



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“CARACTERIZACIÓN DE LA MICROALGA *FISCHERELLA MUSCICOLA*,
PARA EVALUAR LA BIOMASA Y SU POTENCIAL USO EN LA INDUSTRIA
ALIMENTICIA”**

Realizado por:

JOHANA PRISCILA YUNGA ATAPUMA

Director del proyecto:

Ing. Rodolfo Jefferson Rubio Aguiar

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN GESTION AMBIENTAL

Quito, 07 de marzo de 2018

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, JOHANA PRISCILA YUNGA ATAPUMA, con cédula de identidad # 1715897953, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Johana Priscila Yunga Atapuma

1715897953

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“CARACTERIZACIÓN DE LA MICROALGA *FISCHERELLA MUSCICOLA*,
PARA EVALUAR LA BIOMASA Y SU POTENCIAL USO EN LA INDUSTRIA
ALIMENTICIA”**

Realizado por:

JOHANA PRISCILA YUNGA ATAPUMA

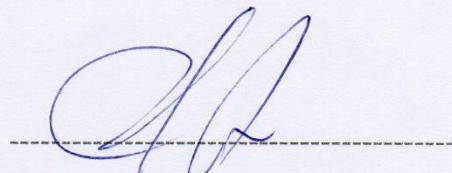
como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN GESTION AMBIENTAL

ha sido dirigido por el profesor

RODOLFO JEFFERSON RUBIO AGUIAR

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



Rodolfo Jefferson Rubio Aguiar

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

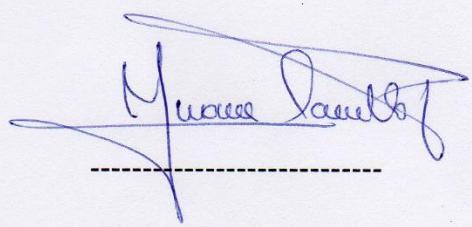
PABLO CASTILLEJO PONS

EMMA IVONNE CARRILLO PAREDES

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



Pablo Castillejo Pons



Emma Carrillo Paredes

QUITO, 07 marzo del 2018

DEDICATORIA

A mis padres quienes han sido mi apoyo constante a lo largo de mi vida estudiantil y profesional, por enseñarme a luchar y así lograr lo que solo con esfuerzo se alcanza, especialmente a mi madre que es mi ejemplo de superación y me ha impulsado a la culminación de este trabajo de tesis.

A mi hijo Mathyas, quien es la razón por la que me levanto cada día, por quien me esfuerzo por un mejor presente, quien es el gran amor de mi vida.

A mis hermanos Diego y Yesenia, a pesar de ser diferentes siempre nos apoyamos y demostramos tener el mismo corazón noble y lleno de amor.

A mi abuelita Mercedes, quien desde el cielo me bendice y guía mi camino

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme culminar con éxito la maestría.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales de la Universidad Internacional SEK
y los docentes de la maestría en Gestión Ambiental por haber impartido sus
conocimientos y experiencias.

A mis padres Diego y Hortencia por ser mi guía en todo momento, por su apoyo
incondicional en cada etapa de mi vida, por el ejemplo de fortaleza, trabajo y cuidar de
mi pequeño en mis horas de estudio.

A mis hermanos Diego y Yesenia con quienes he compartido todos mis logros y quienes
me han ayudado en los momentos que más lo he necesitado.

A mi tía Mónica de la cual siempre he recibido apoyo y amor y me ha enseñado que la
familia siempre es lo primero.

A mi amiga María Fernanda con quien he compartido no solo las aulas de la maestría
sino las aulas de pregrado, gracias por ser una amiga incondicional por todo el apoyo y
años de amistad sincera.

A mis amigos, Vannesa, Adriana, Henry, Fernanda, Javier, ustedes han sido quienes con
sus ocurrencias han alegrado los pequeños momentos que hemos podido compartir.

Para ser sometido a: *Revista Mexicana de Biodiversidad*

Caracterización de la Microalga *Fischerella Muscicola*, para evaluar la biomasa y su potencial uso en la Industria Alimenticia

Characterization of the *Fischerella Muscicola* Microalga, to evaluate the biomass and its potential use in the Food Industry

Johana Priscila Yunga¹ & Rodolfo Jefferson Rubio²

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito, Ecuador. Email: johys37@hotmail.com

²Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito, Ecuador. Email: rodolfo.rubio@uisek.edu.ec

- Autor de correspondencia: Ing. MBA. Rodolfo Jefferson Rubio Aguiar, rodolfo.rubio@uisek.edu.ec

Titulo corto (Running title): Caracterización de la Microalga *Fischerella Muscicola*, para evaluar la biomasa y su potencial uso en la Industria Alimenticia

Resumen.

