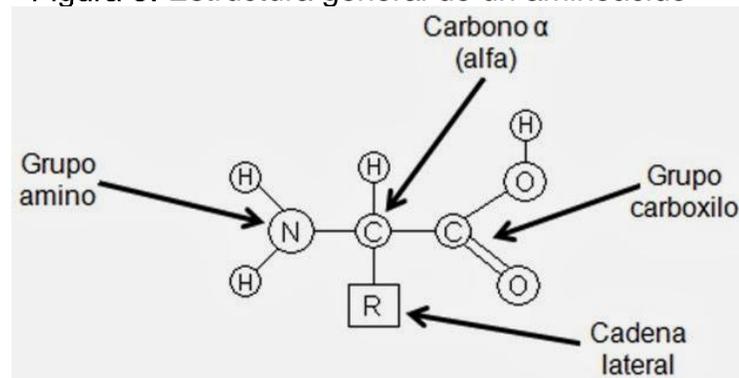
³⁴ Ibid., pag 10

de lípidos en la industria de los biocombustibles, tanto para biodiesel como para hidrógeno, ha ganado también importancia en las últimas décadas.

Las proteínas son la fracción de mayor proporción dentro de la biomasa microalgal³⁵ y por contener todos los aminoácidos esenciales³⁶ se aprovechan en el campo de los alimentos, haciéndolas también una fuente potencial para la producción de biofertilizantes y de nutracéuticos para humanos y animales. Por su elevado contenido de proteína, entre el 60 y el 70% en peso seco, *Spirulina* y *Chlorella* son consideradas para la producción a gran escala por su capacidad de acumular proteínas³⁷

1.5.2 Proteínas. Las proteínas son biomoléculas compuestas en su mayoría por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, dependiendo del tipo de proteína pueden contener azufre, fósforo, hierro y cobre entre otros elementos, están compuestas por aminoácidos que son moléculas en donde un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH) se unen a un carbono que ocupa sus dos valencias restantes a un hidrógeno (-H) y un grupo que varía y se denomina radical (-R), estos aminoácidos se unen mediante enlaces peptídicos para dar origen a la estructura tridimensional de las proteínas.³⁸

Figura 3. Estructura general de un aminoácido



Fuente: Apuntes de biología molecular, aminoácidos. Citado el 10 de mayo de 2017 Disponible en: <http://apuntesbiologiamol.blogspot.com.co/2014/03/aminoacidos.html>

Los diferentes radicales presentes en los aminoácidos le confieren propiedades características a cada uno, solo veinte son codificados en el ADN y por tal conforman las proteínas, dependiendo de si pueden o no ser sintetizados por el

³⁵ GARCIA C.F.; JAWIARCZYK N., Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos, Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Almería, 2012.

³⁶ WAGHMARE, Ashish G.; MANOJ K. Salve. Concentration and characterization of microalgae proteins from Chlorella pyrenoidosa, Bioresources and Bioprocessing, 2016.

³⁷ ESPINOZA F. Mario, Microalgas en la alimentación ¿Suplementos novedosos o reinventados? Revista ciencia, Vol.68, 2017.

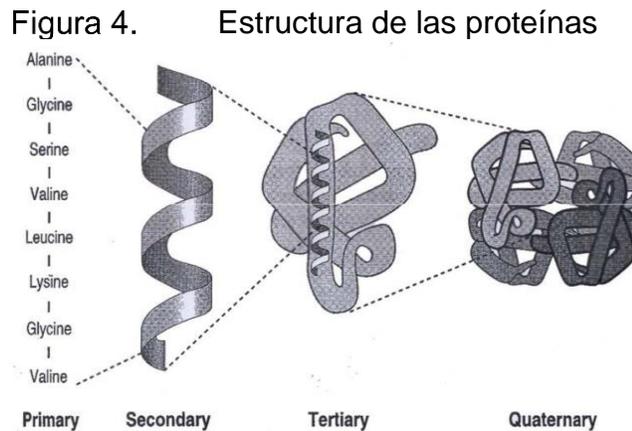
³⁸ LUQUE GUILLEN, victoria. estructura y propiedades de las proteínas. [en línea] citado el 26 de septiembre de 2016. Disponible en: http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf

cuerpo humano se pueden clasificar como aminoácidos esenciales o no esenciales³⁹. Los aminoácidos esenciales entonces al no ser sintetizados o generados por el cuerpo humano deben ser ingeridos a través de la dieta.¹⁵

Los aminoácidos esenciales son: Valina (Val), Leucina (Leu), Treonina (Thr), Lisina (Lys), Triptófano (Trp), Histidina (His), Fenilalanina (Phe), Isoleucina (Ile), Arginina (Arg) y Metionina (Met).

La estructura tridimensional de las proteínas se da en cuatro niveles y cada uno se construye a partir del anterior⁴⁰, por tanto, se distinguen la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria como se observa en la Figura 4.

Lo que caracteriza inicialmente a las proteínas es su secuencia lineal de aminoácidos, es decir el número y orden de los aminoácidos o estructura primaria, ésta estructura determinará la función que la proteína cumplirá ya sea estructural, catalítica, reguladora de reserva, de defensa o transportadora entre otras.



Fuente: Aminoácidos estructuras. Citado el 26 de septiembre de 2016. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/EstructuraProteinasParteA_24774.pdf

La estructura secundaria se refiere a como se pliega la cadena primaria, esto ocurre por la interacción entre los enlaces peptídicos que forman puentes de hidrógeno dentro de la misma cadena. Pueden originar varias estructuras como la α -Hélice o la estructura β -plegada de acuerdo con la Figura 4.

La estructura α -Hélice se mantiene gracias a los puentes de hidrógeno formados entre el grupo amino ($-\text{NH}_2$) de un enlace peptídico y el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$)

39 RODRIGUEZ, Fabián. Estructura y propiedades de aminoácidos y péptidos, 2011. [en línea] citado el 26 de septiembre de 2016. Disponible en: http://sevuprimero.weebly.com/uploads/9/8/6/3/9863937/estructura_y_propiedades_de_pptidos_y_aminocidos_fabin_rodriguez.pdf

40 PROTEÍNAS. [en línea] citado el 26 de septiembre de 2016. Disponible en: http://www.edu.xunta.gal/centros/iespuntacandieira/system/files/04_Prote%C3%ADnas.pdf

del cuarto aminoácido siguiente, generando que la cadena gire en espiral sobre sí misma.⁴¹

La estructura β -plegada se da cuando cadenas principales se estiran al máximo de lo que permiten sus enlaces covalentes, en esta estructura los radicales se orientan alternándose a la derecha e izquierda de la cadena principal y estas estructuras interactúan entre ellas mediante los puentes de hidrógeno para formar láminas u hojas plegadas.¹⁸

La estructura terciaria de las proteínas se refiere a la disposición tridimensional o forma que adopta como tal la cadena secundaria, la estructura terciaria es la estructura más compleja para las proteínas que tienen una sola cadena peptídica y ésta estructura es la responsable de que las proteínas cumplan diferentes funciones biológicas. Se da gracias a las fuerzas producidas entre los radicales de los aminoácidos y pueden darse por enlaces covalentes o no covalentes.¹⁸

Las fuerzas que mantienen esta estructura son los puentes de hidrógeno entre los grupos amino y carboxilo, pero de diferentes secciones de la proteína, puentes disulfuro que se dan por el acercamiento de cadenas laterales de cisteína, interacciones hidrofóbicas que ocurren entre cadenas de aminoácidos no polares e interacciones iónicas dadas por la atracción generada entre las cadenas de aminoácidos básicos ácidos.⁴²

Las proteínas representan la fracción mayoritaria en la biomasa de las microalgas y como ya se había mencionado son de gran valor industrial para la nutrición tanto humana como animal dependiendo de su calidad proteica y de las paredes de las proteínas que contengan, ya que muchas veces no son digeribles, sin embargo, los péptidos y aminoácidos que componen estas proteínas son necesarios en el campo de la salud, la agricultura y la industria.⁴³

1.6 PROTEÍNAS EN LA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS*

Las especies de *Chlorella* tienen un gran potencial para ser utilizadas como una fuente de proteína valiosa, alternativa para los seres humanos, que no depende de factores climáticos, estudios han logrado obtener de esta especie hasta un 78% en peso de proteína, revelando que se trata de una proteína de alta calidad por su contenido de aminoácidos esenciales.⁴⁴

⁴¹ LUQUE GUILLEN, victoria. estructura y propiedades de las proteínas. [en línea] citado el 26 de septiembre de 2016. Disponible en: http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf

⁴² FREYRE, Sofía. Estructura de las proteínas. [en línea] citado el 30 de septiembre de 2016. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=smcTh2LVVQY>

⁴³ F, GARCÍA; JAWIARCZYK N; GONZÁLEZ, López C.V. Valorización de biomasa de microalgas. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Almería, 2012.

⁴⁴ WAGHMARE, Ashish G.; MANOJ K. Salve. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*, *Bioresources and Bioprocessing*, 2016.

Las microalgas como una fuente alternativa de proteínas han sido consideradas desde hace algunas décadas, gracias a su composición rica en aminoácidos esenciales a comparación de otras fuentes, aunque su alto costo de producción dificulta incorporar las proteínas de éstas en otras aplicaciones tales como alimentación o fertilizantes, entre otros.

Tabla 1. Composición general de diferentes algas (% peso seco)

| Alga | Protein | Carbohydrates | Lipids |
|----------------------------------|---------|---------------|--------|
| <i>Anbaena cylindrica</i> | 43-56 | 25-30 | 4-7 |
| <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> | 62 | 23 | 3 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 48 | 17 | 21 |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | 57 | 26 | 2 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 51-58 | 12-17 | 14-22 |
| <i>Dunaliella salina</i> | 57 | 32 | 6 |
| <i>Euglena gracilis</i> | 39-61 | 14-18 | 14-20 |
| <i>Porphyridium cruentum</i> | 28-39 | 40-57 | 9-14 |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | 50-56 | 10-17 | 12-14 |
| <i>Spirulina platensis</i> | 46-63 | 8-14 | 4-9 |

Fuente: BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein, 2007, pág 207.

La Tabla 1 muestra una recopilación de diferentes publicaciones para dar un marco general de las composiciones de especies de microalga, *Chlorella vulgaris* tiene reportado en peso seco de un 51% a un 58 %, pero como se observó antes, las especies *Chlorella* han logrado porcentajes de hasta un 78% variando sus condiciones de cultivo, solo algunas especies de microalgas son seleccionadas para una producción a gran escala, entre ellas: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y la cianobacteria *Spirulina sp*⁴⁵

Se ha determinado que el nitrógeno es un nutriente que restringe el crecimiento, pues cuando se asimila por la microalga, se convierte principalmente en proteínas⁴⁶, necesarias para el cumplimiento de funciones requeridas para el crecimiento y reproducción.

Análisis propuestos para la acumulación de proteínas cultivando la microalga *Chlorella Vulgaris* en medios heterotróficos⁴⁷, optimizan variables de proceso para obtener la mayor producción de proteínas posible bajo diferentes estrategias de cultivo, una de ellas, llamada “sobrecompensación de nitrógeno”⁴⁸, obtuvo rendimientos de proteína del 44.3% de proteína en peso seco, muy cercanos a los encontrados con cultivos autotróficos, que por naturaleza son los que mayor acumulación de proteínas. Esta estrategia de sobrecompensación consiste en

⁴⁵ BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein, 2007, pág 207-210

⁴⁶ TONGHUI, Xie; YUN, Xia; YU, Zeng; LI, Xingrui, Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. Revista Bioresource Technology pp.247-255. febrero de 2017

⁴⁷ Ibid.,p. 254

⁴⁸ Ibid.

poner a la microalga es un medio de nitrógeno muy limitado para después de un periodo de tiempo ser puesta en un medio de cultivo con sobrecompensación del nutriente, es decir exponerla a un medio rico en nitrógeno, lo que indica que mediante diferentes estrategias y condiciones en el cultivo es posible incrementar la fracción proteica de la biomasa microalgal.

Se concluye que con concentraciones de 0.25 y 0.75 g/L de nitrato de sodio en el medio no se cumple con la demanda de nitrógeno para el crecimiento celular, pero al utilizar concentraciones mayores (1 a 2 g/L) se permitiría un suministro adecuado de NaNO₃ para incrementar la biomasa de la microalga, sin que se desperdicie el nitrógeno excedente pues no genera un aumento en la biomasa microalgal y si se gasta mayor cantidad del nutriente⁴⁹.

Tabla 2. Porcentaje de proteína obtenida) y eficiencia fotosintética R(%)

| Estirpe | Proteínas | Carbohidratos | Lípidos | R (%) |
|-------------------------------|------------|---------------|------------|-------|
| <i>Chlorella sp.</i> | 48,5 ± 1,3 | 23,8 ± 1,6 | 17,7 ± 0,1 | 1,3 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 47,3 ± 1,0 | 23,0 ± 1,3 | 19,9 ± 1,5 | 1,4 |
| <i>Scenedesmus vacuolatus</i> | 44,6 ± 2,1 | 20,3 ± 0,6 | 28,0 ± 3,8 | 1,2 |
| <i>Spirulina PCC 6313</i> | 43,7 ± 1,7 | 32,4 ± 0,5 | 17,7 ± 0,1 | 0,5 |

Fuente: GARCIA, Rafael, Tesis doctoral "producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂"

Al evaluar la producción de biomasa de microalgas⁵⁰ se obtiene un porcentaje de proteína en la composición bioquímica de la especie *Chlorella vulgaris* de aproximadamente 47.3% , siendo superada solo por la cepa de microalga *Chlorella sp.*, esto bajo condiciones de un cultivo continuo en un fotobioreactor con burbujeo controlado, regulándose su temperatura y pH, utilizando un medio estándar (Arnon) suplementado con 20 mM de NaNO₃ , se analizó que estas mismas microalgas tienen la mayor productividad de biomasa (0.6 g/L*d)⁵¹, ligado también a la mayor eficiencia fotosintética, mostrada en la tabla 2.

Las proteínas se componen de diferentes aminoácidos y por lo tanto la calidad nutricional de una proteína se determina básicamente por el contenido, la proporción y la disponibilidad de sus aminoácidos. Al comparar las principales especies de algas con respecto a otras fuentes de proteínas, algunos alimentos básicos convencionales, y un patrón de referencia de una proteína bien balanceada, recomendado por WHO / FAO⁵². El patrón de aminoácidos de casi todas las algas se compara favorable con el de la referencia y las otras proteínas alimentarias⁵³.

⁴⁹ Ibid.,p. 251

⁵⁰ GARCIA, Rafael, Tesis doctoral, Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂, (citado el 30 de octubre de 2017). Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/101928/1/TESIS%20DOCTORAL%20RGC.pdf>

⁵¹ Ibid.

⁵² FAO. The state of food and agriculture.1973 [en línea]. Citado el 16 de noviembre de 2017. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/017/e1900e/e1900e.pdf>

⁵³ BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein, 2007, pág 207-210

1.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Entre las principales técnicas para la cuantificación de proteínas de la biomasa de microalgas se encuentran: (1) los métodos colorimétricos, estos se basan en la fluorescencia generada por la reacción redox del enlace cromóforo; (2) análisis de la concentración elemental de nitrógeno y posterior conversión a proteína mediante el método de Kjeldahl o Lowry; y (3) un análisis de proteína cruda, $n \times 6.25$, donde n es el contenido total de nitrógeno (porcentaje del peso seco) y 6.25 el factor de conversión⁵⁴.

Los métodos colorimétricos dependen de la aparición de un cromóforo, conjunto de átomos responsables del color, y de las interferencias de sensibilidad ya que tienen precisiones que están en función del método de pretratamiento de la muestra. Los análisis elementales de nitrógeno son menos propensos a las interferencias, sin embargo, se requieren factores de conversión de nitrógeno a proteína para el análisis elemental de nitrógeno. También hay que tener en cuenta que el método de análisis de proteínas crudas conduce a una sobreestimación⁵⁵ de la concentración de proteínas en las microalgas, que se produce por la presencia de componentes nitrogenados no proteicos⁵⁶.

La utilización de un factor de conversión de nitrógeno orgánico a proteína total es de los métodos más utilizados actualmente, ya que es aplicable para una amplia gama de productos, además se reportan estudios científicos que soportan la utilización de este método para la cuantificación de proteínas en microalgas⁵⁷, siendo de interés en esta investigación para determinar el rendimiento de proteínas, es decir la cantidad de proteína bruta presente en la biomasa seca.

La proteína bruta se refiere a la proteína determinada mediante métodos que cuantifican el nitrógeno total de la muestra, sin diferenciar cantidades pequeñas de nitrógeno de origen no proteico que pueden presentarse en otras estructuras⁵⁸, permitiendo una aproximación válida de la cantidad de proteína presente, debido a que en su mayoría el nitrógeno pertenece a los aminoácidos presentes en las proteínas⁵⁹, siendo este el determinado mediante el método Kjeldahl o Lowry, no obstante, el uso de métodos más selectivos que no tomen en cuenta nitrógeno total, sino específicamente nitrógeno proteico, a pesar de obtener una medida más

⁵⁴ BARBARINO, E. & LOURENÇO, S.O. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *Revista Springer*. Rio de Janeiro. 2005 pp 447-460.

⁵⁵ GONZÁLEZ et al. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*. 2010.

⁵⁶ T. CHIONG, et al. Microalgal-Based Protein By-Products: Extraction, Purification, and Applications. *Protein Byproducts*. 2016. Capítulo 12.

⁵⁷ TONGHUI, Xie; YUN, Xia; YU, Zeng; LI, Xingrui, Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. *Revista Bioresource Technology* pp.247-255. Febrero de 2017

⁵⁸ TREMBLAY, Sylvie. What is crude protein, *Livestrong*. [citado el 28 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.livestrong.com/article/519702-what-is-crude-protein/> <https://www.livestrong.com/article/519702-what-is-crude-protein/>

⁵⁹ MOORE, C. Jeffrey, et al. Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Vol.9,2010

precisa de la proteína (verdadera), tienen la desventaja de que también presentan mayores dificultades y variaciones para cada matriz o tipo de muestra⁶⁰, por ejemplo, en este caso la composición de la muestra de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* afecta la precisión de la cuantificación de proteínas, ventaja que poseen los métodos como Kjeldahl, porque no presentan tantas interferencias entre los cambios de muestra, siendo por esta razón el método más empleado.

El fundamento del método Kjeldhal es la digestión de las proteínas y otros componentes orgánicos que conforman la muestra, en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores metálicos, como óxido de mercurio y selenio o mezcla de sulfato de cobre con selenio⁶¹, el nitrógeno orgánico total se convierte en sulfato de amonio, que se neutraliza con base y se destila para luego ser recolectado y puesto con ácido bórico, con el fin de que el borato formado se titule con HCl o H₂SO₄, para finalmente determinar el nitrógeno presente en la muestra.⁶²

Para la cuantificación de proteínas entonces, primero el nitrógeno orgánico es cuantificado por el método Kjeldhal y posteriormente este valor se multiplica por un factor de conversión, que representa el porcentaje aproximado de nitrógeno que contiene una proteína para ese tipo de muestra.

1.8 FUENTES ORGÁNICAS DE NITRÓGENO

Para bioprocesos con microalgas más eficientes se buscan subproductos industriales que puedan ser aprovechados en el cultivo de microalgas, por el contenido de nitrógeno orgánico que presentan en forma de aminoácidos, estos se obtienen de la desnaturalización de algunas proteínas. La desnaturalización se presenta durante el procesamiento de los mismos, debido a que se utilizan temperaturas elevadas, en la mayoría de las proteínas esta se presenta a 90°C⁶³, afectando las estructuras superiores de la proteína, pero difícilmente alteran la estructura primaria, es decir la secuencia de aminoácidos, debido a que estos están unidos mediante enlaces peptídicos y son difícilmente alterados a estas temperaturas, si lo hacen, se presentan en temperaturas superiores de 200°C⁶⁴, por esta razón podrían evaluarse estas fuentes en el medio de cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*.

⁶⁰ Ibid.

⁶¹ ROMERO, Nalda, Depósito de documentos de la FAO, Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos (Capítulo 15).

⁶² SANTIAGO, Francisco JP SELECTA S.A., Determinación de proteínas por el método de Kjeldhal.(consultado el 30 de octubre de 2017). Disponible en: <http://www.grupo-selecta.com/notasdeaplicaciones/analisis-alimentarios-y-de-aguas-nutritional-and-water-analysis/determinacion-de-proteinas-por-el-metodo-de-kjeldahl-kjeldahl-method-for-protein-determination/>

⁶³ PLUMMER, David. Introducción a la Bioquímica Práctica. Aminoácidos y Proteínas. Capítulo 5. McGraw-Hill Latinoamericana. 1994.

⁶⁴ PLUMMER, David. Introducción a la Bioquímica Práctica. Aminoácidos y Proteínas. Capítulo 5. McGraw-Hill Latinoamericana. 1994.

1.8.1 Harina de sangre. Es un producto obtenido por la deshidratación de la sangre de animal, dependiendo del procesamiento la harina puede ser de alta o baja calidad, debido a las temperaturas a las cuales se dé el proceso. Si la harina se procesa a bajas temperaturas contiene alta cantidad de proteína no degradable en el rumen de animales, esto es favorable para la degradación intestinal, pero cuando la sangre se procesa a altas temperaturas, es decir a unos 100 °C por periodos largos, la proteína presente se desnaturaliza, llegando a aminoácidos libres ,y la harina se considera de baja calidad para alimento de ganado, sin embargo para el cultivo de microalgas aun representaría una fuente de nitrógeno asimilable⁶⁵, a pesar de que no se hayan realizado investigaciones en donde se adicione este subproducto en el medio de cultivo para su aprovechamiento y evaluación en la producción de microalgas.

1.8.2 Harina de maíz. Subproducto obtenido a partir de la molienda del cereal de maíz, en un proceso de trillado que no tiene un alto costo⁶⁶. Este subproducto se ha evaluado como potencial fuente de nitrógeno, igual que el suero de leche y la cáscara de papa en el crecimiento del hongo filamentoso *Mucor miehei*, evaluando el suero lácteo como fuente de nitrógeno y carbono, y la harina de maíz como fuente de nitrógeno, concluyendo que el crecimiento del microorganismo y favorecimiento de la actividad enzimática en el proceso de fermentación que realiza este hongo para la producción de renina, se obtenía al reemplazar la fuente de nitrógeno, Bactopeptona, por suero lácteo siendo éste el de mayor favorabilidad⁶⁷, brindando además una ventaja desde el punto de vista financiero, al utilizar subproductos y productos de bajo costo para la elaboración de los medios. A pesar de esto la harina de maíz no ha sido estudiada para el cultivo específico de microalgas.

1.8.3 Harina de pescado. Subproducto obtenido del procesamiento de pescados, al eliminar el agua y extraer el aceite de pescado como otro coproducto que tiene un mercado muy importante⁶⁸. El proceso regular inicia con el picado o molienda de los pescados de los cuales dependerá el valor nutricional de la harina, se cuece a una temperatura de 100°C durante 20 minutos, se prensa y centrifuga para extraer el aceite de pescado y, por último, se deseca la harina hasta dejarla con un 10% de humedad, siendo este un factor determinante para la utilización de las harinas en general ya que al contar con poca agua disponible se evita la proliferación de microorganismos.

⁶⁵ PIÑERA, Abril Karim, Manual para el cultivo de microalgas Universidad Autónoma de baja California sur, 2002. [en línea] citado el 30 de agosto de 2016. Disponible en: <http://biblio.uabcs.mx/tesis/TE1366.pdf>

⁶⁶ OSORIO, A., GÓMEZ, N., & SÁNCHEZ, C. Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho *Mucor miehei*. Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia N.º 45 pp. 17-26. Septiembre, 2008

⁶⁷ OSORIO, A., GÓMEZ, N., & SÁNCHEZ, C. Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho *Mucor miehei*. Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia N.º 45 pp. 17-26. Septiembre, 2008

⁶⁸ FEDNA, F. e. Harina de pescado. (Consultado el 6 de agosto de 2017). Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/harina-de-pescado-70913

El componente de mayor valor nutritivo en la harina de pescado es la proteína, que contiene una proporción ideal de aminoácidos esenciales, como lisina y metionina⁶⁹, además aporta una alta cantidad de fósforo disponible que puede traer problemas de contaminación en algunas aplicaciones para acuicultura, pero que pueden beneficiar el cultivo de microalgas, teniendo en cuenta que este es un importante intermediario metabólico y forma parte de lípidos y enzimas, sin mencionar que también es considerado un nutriente limitante del crecimiento microalgal⁷⁰.

La harina de sangre se ha aplicado en el cultivo de microalgas comparándose con cultivos enriquecidos con ensilado biológico de pescado⁷¹, un subproducto de la industria pesquera que genera contaminación, obteniendo rendimientos bajos de la harina de pescado en los cultivos (0.75g/L*d) respecto al ensilado de pescado y a medios control preparados a base de agua de mar, siendo además un subproducto más costoso⁷².

1.8.4 Harina de soja. Es un coproducto del proceso de extracción del aceite de soja obtenido al finalizar el proceso de desolventización, donde se evapora el solvente utilizado en el proceso de extracción del aceite de la torta, esta se seca hasta obtener harina con una humedad del 12% aproximadamente, asume gran importancia debido a la cantidad que se genera en el proceso, además de su alta demanda como fuente de proteína muy completa según el método de clasificación adoptado por la OMS y la FDA⁷³.

Dependiendo de su procesamiento también es la cantidad de proteína bruta en su composición bioquímica, esta normalmente está alrededor del 44% con la adición de cascarilla durante el proceso y harinas con porcentajes mayores de proteína, es decir, con un porcentaje de entre un 47 y 48% se obtienen en el proceso de extracción del aceite de los granos de soja mediante solvente.