En los últimos años a nivel biotecnológico se han estudiado las propiedades de las microalgas con el propósito de introducirlas como materia prima en la elaboración de productos alimenticios. Para el presente estudio se trabajó con la microalga *Fischerella musciola*, la cual se caracteriza por ser termófila soportando temperaturas de hasta 45°C lo que permitiría que no pierda sus propiedades en caso de ser atacada por un organismo externo (bacterias).

Se inoculó una solución de la microalga pura *Fischerella musciola* proporcionada por la Escuela Politécnica del Ejercito (ESPE) a través del Centro de Investigación de Nanociencia y Nanotecnología en un medio de cultivo definido para establecer la cinética de crecimiento, este crecimiento fue evaluado durante un tiempo determinado registrando valores a condiciones controladas de laboratorio mediante la utilización de fotobiorreactores para producción de biomasa.

Una vez que se llegó a la fase estacionaria se realizó su cosecha mediante decantación, el tiempo de separación de la fase líquida y acuosa se determinó con la curva de sedimentación, posteriormente se procedió con el secado de la muestra a una temperatura y tiempo definido, luego se trituro la muestra obteniendo como resultado el porcentaje de proteína.

Mediante la caracterización de la microalga *Fischerella Muscicola* conjuntamente con la evaluación de la biomasa, se concluyó que el porcentaje obtenido de proteínas cumple con la cantidad de nutrientes presentes en la industria alimenticia, según datos de la FAO.

Palabras clave: Microalga / *Fischerella Musciola* / Proteínas / Velocidad de Crecimiento /Nutrientes

Abstract.

In recent years at the biotechnological level, the properties of microalgae have been studied with the purpose of introducing them as raw material in the production of food products. For the present study we worked with the microalga *Fischerella musciola*, which is characterized by being thermophilic, supporting temperatures of up to 45 ° C, which would allow it not to lose its properties in case of being attacked by an external organism (bacteria).

A solution of the pure microalga *Fischerella musciola* provided by the Polytechnic School of the Army (ESPE) was inoculated through the Research Center of Nanoscience and Nanotechnology in a defined culture medium to establish the kinetics of growth, this growth was evaluated for a time determined by registering values at controlled laboratory conditions through the use of photobioreactors for biomass production.

Once the stationary phase was reached, it was harvested by decanting, the separation time of the liquid and aqueous phase was determined with the sedimentation curve, followed by the drying of the sample at a defined temperature and time, then the sample was triturated obtaining the percentage of protein as a result.

Through the characterization of the microalga *Fischerella Muscicola* together with the evaluation of biomass, it was concluded that the percentage obtained of proteins complies with the amount of nutrients present in the food industry, according to FAO data.

Keywords: Microalga / *Fischerella Musciola* / Proteins / Growth Speed / Nutrients

INTRODUCCION

Las microalgas son seres unicelulares muy variados en tamaño y forma, que existen en casi todos los hábitats conocidos, principalmente acuáticos, marinos como dulceacuícolas o a veces bajo tierra. (*Medina, 2012*) Las microalgas se caracterizan por:

- a) ser seres principalmente fotoautotróficos, estimándose que el 90 % de la fotosíntesis total de la tierra es realizada por estos vegetales acuáticos;
- b) ser seres con gran capacidad de producción de biomasa; a pesar de que la biotecnología de microalgas es similar a la agricultura convencional, las microalgas tienen muchas ventajas sobre las plantas terrestres. Ellas crecen con mayor rapidez por su facilidad de división, tienen mayor productividad que los cultivos tradicionales y pueden obtenerse en condiciones climáticas y regiones donde los cultivos no pueden hacerlo, tales como los desiertos o zonas costeras. Una de las principales ventajas de las microalgas es que sostienen el exceso del CO₂ atmosférico y producen O₂, que ayudan a reducir el efecto invernadero;
- c) ser seres de composición compleja que encuentran un campo de actuación bastante amplio en la nutrición humana y animal. También contienen sustancias de alto valor biológico, tales como ácidos grasos poliinsaturados, proteínas, antioxidantes, vitaminas y minerales.

Los microorganismos extremófilos, tienen la capacidad de prosperar en ambientes extremos, tales como las fuentes hidrotermales, dado que viven en ambientes con condiciones de temperatura, acidez, presión y hábitats con altas concentraciones de compuestos, ya que tienen la destreza para absorber iones metálicos o tolerar escenarios hipersalinos (*Duran, y otros, 2009*). La gama de estas condiciones no hace posible la vida para la gran mayoría de organismos en la tierra (*Rodríguez C., 2005*).