La harina de soja es una buena fuente de proteína utilizada para alimentación acuícola, fundamentalmente por contener un buen balance de aminoácidos, sin embargo; a comparación con la harina de pescado tiene una deficiencia en metionina y cisteína, dos aminoácidos esenciales, por ser esta harina de origen vegetal y no animal⁷⁴

⁶⁹ Ibid.

⁷⁰ GONZALES L. María. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. trabajo de para optar al título de Msc. universidad nacional de Colombia, 2010.

⁷¹ JUSCAMAITA Juan. Producción de la microalga *nannochloropsis oculata* (droop) *hibberd* en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. Universidad Nacional Agraria de Lima.

⁷² Ibid.

⁷³ B., M. A., & Thais M., F. (s.f.). Fuentes de aceites y grasas: materias primas industriales. En Temas selectos en aceites y grasas (págs. 1-24). BLUCHER.

⁷⁴ FAO, Aminoácidos esenciales. [citado el 25 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S06.htm>

Se ha aplicado harina de soya a medios de cultivo de microalgas⁷⁵, comparándose con medio nutritivo, Yashima, tratamiento control establecido por la FAO. El medio que contenía harina soya presentaba 30% de esta, 50% de salvado de trigo y 18% de cebadina, entre sus principales componentes, además de agua, melaza y carbón vegetal, afirmando que el medio de compuestos orgánicos fue más eficiente que el medio control, aumentando el crecimiento de la microalga, mejorando la calidad del cultivo y reduciendo el costo de producción en un 98.8%⁷⁶.

No se reportan evaluaciones para medios enriquecidos con harina de soya para la microalga evaluada en esta investigación, no obstante, el artículo de investigación "Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético"⁷⁷, estudia la viabilidad de utilizar como medio de cultivo el residual que queda del ablandamiento del grano de soya, obteniendo altos valores de densidad celular máxima (360×10^6 cel/mL), comparados con un medio control (Bristol), que tiene nitrato como principal fuente de nitrógeno, presentando también mayor acumulación de proteínas. Por otra parte, se aplica un campo magnético sobre el cultivo en fase exponencial para evaluar el efecto de este sobre el crecimiento celular, encontrando que en el residual de soja y bajo un campo magnético de 0.03T se obtienen densidades celulares máximas en un menor tiempo de cultivo.

1.8.5 Suero de leche como subproducto de la industria quesera. El suero de leche o lactosuero proviene de la elaboración de quesos como subproducto después de la coagulación o precipitación de la caseína. Su rendimiento es bastante alto ya que aproximadamente por cada 10 litros de leche utilizada en la elaboración de quesos se obtienen 8.5 litros de lactosuero como subproducto⁷⁸. Su composición, en la tabla 3, puede variar de acuerdo con la materia prima utilizada, la calidad de la leche, su valor nutricional además del tipo de queso a realizar, ya que los principales tipos de suero que se obtienen gracias al proceso de elaboración del queso se pueden clasificar en dulce o ácido. El primer tipo de suero se caracteriza porque para su obtención se utilizan enzimas proteolíticas (cuajo) las cuales hacen que la caseína se precipite a una temperatura que no sobrepasa los 50°C⁷⁹; el segundo tipo de suero se obtiene acidificando la leche (pH entre 4.5-4.6⁸⁰) con el fin de precipitar la caseína igualando la carga eléctrica neta a cero de la proteína, haciendo que ésta se desestabilice y se precipite. El suero lácteo es rico en proteínas totales y aminoácidos esenciales, son proteínas de rápida absorción para el cuerpo humano.

⁷⁵ Efecto del medio EM-bokashi en el cultivo de la microalga marina *tetraselmis suecica* k. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú. Revista de Ecología Aplicada, Vol 6, p. 111-116.

⁷⁶ Ibid.,p.111

⁷⁷ GOMEZ Lilina: ALVAREZ Inaundis, Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. Revista Colombiana de Biotecnología de la Universidad Nacional. p. 27-38.

⁷⁸ Jelen, P. Whey processing, utilization and products. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. London, UK, 2003. p. 2739-2745.

⁷⁹ Hernández, M. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. México, 2014. p. 13-22

Tabla 3. Composición del lactosuero dulce y ácido.

| Constituyente | Lactosuero dulce (g/L) | Lactosuero ácido (g/L) |
|---------------|------------------------|------------------------|
| Sólidos | 63,0-70,0 | 63,0-70,0 |
| Lactosa | 46,0-52,0 | 44,0-46,0 |
| Proteína | 6,0-10,0 | 6,0-8,0 |
| Calcio | 0,4-0,6 | 1,2-1,6 |
| Fosfatos | 1,0-3,0 | 2,0-4,5 |
| Lactato | 2,0 | 6,4 |
| Cloruros | 1,1 | 1,1 |

Fuente: Guerra, et al. Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. Valledupar, Colombia, 2013. p. 57

El suero lácteo en el cultivo específico de la microalga *Chlorella vulgaris* ha sido evaluado como sustrato potencial para la producción de biomasa y lípidos, demostrando que la aplicación de este subproducto en el medio de cultivo mejoró el rendimiento de biomasa seca y la productividad volumétrica frente a un medio control, obteniendo 0.076 g/L*d de biomasa con el cultivo enriquecido, respecto al medio control con 0.05 g/L*d de biomasa seca⁸¹.

1.8.6 Estiércol. Mezcla de heces de los animales y orina. Compuesto por otros elementos generalmente paja, restos de alimentos, productos químicos y agua entre otros. Actualmente es utilizado como fertilizante ya que aporta materia orgánica al suelo, en especial nitrógeno. El contenido de nutrientes del estiércol depende del tipo de ganado, alimentación, condiciones ambientales, contenido de materia seca (estado fresco o secado), como se observa en la tabla 4. El estiércol está formado por materiales hidrocarbonados, compuestos nitrogenados y una alta población de microorganismos con un contenido bajo de elementos minerales. El nitrógeno presente se encuentra principalmente en su forma orgánica (C_n-NH₂) y requiere de procesos como la mineralización, para que los microorganismos tomen el nitrógeno orgánico presente y lo transforman en amonio (NH₄), nitritos (NO₂⁻) y nitratos (NO₃⁻)⁸², esto con el fin de ser más fácilmente absorbido por las microalgas⁸³

⁸¹ CHAPARRO, Ginna. Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio. Trabajo de grado Ingeniera Química. Bogotá, D.C. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías. 2017.

⁸² IGLESIAS, L. *El estiércol y las practicas agrarias respetuosas con el medio ambiente.* . (1994). Getafe-Madrid: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

⁸³ GONZALES L. María, Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus acutus*. Universidad Nacional de Colombia. 2010

Tabla 4. Guía del campo de los cultivos Andinos, Composición química del estiércol

| Especie animal | Materia seca % | N % | P2O5 % | K2O % | CaO % | MgO % | SO4 % |
|----------------|----------------|------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Vacunos (f) | 6 | 0,29 | 0,17 | 0,10 | 0,35 | 0,13 | 0,04 |
| Vacunos (s) | 16 | 0,58 | 0,01 | 0,49 | 0,01 | 0,04 | 0,13 |
| Ovejas(f) | 13 | 0,55 | 0,01 | 0,15 | 0,46 | 0,15 | 0,16 |
| Ovejas (s) | 35 | 1,95 | 0,31 | 1,26 | 1,16 | 0,34 | 0,34 |
| Caballos (s) | 24 | 1,55 | 0,35 | 1,50 | 0,45 | 0,24 | 0,06 |
| Caballos(f) | 10 | 0,55 | 0,01 | 0,35 | 0,15 | 0,12 | 0,02 |
| Gallina (s) | 47 | 6,11 | 5,21 | 3,20 | s.i. | s.i. | s.i. |

(f) Fresco, (s) Seco, (s.i.) Sin información

Fuente: Tapia, M. Guía de campo de los cultivos andinos. Perú, 2007. Citado en 18 de agosto de 2017. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/ai185s/ai185s.pdf>

Como se puede observar, el estiércol de gallina es uno de los que más porcentaje de nitrógeno presenta, seguido de los camélidos, mejor conocidos como llamas en Colombia, y las ovejas o cabras.

Algunos de estos residuos como el estiércol de caballo y el humus de lombriz, han sido evaluados frente a medios con fertilizantes para los cultivos de *Chlorella vulgaris*⁸⁴, en los resultados de esta evaluación se mostró que la utilización de estos compuestos orgánicos permiten densidades celulares menores respecto al medio enriquecido con fertilizante complejo NPK, pero superiores respecto al medio Chu₁₀, se encontró además un mayor contenido proteico en las células cultivadas en el humus de lombriz y la equinaza, con porcentajes de 56.8% y 32.5%, comparado con el medio NPK de tan solo un 16.8% de proteína, a pesar de tener la mayor densidad celular⁸⁵.

El estiércol de gallina o gallinaza también se ha estudiado en el cultivo de microalgas, en específico el cultivo de *Chlorella sorokiniana*, utilizando medios mixotróficos con el lixiviado de gallinaza⁸⁶ en porcentajes de 30, 50 y 80%, evaluando entre los medios densidades celulares máximas y velocidades específicas de crecimiento, mostrando las mejores condiciones de cultivo en uno de los medios autotróficos, (Remital), a bajas concentraciones para esta especie de microalga, concluyendo que para esta, el cultivo autotrófico era más favorecedor que el mixotrófico, es decir, la utilización del lixiviado de gallinaza no mostró mejores resultados en el crecimiento celular⁸⁷

⁸⁴ Effect of culture medium on growth and protein content of *Chlorella vulgaris*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol 25, 2011.

⁸⁵ Ibid.

⁸⁶ Evaluación del crecimiento de la microalga *chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. Departamento de ingeniería Agronómica de la Universidad de los Llanos.

⁸⁷ Ibid.

1.8.7 Subproductos del café. El café es uno de los productos más apetecidos en Colombia y en el mundo, se obtiene de semillas tostadas y molidas, contiene minerales, sustancias orgánicas como los carbohidratos, lípidos, proteínas y alcaloides⁸⁸. Para su obtención son necesarios procesos de recolección, despulpado, lavado, secado y tostado; cada uno de estos procesos genera cierta cantidad de residuos los cuales contienen ciertos componentes que pueden ser aprovechables como abonos orgánicos, en el proceso industrializado del café, solo se aprovecha el 5% en peso del fruto seco, el 95% restante son residuos orgánicos con diferentes composiciones químicas⁸⁹

La almendra o el grano del café es el que contiene una mayor cantidad de compuestos nitrogenados, seguido de la pulpa, siendo el subproducto con mayor cantidad de nitrógeno total, conteniendo de un 1.3 a un 2% de nitrógeno que puede llegar a ser una buena fuente de nutrientes orgánicos para las microalgas, a pesar de no haber reportes de la evaluación de este subproducto para el cultivo de las mismas. Por otra parte, la utilización de este subproducto en bioprocesos con microalgas podría disminuir la contaminación de ciertas fuentes hídricas debido a la mala disposición que a veces se le da a estos subproductos y a la remediación que se realizaría al agua mediante la utilización de las microalgas.

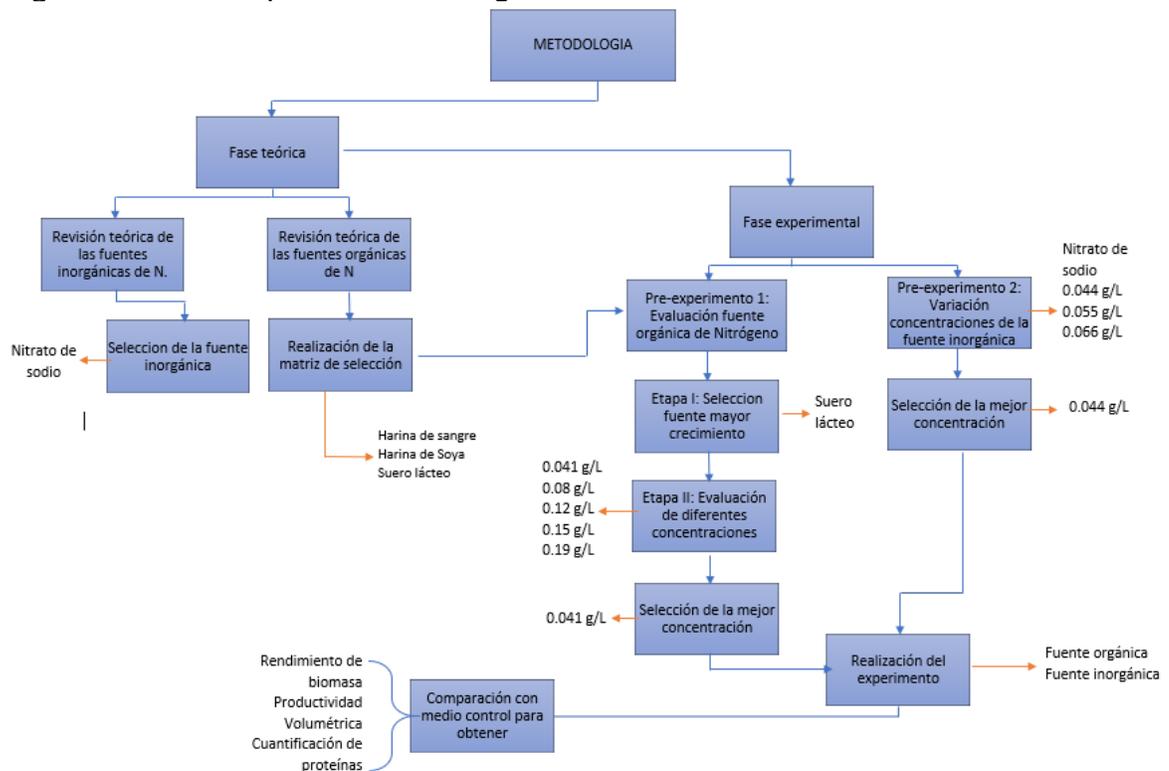
⁸⁸ CENICAFÉ, Manejo de subproductos. [Citado el 25 de noviembre de 2017]. Disponible en: http://www.cenicafe.org/es/index.php/cultivemos_cafe/manejo_de_subproductos

⁸⁹ Ibid.

2. METODOLOGÍA

La metodología se desarrolló en una primera fase teórica y una segunda fase experimental dividida en dos pre-experimentos y un experimento final, como se muestra en la Figura 5.

Figura 5. Esquema metodológico.



2.1 FASE TEÓRICA

Consistió en hacer una revisión teórica para encontrar las dos fuentes de nitrógeno, tanto inorgánica como orgánica con el fin de enriquecer el medio de cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*. La fuente inorgánica se definió mediante la comparación y análisis de resultados de varias investigaciones consultadas.

Para la selección de la fuente orgánica se analizaron diferentes tipos de materias provenientes de procesos industriales o agrícolas, los cuales se compararon mediante una matriz de selección, de acuerdo con los criterios descritos en el cuadro 1, evaluando su potencial como fuente de nitrógeno orgánico para cultivos de microalgas.

Cuadro 1. Criterios de selección para la fuente orgánica de nitrógeno

| Fuente orgánica | Relación: Porcentaje de Nitrógeno respecto al costo | Susceptibilidad a contaminación | Disponibilidad |
|---|---|---|--|
| <p>Estructura orgánica en la que se encuentra el nitrógeno en la fuente evaluada. Teniendo en cuenta que, para todas las fuentes, la forma orgánica son los aminoácidos. Estos se encuentran por desnaturalización de la proteína en el respectivo proceso de obtención de las materias primas evaluadas. Los aminoácidos y la urea son estructuras químicas asimilables por las microalgas⁹⁰ y por lo tanto permiten el crecimiento de estos microorganismos.</p> | <p>La relación porcentaje de nitrógeno/costo, se refiere a la cantidad de nitrógeno en porcentaje teórico de cada fuente que puede aportar al medio de cultivo, dividido entre el costo por gramo de cada una en el mercado. Teniendo en cuenta que debe ser un bioproceso viable se busca que las materias primas o las fuentes del nitrógeno orgánico tengan un bajo costo o sean subproductos de la industria de bajo valor comercial. Este criterio se evaluó, definiendo tres rangos de relación: Bajo: 0 a 0.3 Medio: 0.3 a 5 Alto: mayor a 5</p> | <p>A pesar de que las fuentes orgánicas por su naturaleza son susceptibles a la contaminación, no todas tienen la misma carga de microorganismos, materia orgánica y contenido de agua, por ello se evaluó este criterio, para determinar si era necesario realizar un pretratamiento a los productos o subproductos industriales elegidos antes de añadirlos al medio de cultivo. No se especifica la contaminación referida al cultivo de microalgas, sino la contaminación que pueda presentarse durante el almacenamiento o la manipulación de estas materias primas.</p> | <p>Se buscó que fuese un producto de fácil adquisición en la zona de realización del ensayo experimental, es decir, que sea un producto de fácil obtención en la ciudad de Bogotá, D.C. que no requiera costos adicionales de transporte dado que este generaría un incremento en la relación %nitrógeno/costo. Además se busca que sea un producto o subproducto que se genere en altas cantidades. Así mismo se consideró que no compita entre las principales materias primas en el sector alimenticio.</p> |

⁹⁰ ORTIZ MORENO Martha, *et al.* Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas [citado el 20 de noviembre de 2017]. Disponible en internet: <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v16n1/v16n1a02.pdf>

2.1.1 Concentración de Nitrógeno para las fuentes orgánicas seleccionadas. El trabajo de grado “Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio”⁹¹ se tomó como referencia el tratamiento con mayor producción de biomasa microalgal, para determinar la cantidad de suero lácteo a usar y establecer mediante el cálculo de proteína bruta⁹² la cantidad de nitrógeno presente en esta muestra, con el fin de llevar esta misma concentración a los tres tratamientos, harina de sangre, suero lácteo y harina de soya, con sus respectivas réplicas.

2.1.2 Cálculo de la concentración de nitrógeno de las fuentes orgánicas seleccionadas. A continuación, se presentan los cálculos para la determinación de las cantidades de fuentes orgánicas que se agregaron a cada uno de los tratamientos de tal forma que existiera una equivalencia en términos de concentración de nitrógeno. Se tuvo en cuenta que, en las fuentes orgánicas de nitrógeno seleccionadas, este nutriente debido a la desnaturalización de proteínas se encuentra presente en forma de aminoácidos libres que son asimilados por las microalgas ⁹³.

Se obtuvieron de la teoría los valores aproximados de proteína y ya que esta es una medida indirecta de la cantidad de nitrógeno, con el siguiente factor se realizaron las conversiones de proteína bruta a nitrógeno.

$$(4) \quad \text{Proteína bruta} = \text{Nitrógeno total} * 6.25$$

Este factor se basa en la suposición de que aproximadamente un 16% de nitrógeno está presente en la proteína promedio, como se verá más adelante es utilizado para determinar la cantidad de proteína bruta de una muestra, usualmente mediante el método Kjeldahl⁹⁴.

Proteína teórica del suero lácteo = 7 g/L

Nitrógeno total = 1.12 g/L

En el pre tratamiento realizado al suero, se pasteurizó y se evaporó a la mitad, es decir se concentró a 2.24 g/L de nitrógeno.

⁹¹ CHAPARRO, Gina. Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio. Trabajo de grado Ingeniera Química. Bogotá, D.C. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías. 2017.

⁹² MOORE, Jeffrey, et al. Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. Institute of food Technologists.2010. [en línea]. Disponible en internet: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2010.00114.x/pdf>

⁹³ FERNANDEZ, Jose. Nutrientes y medios de cultivo de microalgas. Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas. Universidad de Almería. [en línea]. 2014. Disponible en internet: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-3-nutrientes.html>

⁹⁴ FAO. Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos. [en línea]. Citado 19 de noviembre de 2017. Disponible en internet: <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s17.htm>

En la literatura no se encuentran fuentes de nitrógeno como las harinas de soya y de sangre para la producción de biomasa microalgal, no obstante, se encuentra registro del uso del suero de leche para la producción de biomasa de microalgas⁹⁵, en el cual se obtuvo la mayor tasa de crecimiento a una concentración de nitrógeno atribuido por el suero de leche de 0.11g/L, por esta razón se tomó esta concentración de Nitrógeno inicial para obtener la cantidad de harina de soya y sangre necesarias para obtener la misma concentración.

Para la harina de sangre con un 12.2% de Nitrógeno, la concentración fue de 0.11g/L con un volumen total para este tratamiento de 0.27L, es decir, la cantidad de nitrógeno que debe aportar la harina de sangre es de 0.03 g, igual que la harina de soya que contiene un 7% de nitrógeno.

$$(5) \quad 0.03 \text{ g de Nitrógeno} * \frac{1 \text{ g de harina de sangre}}{0.122 \text{ g de Nitrógeno}} = 0.25 \text{ g de harina de sangre}$$

$$(6) \quad 0.03 \text{ g de Nitrógeno} * \frac{1 \text{ g de harina de soya}}{0.07 \text{ g de Nitrógeno}} = 0.43 \text{ g de harina de soya}$$

2.1.3 Diseño de experimentos. En la tabla 5, se muestran las variables de respuesta para cada uno de los ensayos experimentales realizados en esta fase.

Tabla 5. Variables de respuesta en la fase experimental

| | Variable manipulada | Variable de respuesta |
|--|--|--|
| Pre-experimento 1: Etapa I ⁹⁶ | Fuentes orgánicas de nitrógeno | [cel/ml] y μ |
| Pre-experimento 1: Etapa II ⁹⁷ | Concentraciones de Fuente orgánica | [cel/ml] y μ |
| Pre-experimento 2 ⁹⁸ | Concentraciones de Fuente inorgánica | [cel/ml] y μ |
| Experimento ⁹⁹ | Fuentes orgánica, inorgánica y control | [cel/ml], μ , peso seco, productividad volumétrica y rendimiento de proteína |

⁹⁵ CHAPARRO, Ginna. Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio. Trabajo de grado Ingeniera química. Bogotá, D.C. Fundación Universidad de América. Facultad de Ingenierías. 2017

⁹⁶ Elección de fuente orgánica, selección entre harina de Soya, de Sangre y Suero lácteo. Mayor tasa de crecimiento el suero lácteo

⁹⁷ Determinación de la concentración con mayores crecimientos celulares de la fuente orgánica. Mejor concentración de fuente orgánica 0.041 g/L de nitrógeno.

⁹⁸ Determinación de la concentración con mayores crecimientos celulares de la fuente Inorgánica. 1 g/L de nitrato de sodio.

⁹⁹ Evaluación del crecimiento celular y biomasa del enriquecimiento del medio con fuente orgánica e inorgánica. Mayor rendimiento de biomasa y productividad volumétrica enriqueciendo el medio con el suero lácteo.

2.2 FASE EXPERIMENTAL

2.2.1 Preparación del inóculo. Para todos los ensayos experimentales que se realizaron en esta fase, el inóculo se preparó a partir de un cultivo base con la cepa de microalga *Chlorella vulgaris*, este solo contiene medio preparado en una proporción de 0,2% V/V de fertilizante agrícola (Foliagro) en agua destilada. La composición del fertilizante se puede apreciar en el Anexo B. La cantidad del inóculo tomada para los dos pre-experimentos fue de 100 ml y para la preparación de éste y de los medios de cultivo se empleó la técnica aséptica¹⁰⁰

2.3 CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA EXPERIMENTACIÓN

Todos los cultivos microalgales se dispusieron en una incubadora, Figura 6, con iluminación mediante cinta LED 5050 roja de la marca New Light de 12V Y 14.4 W de potencia, por ser la luz roja la longitud de onda que permite alto aprovechamiento de la luz artificial en la fotosíntesis microalgal (600-680 nm)¹⁰¹, con un fotoperiodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad, que se controló con un temporizador análogo de la marca Completel (TS-WU3).

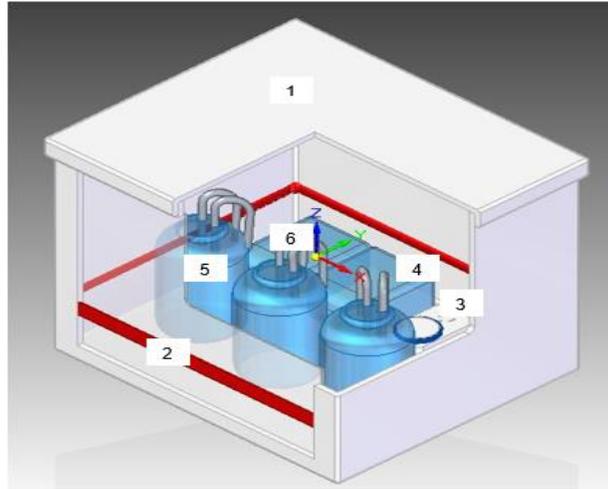
Adicionalmente, se realizó la medición de la temperatura y pH al inicio y al final de los ensayos experimentales pertenecientes a la etapa I y II del pre-experimento 1, mediante el pH metro Sension+ PH1 de la marca Hach, para verificar que las condiciones del cultivo fueran las adecuadas para la microalga *Chlorella vulgaris* de acuerdo con la teoría.

Para la agitación se utilizaron bombas de aire de la marca Shark (RS-610), que proporcionaron un caudal de salida de 4 L/min mediante una manguera de entrada, con referencia 3/16", conectada hasta el recipiente de vidrio con el fin de generar una entrada de aire y agitación, al recipiente también se adaptó una manguera de salida, para la desgasificación del tratamiento, con un filtro de aire hecho con algodón para disminuir la posible contaminación externa al medio.