Las condiciones de temperaturas para el crecimiento de microorganismos termófilos oscilan entre 45°C y 80°C, mientras que para hipertermófílicos están por encima de 80°C (*Rodríguez C., 2005*).

Los extremófilos son de gran interés, ya que sobreviven a hábitats extremos, al igual que los procesos metabólicos que utilizan para obtener energía y estabilidad macromolecular. La tasa de crecimiento de los termófilos es rápida, pero de corta

duración dependiendo de los minerales que se encuentren, por ejemplo, los microorganismos que se desarrollan en fumarolas, chimeneas hidrotermales y bacterias metanogénicas (*Oliart, Manresa, & Sánchez, 2016*).

La membrana celular de los termófilos es rica en lípidos saturados. En cuanto a las proteínas, poseen mayor estabilidad por la gran cantidad de enlaces covalentes e interacciones hidrofóbicas. Además, tienen enzimas termorresistentes, lo que les ayuda a trabajar en condiciones extremas (*Oliart, Manresa, & Sánchez, 2016*).

Clasificación de los Microorganismos extremófilos según:

Temperatura. - Según (*Rodríguez, Corral, & Linares, 2006*) Rodríguez et al., 2006, los microorganismos termófilos presentan un margen de temperaturas en el cual pueden crecer, por ende, se los puede clasificar en termófilos entre los 45-80°C y los hipertermófilos, de 80-113°C.

pH. - Los microrganismos extremófilos crecen en un rango determinado de pH, que dependerán del hábitat y concentraciones de sales. Hay que destacar que el pH en el interior de la célula es aproximadamente neutro (*Cárdenas, y otros, 2006*).

Los acidófilos crecen en un pH óptimo de 2 a 3, oxidan el azufre del ácido sulfúrico como fuente de energía, por lo que se requiere que el microorganismo pueda adaptarse a pH bajos (*Cárdenas, y otros, 2006*).

Los alcalófilos se desarrollan en rangos de pH comprendidos entre 8,5 – 11, generalmente los ambientes donde crecen son lugares muy básicos, como lagos sódicos o suelos muy carbonatados. Los alcalófilos obligados y facultativos necesitan un pH elevado para sobrevivir, aunque los facultativos también crecen en ambientes neutros. *Bacillus Spirulina* y arqueas-haloalcalófilos necesitan altas cantidades de sal para subsistir (*Cárdenas, y otros, 2006*).

En los últimos años se ha logrado avances importantes en la utilización de las microalgas para diversos fines como salud humana, cosmetología, purificación de aguas residuales, prevención de contaminación acuática, industria farmacéutica, acuicultura, producción de pigmentos y antibióticos, entre otros. Se han reportado aproximadamente 493 especies que podrían ser utilizadas como alternativas de alimentación para el hombre y otros animales (*Norton, 1996*). En países como Alemania, Perú, India, Japón y México, han registrado que algunas especies de microalgas son un excelente

complemento alimenticio para el hombre, se sabe que las microalgas contienen niveles de proteína similares a los de las fuentes de proteínas tradicionales, como la carne, el huevo, la soja y la leche (*Gouveia, 2008*).

Actualmente la búsqueda de nuevas fuentes de energía renovable y suplementos alimenticios se ha vuelto una prioridad en las políticas de Costa Rica, Honduras, El salvador, Guatemala, España, entre otros. El Doctor Cristian Agurto Muñoz Investigador del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción ha denominado a las microalgas el “oro verde” del futuro ya que se está extendiendo con mucha fuerza en el campo investigativo y se ha puesto en mira la producción de biodiesel y suplementos proteicos a partir del cultivo de microalgas, ya que su reproducción es rápida, es así como en la composición proteica de *Chlorella vulgaris* (51 – 58 %) y *Spirulina máxima* (60 – 71%) existiendo un alto porcentaje de proteínas que pueden ser transformados en suplementos alimenticios. (*Fleurence, 1999*)

Todo esto está conlleva al desarrollo de tecnologías orientadas al cuidado del medio ambiente, a la reutilización de los residuos y a la generación de energías limpias de bajo costo que se han tornado indispensables. Entre estas tecnologías, los cultivos de microalgas adquieren un gran protagonismo, al ser considerados eco-amigables (*ecofriendly process*), ya que reciclan eficientemente contaminantes desde medios líquidos y gaseosos (*Olgin, 2003*), incorporándolos a su metabolismo para generación de biomasa (*Markou & Georgakakis 2011*).

Los cultivos de microalgas son considerados una tecnología de mediana complejidad, con desarrollo en escala de plantas pilotos (*Flotats et al. 2011*). Al tratarse de organismos termófilos presentan una gran ventaja ya que el ataque de microrganismos externos (hongos, bacterias) pueden ser eliminados con elevadas temperaturas, sin que las microalgas pierdan sus propiedades, así también pueden ser cultivadas a partir de materia prima de subprocesos industriales que generen CO₂.