¹⁰⁰ MALAJOVICH, Maria. Introducción a las técnicas microbiológicas. Biotecnología: enseñanza y divulgación. 2015 [en línea] Disponible en internet: https://bteduc.com/roteiros_es/2015_Tecnicas_microbiologicas.pdf

¹⁰¹ ALVAREZ, J. Cultivo de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) con iluminación mediante LEDs (Light Emitting Diodes). Trabajo de grado Ingeniero agrónomo. Universidad Politécnica de Madrid. 2012.

Figura 6. Montaje utilizado en la experimentación para los medios de cultivo



Fuente: RIVERA, C. Montaje utilizado en la experimentación. 2017

A continuación, se presentan los elementos de las condiciones de cultivo:

Tabla 6. Convenciones de la figura 6.

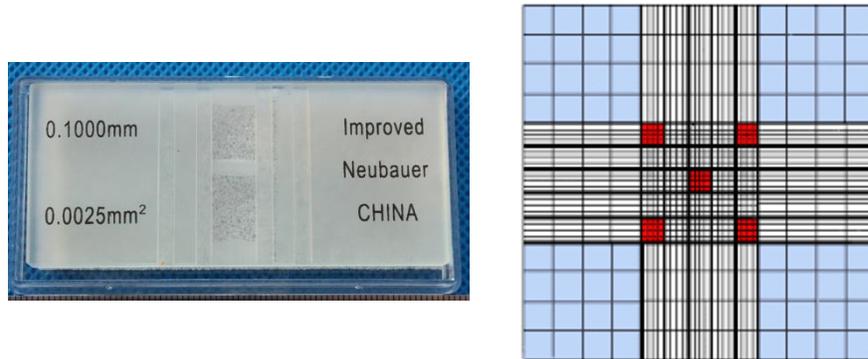
| | |
|---|----------------------------|
| 1 | Cava de icopor |
| 2 | Cinta led 5050 Roja |
| 3 | Temporizador (TS-WU3) |
| 4 | Bomba Shark (RS-610) |
| 5 | Recipientes de vidrio |
| 6 | Manguera de plástico 3/16" |

2.4 RECUENTO CELULAR

Se utilizó el método de recuento en cámara de Neubauer, uno de los más utilizados para determinar concentración celular de las microalgas¹⁰², esta cámara es una herramienta de precisión utilizada para determinar el número de células de microalga por unidad de volumen, expresado en (cel/ml).

¹⁰² MALAJOVICH, María. Introducción a las técnicas microbiológicas. Biotecnología: enseñanza y divulgación. 2015 [en línea] Disponible en internet: https://bteduc.com/roteiros_es/2015_Tecnicas_microbiologicas.pdf

Figura 7. Cámara de Neubauer



Fuente: CELEROMICS. Conteo Celular con Hematocitómetro. [en línea].
Disponible en:
<http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/Como-contar-celulas-con-camara-de-Neubauer-Definiciones.php>

Se realizó el conteo tomando una muestra del medio de cultivo, con una micropipeta, depositándola en la cámara de Neubauer para ser llevada al microscopio, en ella solo se contaron las células que se encontraban en los cuadrantes de las esquinas y centro de la sección (zona sombreada de la Figura 7) por lo que se contaron 5 cuadrantes. Se halló la concentración celular utilizando la siguiente ecuación:

$$(7) \quad \text{Concentración} \left(\frac{\text{Cél}}{\text{ml}} \right) = \# \text{Células totales en cinco cuadrantes} * \text{Factor Dilución} * 50.000$$

2.5 PRE-EXPERIMENTO 1: ETAPA I

Se evaluó experimentalmente cada una de las tres fuentes orgánicas de nitrógeno: harina de sangre, suero lácteo y harina de soja, que se seleccionaron a partir del análisis teórico y la matriz de selección, analizando el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en medios con enriquecimiento de estas tres fuentes, realizando tres replicas para cada tratamiento. Se mantuvo constante la concentración del nitrógeno para cada una de éstas, así como todos los demás factores que inciden en su crecimiento tales como luz, temperatura y agitación.

Los medios de cultivo que fueron enriquecidos con la harina de sangre y soja tuvieron un volumen final de 270 mL, mientras que para el suero lácteo fue de 285 mL, de acuerdo con la composición de los medios de cultivo como se observa en la Tabla 7, estos se realizaron en recipientes de vidrio con capacidad de 1 L.

Tabla 7. Composición de los medios del cultivo con enriquecimiento de fuentes orgánicas.

| Medio de cultivo | 1 | 2 | 3 |
|-----------------------|--------|--------|--------|
| Inóculo de microalgas | 100 mL | 100mL | 100mL |
| Medio de Foliagro | 150 mL | 150 mL | 150 mL |
| Agua destilada | 20 mL | 20 mL | 20 mL |
| Suero lácteo | 15 mL | - | - |
| Harina de sangre | - | 0.25 g | - |
| Harina de soya | - | - | 0.43 g |
| Volumen total | 285 | 270 | 270 |

Los gramos de harina de sangre y soja se disolvieron previamente en los 20 mL de agua destilada de la composición del medio de cultivo antes de ser añadidos, mientras que, para el suero lácteo, este tuvo el siguiente pretratamiento antes de ser agregado.

2.5.1 Pre tratamiento del suero lácteo. El suero lácteo se obtuvo como subproducto de la elaboración de cuajada como se plantea en el Anexo A, una vez se separó, éste se llevó a un calentamiento prolongado a temperatura de ebullición (100-101°C)¹⁰³ con el fin de evaporar la mitad del volumen del suero lácteo obtenido, mediante la medición inicial y final de la altura del líquido en el recipiente, para eliminar gran parte del agua que representa el 93.7%¹⁰⁴ y concentrar el extracto seco, (proteínas, materia grasa, hidratos de carbono y minerales) es decir, todos los componentes del suero menos el agua¹⁰⁵ ya que algunos de estos tienen un punto de ebullición más alto y no se alcanzan a evaporar en especial la de los aminoácidos los cuales tienen una temperatura de ebullición de 200°C¹⁰⁶. Se mantuvo en punto de ebullición constante por aproximadamente dos horas, se volvió a filtrar con el fin de separar parte de las proteínas, azúcares y grasas entre otros, que se precipitaron de nuevo debido a la alta temperatura y finalmente se llevó a un choque térmico con hielo con el fin de retrasar e inhibir parte de la carga bacteriana, retrasar su posible deterioro y conservar su calidad.

103 BOLAÑOS, Pablo. Agroindustria, Parte 1. EUNED. ISBN: 997764537X, 9789977645377

104 ARANGO, A. El suero de quesería un potencial industrial, tecnológico, económico y de alto valor nutricional. COLANTA. Citado en 11 de septiembre de 2017. Disponible en: http://biblioteca.colanta.com.co/pmb/opac_css/doc_num.php?explnum_id=411

105 ETSIAAB. Características de las materias primas. [en línea]. Disponible en internet: https://www1.etsia.upm.es/acreditacion2015/Evidencias_IAL/TFC/Laura%20D%C3%ADaz%20D%C3%ADaz/7.%20ANEJO%20IV.%20CARACTER%C3%8DSTICAS%20DE%20LAS%20MATERIAS%20PRIMAS.pdf

106 PLUMMER, David. Introducción a la Bioquímica Práctica. Aminoácidos y Proteínas. Capítulo 5. McGraw-Hill Latinoamericana. 1994.

2.5.2 Tratamiento de los datos de la etapa I. Mediante la linealización de las concentraciones celulares se calculó la tasa intrínseca de crecimiento (μ), siendo la variable de respuesta para el análisis de estadística descriptiva como el promedio, la varianza y la desviación estándar, para determinar así cuál de los tres medios enriquecidos obtuvo una mayor tasa de crecimiento, seleccionando la fuente orgánica que mayor favorabilidad presentó en el cultivo y utilizarla en la etapa II de la pre-experimentación.

2.6 PRE-EXPERIMENTO 1: ETAPA II

De acuerdo con los resultados obtenidos en la etapa I, donde se evaluaron las tres fuentes orgánicas seleccionadas, se definió el suero lácteo como fuente orgánica para enriquecer el medio de cultivo. Posteriormente se realizaron ensayos a cinco concentraciones diferentes y se determinó su efecto sobre el crecimiento o producción de la biomasa microalgal. Estas concentraciones fueron 0.041 g/L, 0.08 g/L, 0.12 g/L, 0.15 g/L y 0.19 g/L de nitrógeno tomando como base la concentración de suero lácteo en la que se presentó mayor productividad¹⁰⁷, a diferencia de que en esta investigación este subproducto cuenta con un pretratamiento antes de ser añadido. Es decir, el medio de cultivo fue enriquecido con variaciones de 5, 10, 15, 20 y 25 ml de suero lácteo concentrado de acuerdo con la tabla 8.

Tabla 8. Composición de los tratamientos enriquecidos con suero lácteo

| Medio de cultivo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------------------------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| Inoculo de microalga | 100 mL | 100 mL | 100 mL | 100 mL | 100 mL |
| Medio Foliagro | 150 mL | 150 mL | 150 mL | 150 mL | 150 mL |
| Agua destilada | 20 mL | 20 mL | 20 mL | 20 mL | 20 mL |
| Suero lácteo | 5 mL | 10 mL | 15 mL | 20 mL | 25 mL |
| Volumen total | 275 mL | 280 mL | 285 mL | 290 mL | 295 mL |
| Enriquecimiento de nitrógeno | 0.041 g/L | 0.08 g/L | 0.12 g/L | 0.15 g/L | 0.19 g/L |

2.6.1 Diseño experimental. Se evaluó la influencia de la concentración de suero lácteo en la etapa II del pre-experimento 1, mediante un análisis de varianza ANOVA de un factor, para determinar si la concentración afectaba la variable de respuesta, es decir, la tasa intrínseca de crecimiento, sabiendo que la hipótesis nula H_0 indica que no hay efecto de los niveles o concentraciones del suero lácteo sobre la variable de respuesta, y la hipótesis alterna H_1 , que sí hay un impacto sobre esta.

$$(8) \quad H_0: \quad \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$$

$$(9) \quad H_1: \quad \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5$$

¹⁰⁷ CHAPARRO, Ginna. Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio. Trabajo de grado Ingeniera química. Bogotá, D.C. Fundación Universidad de América. Facultad de Ingenierías. 2017

Para determinar cuál fue la mejor concentración de suero lácteo a usar en el experimento final, se compararon las tasas intrínsecas de crecimiento de los diferentes ensayos experimentales.

2.7 PRE-EXPERIMENTO 2

En esta etapa se evaluaron tres concentraciones diferentes de la fuente inorgánica de nitrógeno que se eligió en la fase teórica, nitrato de sodio, y se evaluó a que concentración se tuvo un mayor crecimiento microalgal, tomando como base los resultados presentados en el artículo científico¹⁰⁸, se evaluó un rango favorable para el crecimiento y la acumulación de proteínas con valores de 1 g/L, 1.25 g/L y 1.5 g/L de NaNO₃, estas concentraciones se evaluaron a las condiciones de este experimento, sin estrategia de sobrecompensación.

Se utilizaron recipientes de vidrio con capacidad de 1 L para evaluar los diferentes medios de cultivo, el volumen final de cada tratamiento fue de 270 mL de acuerdo con la tabla 9.

Tabla 9. Composición de los tratamientos enriquecidos con Nitrato de sodio.

| Medio de cultivo | 1 | 2 | 3 |
|------------------------------|-----------|----------|-----------|
| Inoculo de microalga | 100 mL | 100 mL | 100 mL |
| Medio Foliagro | 150 mL | 150 mL | 150 mL |
| Agua destilada | 20 mL | 20 mL | 20 mL |
| NaNO ₃ | 0.27 g | 0.337 g | 0.405 g |
| Enriquecimiento de nitrógeno | 0.044 g/L | 0.055g/L | 0.066 g/L |

2.7.1 Diseño experimental. Se evaluó la influencia de la concentración de nitrato de sodio del pre-experimento 2, mediante un análisis de varianza ANOVA de un factor, para determinar si la concentración afectaba la variable de respuesta, la tasa intrínseca de crecimiento, al igual que en el pre experimento 1. Para determinar cuál fue la mejor concentración de nitrato de sodio a usar en el experimento final, se compararon las tasas intrínsecas de crecimiento de los diferentes ensayos experimentales, seleccionando la mayor.

2.8 EXPERIMENTO

El experimento consistió en realizar los cultivos microalgales a partir de los resultados obtenidos en el pre-experimento 1 y 2; en otras palabras, se enriqueció el medio de cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* con la fuente orgánica e inorgánica de nitrógeno a concentraciones definidas anteriormente y se compararon con un ensayo experimental de control, que solo contenía medio Foliagro, para

¹⁰⁸ TONGHUI, Xie; YUN, Xia; YU, Zeng; LI, Xingrui, Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. Revista Bioresource Technology pp.247-255. febrero de 2017

evaluar mediante peso seco, el cálculo de rendimiento de biomasa, productividad volumétrica y fracción proteica, cuál fue la fuente de nitrógeno, que presentó mayor incremento celular y de proteína al enriquecer el medio de cultivo.

El volumen total de trabajo en los experimentos fue de 3 L partiendo de un volumen de 270 mL para los medios de control, nitrato de sodio y de 275ml para el tratamiento con suero lácteo de acuerdo con las siguientes tablas. La capacidad volumétrica de los recipientes de vidrio fue de 1 L y 4 L como se observa en la Figura 8.

Figura 8. Recipientes de vidrio para la experimentación

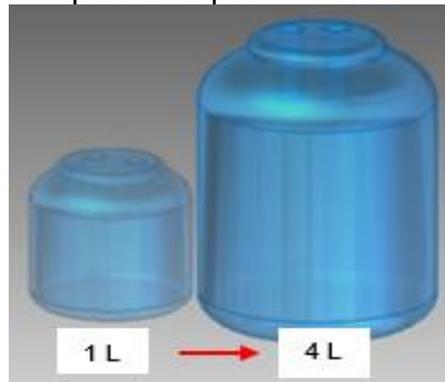


Tabla 10. Composición del cultivo con suero lácteo llevado a 3L.

| Composición | Proporción | Volumen inicial (mL) | Volumen Final (mL) |
|----------------|------------|----------------------|--------------------|
| Suero lácteo | 2% | 5 | 60 |
| Agua destilada | 7% | 20 | 210 |
| Inóculo | 37% | 102 | 1110 |
| Medio | 54% | 149 | 1620 |
| Volumen total | 100% | 275 | 3000 |

Tabla 11. Composición del cultivo con Nitrato de sodio llevado a 3L.

| Composición | Proporción | Volumen inicial (mL) | Volumen Final (mL) |
|------------------|------------|----------------------|--------------------|
| Nitrato de sodio | 1 g/L | - | - |
| Agua destilada | 9% | 24 | 270 |
| Inóculo | 37% | 100 | 1110 |
| Medio | 54% | 146 | 1620 |
| Volumen total | 100% | 270 | 3000 |

Tabla 12. Composición del Medio Control llevado a 3L.

| Composición | Proporción | Volumen inicial (mL) | Volumen Final (mL) |
|----------------|------------|----------------------|--------------------|
| Agua destilada | 9% | 24 | 270 |
| Inóculo | 37% | 100 | 1110 |
| Medio | 54% | 146 | 1620 |
| Volumen total | 100% | 270 | 3000 |

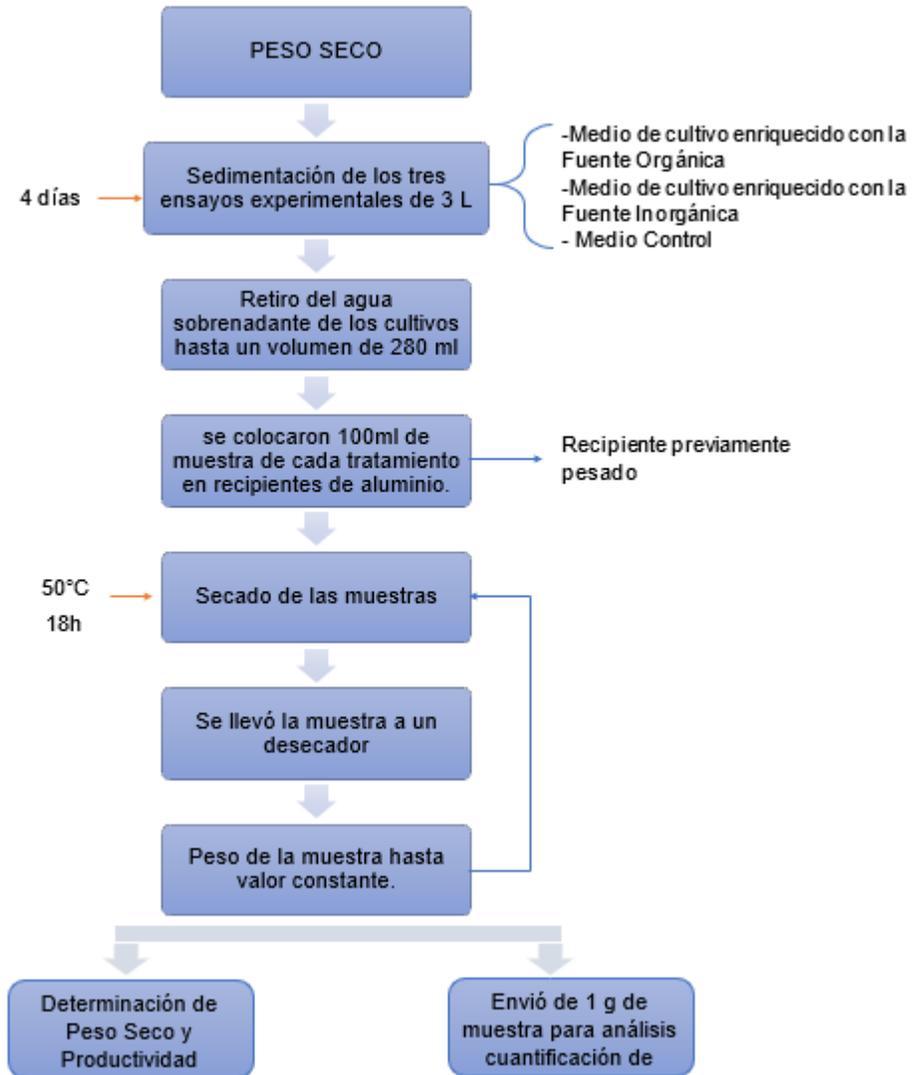
2.8.1 Tratamiento de los datos del experimento. Se realizó un análisis estadístico con las tasas intrínsecas de crecimiento (μ) resultantes de la linealización de las curvas de crecimiento, además se tomaron como variables de respuesta los resultados que se obtuvieron de rendimiento de biomasa y productividad volumétrica, para seleccionar la fuente de nitrógeno con mayores valores de estas variables.

2.9 PESO SECO, PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Se empleó el protocolo basado en el libro: Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal¹⁰⁹ modificado que se encuentra en el Anexo G, no obstante, en la Figura 9 se observa el diagrama de flujo:

¹⁰⁹ DOMENICO V. & ARREDONDO, V. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Capítulo 3: Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. CIBNOR. México.

Figura 9. Diagrama determinación de peso seco



Se utilizó para el secado de las muestras un horno de marca NABERTHERM – TR120, variando su temperatura hasta 50°C durante un periodo de 18 h para muestras de 50 ml. Después del periodo de secado se llevaron las muestras a un desecador por un periodo de 3 horas y se pesaron en una balanza analítica de 5 dígitos hasta obtener un peso constante. Por último, se realizaron los cálculos para la determinación de peso seco y productividad volumétrica.

$$(10) \quad PST (mg/ml) = \frac{(PSFM - PSF)}{VF}$$

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

$$(11) \quad Productividad = \frac{PST}{V_c * t \text{ (días)}}$$

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

El secado de la biomasa para el análisis de cuantificación de proteínas se realizó mediante un horno de marca CHALLENGER GH/DOR 120V/E, alcanzando la temperatura de 100°C durante un periodo de 12 h para muestras de 280 ml.

Para la realización del análisis de cuantificación de proteínas estándar, se dispuso de 0.53 g de biomasa seca de cada uno de los tres tratamientos, medio enriquecido con fuente orgánica, inorgánica y control, para así evaluar la acumulación de proteína en cada una de las células y se envió al análisis de cuantificación de proteínas, por el método Kjeldahl estándar de la AOAC 2001.11 (2005) / NTC 4657 (1999), en el laboratorio de alta complejidad de la Universidad de la Salle (LIAC).

2.10 EVALUACIÓN DE COSTOS DE LA BIOMASA OBTENIDA

Para el desarrollo del último objetivo, en este análisis solo se tuvieron en cuenta los costos operativos de producción de la proteína microalgal para los tres medios de cultivo evaluados. Este se determinó con base en el costo de producción de la biomasa y el porcentaje de proteína obtenido en los resultados del análisis de la cuantificación; además de la productividad y el rendimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* a nivel laboratorio.

Se realizaron cinco fases de resultados de costos, la primera indicó los costos comunes para la adaptación de los recipientes de cultivo y todo lo referente para iniciar la operación de producción de la biomasa, es decir, el costo unitario de operación. La segunda fase analizó el costo por litro de cada uno de los medios evaluados, teniendo en cuenta la variación en la composición de estos por los enriquecimientos realizados. El tercer análisis combinó las productividades obtenidas previamente en los diferentes tratamientos, enriquecidos y control, respecto a los costos establecidos por litro de cultivo, para determinar un costo por gramo de biomasa producida en cada tratamiento. Por último, se realizó una sumatoria para obtener un total de costos de producción, evaluando el costo asociado al consumo de energía y agua de los diferentes tratamientos, además de los costos de las materias primas utilizadas en los medios de cultivo, para seleccionar según estos análisis la fuente de nitrógeno enriquecida que presentó un buen balance entre costo y productividad. Por último, de acuerdo con la cantidad de biomasa obtenida y sabiendo el porcentaje de proteína de cada medio de cultivo se calculó el costo de la producción de la proteína de la microalga *Chlorella vulgaris*.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 FASE TEÓRICA

3.1.1 Selección de la fuente inorgánica. Para la fuente inorgánica de nitrógeno, se eligió el nitrato de sodio (NaNO_3), debido a que en diferentes investigaciones consultadas^{110 111 112}, la microalga *Chlorella vulgaris* es capaz de metabolizar este nutriente efectivamente, logrando mayores densidades celulares a diferencia de otras fuentes de nitrógeno como nitritos, que en grandes cantidades pueden llegar a inhibir el crecimiento microalgal y el amonio que puede generar una reducción del pH¹¹³ en el medio de cultivo.

3.1.2 Selección de la fuente orgánica. Se realizó la revisión teórica de las posibles fuentes orgánicas de nitrógeno para el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*, en el cuadro 2 se muestran los aspectos relevantes en los parámetros evaluados para los productos y subproductos industriales que pueden ser aprovechados en el cultivo de microalgas.

Cuadro 2. Evaluación de parámetros para la selección de las fuentes orgánicas de nitrógeno

| Fuente orgánica | Relación: %Nitrógeno/costo | Susceptibilidad a contaminación | Disponibilidad |
|------------------|--|---|---|
| Harina de sangre | Dependiendo de su procesamiento puede contener de 60-90% de proteína 10% de nitrógeno teórico Costo: 28 \$/g ¹¹⁴ Relación:0.36 | Esta harina puede presentar menor o mayor contaminación por residuos animales como uñas, dependiendo de su proceso de producción. Debido a su baja cantidad de agua puede conservarse y almacenarse fácilmente, sin embargo, no existen normas sanitarias que rijan este subproducto, utilizado para la elaboración de concentrados. ¹¹⁵ No es posible afirmar con certeza si la cantidad de hierro presente en esta harina podría generar problemas en el cultivo de microalgas. | Existe un gran volumen de sangre como subproducto en los mataderos, aproximadamente 2.8 Kg/ animal sacrificado, que no se comparan con su poca demanda, por lo cual podría ser evaluado para aplicaciones biotecnológicas como el cultivo de microalgas por poseer proteínas con aminoácidos de alto valor nutritivo que son procesadas a altas temperaturas desnaturalizando las proteínas. ¹¹⁶ |

110 LÓPEZ & GONZÁLEZ, Efecto de la concentración y fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de la microalga *Chaetoceros muelleri*. Revista Phytton. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. 2015

111 GOMÉZ, Liliána. Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella Salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba. 1997. [citado el 24 de noviembre de 201]

112 DURAN, Linda, et al. Influencia de la Relación Carbono/Nitrógeno en la Producción de Proteínas Totales en *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803. Universidad Industrial de Santander. [en línea]. 2011. Disponible en internet: <http://oaji.net/articles/2017/5082-1501178284.pdf>

113 GOMÉZ, Liliána. Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella Salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba. 1997. [citado el 24 de noviembre de 201]

114 Valor proporcionado por el Frigorífico Guadalupe de Bogotá.

115 BELTRAN, Catalina, et al. Aprovechamiento de la sangre de bovino para la obtención de harina de sangre y plasma sanguíneo en el matadero santa cruz de malambo Atlántico. Trabajo de grado Ingeniero de Alimentos. Bogotá, D.C. Universidad de la Salle. 2007.