El objetivo principal es la obtención de biomasa a partir de *Fischerella muscicola* en condiciones controladas de laboratorio para aplicación como sustituto proteico en la industria alimentaria, para el efecto se realizó el escalado del cultivo determinado y se estudió su velocidad de crecimiento y cantidad de nutrientes. Este crecimiento se evaluó en condiciones controladas, en fotobiorreactores a escala de laboratorio.

Se cuantificó la cantidad de proteínas de la biomasa obtenida de la microalga *Fischerella musciola* mediante pruebas de laboratorio y su comparación con la cantidad de proteína de otras microalgas utilizadas en la industria alimenticia.

Se analizó la cinética de crecimiento de la microalga *Fischerella musciola* para la determinación de la tasa de producción determinando las mejores condiciones de crecimiento. Por lo que se ha planteado la siguiente hipótesis:

“La biomasa proveniente de Fischerella muscicola presenta una buena tasa de crecimiento celular, y alto porcentaje de proteínas”

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. ÁREA DE ESTUDIO

La cepa de microalga *Fischerella musciola*, fue proporcionada por la Escuela Politécnica del Ejercito (ESPE) a través del Centro de Investigación de Nanociencia y Nanotecnología, misma que proviene de las aguas termales de Chachimbiro. El crecimiento para la obtención de la biomasa y su posterior caracterización se la realizó en el laboratorio de investigación de la Universidad Internacional SEK.

1.2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: los componentes utilizados para la preparación del medio de cultivo BG – 11 se detallan en la tabla 1.

Tabla 1: Componentes para la preparación de Medio BG – 11, donde Se prepara stock (1) mezclando los reactivos de 1 – 8 y se afora a 1000 mL, así también se prepara el stock (2) mezclando los reactivos de metales traza (9) y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. Ajuste el pH a 7 - 7.4 con NaOH y se autoclava, según (Allen 1968, Allen and Stainer 1968, Rippka et al. 1979)

#	Componente	solución(g / L)
1	NaNO ₃	1.5 g
2	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	40.00
3	MgSO ₄ . 7H ₂ O	75.0
4	CaCl ₂ . 2H ₂ O	36.0
5	Citric Acid	6.0
6	Ammonium Ferric Citrate	6.0
7	MgNa ₂ EDTA. H ₂ O	1.0
8	Na ₂ CO ₃	20
9	Metales Traza	
9.1	H ₃ BO ₃	2.86 g
9.2	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1.81 g
9.3	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.22 g
9.4	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.39 g
9.5	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.08 g

9.6	Co (NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0.05 g
-----	--	--------

1.3.ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES Y MEDIO DE CULTIVO

1.3.1. Esterilización del sitio de trabajo

Con solución de Alcohol Etílico al 70%, se esterilizó el material de cristal pipeta, cajas de Petri, tubos de ensayo, entre otros, así también el lugar donde se realizaron las preparaciones de los medios de cultivo y/o manipulación de la cepa.

1.3.2. Esterilización Física

La autoclave marca (Wise Clave) se utilizó para la esterilización de los medios de cultivo, material de cristal a 122 °C y 1 atm de presión.

1.4.CONDICIONES DE CULTIVO

1.4.1. Determinación de la temperatura óptima de crecimiento celular

Se evaluaron los factores de diseño, que permitan establecer el modelo factorial más idóneos para determinar el mayor crecimiento celular a diferentes temperaturas, para posteriormente llevarlos a escala de fotobiorreactores y obtener la biomasa para la cuantificación de proteínas.

1.4.2. Elección de variables de diseño

Debido a que la microalga *Fischerella Muscicola*, es un microorganismo termófilo por tener la capacidad de prosperar en temperaturas de 45°C, se ha procedido a definir tres temperaturas para la evaluación de la cinética de crecimiento y concentración inicial de microalga, manteniendo constante la cantidad de aire suministrado.

1.4.3. Diseño Factorial

El modelo que mejor se ajustó para establecer el diseño fue uno factorial. El mismo posibilitó estudiar conjuntamente la incidencia de varios factores o

variables con respecto al crecimiento celular a la vez que permitió evaluar si existía algún tipo de interacción entre los mismos. Este arreglo de igual manera fue de utilidad para determinar las mejores condiciones de reacción en términos de la combinación de los niveles que maximizaron la variable de respuesta. (Marin, n.d.)

$$2^k$$

Donde:

k = Número de Factores o variables de estudio. $2 \leq k \leq 5$

2 = Niveles de cada factor

Al considerar dos variables de estudio entre cuantitativas y cualitativas, el modelo quedó definido como 2^2 por tanto se necesitó realizar cuatro tratamientos combinando aleatoriamente los niveles de cada factor. Se realizó ensayos por triplicado para reducir el error que se pueda provocar en cada una de las corridas.