116 Ibid.,

Cuadro 2. (Continuación).

| Fuente orgánica | Relación: %Nitrógeno/costo | Susceptibilidad a contaminación | Disponibilidad |
|---------------------------|---|---|--|
| Harina de maíz pre cocida | 8.29 g de proteína por cada 100g, es decir 8.29% de proteína ¹¹⁷ , representando un 1.33% de Nitrógeno teórico. Costo: 2.5 \$/g ¹¹⁸ Relación:0.53 | Su baja actividad de agua restringe el crecimiento microbiano si se almacena adecuadamente, sin embargo, cuando las condiciones de humedad no son adecuadas aparecen comúnmente bacterias del género <i>Bacillus</i> y diversos mohos. ¹¹⁹ | Es base de la alimentación en Suramérica, teniendo un consumo de 3 Kg de harina de maíz por habitante en Colombia al año. ¹²⁰ Es un alimento con alta demanda a pesar de ser ampliamente producido, por lo cual presenta esta desventaja para ser usada en el cultivo de microalgas. |
| Harina de soja | Depende de su procesamiento, pero la estándar, contiene 44% de proteína. 7.04 % de Nitrógeno teórico Costo 1.05 \$/g ¹²¹ Relación:6.70 | Esta se procesa térmicamente para disminuir la carga microbiana. ¹²² De igual manera, al ser una harina, su Aw es muy bajo, evitando la proliferación de microorganismos durante el almacenamiento y manipulación de esta materia prima. | La harina de soja es relativamente económica, por ser un subproducto proveniente de la industria del aceite de soja, pero posee una amplia aplicación internacional para la alimentación de ganado, por su valor nutritivo. ¹²³ Este subproducto ha obtenido buenos resultados implementándose para el cultivo de microalgas. ¹²⁴ |
| Harina de pescado | 70%, de proteína de alta calidad. 75.90 g por cada 100 g, es decir 12.14 % de Nitrógeno teórico ¹²⁵ Costo:5 \$/g ¹²⁶ Relación: 2.42 | Depende de la frescura en la que se disponga la materia prima y de sus temperaturas de almacenamiento, de lo contrario se afectará por actividad bacteriana y enzimática, a pesar de contener apenas un 10% de humedad ¹²⁷ . | Es un coproducto que cada vez tiene más aplicaciones por ser una fuente de proteína y grasa fácilmente digerible. La harina de pescado se convierte cada vez más en un producto importante que se utiliza solamente cuando el rendimiento lo requiera, es decir cuando se requieran alta cantidad y calidad de proteína, sino esta se reemplaza por harina de soja, debido a su alto costo. ¹²⁸ |

¹¹⁷FUNIBER, Fundación universitaria iberoamericana. Base de Datos Internacional de Composición de Alimentos [citado el 6 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.composicionnutricional.com/alimentos/HARINA-DE-MAIZ-1>

¹¹⁸ Boletín informativo, Indicadores Corabastos [citado el 30 de octubre de 2017]. Disponible en: http://www.corabastos.com.co/index.php?option=com_content&view=article&id=471&Itemid=290

¹¹⁹ Granos y harinas. (consultado el 6 de Agosto de 2017). Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/8%20granos%20y%20harinas.pdf>

¹²⁰ FEDEAGRO, Consumo per cápita [citado el 6 de Agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.fedeagro.org/consumo/cereales.asp>

¹²¹ Valor proporcionado por la productora Avío, en la central de mercado de Paloquemao de la ciudad de Bogotá.

¹²² B., M. A., & Thais M., F. (s.f.). Fuentes de aceites y grasas: materias primas industriales. En: *Temas selectos en aceites y grasas* (págs. 1-24). BLUCHER.

¹²³ Ibid.,

¹²⁴ RODRIGUEZ Luzmila. Efecto del medio EM-bokashi en el cultivo de la microalga marina tetraselmis suecica k. revista de ecología aplicada de la Universidad Nacional Agraria de Lima.

¹²⁵ FUNIBER, Fundación universitaria iberoamericana. Base de Datos Internacional de Composición de Alimentos [citado el 6 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.composicionnutricional.com/alimentos/HARINA-DE-PESCADO-5>

¹²⁶ Indexmundi. Harina de pescado precio mensual-dólares americanos por tonelada métrica. [citado el 6 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.indexmundi.com/es/precios-de-mercado/?mercancia=harina-de-pescado>

¹²⁷IFFO, Producción de harina de pescado.[citado el 6 de agosto de 2017].Disponible en: <http://www.ifo.net/es/produccion%20de%20harina%20de%20pescado>

¹²⁸ Harina de pescado-el tema del precio. Camara Nacional de pesquería. [Consultado el 7 de Agosto de 2017]. Disponible en: <http://camaradepesqueria.com/harina-de-pescado-tema-del-precio/>

Cuadro 2. (Continuación).

| Fuente orgánica | Relación: %Nitrógeno/costo | Susceptibilidad a contaminación | Disponibilidad |
|-----------------|---|--|---|
| Suero de leche | <p>La cantidad de proteína depende de su obtención, en general posee aproximadamente 7 g/L de Proteína bruta¹²⁹, es decir 7% de nitrógeno teórico</p> <p>Costo:1.16 \$/g¹³⁰</p> <p>Relación:6.03</p> | <p>El suero de leche tiene un alto contenido de materia orgánica (DBO), entre 30,000 y 50,000 mg/L¹³¹, esto sumado a la cantidad de agua que la compone, representan condiciones óptimas para la proliferación de microorganismos, no solo durante su almacenamiento y manipulación, sino que claramente puede presentar problemas para su utilización en aplicaciones biotecnológicas, sin embargo, el suero ha sido utilizado exitosamente para su aplicación en el cultivo de microalgas en investigaciones anteriores.¹³²</p> | <p>Muy disponible, es decir, se produce una gran cantidad como subproducto libre para ser aprovechado, debido a que posee un alto rendimiento, es decir, para la producción de 1 Kg de queso, se obtienen aproximadamente 9 Kg de suero lácteo.¹³³</p> |
| Estiércol | <p>Su composición bioquímica, es decir, su cantidad de nitrógeno depende de diversos factores, por ejemplo, la dieta del animal del cual se obtenga el estiércol, también el tipo de animal produce contenidos diferentes de este nutriente, por ejemplo puede contener un mínimo de 0.25% hasta un máximo de 6.11% dependiendo si es estiércol de vacuno o de gallina, como se observa en la tabla 5.</p> <p>No se puede determinar un costo aproximado de este subproducto, debido a que en gran medida depende del transporte de la materia prima al sitio de procesamiento y al tratamiento al que debe someterse para ser usado en aplicaciones biotecnológicas.</p> | <p>Posee una alta carga de microorganismos que aceleran su descomposición, desprendiendo olores desagradables.¹³⁴Se hacen necesarios por esta razón pre tratamientos adecuados de la materia orgánica para permitir el crecimiento adecuado y el control del cultivo de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>.</p> <p>En investigaciones previas se evalúan lixiviados de estiércol de gallina y de caballo, aplicando este último para la producción de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>, proporcionando altos contenidos de proteína en las células microalgales, respecto a medios control.¹³⁵</p> | <p>Alta disponibilidad debido a que es un desecho de las actividades ganaderas en varias regiones cercanas a las zonas urbanas, como la ciudad de Bogotá, en donde se llevará a cabo el proceso.</p> |

129 HERNANDEZ R. M; VELEZ J.F. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales .Departamento de ingeniería química de la Universidad de las Américas. México.

130 Este valor fue calculado mediante el rendimiento de obtención del suero lácteo en la elaboración de cuajada.

131 GUERRA, et al. Aprovechamiento del lacto suero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. Valledupar, Colombia, 2013. p. 57

132 CHAPARRO G. Viviana. Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga chlorella vulgaris a escala de laboratorio. Departamento de ingeniería química de la Fundación Universidad de América.

133 VALENCIA Elizabeth, et al. La industria de la leche y la contaminación del agua.p.27-31 [citado el 7 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.elementos.buap.mx/num73/pdf/27.pdf>

134 GUERRA, et al. Aprovechamiento del lacto suero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. Valledupar, Colombia, 2013. p. 57

135 MUÑOZ Marcela, et al. Effect of culture medium on growth and protein content of Chlorella vulgaris.Universidad de los Llanos.

Cuadro 2. (Continuación).

| Fuente orgánica | Relación: %Nitrógeno/costo | Susceptibilidad a contaminación | Disponibilidad |
|----------------------|--|---|---|
| <p>Pulpa de Café</p> | <p>La pulpa puede llegar a contener desde un 1.30% a un 2% de nitrógeno¹³⁶ del peso seco del fruto de café.</p> <p>A pesar de ser un subproducto muy estudiado, este no reporta precios en el mercado y su obtención dependería en mayor medida del transporte al lugar de utilización.</p> | <p>La pulpa puede contener baja cantidad de microorganismos mediante el despulpado en seco del café ($4,59 \times 10^2$ UFC/g $\times 10^5$)</p> <p>, pero a pesar de ser el proceso en seco, la cantidad de agua presente en la pulpa es alta¹³⁷, lo cual dificultaría el almacenaje y la manipulación de esta materia prima.</p> | <p>La pulpa es el principal subproducto del beneficio del café¹³⁸, presentando entonces buena disponibilidad en las zonas cafeteras del país e industrias de procesamiento del café, sin embargo, difícilmente es disponible en zonas urbanas, lo cual podría no ser relevante si se piensa en colocar el proceso productivo es una zona cafetera.</p> |

De acuerdo con la tabla anterior, se seleccionaron la harina de sangre, la harina de soya y el suero lácteo como las fuentes orgánicas de nitrógeno para realizar la evaluación experimental, enriqueciendo los medios de cultivo y evaluando de manera cualitativa y cuantitativa el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en los medios, mediante la tasa intrínseca de crecimiento.

El suero lácteo se seleccionó por ser un subproducto con alta disponibilidad pues presenta un rendimiento aproximado del 90%¹³⁹ en la elaboración de queso, una cantidad apreciable que podría ser aprovechada en el cultivo de microalgas por la composición bioquímica previamente descrita. Presenta un valor de 6.03 en el parámetro de relación entre el porcentaje de nitrógeno respecto al precio por gramo, clasificado como una relación favorable por ser mayor a 5, que se planteó como indicativo de un contenido de nitrógeno apreciable a un bajo costo. Es importante tener en cuenta que el suero de leche debe ser implementado fresco en el medio de cultivo, para disminuir la probabilidad de contaminación.

La harina de soya se seleccionó debido a que presentó una relación de cantidad de nitrógeno respecto al costo de 6.07, siendo la más alta relación comparada con las demás fuentes. Es de fácil manipulación y tiene baja susceptibilidad a la contaminación pues en la experimentación se observó actividad casi nula de bacterias, a pesar de prescindir de esterilización en los cultivos.

136 KHALAJABADI, S. Composición elemental de frutos de café y extracción de nutrientes por la cosecha en la zona cafetera de Colombia. CENICAFE. Citado el 19 de agosto de 2017. Disponible en: [http://www.cenicafe.org/es/publications/arc057\(04\)251-261.pdf](http://www.cenicafe.org/es/publications/arc057(04)251-261.pdf)

137 BLANDON Gladis, et al. Caracterización microbiológica y físico-química de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombricompostaje. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE.

138 Ibid,...

139 VALENCIA Elizabeth, et al. La industria de la leche y la contaminación del agua.p.27-31 [citado el 7 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.elementos.buap.mx/num73/pdf/27.pdf>

Se descartó el estiércol por varias razones, la primera es la carga microbiana que posee, pues dificulta su manipulación y adición en los cultivos; la segunda es la heterogeneidad de su composición bioquímica, ya que esto requeriría un mayor control del proceso de producción y por último no tiene un costo estándar en el mercado, ni un costo generado por pre tratamiento y acondicionamiento para poder ser utilizado en el medio de cultivo por lo que no se pudo establecer una relación entre la cantidad de nitrógeno y su precio.

La pulpa de café no fue seleccionada debido a que en esta zona del país es difícil su obtención, su relación entre nitrógeno y costo no pudo ser establecida, pero si se observa en el cuadro anterior, que esta no posee un alto contenido de nitrógeno con respecto a las otras fuentes, sin embargo, podría aumentar la acidez del medio de cultivo, lo cual inhibiría el crecimiento microalgal.

La harina de maíz no fue seleccionada debido a que es un producto de la industria alimenticia con alta demanda en el país, por esta razón no se tuvo en cuenta a pesar de contar con una relación nitrógeno/costo intermedio (0.53); esta relación se da porque es un producto que posee un bajo costo en el mercado, lo que hizo que la relación aumentara a pesar de no contar con alta cantidad de nitrógeno comparada con las otras fuentes.

Finalmente, la harina de pescado no se seleccionó a pesar de tener una relación nitrógeno/costo intermedio (2.42), puesto que se utiliza para fines específicos de nutrición animal, lo cual incrementa su precio en el mercado, además esta fuente tiene una baja disponibilidad debido a que casi no se produce ni utiliza en Colombia¹⁴⁰.

3.2 RESULTADOS DEL PRE-EXPERIMENTO I: ETAPA I

En esta etapa se evaluaron las fuentes orgánicas como harina de sangre, de soya y suero lácteo por su contenido de aminoácidos, debido a que en el caso de la harina de soya y sangre las cuales se encuentran en forma de polvo, pasaron por un proceso de secado a altas temperaturas (100°C a 105°C)¹⁴¹ y el suero lácteo a (100-101°C), a estas temperaturas, gran parte de las proteínas se desnaturalizan, es decir, quedan solo con su estructura primaria, la cual es una secuencia de aminoácidos¹⁴².

La desnaturalización se da debido a que las interacciones entre la estructura de las proteínas se mantienen por fuerzas de puentes de hidrógeno, y de van der Waals,

¹⁴⁰ EL ECONOMISTA. [Citado el 10 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://empresite.economistaamerica.co/Actividad/HARINA-DE-PESCADO/>

¹⁴¹ ENGORMIX. Avicultura, industria cárnica. [en línea] Disponible en internet: <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/harina-de-sangre-t29408.htm>

¹⁴² FENNEMA, Owen. Food Chemistry. University of Wisconsin Madison. 1996. [en línea]. p. 335 Disponible en internet: <http://cst.ur.ac.rw/library/Food%20Science%20books/batch1/Marcel%20Dekker,.Food%20Chemistry,%203rd%20Edition.pdf>

que son de naturaleza exotérmica y por ello a altas temperaturas se desestabilizan provocando este proceso¹⁴³.

Dado que los enlaces peptídicos de hidrógeno en las proteínas están en su mayoría atrapados en el interior, se mantienen estables en un amplio rango de temperaturas, por lo cual la desnaturalización puede ser parcial y depende de la cadena de aminoácidos y su solubilidad en el agua¹⁴⁴, adicionalmente, se ha demostrado que, en algunos casos de alimentos específicos, las proteínas parcialmente desnaturalizadas son más digeribles y tienen mejores propiedades de absorción y emulsión que las proteínas nativas¹⁴⁵ y en el caso de las microalgas, los aminoácidos y urea son fuentes de nitrógeno asimilables.¹⁴⁶

De manera cualitativa se observó que la microalga *Chlorella vulgaris* logró adaptarse al medio enriquecido con todas las fuentes preseleccionadas, debido al cambio de color paulatino de verde claro a verde oscuro que presentó hasta el día siete, esto es consecuencia de que hubo un incremento de biomasa microalgal.

A pesar de que el suero lácteo presentó una buena concentración celular como se puede observar en el Anexo C, es importante reconocer que el suero lácteo es muy susceptible a contaminación; por esta razón debe manejarse con la mayor inocuidad posible, así que, si se desea utilizar directamente como subproducto de la industria láctea, es necesario tomar medidas que permitan el control del crecimiento microbiano en él, siendo el medio enriquecido con esta fuente el que mostro mayor evidencia de contaminación microbiana.

3.2.1 Curvas de crecimiento. A continuación, se muestran las curvas de crecimiento obtenidas para la microalga *Chlorella vulgaris* en los diferentes medios con enriquecimiento de fuentes orgánicas y las tres repeticiones realizadas.

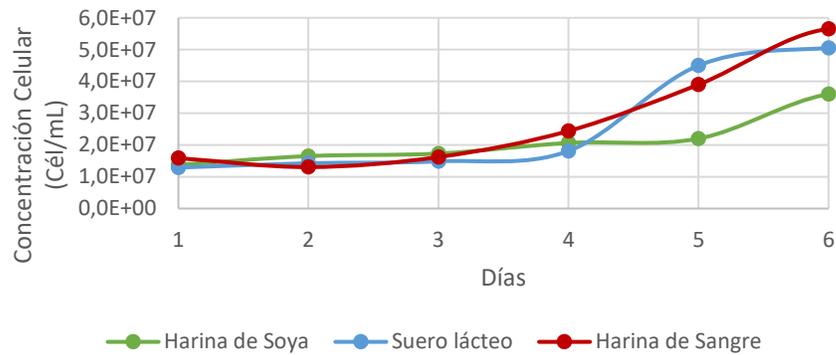
143 Ibid., 357

144 Ibid., p 371

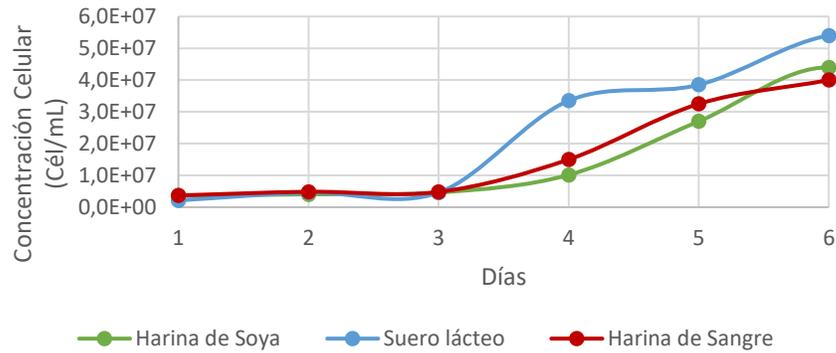
145 Ibid., p 356

146 FERNANDEZ, Jose. Nutrientes y medios de cultivo de microalgas. Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas. Universidad de Almería. [en línea]. 2014. Disponible en internet: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-3-nutrientes.html>

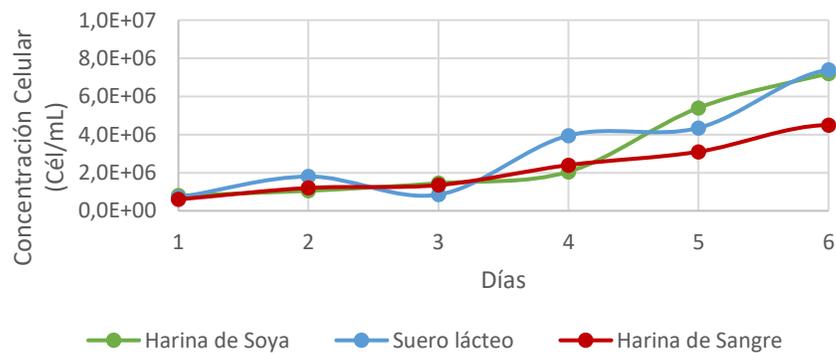
Gráfica 1. Curvas de crecimiento para fuentes orgánicas de nitrógeno
Repetición. 1



Gráfica 2. Curvas de crecimiento para fuentes orgánicas de nitrógeno
Repetición. 2



Gráfica 3. Curvas de crecimiento para fuentes orgánicas de nitrógeno
Repetición. 3



Es importante aclarar que estas réplicas se llevaron a cabo en semanas diferentes, debido a que al inicio sólo se hizo la evaluación cualitativa que consistía en observar la coloración y características de los cultivos en un periodo de 7 días.

Todos los cultivos presentaron un cambio de coloración, por lo que se dio inicio a la realización de las réplicas y al conteo celular para determinar las curvas de crecimiento en cada una de las fuentes evaluadas, por lo que el eje mostrado en las gráficas 1, 2 y 3, de la de concentración celular, no tiene el mismo rango, por esta razón se decidió evaluar la tasa intrínseca de crecimiento¹⁴⁷ en los cultivos y no la concentración celular obtenida al final del tiempo, para observar los mayores cambios de crecimiento celular en los periodos de tiempo y no la cantidad de células producidas al final del mismo.

Las tasas de crecimiento presentaron mayores valores para el medio con enriquecimiento de suero lácteo, esto debido a que como se observa en las gráficas anteriores, las curvas de crecimiento presentaron fases exponenciales más marcadas en menor tiempo, mostrando de igual manera mayores pendientes mediante la linealización de estas curvas en el medio enriquecido con suero lácteo, como se observó que en las réplicas 2 y 3 la mayor concentración celular se obtuvo en el medio enriquecido por suero lácteo, a pesar de ello en la réplica 1 la mejor concentración celular se dio con la harina de sangre, por ello, se linealizó el comportamiento de los datos experimentales y se calculó el parámetro de la velocidad o tasa intrínseca de crecimiento (μ) mediante la ecuación (2) y se midió el cambio de la concentración celular en un tiempo determinado.

Gráfica 4. Linealización de la concentración celular respecto al tiempo

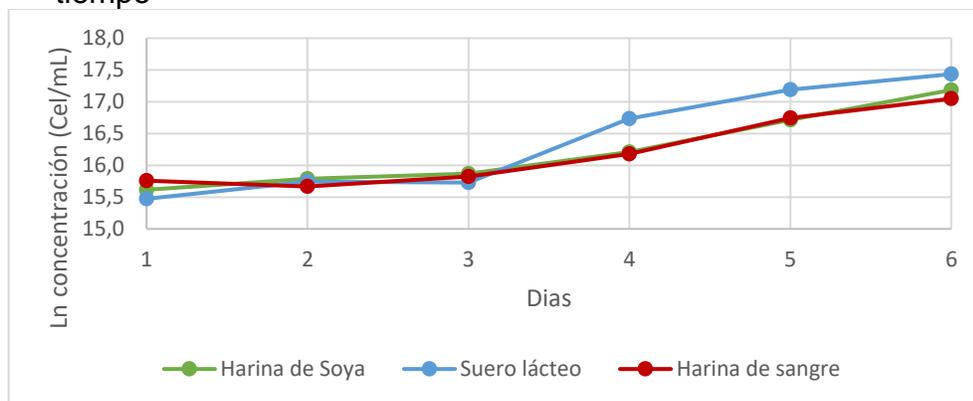
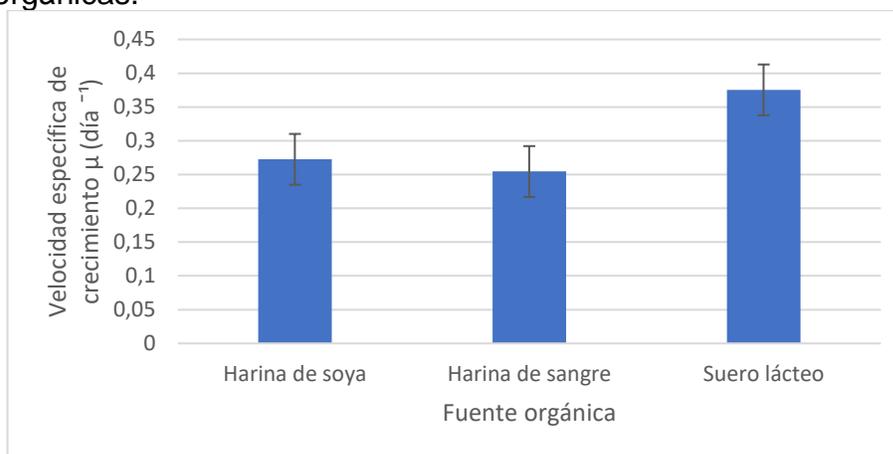


Tabla 13. Velocidades específicas de crecimiento promedio para los diferentes cultivos enriquecidos.

| Enriquecimiento de nitrógeno | Tasa de crecimiento | Coefficiente de determinación |
|------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| Harina de soya | $\mu=0,2725$ | $R^2=0,9151$ |
| Harina de sangre | $\mu=0,2545$ | $R^2=0,8876$ |
| Suero lácteo | $\mu=0,3753$ | $R^2=0,9108$ |

¹⁴⁷SERRANO L. Miguel. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Tesis de investigación para Magister en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia 2012.

Gráfica 5. Velocidad específica de crecimiento para la microalga *Chlorella vulgaris* evaluada en medios enriquecidos con fuentes orgánicas.



A partir de las tasas de crecimiento calculadas, se determinó un mayor promedio en el tratamiento con suero lácteo seguido por la harina de soya y por último la harina de sangre. A pesar de que son menores las tasas de crecimiento en estas últimas, se puede observar en la linealización de las curvas de crecimiento de la gráfica 4 que la microalga si logró adaptarse y creció favorablemente, es posible que por la fase sólida en que se encuentran las fuentes se dificultó la transferencia de los nutrientes a las microalgas y esta sea una de las razones por las cuales presentaron menores tasas.

Los valores de R^2 , coeficientes de determinación, mostraron que los datos experimentales si están muy cercanos a un comportamiento lineal como el que se presentó en el crecimiento de microorganismos mostrado en la ecuación (2).

Tabla 14. Análisis estadístico de los datos. Pre-experimento 1, etapa I.

| | Harina de Soya | Suero lácteo | Harina de sangre |
|-----------|----------------|--------------|------------------|
| \bar{X} | 0,3262 | 0,3971 | 0,2362 |
| S^2 | 2,07E-02 | 0,0297 | 0,00307 |
| S | 0,14377 | 0,1723 | 0,0554 |

Los valores de tasa de crecimiento en el suero lácteo se desviaron del promedio en 0.1723, la harina de soya en 0.1437 y la menor desviación se presentó en los datos experimentales de la harina de sangre, con 0.0554, como se observa en la gráfica 5, sin embargo, son valores considerables de desviación de los datos, que pudieron ser causados por el error asociado al conteo celular, más aún al hablar del comportamiento de microorganismos, debido a la adaptación fisiológica que sufrieron las microalgas para la incorporación de estos nuevos compuestos

orgánicos a su estructura¹⁴⁸ a causa de que ya estaban adaptados a la anterior disponibilidad de nutrientes.

Tabla 15. Condiciones de pH iniciales y finales para los medios enriquecidos.

| | Harina de Soya | Suero lácteo | Harina de Sangre |
|------------|----------------|--------------|------------------|
| pH inicial | 7,42 | 7,47 | 7,10 |
| pH final | 7,54 | 6,79 | 7,41 |

Según los resultados obtenidos en la tabla 15, la fuente que generó mayor acidez en el medio fue la harina de sangre, sin embargo, está entre el rango óptimo en el cual la microalga *Chlorella vulgaris* se desarrolla con facilidad.

La temperatura registrada permaneció entre el rango de 20 y 21 °C, influenciada por la iluminación de las luces LED y las condiciones medioambientales, sin embargo, en este rango de temperaturas la microalga crece favorablemente siendo la temperatura óptima para su crecimiento 25 °C¹⁴⁹.

3.3 PREEXPERIMENTO I: ETAPA II

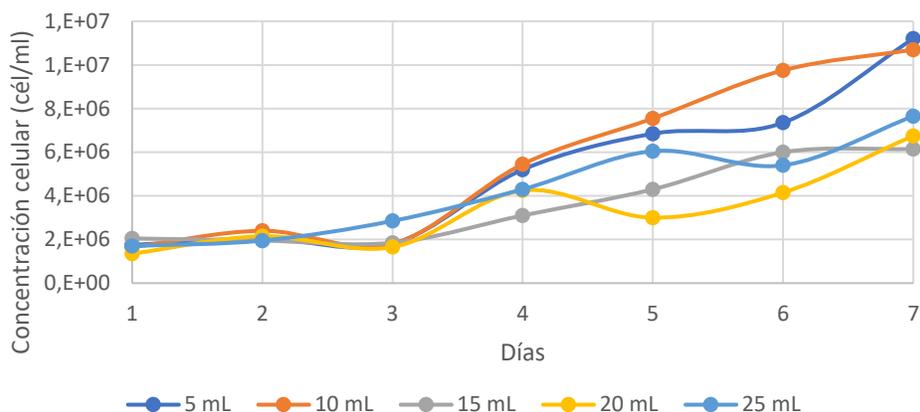
Según los resultados de la tabla 14, se seleccionó el suero lácteo como fuente orgánica de nitrógeno para enriquecer el medio de cultivo, porque obtuvo la mayor tasa intrínseca de crecimiento.

Se designaron y evaluaron entonces las concentraciones de enriquecimiento del suero lácteo (0.041 g/L, 0.08 g/L, 0.12 g/L, 0.15 g/L y 0.19/L), determinando las siguientes curvas de crecimiento.

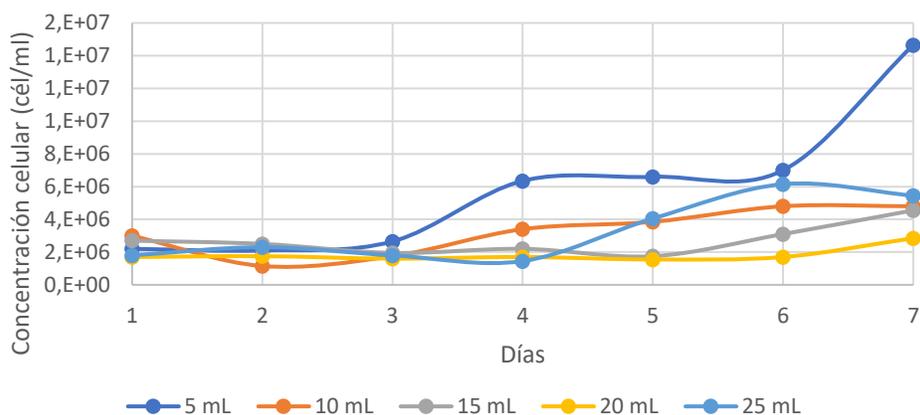
¹⁴⁸ Evaluación del crecimiento de la microalga *chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas .Departamento de ingeniería Agronómica de la Universidad de los Llanos.

¹⁴⁹ SILVA, Ana margarita. Evaluación de fertilizantes agrícolas, Universidad de Costa Rica, mesoamerican journal of agronomy ,agriculture and livestock 2015

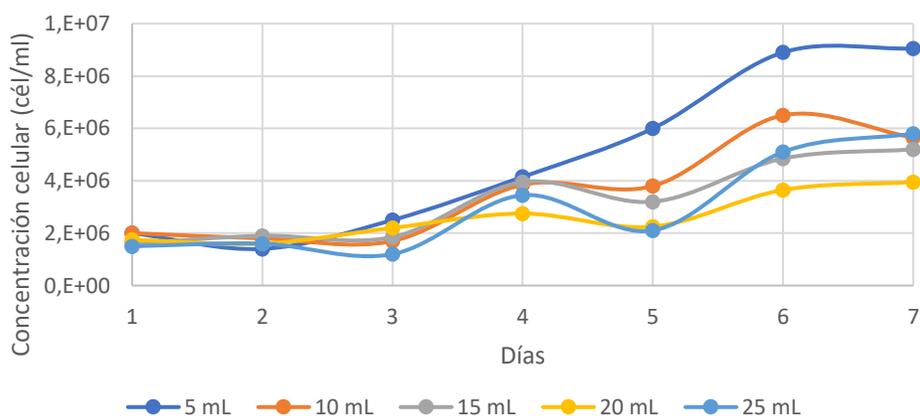
Gráfica 6. Curva del crecimiento celular, primera repetición



Gráfica 7. Curva del crecimiento celular, segunda repetición



Gráfica 8. Curva del crecimiento celular, tercera repetición



Se observó en las gráficas 7 y 8, un mayor crecimiento microalgal en el enriquecimiento del medio con 5 mL de suero lácteo, puede deberse a que en el ensayo realizado se notó que, a mayor concentración de suero lácteo, mayor fue la

espuma que se generó en el cultivo, este puede ser un factor que interfiere en el crecimiento de la microalga porque esta espuma representa una barrera para la correcta transferencia de nutrientes, además parte del sustrato y células quedan atrapadas allí¹⁵⁰.

3.3.1 Diseño experimental.

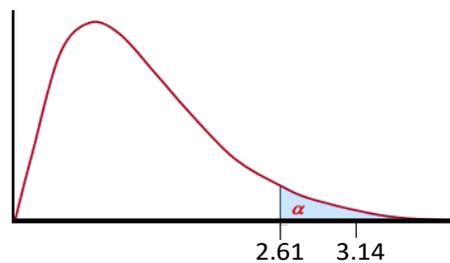
Tabla 16. Tasas de crecimiento para las diferentes concentraciones de suero lácteo

| (μ) | 5 mL | 10 mL | 15 mL | 20 mL | 25 mL |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Repetición 1 | 0,3378 | 0,3516 | 0,2281 | 0,2408 | 0,2608 |
| Repetición 2 | 0,3217 | 0,1806 | 0,0674 | 0,0522 | 0,2179 |
| Repetición 3 | 0,3251 | 0,2317 | 0,2128 | 0,1469 | 0,2477 |
| \bar{X} | 0,3282 | 0,2546 | 0,1694 | 0,1466 | 0,2421 |
| \bar{X}_{TOTAL} | 0,2282 | | | | |

Tabla 17. ANOVA de un factor para el pre-experimento 2

| ORIGEN VARIANZA | SUMA CUADRADOS | GRADOS LIBERTAD | PROM. CUADRADOS | F |
|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|--------------|
| SCE | 0,062998503 | 4 | 0,015749626 | 3,147504 |
| SCD | 0,050038447 | 10 | 0,005003845 | 91 |
| SCT | 0,113036949 | 14 | | F tabla 2,61 |

Figura 10. Zona de aceptación de la hipótesis nula H_0 :



De acuerdo con los cálculos anteriores, se demostró que a un nivel de significancia α (0.1) el valor de F en las tablas de distribución Fisher- Snedecor era igual a 2.61 y el valor calculado de F se encontró después de éste, por lo tanto, se rechazó la hipótesis nula, demostrando que el cambio en la concentración de la fuente orgánica sí afectó la variable respuesta, es decir, la velocidad específica de crecimiento.

¹⁵⁰ Montoya D. & Bermúdez M. Modelamiento de la transferencia de oxígeno para el cultivo de microorganismos en un biorreactor de columna de burbujeo. Trabajo de grado Ingeniero químico. Manizales. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. 2003. 29 p.

3.3.2 Determinación de la concentración de fuente orgánica. Se definió la concentración del suero lácteo en el experimento final, mediante el análisis de las curvas de crecimiento de las gráficas 6, 7 y 8, y tasas de crecimiento en la Tabla 16, determinando que en la repetición 1, la velocidad específica de crecimiento fue mayor para el enriquecimiento con 0.08 g/L, correspondiente a 10 mL de suero lácteo, pero en las dos siguientes repeticiones se tiene una mayor velocidad de crecimiento para los cultivos enriquecidos con 0.041 g/L, que corresponde a 5 mL de suero lácteo.

En la pre-experimentación 1 etapa II se determinó que los valores de las tasas de crecimiento de la segunda repetición son menores, esto puede deberse a que la posición de estos tratamientos dentro de la incubadora no permitía una buena iluminación, es decir las repeticiones 1 y 3 al estar a los extremos de esta tenían una mayor incidencia de luz, por lo cual, este factor se tuvo en cuenta para los experimentos posteriores distribuyéndolos de mejor manera.

Gráfica 9. Logaritmo natural de las concentraciones celulares del medio enriquecido con suero lácteo.

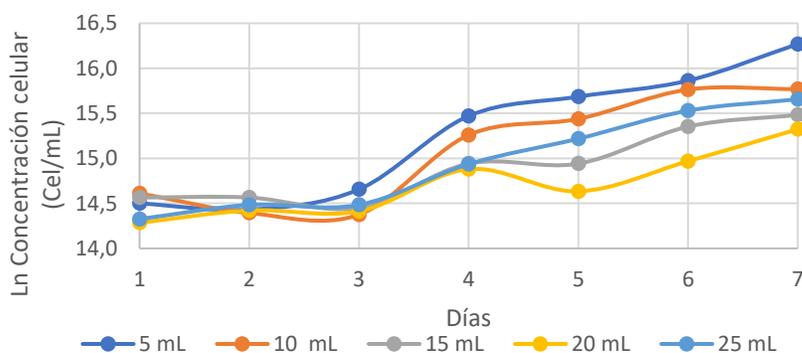
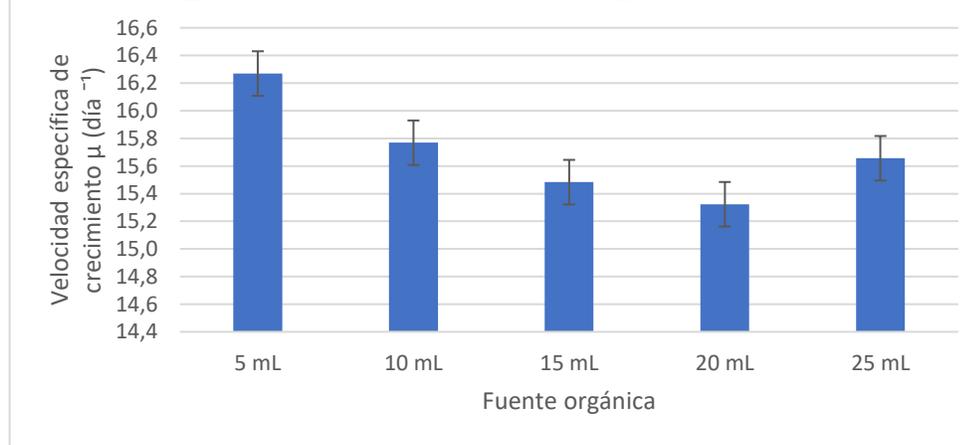


Tabla 18. Tasas de crecimiento promedio para los medios enriquecidos con sus respectivos aportes de nitrógeno.

| Suero lácteo | Enriquecimiento | Tasa de crecimiento (μ) | Coefficiente de determinación (R^2) |
|--------------|-----------------|-------------------------------|---|
| 5 mL | 0.041 g/L | 0,3286 | 0,9341 |
| 10 mL | 0.08 g/L | 0,2598 | 0,8257 |
| 15 mL | 0.12 g/L | 0,2434 | 0,9587 |
| 20 mL | 0.15 g/L | 0,1722 | 0,8503 |
| 25 mL | 0.19 g/L | 0,1581 | 0,8445 |

Gráfica 10. Velocidad específica de crecimiento para la microalga *Chlorella vulgaris* evaluada en medios enriquecidos con Suero lácteo.



Con los datos obtenidos se determinó que la mejor concentración evaluada fue la de 0.041 g/L de enriquecimiento de nitrógeno, que corresponde a 5 mL de suero lácteo en el medio de cultivo, de acuerdo con la Gráfica 10 y la Tabla 20, es la que representó un mayor cambio en la concentración celular respecto a las otras concentraciones, al tener una menor concentración de suero lácteo se disminuyó también la carga bacteriana, además de la poca formación de espuma que favoreció la transferencia de los nutrientes y luz.

Adicionalmente, se realizó un análisis de la variación del pH a las diferentes concentraciones de suero lácteo:

Tabla 19. Condiciones de pH iniciales y finales para las diferentes concentraciones de suero lácteo en el medio

| Suero lácteo | 5 mL | 10 mL | 15 mL | 20 mL | 25 mL |
|--------------|------|-------|-------|-------|-------|
| pH Inicio | 7,25 | 7,20 | 7,46 | 7,50 | 7,64 |
| pH final | 6,98 | 6,90 | 6,86 | 6,44 | 6,7 |

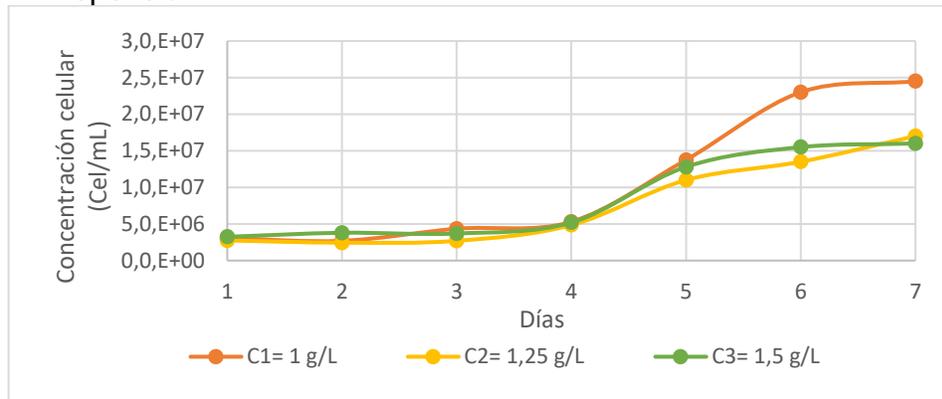
Inicialmente se observó que, a una mayor concentración de suero lácteo, el pH se hacía levemente más alcalino, sin embargo, como era de esperarse con el paso de los días, los medios se hicieron más ácidos debido a la formación del ácido láctico por la posible fermentación de algunos azúcares del suero lácteo, así como la acidez que pueden producir los citratos, fosfatos y proteínas¹⁵¹. El tratamiento con la menor concentración de suero lácteo no representó gran variación con respecto a la acidez generada en el tiempo.

¹⁵¹ GOMEZ, Margarita. Definición, composición, estructura y propiedades de la leche. Tecnología en lácteos. 2005. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá, D.C.

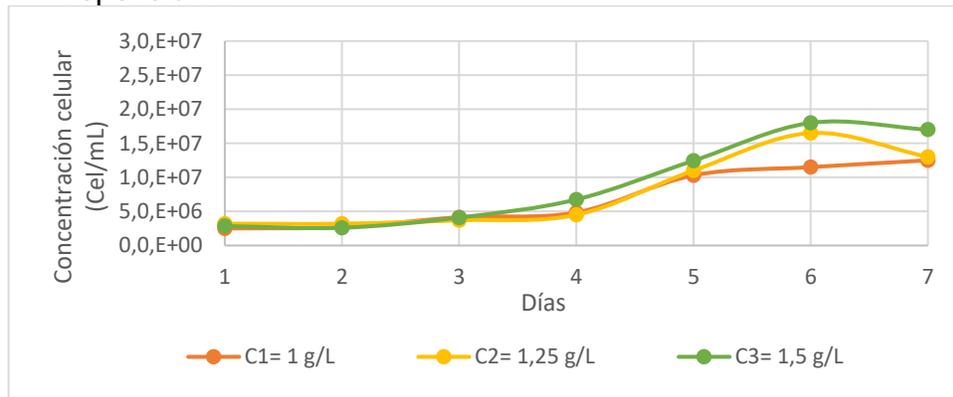
3.4 PREEXPERIMENTO II

Se realizaron las curvas de crecimiento para tres concentraciones de nitrato de sodio (1 g/L, 1,25 g/L, 1,5 g/L) y se inició con el diseño experimental.

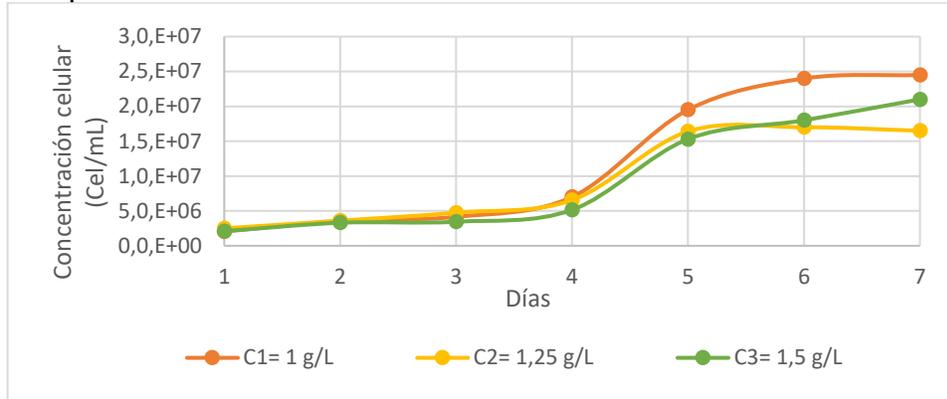
Gráfica 11. Curva de crecimiento celular en fuente inorgánica, repetición 1



Gráfica 12. Curva de crecimiento celular en fuente inorgánica, repetición 2



Gráfica 13. Curva de crecimiento celular en fuente inorgánica, repetición 3



3.4.1 Diseño experimental. De acuerdo con las gráficas anteriores se calculó el promedio de las tasas intrínsecas de crecimiento (μ) para cada una de las repeticiones en las concentraciones evaluadas, se analizó mediante el ANOVA de un factor si el cambio en las concentraciones influyó en la variable respuesta, es decir, tasa de crecimiento.

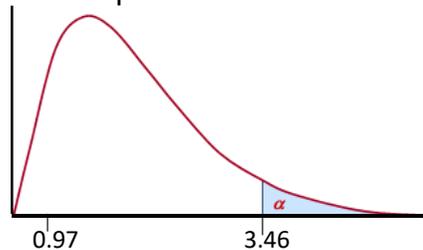
Tabla 20. Tasas de crecimiento para las diferentes concentraciones de NaNO_3

| μ | 1 g/L | 1,25 g/L | 1,5 g/L |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|
| Repetición 1 | 0,4463 | 0,3672 | 0,3155 |
| Repetición 2 | 0,3084 | 0,3063 | 0,4099 |
| Repetición 3 | 0,4686 | 0,3382 | 0,4211 |
| \bar{X} | 0,407766667 | 0,337233333 | 0,382166667 |
| \bar{X}_{TOTAL} | 0,375722222 | | |

Tabla 21. ANOVA de un factor para el pre-experimento II

| ORIGEN VARIANZA | SUMA CUADRADOS | GRADOS LIBERTAD | PROM. CUADRADOS | F |
|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|--------------|
| SCE | 0,007649316 | 2 | 0,003824658 | 0,97054304 |
| SCD | 0,02364444 | 6 | 0,00394074 | |
| TOTAL | 0,031293756 | 8 | | F tabla 3,46 |

Figura 11. Zona de aceptación de la hipótesis nula H_0 :



De acuerdo con los cálculos anteriores, se observó que a un nivel de significancia α (0.1), el valor de F en las tablas de distribución Fisher- Snedecor fue igual a 3,46 y el valor calculado de F es mucho menor que éste (0,97), aceptando la hipótesis nula, la cual indica que no hay diferencia significativa entre las concentraciones, por lo tanto, no se afecta la variable respuesta.

Como se mencionó anteriormente, estas concentraciones escogidas fueron las mejores de la evaluación realizada a *Chlorella vulgaris* en cultivos con nitrato de sodio añadido¹⁵²; aunque la metodología es diferente, el rango escogido para las concentraciones fue muy cercano al valor óptimo reportado¹⁵³, con esto se demostró que cualquiera de estas concentraciones estimula en una medida muy cercana el crecimiento celular de la microalga para la experimentación final.

3.4.2 Determinación de la concentración de la fuente inorgánica. Con los valores obtenidos en la tabla 20, se observó que la mayor tasa de crecimiento promedio se dio en las réplicas 1 y 3 para una concentración de NaNO₃ de 1 g/L, pero no se observó un patrón creciente o decreciente de los resultados, por el contrario, el promedio de la concentración de 1.25 g/L resultó ser la de menor tasa de crecimiento microbiano y en la de 1.5 g/L volvió a aumentar, esto pudo ser a causa de varios factores: el primero es que fueron rangos muy cercanos como se observa en los resultados de la tabla ANOVA; segundo, por algún cambio en una variable no estrictamente controlada como la luz o temperatura en el caso de este experimento; tercero, el método de cuantificación de microorganismos mediante la cámara de Neubauer tiene errores asociados debido a la dilución de las muestras o al no contar exactamente con la concentración celular en 1 mL, por lo que la elección de la concentración de la fuente inorgánica se planteó a partir de la linealización de la tasa de crecimiento promedio de las repeticiones para cada concentración.

152 TONGHUI, Xie; YUN, Xia; YU, Zeng; LI, Xingrui, Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. Revista Bioresource Technology pp.247-255.febrero de 2017

153 Ibid.

Gráfica 14. Linealización del crecimiento celular para concentraciones de NaNO_3

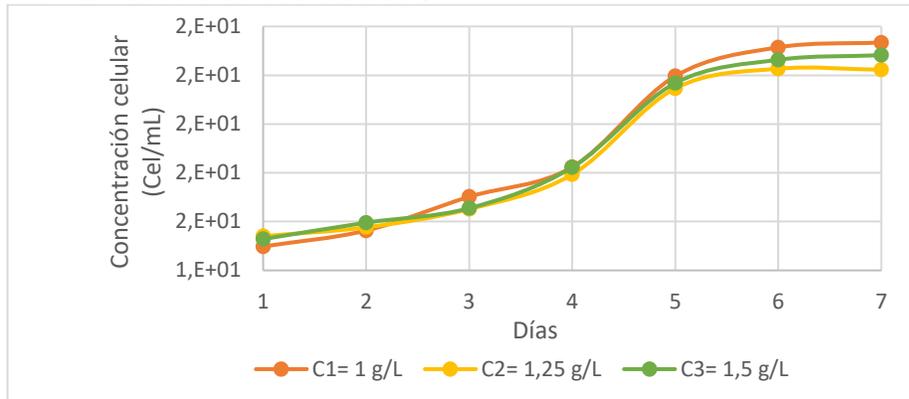
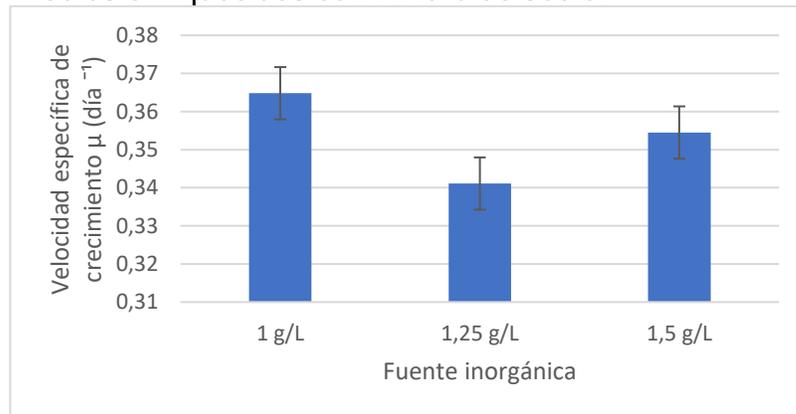


Tabla 22. Tasas de crecimiento para las diferentes concentraciones de fuente inorgánica.

| NaNO_3 | μ | R^2 |
|-----------------|--------|--------|
| 1 g/L | 0,3648 | 0,9577 |
| 1,25 g/L | 0,3411 | 0,9263 |
| 1,5 g/L | 0,3545 | 0,9468 |

Gráfica 15. Velocidad específica de crecimiento en medios enriquecidos con Nitrato de sodio.



Con base en la tabla 22 y la gráfica 15, se determinó que la concentración de 1 g/L de Nitrato de sodio en el medio permitió la mayor tasa de crecimiento ($\mu = 0,3648$) y mejor relación R^2 (0,9577) por lo que se seleccionó esta para el experimento final.