1.4.4. Cultivo inicial

Debido a que la microalga es termófila, para el diseño experimental se realizaron pruebas para determinar la temperatura óptima para el crecimiento a la cual presenta mayor cantidad de biomasa estableciendo su cinética de crecimiento, se trabajó con temperaturas de 25°C, 35°C y 45°C con un número promedio inicial de 102222 cel./mL de *Fischerella musciola*, contenidos en 1000 mL de medio de cultivo BG – 11; para verificar la respesabilidad se realizó el ensayo por triplicado.

1.5. ESCALADO

1.5.1. Fotobiorreactores

Se utilizaron seis reactores cilíndricos de vidrio, transparentes y lisos de 4000 mL en los cuales se colocó 3000 mL de medio de cultivo BG – 11 y se realizaron inoculaciones de 3 mL de solución de *Fischerella musciola*.

Para el crecimiento se determinó el pH inicial de cada biorreactor, se suministró aireación con bombas de pecera a la temperatura ambiente (25 – 30 °C), el registro

de conteo celular y la determinación de absorbancia se realizó en días alternos durante 37 días.

Para definir la cinética de crecimiento de cada uno de los fotobiorreactores se utilizó el modelo de crecimiento exponencial $N = No \times (2)^n$. (Gándara & Janet, 2004)

Donde:

N: número final de células

No: Número inicial de células

n: número de generaciones que han ocurrido

$$N = No \times (2)^n \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$n = 3,3 \times (\log N - \log No) \quad (\text{Ecuación 2})$$

1.5.2. Iluminación

Considerando que la energía lumínica no se puede acumular, es un factor que debe ser incorporada de forma continua (AST ingeniería S. L., 2013).

Para el crecimiento celular se utilizaron lámparas LED mismas que permanecieron encendidas durante todo el periodo de crecimiento.

1.5.3. Aireación

La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de las algas, para asegurar que todas las células de la población estén igualmente expuestas a la luz y los nutrientes, y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire.

1.6. CONTEO CELULAR

1.6.1. Protocolo (Marin, n.d.)

La concentración celular que presenta la microalga *Fischerella musciola* es alta y al ser difícil su conteo se realizó:

1. Con la ayuda de una varilla agitadora se mezcla el cultivo con el fin de permitir que las células tengan una distribución homogénea.
2. Con una pipeta previamente autoclavada se toma una muestra de 1 mL y se coloca en un tubo previamente lavado y seco. Se agrega una gota de lugol para

fijar las células. (Solución A: pesar 10 g de KI y disolver en 100 mL de agua destilada. Solución B: pesar 5 g de I₂ cristalino y disolver en 10 mL de CH₃ COOH. Mezclar ambas soluciones (A+B), agitar bien y mantener en frasco ámbar).

3. La dilución utilizada es 1:10 (1 mL de muestra y 10 mL de agua destilada), pero es necesario verificar que la concentración resultante sea suficiente para obtener una precisión adecuada, la cual depende del número de células presentes.
4. Cuando el cultivo está muy concentrado (>10⁶ cel./mL) se realiza una dilución con agua destilada de 1:100 (1 mL de muestra y 100 mL de agua destilada)

1.6.2. Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer

Se toman 10 uL de la muestra con la micropipeta y se siguen los siguientes pasos:

1. Se coloca un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, y se coloca en posición horizontal sobre la mesa, en un lugar donde nos sea cómodo pipetear.
2. se introduce una punta desechable en el extremo de la micropipeta,
3. se ajusta la micropipeta para succionar 10 uL de líquido.
4. se introduce la punta de la micropipeta en la muestra
5. Se pulsa el pistón o embolo superior de la pipeta suavemente hasta que se siente como el pistón llega al final de su recorrido.
6. Se saca la punta de la pipeta de la muestra, y siempre manteniéndola en posición vertical se lleva hasta la cámara de Neubauer.
7. Se coloca la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer. Se trata de dejar que el líquido penetre entre la cámara y el cubreobjetos desde el lateral, por capilaridad.
8. Se suelta el pistón suavemente mientras se supervisa que el líquido está entrando correctamente y de forma uniforme en la cámara.
9. En caso de que aparezcan burbujas, el cubreobjetos se haya movido o algo no haya salido bien, repetir la operación

1.6.3. Preparación y enfoque del microscopio

1. Colocar la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio y fijar la cámara la pinza de sujeción.
2. Encender la luz del microscopio y la cámara.
3. Enfocar el microscopio hasta que pueden verse nítidas las células mirando por el binocular.
4. Buscar el primer cuadro donde vaya a realizarse el recuento.