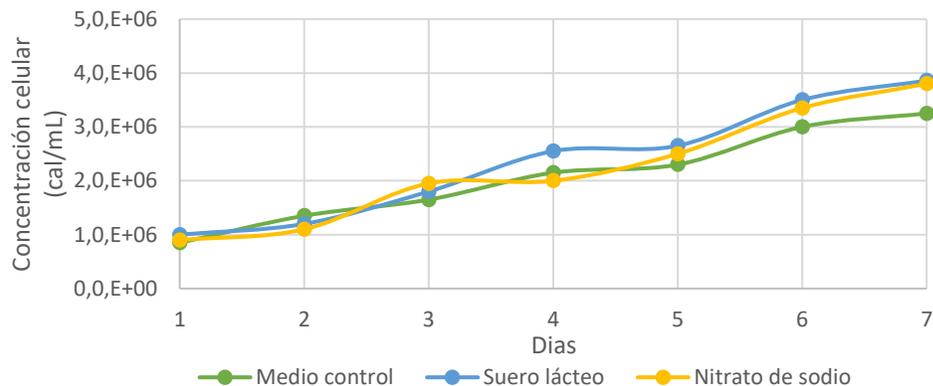
En algunas investigaciones se considera la relación Carbono/Nitrógeno del medio de cultivo para un desarrollo celular adecuado,¹⁵⁴ según esto, se determinó que si se disminuye la concentración de nitrato de sodio en el medio de cultivo, esta relación se hace mayor debido a una disponibilidad de carbono constante, presente como CO₂ en el aire para todos los tratamientos.

Los valores de relación C/N superiores a 5, no han obtenido buenos resultados¹⁵⁵, es por ello que en esta investigación, la cual tiene condiciones muy similares para la misma cepa de microalga, se deberían tener mayores crecimientos celulares en una relación C/N de 20mM (1.7 g/L) de nitrato de sodio, que en esta investigación debió ser el valor más cercano de concentración de NaNO₃ (1.5 g/L), no obstante, a pesar de presentar una tasa cercana, no alcanzó a la lograda en la concentración más baja de 1g/L ($\mu=0,4127$).

3.5 EXPERIMENTO

El crecimiento de *Chlorella vulgaris* es mostrado a continuación para los cultivos escalados a 3L con enriquecimientos de fuentes orgánica e inorgánica, a las concentraciones previamente seleccionadas, y medio control.

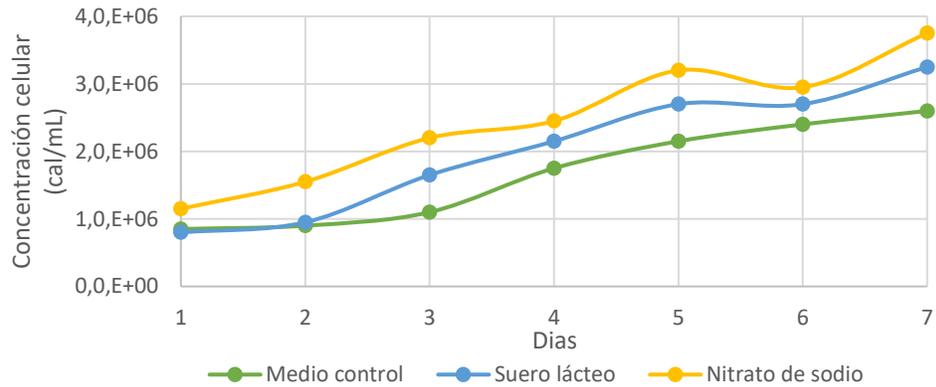
Gráfica 16. Crecimiento celular del experimento final. Repetición 1



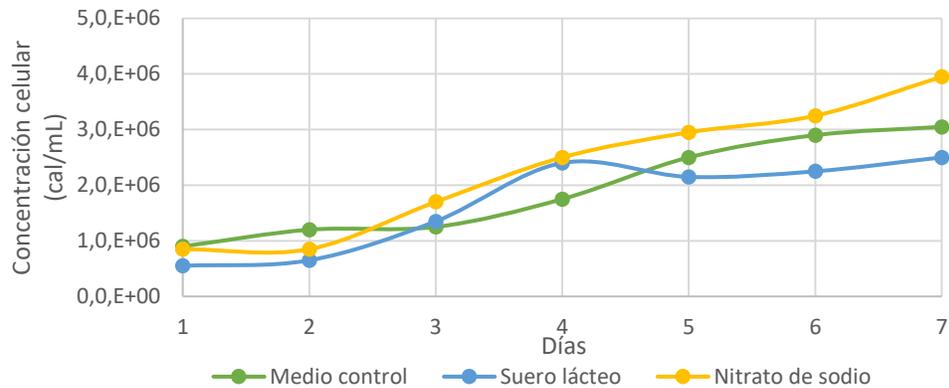
154 RUIZ, M. Ana, Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad politécnica de valencia, abril de 2011

155 GARCÍA, Rafael. Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂. Tesis doctoral en Biología. Universidad de Sevilla. [en línea] Disponible en internet: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/101928/1/TESIS%20DOCTORAL%20RGC.pdf>

Gráfica 17. Crecimiento celular del experimento final. Repetición 2



Gráfica 18. Crecimiento celular del experimento final. Repetición. 3



En las gráficas 16, 17 Y 18 se observó una mayor concentración celular para el cultivo con enriquecimiento de fuente inorgánica, sin embargo, la tasa intrínseca de crecimiento mostró mayores variaciones en el tratamiento con suero lácteo en especial en la segunda repetición, se analizó entonces la linealización de los datos de los promedios de tasas de crecimiento.

En las repeticiones 1 y 2 hubo una brecha muy marcada entre el tratamiento control y los tratamientos enriquecidos con nitrógeno orgánico e inorgánico, confirmando varios estudios, donde se concluye que el nitrógeno es un factor determinante en el crecimiento de esta microalga y que el enriquecimiento de estas fuentes mejoró notoriamente la cantidad de biomasa en los cultivos, indicando indirectamente también una mayor cantidad de proteína.

Gráfica 19. Linealización de las concentraciones celulares

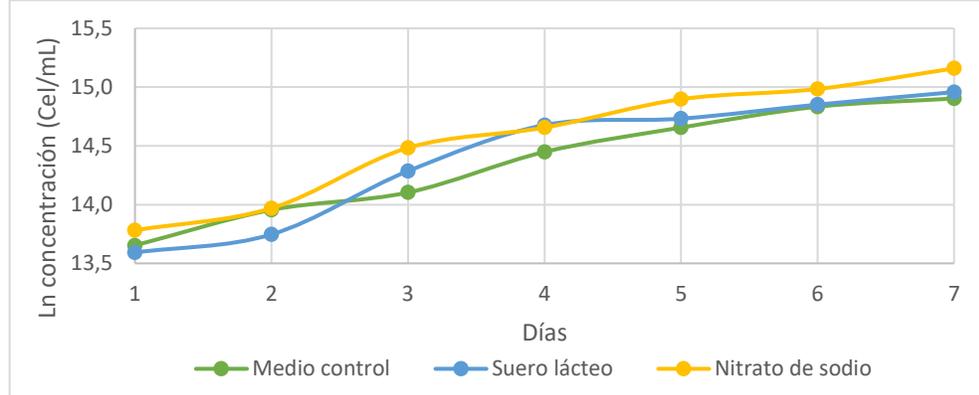


Tabla 23. Tasas de crecimiento con fuente orgánica, inorgánica y control.

| μ | CONTROL | SUERO | NITRATO |
|--------------|---------|--------|---------|
| Repetición 1 | 0,2191 | 0,2238 | 0,2476 |
| Repetición 2 | 0,2138 | 0,2424 | 0,1860 |
| Repetición 3 | 0,2186 | 0,2675 | 0,2801 |

3.5.1 Tratamiento de los datos del experimento

Tabla 24. Análisis estadístico de los resultados

| | Control | Suero lácteo | NaNO ₃ |
|-----------|----------|--------------|-------------------|
| \bar{X} | 0,2172 | 0,2446 | 0,2379 |
| S^2 | 8,56E-06 | 0,000481 | 0,00228 |
| S | 0,00293 | 0,0219 | 0,0478 |

El promedio de la tasa de crecimiento de las repeticiones del suero lácteo es mayor que la del nitrato de sodio, en especial porque el valor resultante en la réplica 2 del pre-experimento con nitrato de sodio es muy bajo y afecta de manera significativa el promedio de los datos de las tasas de crecimiento, por ende, no es adecuado considerar que el suero lácteo es significativamente mejor que el nitrato para ser usado como fuente de nitrógeno adicional para los cultivos de la microalga *Chlorella vulgaris*, no obstante, hay que tener en cuenta que el suero lácteo cuenta con carbono orgánico, el cual puede influir considerablemente en el aumento de la densidad celular¹⁵⁶.

Es importante por esta razón aclarar que se decidió utilizar el suero lácteo como materia prima en esta investigación, porque si se considera el uso de este

¹⁵⁶ RUIZ, M. Ana, Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad politécnica de valencia, abril de 2011

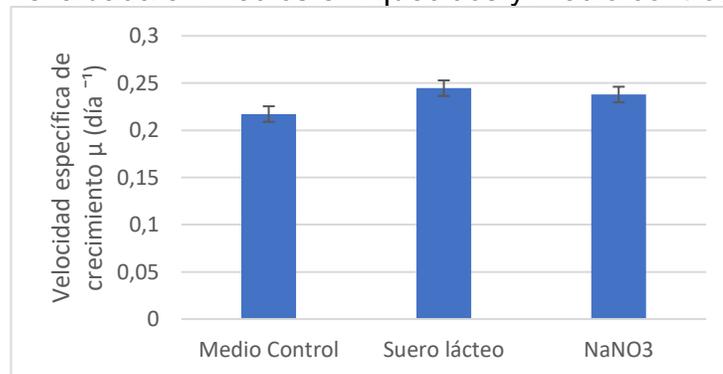
subproducto, es conveniente aprovechar al máximo su composición química, tanto el nitrógeno, como el carbono y no sería lógica una separación para evaluar solamente el efecto del nitrógeno sobre el medio, la idea es aprovechar el subproducto tal como se obtiene del proceso y no realizarle más procesos de tratamiento y separación que significarían un costo adicional.

Como se puede observar en la tabla 23, los valores de tasa de crecimiento obtenidos entre las repeticiones para el medio control son muy cercanos, es decir las tasas de crecimiento se desvían del promedio tan solo 0.0029, mientras que los de medios enriquecidos con fuentes de nitrógeno tienen desviaciones en la tasa de crecimiento de 0.0219 y 0.0478 en el suero lácteo y el nitrato de sodio respectivamente.

Tabla 25. Tasas de crecimiento del experimento final

| | μ | R ² |
|-------------------------|--------|----------------|
| Control | 0,2164 | 0,9684 |
| Suero lácteo | 0,2411 | 0,9077 |
| Nitrato de sodio | 0,2348 | 0,9535 |

Gráfica 20. Velocidad específica de crecimiento para la microalga *Chlorella vulgaris* evaluada en medios enriquecidos y medio control.



Como se observa en la gráfica 20 y tabla 25, al comparar los enriquecimientos de fuente orgánica e inorgánica con el medio control, ambos tratamientos dieron diferencias favorecedoras significativas en la velocidad de crecimiento.

El suero lácteo presentó una mayor tasa de crecimiento con respecto a la fuente inorgánica, es decir, que hay un mayor incremento de células en un menor tiempo, lo cual es lo que se busca para estos procesos, en cuanto a que el incremento se de en una menor cantidad de tiempo, debido a que esto influencia también la productividad.

Con el coeficiente de determinación (R^2) se confirmó que los comportamientos de los datos experimentales coinciden con el comportamiento lineal con valores superiores a 0.9.

Finalmente se evaluó la variación del pH en los diferentes tratamientos:

Tabla 26. Condiciones de pH finales para los tratamientos escalados.

| pH | Control | Suero lácteo | NaNO ₃ |
|-----------|---------|--------------|-------------------|
| Rep 1 | 7.09 | 7.73 | 7,13 |
| Rep 2 | 7.16 | 7.70 | 7.20 |
| Rep 3 | 7.2 | 7.70 | 7.15 |
| \bar{X} | 7.15 | 7.71 | 7.16 |

En los datos de la tabla 26, se mostró una pequeña variación en el cultivo con suero lácteo, el cual no representó un factor limitante del crecimiento, debido a que el pH óptimo para este microorganismo según literatura se encuentra entre 7 y 9.

3.6 PESO SECO Y PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA

Se realizaron los cálculos de acuerdo con la comparación de los medios enriquecidos con nitrógeno de fuente orgánico e inorgánico con el medio de control.

Tabla 27. Determinación del peso seco de la fuente inorgánica

| NITRATO DE SODIO | | | | | | | |
|------------------|--------|--------|------------------|--------------|-------------------|----------------|-------------|
| REP | PSF | PSFM | PSFM- PDF (g) | PROM (mg) | PESO TOTAL(mg) | PST (mg/mL) | RENDIMIENTO |
| 1 | 1,1812 | 1,362 | 0,1808 | 181,55 | 1016,68 | 0,3389 | 33,89% |
| 2 | 1,1959 | 1,3782 | 0,1823 | | | | |

Tabla 28. Determinación del peso seco de la fuente orgánica

| SUERO LÁCTEO | | | | | | | |
|--------------|--------|---------|------------------|--------------|-------------------|----------------|-------------|
| REP | PSF | PSFM | PSFM- PDF (g) | PROM (mg) | PESO TOTAL(mg) | PST (mg/mL) | RENDIMIENTO |
| 1 | 1,2332 | 1,51165 | 0,27845 | 293,55 | 1643,88 | 0,5480 | 54,80% |
| 2 | 1,1875 | 1,49615 | 0,30865 | | | | |

Tabla 29. Determinación del peso seco del medio control

| CONTROL | | | | | | | |
|---------|--------|---------|------------------|--------------|-------------------|----------------|-------------|
| RE P | PSF | PSFM | PSFM- PDF (g) | PROM (mg) | PESO TOTAL(mg) | PST (mg/mL) | RENDIMIENTO |
| 1 | 1,1518 | 1,24065 | 0,08885 | 95,975 | 537,46 | 0,1792 | 17,92% |
| 2 | 1,2324 | 1,3355 | 0,1031 | | | | |

Como era de esperarse por los resultados mostrados en las tasas de crecimiento, el mayor rendimiento de biomasa seca se obtuvo en el tratamiento con enriquecimiento de suero lácteo (54.80%), después se encontró el tratamiento enriquecido con nitrato de sodio (33.89%) y por último, con un muy bajo rendimiento se presentó el tratamiento sin enriquecimiento o control (17.92%).

Es importante mencionar que al no realizar un debido lavado de las muestras, para evitar una pérdida considerable de biomasa, que se queda en la centrifugadora, el peso seco total de la muestra con suero lácteo pudo verse sobreestimado, debido a que, a la temperatura de secado, solo el agua fue retirada, pero la proteína atribuida al medio de cultivo, por tener suero lácteo, se quedó en la muestra, sin embargo, es un aumento de proteína se pudo despreciar debido a que es de menos de 0.1 mg.

El tratamiento enriquecido con NaNO_3 es un cultivo autotrófico, por la ausencia de fuente orgánica de carbono disuelta en el medio, mientras que el enriquecido con suero lácteo, en esencia es un cultivo heterotrófico y a pesar de que las tasas obtenidas en el primer cultivo en cuanto a concentración de biomasa y tasa de crecimiento son muy cercanas y favorables respecto al medio control, se debe tener presente esta diferenciación porque los cultivos heterotróficos presentan mayor productividad de biomasa respecto a los autotróficos generalmente.¹⁵⁷

Con los resultados del peso seco obtenidos, se calcula la productividad volumétrica con la ecuación (15).

Tabla 30. Productividad volumétrica de los tratamientos finales.

| | PST(mg) | Volumen cultivo (L) | Tiempo cultivo (d) | Productividad (g/L*d) |
|------------------|---------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| Suero lácteo | 1643.88 | 3 | 7 | 0,07828 |
| Nitrato de sodio | 1016.68 | 3 | 7 | 0,04841 |
| Medio control | 537.46 | 3 | 7 | 0,02559 |

De acuerdo con la tabla 30, el tratamiento con mayor productividad es el de suero lácteo con 0.07828 g/L*d, un valor muy similar al logrado por Chaparro Rojas¹⁵⁸ (0.076 g/L*d) y en comparación a los resultados obtenidos por Hernández Gregorio¹⁵⁹ es mucho mayor, ya que en dicha investigación se obtuvieron 0.038

¹⁵⁷ TONGHUI, Xie; YUN, Xia; YU, Zeng; LI, Xingrui, Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. Revista Bioresource Technology pp.247-255. febrero de 2017

¹⁵⁸ CHAPARRO, Ginna. Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio. Trabajo de grado Ingeniera química. Bogotá, D.C. Fundación Universidad de América. Facultad de Ingenierías. 2017

¹⁵⁹ HERNANDEZ, G. Alejandro, Evaluación de las incidencias de salinidad y pH sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana. Revista ITECKNE, junio de 2016.

g/L*d a un pH neutro y 0.039 g/L*d a una concentración de salinidad de 0.3 M, teniendo en cuenta que las condiciones de temperatura, iluminación y agitación son muy cercanas a las presentadas en esta investigación.

De acuerdo con los análisis anteriores y teniendo en cuenta que el medio enriquecido con suero lácteo, con 0.041g/L de nitrógeno, presenta el mejor rendimiento de biomasa y mayores tasas de crecimiento en los diferentes tratamientos, se seleccionó este como la fuente de nitrógeno más favorable frente a las evaluadas para enriquecer el medio de cultivo, generando mayores cantidades de biomasa además de ser una buena fuente de nutrientes, no solo de nitrógeno, sino que aporta carbono, permitiendo un mayor crecimiento celular en este tipo de cultivo mixotrófico, utilizando además una concentración prácticamente igual que la enriquecida con la fuente inorgánica (NaNO₃) de 0.044 g/L y presentando mayor rendimiento y productividad.

El suero lácteo a pesar de ser una fuente susceptible a contaminación, con un pre-tratamiento, es decir pasteurización y eliminación de gran parte del agua, se logró una baja carga bacteriana como se observó en esta investigación, y se concluye que utilizar este subproducto de la industria en baja cantidad para generar productos de valor agregado de la biomasa microalgal, conlleva a mejorar el proceso de crecimiento celular, generando mayores productividades.

Es conveniente mencionar que el nitrato de sodio también es una opción para enriquecer los medios de cultivos, como ya se ha mencionado antes, siendo la fuente inorgánica de mayor asimilación por *Chlorella vulgaris*, y que, a pesar de ser un cultivo autotrófico, es decir, con una desventaja para densidades celulares altas, obtuvo tasas de crecimiento muy favorables respecto al medio control.

3.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

El método Kjeldahl estándar de la AOAC determinó un porcentaje de proteína bruta, en biomasa seca, para el tratamiento enriquecido con suero lácteo de 55,63%, como se muestra en el Anexo I, siendo este el mayor porcentaje entre los tratamientos evaluados, para el medio de control se obtuvo un 45,05% de proteína bruta en la biomasa microalgal y por último un valor de 39,54% en peso seco de proteínas para el cultivo enriquecido con nitrato de sodio, es decir la fuente inorgánica.

Esto indicó que el enriquecimiento con el suero lácteo no solo obtuvo altas concentraciones celulares, sino que también proporcionó un incremento en la fracción proteica de esta biomasa, a diferencia de lo reportado en literatura, donde se expresa que los cultivos heterotróficos tienen una acumulación menor de proteínas¹⁶⁰.

¹⁶⁰ TONGHUI, Xie; YUN, Xia; YU, Zeng; LI, Xingrui, Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. Revista Bioresource Technology pp.247-255. febrero de 2017

Es posible que la fracción proteica de la microalga se viera favorecida por el aporte de nutrientes y la velocidad de asimilación del medio enriquecido con la fuente orgánica, debido a que parte del nitrógeno orgánico presente en el suero lácteo debe ser mineralizado e incorporado a la estructura de las microalgas, lo cual favoreció su crecimiento y aumento en la fracción proteica, este proceso puede ser un poco más lento que al utilizar fuentes inorgánicas directamente, pero permite una eficiente incorporación de los nutrientes¹⁶¹.

No se encontraron investigaciones similares en donde se evalúe la fracción de proteína de la microalga al adicionar suero lácteo como nutriente, sin embargo, este porcentaje es similar al obtenido en otros estudios donde se enriquece el medio de cultivo con fuentes orgánicas, donde se obtuvo una fracción proteica de 56,8%¹⁶² al añadir al medio humus de lombriz.

El porcentaje obtenido en el medio control fue de 45,05%, es similar al reportado en otras investigaciones, con un valor de 44,56%¹⁶³ de proteína al evaluar la composición bioquímica de la microalga *Chlorella vulgaris* cultivada autotróficamente, por lo cual este resultado es congruente con los estudios realizados.

El medio de cultivo autotrófico enriquecido con nitrato de sodio obtuvo la menor cantidad de proteínas, con un 39,54% en peso seco, que comparado con valores obtenidos en otras investigaciones donde también se evaluó esta fuente de nitrógeno, como 44.3%¹⁶⁴ y porcentajes cercanos a 46%¹⁶⁵, fue una fracción proteica baja.

En un estudio similar, en el cual se evaluó la influencia del nitrato de sodio, el rango de rendimientos de proteínas estuvo entre 34% y 60%¹⁶⁶, encontrando que la concentración del nitrato ejerce una influencia significativa positiva en la producción de proteínas, de acuerdo con lo anterior, se esperaba un mayor porcentaje de proteínas por parte del medio enriquecido con nitrato, pero de acuerdo con los resultados presentados, esta fuente aumentó la cantidad de biomasa, sin embargo,

¹⁶¹

¹⁶¹ MUÑOZ, et al. Effect of culture medium on growth and protein content of *Chlorella vulgaris*. Revista colombiana de ciencias pecuarias. 2011. Universidad de los llanos. [citado el 25 de noviembre de 2017]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902012000300012

¹⁶² Ibid.,

¹⁶³ MORRIS Q. Humberto. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. Centro de investigaciones de energía solar, Santiago de Cuba. [citado el 25 de noviembre de 2017]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol13_2_99/ali07299.pdf

¹⁶⁴ TONGHUI, Xie; YUN, Xia; YU, Zeng; LI, Xingrui, Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. Revista Bioresource Technology pp.247-255. febrero de 2017

¹⁶⁵ DURAN, et al. Influencia de la Relación Carbono/Nitrógeno en la Producción de Proteínas Totales en *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803. Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales. 2011. [Citado el 26 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://oaji.net/articles/2017/5082-1501178284.pdf>

¹⁶⁶ GONZALEZ, et al. Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales : Chlorellaceae) a través del diseño de medios de cultivo selectivos. 2017. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. [Citado el 26 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/736/488>

no favoreció la acumulación de proteínas, siendo necesario el incremento de ambas variables para obtener procesos más viables de producción de este metabolito.

Los resultados arrojados en esta investigación demuestran que al enriquecer el medio de cultivo con una baja concentración de un subproducto de la industria quesera como el suero lácteo (2% V/V) se incrementó en un 37% la cantidad de biomasa y en un 10% la de proteínas, respecto al medio control, logrando mejorar e incrementar la densidad celular aumentando el rendimiento y productividad, con ello se optimiza el proceso dando un metabolito que puede ser aprovechado en el campo de la alimentación humana o biofertilizantes. De esta manera, se contribuye con el desarrollo de diferentes proyectos donde se utilicen desechos industriales para hacer procesos que no solo sean rentables sino sostenibles, contrarrestando los graves problemas ambientales como la deforestación, degradación del suelo y la liberación de gases de efecto invernadero como el metano, que se generan por las fuentes actuales de proteínas, siendo las microalgas una alternativa que al evaluarse de manera industrial podría reducirse los costos por las materias primas con el fin de seguir optimizando el proceso.

3.8 EVALUACIÓN DE COSTOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y PROTEÍNA

Los costos mostrados en la Tabla 31 son comunes para todos los medios de cultivo evaluados, hacen parte de los activos necesarios para la producción de la biomasa microalgal, no obstante, no es necesario que sean analizados, ya que no hubo variación de estos entre los diferentes procesos de obtención que representaron en los tratamientos y sí incrementan de manera significativa el costo por gramo de biomasa producida, por otra parte, estos si deben mencionarse ya que hacen parte de los costos necesarios del proceso de producción.

Tabla 31. Costos comunes para el proceso de producción en los tratamientos.

| Elementos utilizados para los cultivos | COSTO | CANTIDAD | SUBTOTAL |
|---|-----------|----------|-----------|
| Cinta led | \$24.000 | 1 | \$24.000 |
| Temporizador | \$18.500 | 1 | \$18.500 |
| Adaptador | \$8.000 | 1 | \$8.000 |
| Bomba | \$12.000 | 1 | \$12.000 |
| Cava de icopor | \$21.000 | 1 | \$21.000 |
| Beaker 250 mL | \$11.500 | 1 | \$11.500 |
| Pipeta (10 mL) | \$30.000 | 1 | \$30.000 |
| Manguera 3/16 (m) | \$250 | 3 | \$750 |
| Recipientes de vidrio (4L) | \$4.000 | 2 | \$8.000 |
| Cepa de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> | \$363.000 | 1 | \$363.000 |

La cepa de microalga *Chlorella vulgaris*, hace parte de los medios de cultivo, considerándose como la materia prima más importante, sin embargo, el costo de la cepa hizo parte de una inversión inicial, por lo cual no es necesario volver a adquirirla debido a que la microalga se reproduce en las condiciones adecuadas y se puede utilizar para todos los procesos de producción siguientes, es por esta razón que no sería coherente adicionar este costo individual a cada uno de los medios de cultivo, teniendo en cuenta que esta es costosa y no varía entre los tratamientos.