1.6.4. Consideraciones que tomar durante el conteo celular

1. Si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo del cuadro, deben contabilizarse, pero no se contabilizan si tocan el límite inferior o el límite derecho.
2. En caso de que la concentración celular sea muy alta, y sea fácil perderse en el recuento, se suele utilizar un orden de conteo en forma de zig-zag

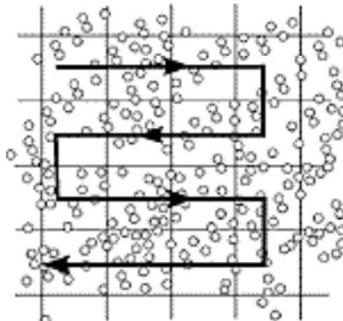


Figura 1: Recuento con alta concentración celular

1.6.5. Cálculo de la concentración

Aplicamos la fórmula del cálculo de concentración celular.

$$\text{Concentración (cel/ml)} = \frac{\text{número de células}}{\text{volúmen (ml)}}$$

El número de células es la suma de todas las células contadas en todos los cuadros. El volumen es el volumen total de todos los cuadros donde hemos hecho el recuento. El volumen de 1 cuadro grande es: 0.0001 mL

La fórmula para recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10000}{\text{número de cuadros}} \quad \text{Ecuación 3}$$

En el caso de que hayamos aplicado una dilución, deberemos trasformar la concentración obtenida durante el recuento celular en la concentración de la muestra original.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Ejemplo:

Para una dilución de 1: 10. Dilución = 0,1

Para una dilución de 1: 100, Dilución = 0,01

1.7. OBTENCIÓN DE BIOMASA

Una vez que se ha llegado a la fase estacionaria de crecimiento, se procedió a la caracterización del cultivo mediante la determinación de la densidad microcelular, para posteriormente realizar el cosechado de la biomasa por el método de sedimentación.

Para la prueba de sedimentación se tomó un volumen de 1000 mL de muestra homogenizada y con la ayuda de una probeta graduada se registraron los valores de tiempo (min) y altura en (mL), con estos valores se construye la curva de sedimentación.

Para la cosecha de la biomasa se utilizaron embudos de separación y se extrapoló el volumen de cada fotobiorreactor para determinar el tiempo de sedimentación

que requeriría cada uno, a las siete horas el conteo celular reveló que ya no había presencia de microalgas.

La biomasa sedimentada en el fondo del embudo de separación se trasladó a bandejas de aluminio, las cuales se introdujeron en la estufa a 70°C durante 10 horas para evaporar toda el agua contenida en ella, después de eso con la ayuda de un mortero previamente esterilizado se pulverizó la biomasa seca y se pesó en una balanza analítica, para ser almacenada en Falcoms para poder realizar la prueba de proteínas respectiva.

1.8. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

Para la determinación de proteína se envió al laboratorio Multianalítica Cía. Ltda., quien aplicó el método Kjeldahl. Para la aplicación de este método se realizó:

1.8.1. Digestión

- 1.** Pesar 10 g de muestra.
- 2.** Pesar la muestra sobre el papel libre de nitrógeno y colocarla dentro del tubo Kjeldahl.
- 3.** Transferir los tubos de digestión con las muestras al digestor de proteína.
- 4.** Encender la Sorbona.
- 5.** Agregar a cada tubo una tableta de Kjeldahl y 15 mL de ácido sulfúrico grado técnico.
- 6.** Acoplar las campanas de extracción de gases y conectar la manguera a la trampa de agua.
- 7.** Abrir la llave de la trampa de agua y prender el Digestor de proteína.
- 8.** Una vez que el digestor de proteína ha llegado a 400°C +/- 10°C dejar por aproximadamente 30 minutos para completar la digestión, la finalización del proceso se evidencia cuando las muestras se encuentran de color verde transparente.
- 9.** Una vez transcurrido el tiempo necesario, apagar el digestor y dejar enfriar.
- 10.** Sacar los tubos del digestor utilizando los guantes de calor, dejándolos en la Sorbona y verificar que no haya desprendimiento de vapores.
- 11.** Cerrar la llave de la trampa de agua.

12. Una vez fríos los tubos, añadir 70 mL de agua desmineralizada cuidadosamente al tubo. Si se da una reacción violeta es porque los tubos están muy calientes, por lo que se los debe dejar enfriar más tiempo.
13. En caso de que las sales solidifiquen después de la digestión, calentar ligeramente los tubos en el digestor, dejar enfriar y añadir el agua. Si la muestra no se diluye agitar con vigor hasta que las sales hayan disuelto.

1.8.2. Destilación

1. Colocar 70 mL de agua desmineralizada en el tubo kjeldhal.
2. Introducir el tubo en la cabina de destilación, asegurarse de que se encuentre ajustado y bajar la ventanilla de seguridad.
3. Sacar el tubo cuidadosamente, usando guantes de calor y desechar el agua.

1.8.3. Blanco

1. Colocar 70 mL de agua desmineralizada en un tubo kjeldhal.
2. Introducir el tubo en la cabina, asegurar que se encuentre ajustada y bajar la ventanilla de seguridad.
3. El equipo dispensará automáticamente el Ácido Bórico y el Hidróxido de sodio. Para destilar y titular automáticamente desplegado el valor de volumen de HCl 0.1 N en mL.

1.8.4. Patrón – Sulfato de amonio

1. Secar solamente la cantidad requerida del patrón Sulfato de amonio en la estufa a 130°C por una hora.
2. Pesar 0.05g a 0.06g de sulfato de amonio seco y anotar el valor.
3. Trasvasar el tubo kjeldhal y adicionar 70mL de agua desmineralizada.
4. Introducir el tubo con el patrón en el destilador directamente (sin digestión).
Seguir el proceso descrito anteriormente en el BLANCO.
5. Una vez concluida la destilación registrar el valor del volumen.

1.8.5. Lectura de muestras:

1. Introducir el tubo con muestra en la cabina del destilador, asegurarse de que se encuentre ajustado y bajar la ventanilla de seguridad.

2. El equipo dispensará automáticamente el ácido bórico y el hidróxido de sodio. Para destilar y titular automáticamente desplegando el valor de volumen de HCl 0.1N en mL.
3. Una vez concluida la destilación, se registra el valor de volumen consumido y se procede a realizar los cálculos.

1.8.6. Fórmula de cálculo

$$\% \text{ Proteína} = \frac{VHCl(\text{ml}) \times NHCL \times 0.014 \times \text{factor} \times 100}{g \text{ muestra}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Factor de conversión según norma INEN 1334-2 2011/ programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comisión del CODEX Alimentarius:

- Otros Alimentos: 6.25

RESULTADOS

DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADISTICO

*a. Temperatura de trabajo y cinética de crecimiento celular de *Fischerella Muscicola**

Tabla 2: Conteo celular a 25°C, donde C1, C2 y C3 representa el conteo celular de cada ensayo, \bar{C} conteo celular promedio y σ la desviación estándar de las mediciones

Tiempo (días)	C1	C2	C3	$\bar{C} \pm \sigma$
1	104167	100000	102500	102222 ± 2097
3	310000	323000	301000	311333 ± 11060
5	450000	400000	387000	412333 ± 33262
7	481818	468182	451818	467273 ± 15021
9	655556	630000	548182	611246 ± 56090
11	2928571	2928571	2990476	2949206 ± 35741
13	3130435	2788462	2925000	2947965 ± 172139
15	2716667	3380000	2944444	3013704 ± 337047
17	3407407	3333333	3500000	3413580 ± 83505
19	3880769	4000000	4120000	4000256 ± 119616
21	4229167	4291667	4170833	4230556 ± 60429
23	3777778	4100000	4750000	4209259 ± 495234
25	4040000	4434783	4704545	4393109 ± 334227
27	4216667	4229167	4426087	4290640 ± 117467
29	3884615	4426087	4613636	4308113 ± 378558
31	4270833	4347826	4460870	4359843 ± 95586
33	4426087	4216667	4413043	4351932 ± 117325
35	4590909	4229167	4100000	4306692 ± 254471
37	3892308	4627273	4408696	4309425 ± 377405