Se evaluaron los costos referidos a los cultivos con los enriquecimientos de fuente orgánica, inorgánica y control según su composición, es decir según las materias primas adicionadas, que son la variación propuesta en los medios de cultivo, siendo esto el análisis que compete a la evaluación realizada en esta investigación.

En la Tabla 32 se obtiene para cada uno de los tratamientos, el costo por litro de medio de cultivo.

Tabla 32. Análisis de costo unitario para los diferentes medios de cultivo

| Componentes de los medios de cultivo | Unidad | Precio unitario | Cantidad | Medio Control | Medio enriquecido | |
|---|--------|-----------------|----------|---------------|-------------------|-------------------|
| | | | | | Fuente orgánica | Fuente inorgánica |
| Agua destilada Control y fuente inorgánica | L | \$5,400 | 3.8 | \$20,520 | - | \$20,520 |
| Agua destilada fuente orgánica | L | \$5,400 | 3.2 | - | \$17,280 | - |
| Fertilizante Foliagro Control y fuente inorgánica | mL | \$12 | 6.72 | \$79 | - | \$79 |
| Fertilizante Foliagro Fuente orgánica | mL | \$12 | 6.48 | - | \$76 | - |
| Suero lácteo | mL | \$2 | 120 | - | \$240 | - |
| Nitrato de sodio | G | \$3 | 6 | - | - | \$18 |
| COSTOS TOTALES | | | | \$20,599 | \$17,596 | \$20,617 |
| COSTO POR LITRO DE CULTIVO (\$/L cultivo) | | | | \$3,433 | \$2,933 | \$3,436 |

Realizando el análisis del costo de los diferentes medios por litro, como se muestra en la Tabla 32, el medio con suero lácteo representa una ventaja al ser un subproducto de bajo costo que incrementa no solo nutrientes como el carbono y el nitrógeno orgánico, sino que también aporta agua al volumen total de cultivo, disminuyendo el costo del agua destilada.

Teniendo en cuenta este análisis, que es el más relevante, por tener presente los cambios por el costo de fuente orgánica e inorgánica, se muestra que el suero lácteo no solo representó el medio de cultivo más económico, sino que también presentó la mayor productividad en comparación con los nutrientes aportados, lo cual desde

este punto de vista lo convierte en la mejor opción para enriquecer medios con *Chlorella vulgaris*.

Si se compara el costo entre el medio control y el enriquecido con fuente inorgánica, en realidad la diferencia es mínima y el enriquecimiento con nitrato de sodio sí genera un incremento significativo en la productividad de los cultivos, presentando un rendimiento de 33.89%, respecto al 17.92% obtenido con el medio control.

Tabla 33. Costo por gramo de biomasa para los medios enriquecidos con fuente orgánica e inorgánica de nitrógeno.

| Medios de cultivo | Biomasa (mg)/L | Costo/L | \$/mg biomasa | \$/g de biomasa |
|--|----------------|---------|---------------|-----------------|
| Medio de control | 178.49 | \$3,433 | \$19 | \$19,235 |
| Medio de cultivo enriquecido con fuente inorgánica | 338.89 | \$3,436 | \$10 | \$10,139 |
| Medio de cultivo enriquecido con fuente orgánica | 547.96 | \$2,933 | \$5 | \$5,352 |

Tabla 34. Costo por gramo de proteína producida para los medios enriquecidos con fuente orgánica e inorgánica de nitrógeno.

| Medios de cultivo | proteínas (mg)/L | Costo/L | \$/mg proteína | \$/g de proteína |
|--|------------------|---------|----------------|------------------|
| Medio de control | 80.41 | \$3,433 | \$43 | \$42,696 |
| Medio de cultivo enriquecido con fuente inorgánica | 134 | \$3,436 | \$26 | \$2,643 |
| Medio de cultivo enriquecido con fuente orgánica | 301.378 | \$2,933 | \$9.73 | \$9,731 |

En la tabla 34 se observa que el incremento en la fracción proteica y la biomasa microalgal por el enriquecimiento con suero lácteo que permitió obtener el menor costo por gramo de proteína, comparando los costos con los medio control y enriquecido con nitrato de sodio, en este último se puede observar que el costo comparado con el medio control es el doble, indicando que de igual manera este enriquecimiento permitió reducir los costos, aunque no se comparan con los alcanzados con el enriquecimiento de suero lácteo, el cual presentó mayores beneficios económicos en esta investigación.

Tabla 35. Costos operativos diferentes a los analizados en las materias primas

| Costos de operación (OPEX) | Consumo(KW) | horas | medio control | Medio enriquecido | |
|----------------------------|----------------|----------|---------------|-------------------|-------------------|
| | | | | Fuente orgánica | Fuente inorgánica |
| Consumo de energía | | | | | |
| Cinta led | 0.0144 | 120 | \$908 | \$908 | \$908 |
| Balanza analítica | 0.008 | 1 | \$4 | \$4 | \$4 |
| Horno de secado Nabertherm | 3 | 18 | \$28,371 | \$28,371 | \$28,371 |
| Bomba | 0.005 | 240 | \$630 | \$630 | \$630 |
| Tratamiento térmico suero | 0.111 | 2.5 | - | \$146 | - |
| Agua potable | Costo unitario | | | | |
| Cargo fijo mensual | \$18,966 | cantidad | \$18,966 | \$18,966 | \$18,966 |
| \$/L | \$3,449 | 2L | \$6,899 | \$6,898.96 | \$6,898.96 |
| Hielo(g) | \$1.20 | 800 g | - | \$960 | - |
| TOTAL | | | \$55,778 | \$56,884 | \$55,778 |

Los costos de agua y energía de la tabla 35, fueron calculados con tarifas estándar comerciales de \$/KWh de 252.38, para el caso del consumo de energía y \$3.449, por litro de agua utilizado, más un recargo fijo de consumo.

El mínimo costo adicional que se ve reflejado en la producción del medio de cultivo enriquecido con suero lácteo, es considerado por la energía que se requirió para aumentar la temperatura del suero lácteo a su punto de ebullición (100.17 °C) por un periodo de 2.5 horas, para la realización de un pre-tratamiento a este subproducto, mediante un choque térmico, para reducir la contaminación del cultivo con otros microorganismos.

La diferencia es muy pequeña entre los costos totales referentes a composición de los medios de cultivo y costos de operación por consumo de energía y agua de los tres cultivos, con costos totales de producción para los medios: control, enriquecido con suero lácteo y enriquecido con nitrato de sodio de \$59,211; \$59,816 y \$59,214, respectivamente.

La diferencia es mínima a escala laboratorio, mostrando un costo ligeramente mayor en la producción con el cultivo enriquecido con suero lácteo, pero que obtuvo los mayores rendimientos de biomasa y la mayor fracción de proteína, reduciendo así los costos por gramo de biomasa y de proteína, como se observan en las tablas 33 y 34.

En comparación con los costos manejados en el mercado para la biomasa y la proteína de microalga, los resultados presentados por gramo de las mismas sigue siendo muy alto, sin embargo, esto se debe a la producción realizada a nivel laboratorio, utilizando recursos y energía para una producción mínima de 1 g por 3L

de medio de cultivo aproximadamente, costo que puede reducirse al implementar procesos a mayor escala, con innovaciones tecnológicas y condiciones estrictamente controladas.

4. CONCLUSIONES

- Se realizaron las curvas de crecimiento para tres concentraciones de la fuente de nitrógeno inorgánica y cinco concentraciones para la fuente de nitrógeno orgánica seleccionada, determinando las mejores velocidades específicas de crecimiento (μ) para los siguientes enriquecimientos: en la fuente inorgánica (NaNO_3) a 1g/L, es decir un enriquecimiento de nitrógeno teórico de 0.044g/L, con un valor de $\mu=0.3648$ y en la fuente orgánica con 5 mL de suero lácteo, un enriquecimiento de nitrógeno teórico muy similar de 0.041 g/L, obteniendo una velocidad específica de crecimiento de $\mu= 0.3286$ muy favorable.
- La comparación entre la fuente orgánica e inorgánica de nitrógeno confirmó la mayor densidad celular en cultivos heterotróficos, es decir, en el cultivo enriquecido con suero lácteo. Se determinó que la fuente con mayores productividades volumétricas y velocidades específicas de crecimiento era la fuente orgánica, con la obtención de 0,07828 g/L*d de biomasa seca y un valor de $\mu=0,2411$, respecto a la fuente inorgánica de nitrógeno con una productividad de 0,04841g/L*d de biomasa seca y un valor de $\mu=0,2348$.
- El enriquecimiento de nitrógeno con fuentes orgánica e inorgánica generó una mayor productividad volumétrica en los cultivos, respecto al cultivo control evaluado, representando nutrientes favorables para el incremento celular y por ende de proteína en los cultivos de *Chlorella vulgaris*, con rendimientos de biomasa de 54.80% y 33.89% respecto al medio control con tan solo 17.92 %.
- El enriquecimiento del cultivo microalgal con 2% V/V de suero lácteo incrementó no solo la productividad de biomasa respecto al medio control, sino que también acumuló una mayor cantidad de proteínas, obteniendo un rendimiento de proteína en biomasa seca de 55,63%.
- Comparando los costos de producción entre los diferentes medios de cultivo, se encuentran valores muy cercanos entre el control y los medios enriquecidos, costos bajos adicionales pero que incrementaron de manera significativa la generación de biomasa. Es por ello que a pesar de que el costo total de producción es mayor para el tratamiento enriquecido con suero lácteo, este cultivo presentó un incremento significativo en la productividad de biomasa y en la fracción proteica, por esta razón a pesar de que los costos operativos fueron mayores, el costo de producir un gramo de proteína es el menor (\$9.731), por tanto se selecciona esta fuente orgánica de nitrógeno y carbono y se aconseja para su aplicación en los cultivos de la microalga *Chlorella vulgaris*.

5. RECOMENDACIONES

- Para la fase experimental se recomienda realizar el fotoperiodo de 12h luz durante la noche, debido a que la incidencia de la luz genera cierta cantidad de energía calórica en este periodo, con ello la temperatura no baja significativamente, lo cual es más adecuado para el cultivo, ya que no se utilizó un controlador de temperatura.
- Se recomienda la evaluación de la harina de soya, debido a la velocidad específica de crecimiento mostrada, $\mu=0,2725$ en la fase de selección de la fuente de nitrógeno orgánica, pero realizando a esta un pre tratamiento que permita que se solubilice de manera más efectiva en el medio de cultivo, debido al estado sólido en el que se encuentra, dificultando el transporte del nutriente.
- Se recomienda evaluar los medios planteados con fuentes orgánica e inorgánica, pero bajo la misma condición de cultivo heterotrófica, es decir adicionando una fuente de carbono orgánico en el cultivo de la fuente inorgánica de nitrógeno.
- Para el suero lácteo es indispensable trabajar con la mayor brevedad posible desde su proceso de obtención, además de realizar un pre-tratamiento que reduzca la carga microbiana que contiene, a excepción de que provenga de un proceso industrial en el cual este tratamiento ya fue realizado, para disminuir el crecimiento de microorganismos diferentes a la microalga bajo las condiciones de cultivo.
- Para el método del análisis de cuantificación de proteína es necesario tener en cuenta que, si la biomasa a analizar está húmeda, se requiere de una mayor cantidad de muestra, entre 2.5 y 5.0 g, mientras que, si la biomasa esta seca se requiere una menor cantidad para que el análisis obtenga los resultados esperados, aproximadamente 0.5 a 2.0 g, de lo contrario el análisis no detectará la proteína de la muestra.

BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ, J. Cultivo de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) con iluminación mediante LEDs (Light Emitting Diodes). *Trabajo de grado Ingeniero agrónomo. Universidad Politécnica de Madrid*. 2012

ALYABYEV, A. 2011. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*.2011

Aminoácidos estructuras.. Obtenido de (http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/EstructuraProteinasParteA_24774.pdf) . Consultado el 26 de septiembre de 2016

ARANGO, J. (s.f.). El suero de quesería un potencial industrial , tecnológico, económico y de alto valor nutricional. *Cultura láctea, COLANTA*, 9-33. Recuperado el 11 de 09 de 2017, de (http://biblioteca.colanta.com.co/pmb/opac_css/doc_num.php?explnum_id=411)

ARREDONDO, B., & VOLTOLINA, D. (s.f.). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal* (págs. 25-26).

B., M. A., & Thais M., F. (s.f.). Fuentes de aceites y grasas:materias primas industriales. En *Temas selectos en aceites y grasas* (págs. 1-24).

BARBARINO, E. &. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *Springer*, 17, 447-460. 2005 doi:<https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>

BECKER, E. Micro-Algae as a source of protein. 207-210.2007

BENAVENTE-VALDÉS, J. R. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. 2012

BOLAÑOS, P. Agroindustria, Parte 1 . EUNED. 2012

Boletín informativo, Indicadores Corabastos . Obtenido de (http://www.corabastos.com.co/index.php?option=com_content&view=article&id=471&Itemid=290 . Consultado el 30 de octubre de 2017)

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*. 2013

C.F., G., & N., J. Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. *Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Almería*. 2012

CAMARA NACIONAL DE PESQUERÍA. *Harina de pescado-el tema del precio*. Obtenido de (<http://camaradepesqueria.com/harina-de-pescado-tema-del-precio/>). Consultado el 30 de octubre de 2017

CENICAFE. *KHALAJABADI, S. Composición elemental de frutos de café y extracción de nutrientes por la cosecha en la zona cafetera de Colombia*. Obtenido de ([http://www.cenicafe.org/es/publications/arc057\(04\)251-261.pdf](http://www.cenicafe.org/es/publications/arc057(04)251-261.pdf)) Consultado el 19 de AGOSTO de 2017

CENICAFÉ. (24 de noviembre de 2017). *Manejo de subproductos*. Obtenido de (http://www.cenicafe.org/es/index.php/cultivemos_cafe/manejo_de_subproductos)

CHAPARRO, G. (s.f.). Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio. *Trabajo de grado Ingeniera Química. Bogotá, D.C. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías*.

CHIA, M. A., & Lombardi, A. T. (2013). Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO BIOLÓGICO. Obtenido de Ingeniería de tratamiento de aguas residuales: (<http://www.oocities.org/edrochac/residuales/cinetica3.pdf>). Consultado el 9 de septiembre de 2017

COLANTA. *El suero de quesería un potencial industrial, tecnológico, económico y de alto valor nutricional*. Obtenido de (http://biblioteca.colanta.com.co/pmb/opac_css/doc_num.php?explnum_id=411). Consultado el 11 de SEPTIEMBRE de 2017

Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología. *ArgenBio*. Obtenido de (<http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=194>). Consultado el 11 de septiembre de 2016

CUBERO, R. G. *PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS*. Obtenido de (<http://digital.csic.es/bitstream/10261/101928/1/TESIS%20DOCTORAL%20RGC.pdf>). Consultado en Octubre de 2017

DURAN, S. L., Andrés, B. S., & Ángel, G. D. (s.f.). Influencia de la relación Carbono/Nitrógeno en la producción de proteínas totales en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. *Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, 49-58.

EL ECONOMISTA. Obtenido de (<http://empresite.eleconomistaamerica.co/Actividad/HARINA-DE-PESCADO/>). Consultado el 10 de OCTUBRE de 2017

ENGORMIX. (s.f.). *Avicultua, industria cárnica*. Obtenido de (<https://www.engormix.com/avicultura/articulos/harina-de-sangre-t29408.htm>)

ETSIAAB. (10 de SEPTIEMBRE de 2017). *Características de las materias primas*. Obtenido de (https://www1.etsia.upm.es/acreditacion2015/Evidencias_IAL/TFC/Laura%20D%C3%ADaz%20D%C3%ADaz/7.%20ANEJO%20IV.%20CARACTER%C3%8DSTICAS%20DE%20LAS%20MATERIAS%20PRIMAS.pdf)

F, G.-C., Jawiarczyk N, & González-López C.V. Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de. *Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Almería*. 2012

FAO. *Aminoácidos esenciales*. Obtenido de (<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S06.htm>). Consultado el 25 de noviembre de 2017

FAO. *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos*. Obtenido de (<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s17.htm>). Consultado el 17 de noviembre de 2017

FAO. (s.f.). *Macrófitas acuáticas vasculares*. Obtenido de (<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/AB492S09.htm>)

FAO, D. d. *NUTRICION Y ALIMENTACION DE PECES Y CAMARONES CULTIVADOS*. Obtenido de (<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/AB492S06.htm>). Consultado el 4 de Septiembre de 2017

FEDNA. *Harina de soja 47% PB*. Obtenido de (http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/harina-de-soja-47-pb). Consultado en agosto de 2017

FEDNA, F. e. *Harina de pescado*. Obtenido de (http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/harina-de-pescado-70913). Consultado el 6 de Agosto de 2017

FENNEMA, O. (s.f.). *Food Chemistry. University of Wisconsin Madison*. 1996. p. 335 . Obtenido de (<http://cst.ur.ac.rw/library/Food%20Science%20books/batch1/Marcel%20Dekker,.Food%20Chemistry,%203rd%20Edition.pdf>)

FERNÁNDEZ BELTRÁN, C., & PERDOMO ROBAYO, W. F. (6 de Agosto de 2017). *APROVECHAMIENTO DE LA SANGRE DE BOVINO PARA LA OBTENCION DE*. Obtenido de

(<http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/15765/T43.07%20B419a.pdf?sequence=1>)

FREYRE, S. *Estructura de las proteínas*. 2016. btenido de <https://www.youtube.com/watch?v=smcTh2LVVQY>

FUNIBER, Fundación universitaria iberoamericana. *Base de Datos Internacional de Composición de Alimentos*. Obtenido de (<http://www.composicionnutricional.com/alimentos/HARINA-DE-MAIZ-1>). Consultado el 6 de agosto de 2017

GARCIA, R. *Tesis doctoral, Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂*. Obtenido de (<http://digital.csic.es/bitstream/10261/101928/1/TESIS%20DOCTORAL%20>) Consultado el 30 de Octubre de 2017

GLADIS, B. (s.f.). *Caracterización microbiológica y físico-química de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombricompostaje*. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE.

GOMÉZ, L. *Cultivo y aplicación de las microalgas Dunaliella Salina y Chlorella vulgaris en Cuba*. 1997. Obtenido de (file:///D:/Pictures/Downloads/GomezLuna_LilianaMaria_TD_1997.pdf). Consultado el 24 de enero de 2017

GOMEZ, M. Definición, composición, estructura y propiedades de la leche. Tecnología en lácteos. . *Universidad Nacional Abierta y a Distancia*. Bogotá, D.C. 2005

GONZÁLEZ et al. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*. 2010

GONZÁLEZ, L. &. (s.f.). Efecto de la concentración y fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de la microalga Chaetoceros muelleri. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. *Phyton*.

Granos y harinas. Obtenido de (<http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/8%20granos%20y%20harinas.pdf>). Consultado el 6 de Agosto de 2017

GUERRA, e. a. Aprovechamiento del lacto suero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. 57. 2013

GUILLEN, M. V. (2016). *Estructura y propiedades de las proteínas*.

HERNANDEZ, M., & Veléz Ruiz, J. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. México: Universidad de las Américas Puebla. 2004

HERNANDEZ, G. A. Evaluación de las incidencias de salinidad y pH sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana . *ITECKNE*. 2016

IFFO. *Producción de harina de pescado*. Obtenido de (<http://www.iffonet.es/producci%C3%B3n>). Consultado el 6 de AGOSTO de 2017

IGLESIAS, L. *EL ESTIERCOL Y LAS PRACTICAS AGRARIAS RESPETUOSAS CON EL MEDIO AMBIENTE*. Getafe-Madrid: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. 1994

INSTITUTO COLOMBIA DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN
Referencias bibliográficas. Contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá, D.C.

_____, Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación NTC 1486. Bogotá, D.C.; El instituto, 2008. 36p 2008.

_____, Referencias documentales para fuentes de información electrónicas. NTC 4490. Bogotá, D.C.; El instituto 1998. 23 p.

INAUNDIS, G. L. (s.f.). Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. *Revista Colombiana de Biotecnología de la Universidad Nacional*, 27-38.

INDEXMUNDI. *Harina de pescado precio mensual-dólares americanos por tonelada métrica*. Obtenido de (<http://www.indexmundi.com/es/precios-de-mercado/?mercancia=harina-de-pescado>). Consultado el 6 de AGOSTO de 2017

Ingeniería de bioprocesos aplicada a la biotecnología de microalgas. Obtenido de Cuantificación del crecimiento y la productividad : (<https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-4-crecimiento-y-productividad.html>). Consultado el 9 de septiembre de 2017

JELLEN, P. Whey processing, utilization and products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London, UK, 2739-2745. 2003

JUSCAMAITA Juan, y. S. (s.f.). Producción de la microalga *nannochloropsis oculata* (droop) hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Universidad Nacional Agraria de Lima*.

LOPEZ, P. G. *Estudio de toxinas y otros metabolitos de origen marino*. 2006

LUZMILA, R. (s.f.). Efecto del medio EM-bokashi en el cultivo de la microalga marina tetraselmis suecica k. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú. *Revista de Ecología Aplicada*, Vol 6, 111-116.

M, H. R., & J.F., V. (s.f.). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Departamento de ingeniería química de la Universidad de las Américas. México.*

M., M. D. Modelamiento de la transferencia de oxígeno para el cultivo de microorganismos en un biorreactor de columna de burbujeo. Trabajo de grado Ingeniero químico. Manizales. *Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería* , 2003. p 29.

MALAJOVICH, M. (s.f.). *Introducción a las técnicas microbiológicas*. Obtenido de Biotecnología: enseñanza y divulgación. 2015 : https://bteduc.com/roteiros_es/2015_Tecnicas_microbiologicas.pdf

MALDONADO, E., & MORALES, E. (s.f.). Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) con sustratos amiláceos. *Ingeniería en biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas.*

MARCELA, M., & Juan, R. Effect of culture medium on growth and protein content of *Chlorella vulgaris*. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*. 2011

MARÍA, G. L. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus acutus*. *Universidad Nacional de Colombia*. 2010

MARÍN, A. R. *Características fotosintéticas y crecimiento de Scenedesmus obliquus inmovilizada en alginato*. Obtenido de (http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000300004). Consultado el 9 de septiembre de 2017

MARTHA, O. (s.f.). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Departamento de ingeniería Agronómica de la Universidad de los Llanos.*

MIGUEL, S. L. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Tesis de investigación para Magister en Ingeniería Química. *Universidad Nacional de Colombia*. 2012

MONTOYA D. & BERMÚDEZ M. Modelamiento de la transferencia de oxígeno para el cultivo de microorganismos en un biorreactor de columna de burbujeo. Trabajo de grado Ingeniero químico. Manizales. (s.f.). *Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería* .

MOORE, C. J. Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Vol.9*. 2010

OSORIO, A., Gómez, N., & Sánchez, C. *Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de*. Obtenido de (<http://www.scielo.org.co/pdf/rfiua/n45/n45a02.pdf>). Consultado el 6 de Agosto de 2017

PAREDES, P. Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. *Facultad de ciencias, Universidad de la Coruña*, 2005. 22-26.

PÉREZ, A. H. Microalgas, cultivo y beneficio. *Revista de biología marina y oceanografía*. 2014

PIÑERA, A. K. *Manual para el cultivo de microalgas*. Obtenido de <http://biblio.uabcs.mx/tesis/TE1366.pdf>

PLUMMER, D. Aminoácidos y Proteínas. Capítulo 5. En I. a. Práctica. McGraw-Hill Latinoamericana. 1994

Proteínas. Obtenido de (http://www.edu.xunta.gal/centros/iespuntacandieira/system/files/04_Prote%C3%A9Dnas.pdf). Consultado el 26 de septiembre de 2016

QUEVEDO, C., & Sonia P. MORALES V. CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* sp. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*. 2008

RODRIGUEZ, F. Obtenido de (http://sevuprimero.weebly.com/uploads/9/8/6/3/9863937/estructura_y_propiedades_de_pptidos_y_aminocidos_fabin_rodriguez.pdf). Consultado 26 de septiembre de 2016

ROMERO, N. (s.f.). *Depósito de documentos de la FAO*. . Obtenido de Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos (Capítulo 15): <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s17.htm>

RUIZ, M. A. (s.f.). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. *Universidad politécnica de valencia*.

SALVUCCI, E. *Hacia una nueva Biología*. Obtenido de Crecimiento microbiano: (<https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/>). Consultado 9 de septiembre de 2017

SANTIAGO, Francisco JP SELECTA S.A. *Determinación de proteínas por el método de Kjeldhal*. Obtenido de ([94](http://www.grupo-</p></div><div data-bbox=)

selecta.com/notasdeaplicaciones/analisis-alimentarios-y-de-aguas-nutritional-and-water-analysis). Consultado el 30 de octubre de 2017

SIARI, C. N. *Apuntes de biología molecular*. 2014

SILVA, A. m. EVALUACIÓN DE FERTILIZANTES AGRÍCOLAS . 2015

T. CHIONG, C. ACQUAH, S.Y. LAU, & E.H. KHOR. Microalgal-Based Protein By-Products: Extraction, Purification, and Applications . En *Protein Byproducts* (págs. 213-233). Malaysia. 2016

TONGHUI, X., YUN, X., YU, Z., & LI, X. Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. *Bioresource Technology*, 247-255. 2017

TREMBLAY, S. *What is crude protein?*, *Livestrong*. Obtenido de (<https://www.livestrong.com/article/519702-what-is-crude-protein/>). Consultado el 28 de noviembre de 2017

VALENCIA Elizabeth, e. a. *La industria de la leche y la contaminación del agua*. Obtenido de (<http://www.elementos.buap.mx/num73/pdf/27.pdf>). Consultado el 8 de AGOSTO de 2017

WAGHMARE, A. G., & Manoj K. Salve. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing*. 2016

WAITES, M. J., & L.Morgan, N. *Industrial Microbiology:An Introduction*. 2001

ANEXOS

ANEXO A. PREPARACIÓN DEL SUERO LÁCTEO

Recepción de la materia prima: La leche de buena calidad se pesa para conocer la cantidad que entra al proceso y se filtra mediante una fina tela para eliminar macro-sustancias extrañas procedentes de su manipulación¹⁶⁷.

Ajuste de temperatura: si no se encuentra a temperatura de ordeño, calentar hasta ajustar la temperatura por tacto o por termómetro de 32 a 36°C según especificaciones del fabricante¹⁶⁸ para evitar la inactivación de las enzimas proteolíticas presentes en el cuajo¹⁶⁹.

Adición del cuajo: Una pastilla de cuajo MARSCHALL®, se debe utilizar para 50 L de leche según especificaciones del fabricante, éste se debe disolver en agua tibia, 30 minutos antes de su adición. Agregar esta solución del cuajo a la leche en agitación. Reposo de la mezcla de 30-60 min.

Corte: Se corta mediante una lira o cuchillo en cuadros pequeños de 2x2 cm para dejar salir la mayor cantidad de suero lácteo posible, se deja en reposo 5 min.

Desuerado: Consiste en separar el suero dejándolo salir a través de un recipiente especial que permite el moldeo de la cuajada y la salida del suero lácteo. Se debe separar entre el 70 y el 80% del suero. Este se recoge en un recipiente y se lleva al pretratamiento.

Almacenamiento: La cuajada se reserva en un recipiente especial que moldee y permita la salida del suero lácteo excedente.

A nivel industrial¹⁷⁰:

Después de la recepción de la materia prima realizar:

- Análisis fisicoquímico: Deben hacerse pruebas de acidez, antibióticos, porcentaje de grasa y análisis organoléptico (sabor, olor, color). La acidez de la leche debe estar entre 16 y 18 ° (grados° Dornic).
- Pasteurización: Consiste en calentar la leche a una temperatura de 65°C por 30 minutos, para eliminar los microorganismos patógenos y mantener las propiedades nutricionales de la leche, para luego producir un queso de buena calidad. Aquí debe agregarse el cloruro de calcio en una proporción del 0.02-0.03% en relación con la leche que entró a proceso.
- Enfriamiento: La leche pasteurizada se enfría a una temperatura de 37-39 °C, pasando agua fría en la chaqueta o con sacos con hielo.
- Adición del cultivo láctico: Cuando la leche es pasteurizada es necesario agregar cultivo láctico (bacterias seleccionadas y reproducidas) a razón de 0.3%.

167 ARANGO. La industria del queso en Colombia. Despertar lechero COLANTA. [en línea]. Disponible en internet: http://biblioteca.colanta.com.co/pmb/opac_css/doc_num.php?explnum_id=492

168 DANISCO. Instrucciones generales de uso. Cuajo MARSCHALL®. [en línea] Disponible en internet: <http://www.danisco.com/product-range/food-enzymes/dairy-enzymes/marschallr/instrucciones-generales-de-uso/>

169 Hernández, M. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. México, 2014. p. 13-22

170 FAO. Fichas técnicas de procesados lácteos. [en línea] Disponible en internet: <http://www.fao.org/3/a-au170s.pdf>

Después del desuerado:

- Lavado de la cuajada: La cuajada se lava para eliminar residuos de suero y bloquear el desarrollo de microorganismos dañinos al queso. Se puede asumir que por cada 100 litros de leche que entra al proceso, hay que sacar 35 litros de suero y reemplazarlo con 30 litros de agua tibia (35°C), que se escurren de una vez.
- Salado: Se adicionan de 400 a 500 gramos de sal fina por cada 100 litros de leche y se revuelve bien con una paleta. Haga pruebas para encontrar el nivel de sal que prefieren los compradores.
- Moldeo: Los moldes, que pueden ser de acero inoxidable o de plástico PVC, cuadrados o redondos, se cubren con un lienzo y se llenan con la cuajada. En este momento, se debe hacer una pequeña presión al queso para compactarlo mejor. Este queso no se prensa, solamente se voltean los moldes tres veces a intervalos de 15 minutos. Seguidamente, se deja reposar por 3 horas y luego se sacan los moldes y se guarda el queso en refrigeración.
- Pesado: Se hace para llevar registros de rendimientos, es decir los kilogramos obtenidas por litro de leche que entraron al proceso y preparar las unidades para la venta. Empaque: El empaque, se hace con material que no permita el paso de humedad. Generalmente se usa un empaque plástico.
- Almacenado: Se debe almacenar en refrigeración, para impedir el crecimiento de microorganismos y tener siempre queso fresco. El almacenamiento no debe ser mayor de 5 -7 días.

ANEXO B FERTILIZANTE AGRÍCOLA FOLIAGRO

Composición del fertilizante agrícola Foliagro¹⁷¹:

| | | | |
|---|------------|---------------------------------------|-------------|
| Nitrógeno Total (N) | 100,00 g/L | Boro (B) | 0,20 g/L |
| Nitrógeno Amoniacal (N) | 72,00 g/L | Cobre (Cu)* | 0,20 g/L |
| Nitrógeno Nitrico (N) | 3,20 g/L | Hierro (Fe)* | 0,40 g/L |
| Nitrógeno Ureico (N) | 24,80 g/L | Manganeso (Mn)* | 0,40 g/L |
| Fósforo Asimilable (P ₂ O ₅) | 300,00 g/L | Molibdeno (Mo) | 0,03 g/L |
| Potasio Soluble en Agua (K ₂ O) | 100,00 g/L | Zinc (Zn)* | 0,50 g/L |
| Calcio (CaO)* | 0,20 g/L | pH en solución al 10% | 6,5 |
| Magnesio (MgO)* | 0,20 g/L | Densidad a 20 °C | 1,3 g/mL |
| Azufre Total (S) | 0,80 g/L | *Quelataados con EDTA y ácido cítrico | |

¹⁷¹ CARTAGENA, Juan. Evaluación del uso de la microalga *Chlorella vulgaris* en la remoción de materia orgánica de las aguas residuales de la PTAR el salitre a nivel laboratorio. 2017. Trabajo de grado como Ingeniero químico. Fundación Universidad de América

**ANEXO C:
CONCENTRACIONES CELULARES PRE-EXPERIMENTO 1: ETAPA I**

Concentraciones celulares determinadas en el pre-experimento 1, para la realización de las curvas de crecimiento y la linealización de las mismas.

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 1) (Cel/ml) | | | |
|---|----------------|----------------|------------------|
| DIA | Harina de Soya | Suero lácteo | Harina de Sangre |
| 1 | 1,4E+07 | 1,3E+07 | 1,6E+07 |
| 2 | 1,7E+07 | 1,4E+07 | 1,3E+07 |
| 3 | 1,7E+07 | 1,5E+07 | 1,6E+07 |
| 4 | 2,1E+07 | 1,8E+07 | 2,4E+07 |
| 5 | 2,2E+07 | 4,5E+07 | 3,9E+07 |
| 6 | 3,6E+07 | 5,1E+07 | 5,7E+07 |
| 7 | 3,6E+07 | 5,0E+07 | 4,9E+07 |

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 2) (Cel/ml) | | | |
|---|----------------|----------------|------------------|
| DIA | Harina de Soya | Suero lácteo | Harina de Sangre |
| 1 | 3,6E+06 | 2,2E+06 | 3,7E+06 |
| 2 | 4,1E+06 | 4,6E+06 | 4,9E+06 |
| 3 | 4,6E+06 | 4,6E+06 | 4,8E+06 |
| 4 | 1,0E+07 | 3,4E+07 | 1,5E+07 |
| 5 | 2,7E+07 | 3,9E+07 | 3,3E+07 |
| 6 | 4,4E+07 | 5,4E+07 | 4,0E+07 |
| 7 | 2,7E+07 | 5,3E+07 | 4,8E+07 |

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 3) (Cel/ml) | | | |
|---|----------------|--------------|------------------|
| DIA | Harina de Soya | Suero lácteo | Harina de Sangre |
| 1 | 8,0E+05 | 7,0E+05 | 6,0E+05 |
| 2 | 1,1E+06 | 1,8E+06 | 1,2E+06 |
| 3 | 1,5E+06 | 8,5E+05 | 1,4E+06 |
| 4 | 2,1E+06 | 4,0E+06 | 2,4E+06 |
| 5 | 5,4E+06 | 4,4E+06 | 3,1E+06 |
| 6 | 7,2E+06 | 7,4E+06 | 4,5E+06 |
| 7 | 8,7E+06 | 6,5E+06 | 3,3E+06 |

Las concentraciones celulares en negrilla, indican un factor de dilución de 1/10, es decir que se tomó una muestra del cultivo de 1 ml para diluirlo en 9 ml de agua destilada.

ANEXO D
CONCENTRACIONES CELULARES PARA EL PRE-EXPERIMENTO 1: ETAPA II

Concentraciones celulares determinadas en el pre-experimento 1 para la elaboración de las curvas de crecimiento.

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 1) (Cel/ml) | | | | | |
|--|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| DIA | 5 ml | 10 ml | 15 ml | 20 ml | 25 ml |
| 1 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 1,E+06 | 2,E+06 |
| 2 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 |
| 3 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 3,E+06 |
| 4 | 5,E+06 | 5,E+06 | 3,E+06 | 4,E+06 | 4,E+06 |
| 5 | 7,E+06 | 8,E+06 | 4,E+06 | 3,E+06 | 6,E+06 |
| 6 | 7,E+06 | 1,E+07 | 6,E+06 | 4,E+06 | 5,E+06 |
| 7 | 1,E+07 | 1,E+07 | 6,E+06 | 7,E+06 | 8,E+06 |

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 2) (Cel/ml) | | | | | |
|--|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| DIA | 5 ml | 10 ml | 15 ml | 20 ml | 25 ml |
| 1 | 2,E+06 | 3,E+06 | 3,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 |
| 2 | 2,E+06 | 1,E+06 | 3,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 |
| 3 | 3,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 |
| 4 | 6,E+06 | 3,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 1,E+06 |
| 5 | 7,E+06 | 4,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 4,E+06 |
| 6 | 7,E+06 | 5,E+06 | 3,E+06 | 2,E+06 | 6,E+06 |
| 7 | 1,E+07 | 5,E+06 | 5,E+06 | 3,E+06 | 5,E+06 |

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 3) (Cel/ml) | | | | | |
|--|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| DIA | 5 ml | 10 ml | 15 ml | 20 ml | 25 ml |
| 1 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 |
| 2 | 1,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 |
| 3 | 3,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 | 1,E+06 |
| 4 | 4,E+06 | 4,E+06 | 4,E+06 | 3,E+06 | 3,E+06 |
| 5 | 6,E+06 | 4,E+06 | 3,E+06 | 2,E+06 | 2,E+06 |
| 6 | 9,E+06 | 7,E+06 | 5,E+06 | 4,E+06 | 5,E+06 |
| 7 | 9,E+06 | 6,E+06 | 5,E+06 | 4,E+06 | 6,E+06 |

ANEXO E:

CONCENTRACIONES CELULARES PRE-EXPERIMENTO 2

Concentraciones celulares determinadas en el pre-experimento 2 para la elaboración de las curvas de crecimiento.

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 1) (Cel/ml) | | | |
|--|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| DIA | 1 g/ml de NaNO ₃ | 1,25 g/ml de NaNO ₃ | 1,5 g/ml de NaNO ₃ |
| 1 | 3,1,E+06 | 2,8,E+06 | 3,3,E+06 |
| 2 | 2,7,E+06 | 2,5,E+06 | 3,8,E+06 |
| 3 | 4,4,E+06 | 2,7,E+06 | 3,7,E+06 |
| 4 | 5,3,E+06 | 4,9,E+06 | 5,2,E+06 |
| 5 | 1,4,E+07 | 1,1,E+07 | 1,3,E+07 |
| 6 | 2,3,E+07 | 1,4,E+07 | 1,6,E+07 |
| 7 | 2,5,E+07 | 1,7,E+07 | 1,6,E+07 |

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 2) (Cel/ml) | | | |
|--|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| DIA | 1 g/ml de NaNO ₃ | 1,25 g/ml de NaNO ₃ | 1,5 g/ml de NaNO ₃ |
| 1 | 2,5,E+06 | 3,2,E+06 | 2,9,E+06 |
| 2 | 2,7,E+06 | 3,2,E+06 | 2,6,E+06 |
| 3 | 4,2,E+06 | 3,7,E+06 | 4,1,E+06 |
| 4 | 4,9,E+06 | 4,5,E+06 | 6,8,E+06 |
| 5 | 1,0,E+07 | 1,1,E+07 | 1,2,E+07 |
| 6 | 1,2,E+07 | 1,7,E+07 | 1,8,E+07 |
| 7 | 1,3,E+07 | 1,3,E+07 | 1,7,E+07 |

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 3) (Cel/ml) | | | |
|--|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| DIA | 1 g/ml de NaNO ₃ | 1,25 g/ml de NaNO ₃ | 1,5 g/ml de NaNO ₃ |
| 1 | 2,1,E+06 | 2,5,E+06 | 2,1,E+06 |
| 2 | 3,6,E+06 | 3,6,E+06 | 3,3,E+06 |
| 3 | 4,2,E+06 | 4,8,E+06 | 3,5,E+06 |
| 4 | 7,0,E+06 | 6,6,E+06 | 5,2,E+06 |
| 5 | 2,0,E+07 | 1,6,E+07 | 1,5,E+07 |
| 6 | 2,4,E+07 | 1,7,E+07 | 1,8,E+07 |
| 7 | 2,5,E+07 | 1,7,E+07 | 2,1,E+07 |

**ANEXO F:
CONCENTRACIONES CELULARES EXPERIMENTO**

Concentraciones celulares determinadas en el experimento para la elaboración de las curvas de crecimiento.

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 1) (Cel/ml) | | | |
|--|----------------|---------------------|-------------------------|
| DIA | control | Suero lácteo | NaNO₃ |
| 1 | 8,0E+05 | 1,1E+06 | 9,0E+05 |
| 2 | 1,4E+06 | 1,2E+06 | 1,1E+06 |
| 3 | 1,7E+06 | 1,8E+06 | 2,0E+06 |
| 4 | 2,2E+06 | 2,6E+06 | 2,0E+06 |
| 5 | 2,3E+06 | 2,7E+06 | 2,7E+06 |
| 6 | 3,0E+06 | 3,5E+06 | 3,5E+06 |
| 7 | 3,3E+06 | 3,7E+06 | 3,8E+06 |

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 2) (Cel/ml) | | | |
|--|----------------|---------------------|-------------------------|
| DIA | control | Suero lácteo | NaNO₃ |
| 1 | 8,5E+05 | 8,0E+05 | 1,2E+06 |
| 2 | 9,0E+05 | 9,5E+05 | 1,6E+06 |
| 3 | 1,1E+06 | 1,7E+06 | 2,2E+06 |
| 4 | 1,8E+06 | 2,2E+06 | 2,5E+06 |
| 5 | 2,2E+06 | 2,7E+06 | 3,2E+06 |
| 6 | 2,4E+06 | 2,7E+06 | 3,0E+06 |
| 7 | 2,6E+06 | 3,3E+06 | 3,8E+06 |

| CONCENTRACIÓN CELULAR (Repetición 3) (Cel/ml) | | | |
|--|----------------|---------------------|-------------------------|
| DIA | control | Suero lácteo | NaNO₃ |
| 1 | 9,0E+05 | 5,5E+05 | 8,5E+05 |
| 2 | 1,2E+06 | 6,5E+05 | 8,5E+05 |
| 3 | 1,3E+06 | 1,4E+06 | 1,7E+06 |
| 4 | 1,8E+06 | 2,4E+06 | 2,5E+06 |
| 5 | 2,5E+06 | 2,2E+06 | 3,0E+06 |
| 6 | 2,9E+06 | 2,3E+06 | 3,3E+06 |
| 7 | 3,1E+06 | 2,5E+06 | 4,0E+06 |

ANEXO G: PROTOCOLO PARA DETERMINACIÓN DE PESO SECO

GRUPO I+D:

BIOTECFUA



AQUÍ

DIRECTOR
DIEGO RUBIO FERNANDEZ

ESTUDIANTE (S)
MARÍA ALEJANDRA PARRA
LEIDY JOHANA MURCIA

Semillero CBIQA:

Estudiante(s) encargado del
servicio:

Fecha: 23 de octubre de 2017

Señores

Centro de Bioprospección e Ingeniería Química Aplicada al
Estudio de Biomoléculas e Industria – CBIQA –Fundación
Universidad de América:

Solicito a ustedes el uso del Horno de Marca NABERTHERM –
TR120, en tal sentido doy a conocer la fecha, hora, tiempo de
uso y otras especificaciones, lo que para ello anexo protocolo
estandarizado para el tipo de procedimiento solicitado.

Procedimiento solicitado de secado de muestras:

Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico

In book: Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de
la biomasa microalgal., Chapter: Determinación de peso seco y
contenido orgánico e inorgánico, Publisher: CIBNOR, Editors:
Arredondo-YegaBO, Voltolina, D

2.1 Protocolo para la determinación del peso seco total

Tomar un volumen conocido del cultivo de microalga
(homogenizar bien la muestra antes de proceder) y filtrar en los
filtros de peso conocido.

a) Colocar los sobres (entreabiertos) con filtro en una estufa a
temperatura entre 65 y 70 °C durante por lo menos 12 h (el
tiempo de secado depende del tipo de estufa y de la humedad
ambiental, además del volumen de la muestra).

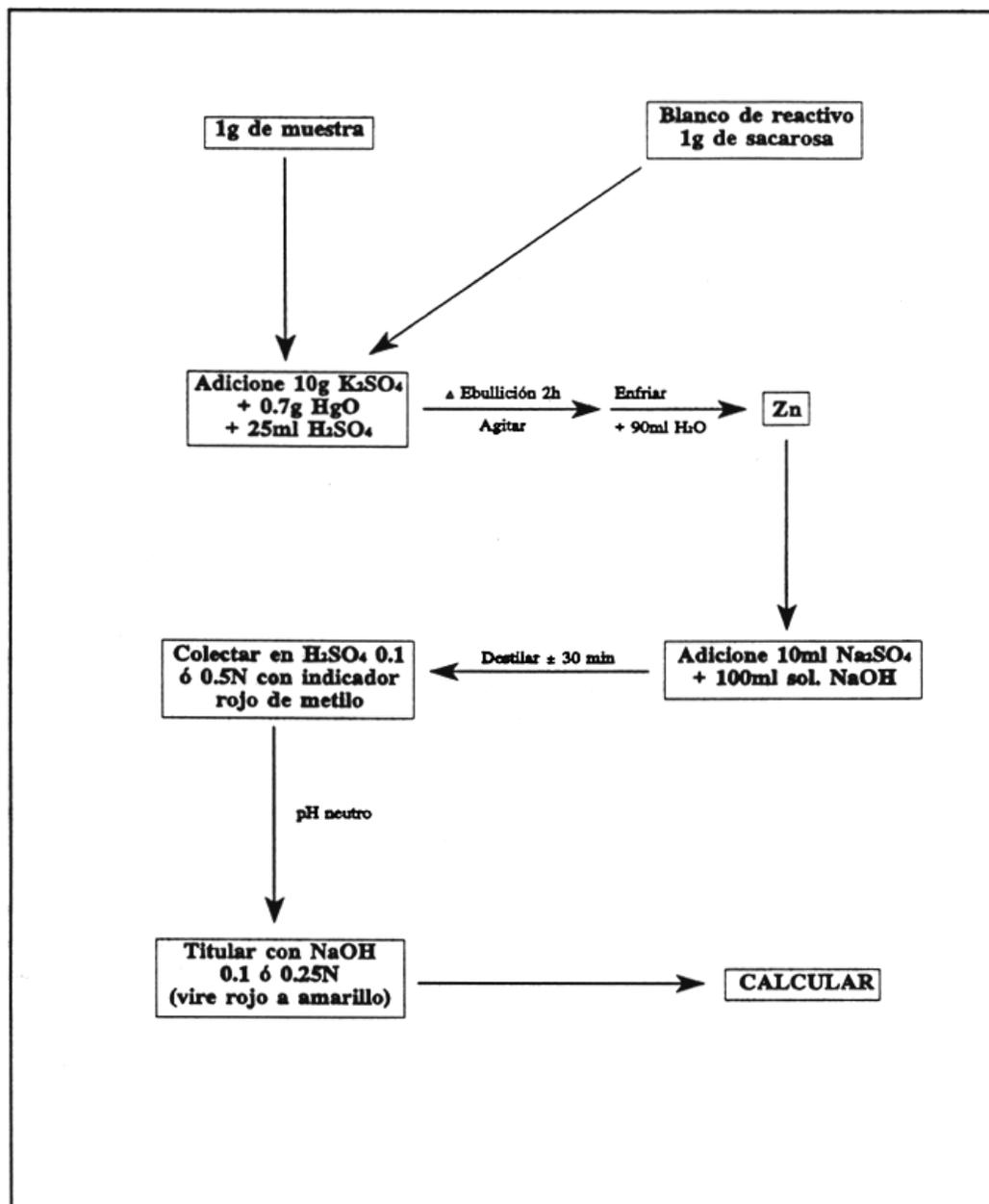
b) Pasar los filtros a un desecador, verificando que el silicagel
esté libre de humedad. Aplicar vacío y dejar en el desecador
durante 1.5 h.

c) Pesar rápidamente los filtros en una balanza analítica de 5
dígitos (sacando los filtros uno por uno del desecador y
cerrándolo cada vez) hasta cuando la lectura se estabiliza.

d) Regresar los filtros a la estufa y repetir la operación los dos
días siguientes o hasta asegurarse que se logró peso constante.

ANEXO H: CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO KJELDAHL

Esquema de la cuantificación de la proteína por el método Kjeldahl, realizado en el laboratorio.¹⁷²



¹⁷² FAO. Manual de técnicas para el laboratorio. Determinación de proteína cruda. [en línea]. Disponible en internet: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB489S/AB489S03.htm>

ANEXO I: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO KJELDAHL



INFORME DE RESULTADOS No 369

FECHA: diciembre 11 de 2017

DATOS DEL CLIENTE:

Nombre del cliente: Leidy Johanna Murcia Moreno

Dirección del cliente: Calle 58 n sur N° 79b-44 de Bogota

Muestras entregadas por: Leidy Johanna Murcia Moreno

Fecha de recepción de muestras: 06 de diciembre de 2017

MUESTRAS RECIBIDAS:

Se recibieron 3 muestras de microalgas en biomasa seca para determinación de proteína.

| Identificación cliente | Condiciones de recepción | Identificación LIAC | Custodia No | Matriz |
|------------------------|--------------------------|---------------------|-------------|--------|
| Suero Lacteo | Temperatura Ambiente | 5269 | 38 | OTRO |
| Control | Temperatura Ambiente | 5270 | 38 | OTRO |
| Nitrato | Temperatura Ambiente | 5271 | 38 | OTRO |

METODOS DE REFERENCIA:

NA

NORMATIVIDAD DE REFERENCIA:

NA

RESULTADOS:

Este informe presenta fielmente los resultados obtenidos para las muestras analizadas bajo las condiciones especificadas y corresponden exclusivamente a las muestras recibidas.

NOTA1:



Bogotá Sede Chapinero-Carrera 5 N°59A -44, Telefono 2174587- 3488000 Ext.1291-1292 email:liac@lasalle.edu.co
Informe No369

Page 1 of 3

FL-019 Formato Reporte de Resultados – Versión 5 – 09/07/2015

Este informe de resultados no puede ser reproducido parcialmente, solo en forma total con previa autorización por escrita de la dirección del LIAC.

NOTA2: El laboratorio no realizo el muestreo por lo que no se hace responsable del mismo ni de la información relacionada en la cadena de custodia incluyendo la procedencia de las muestras.

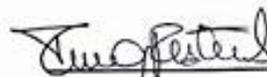
NOTA3:

Este informe de resultados consta de un total de 3 páginas de informe.

Este informe de resultados incluye 0 anexos.



Elsa Fonseca
T.P.Q 1353
Directora Laboratorio



Diana Chaveli Sánchez
T.P 3115
Jefe de Área

| INFORME DE RESULTADOS No. 369 | | | | | | | |
|-------------------------------|--------|--|----------|-----------|--------------------|----------------|---------------|
| Código LIAC | Matriz | Método/Referencia | Unidades | Resultado | Rango Normatividad | Fecha Análisis | Observaciones |
| 5269 | OTRO | Proteína - AOAC 2001.11 (2005) / NTC 4657 (1999)/Método Kjeldahl | % P | 55,63 | NA | 08/12/2017 | |
| 5270 | OTRO | Proteína - AOAC 2001.11 (2005) / NTC 4657 (1999)/Método Kjeldahl | % P | 45,05 | NA | 08/12/2017 | |



Bogotá Sede Chapinero-Carrera 5 N°50A -44, Teléfono 2174587- 3488000 Ext.1291-1292 email:liac@lasalle.edu.co
Informe No369



| INFORME DE RESULTADOS No. 359 | | | | | | | |
|-------------------------------|--------|--|----------|-----------|--------------------|----------------|---------------|
| Código LIAC | Matriz | Método/Referencia | Unidades | Resultado | Rango Normatividad | Fecha Análisis | Observaciones |
| 5271 | OTRO | Proteína - AOAC 2001.11 (2005) / NTC 4657 (1999)/Método Kjeldahl | % P | 39,54 | NA | 06/12/2017 | |

Este Informe de resultados termina en esta línea