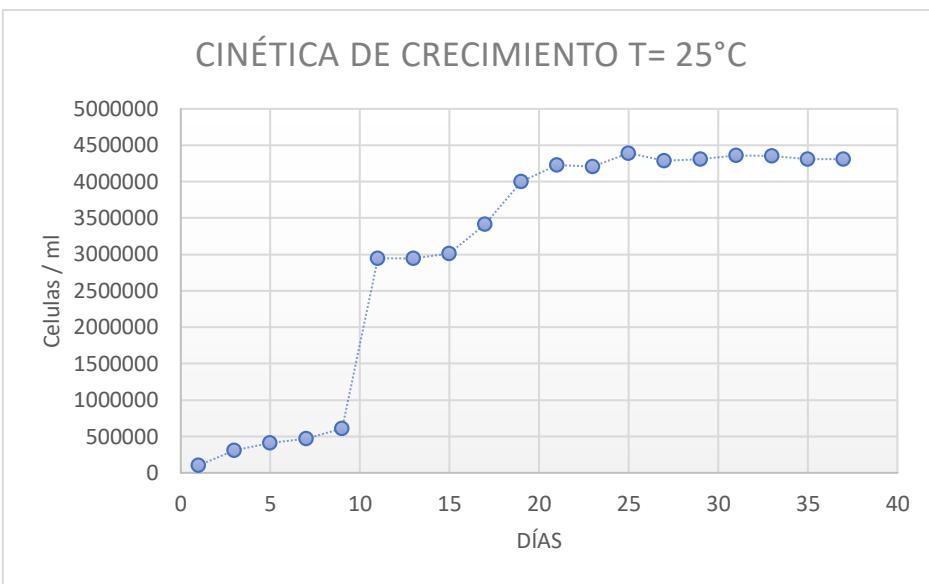


Figura 2: Cinética de crecimiento a 25°C

<i>N</i>	4309425
<i>No</i>	102222
<i>n</i>	5,36

Tabla 3: Conteo Celular A 35°C, donde C1, C2 y C3 representa el conteo celular de cada ensayo, \bar{C} conteo celular promedio y σ la desviación estándar de las mediciones

<i>Tiempo</i> (días)	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	$\bar{C} \pm \sigma$
1	171429	130000	153333	151587 ± 20769
3	557143	450000	477778	494974 ± 55603
5	771429	525000	633333	643254 ± 123513
7	2739130	2576923	3245000	2853685 ± 348459
9	2782609	2615385	3550000	2982664 ± 498391
11	3217391	2769231	3575000	3187207 ± 403732
13	3304348	2884615	3575000	3254654 ± 347865
15	3560000	3630435	3722727	3637721 ± 81608
17	3380000	3782609	3886364	3682991 ± 267477
19	3600000	4130435	4136364	3955599 ± 307972
21	3660000	4065217	4204545	3976588 ± 282885
23	4413043	4880952	4750000	4681332 ± 241394
25	4080000	5447368	4312500	4613289 ± 731628
27	4135714	4456522	5478947	4690394 ± 701492
29	5090000	3685714	5175000	4650238 ± 836383

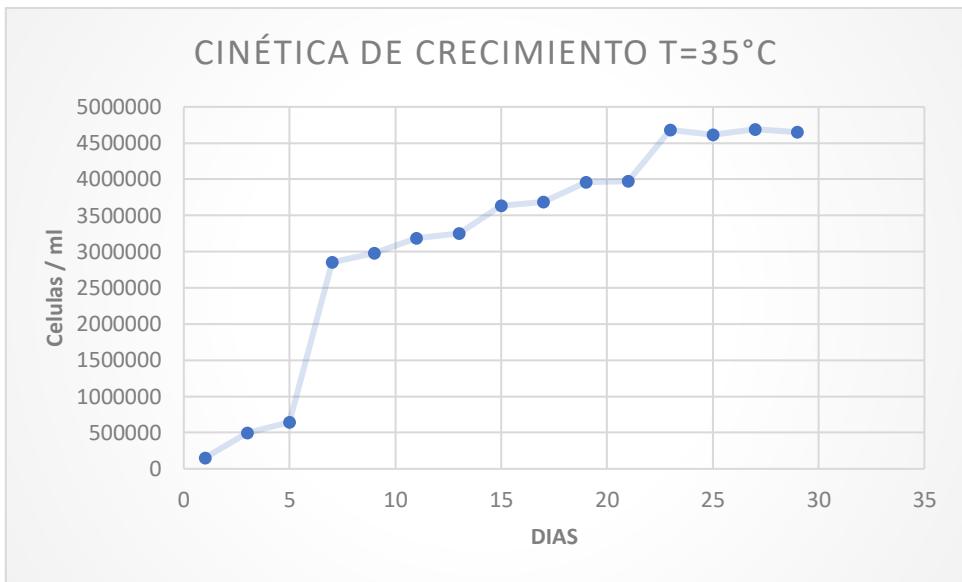


Figura 3: Cinética de crecimiento a 35°C

<i>N</i>	4650238
<i>No</i>	151587
<i>n</i>	4,91

Tabla 4: Conteo Celular A 45°C, donde C1, C2 y C3 representa el conteo celular de cada ensayo, \bar{C} conteo celular promedio y σ la desviación estándar de las mediciones

<i>Tiempo</i> (días)	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	$\bar{C} \pm \sigma$
1	160000	122727	171429	151385 ± 25468
3	610000	542727	572727	575152 ± 33702
5	4045455	4525000	3833333	4134596 ± 354345
7	4545455	4850000	4229167	4541540 ± 310435
9	4360000	4871429	5289474	4840301 ± 465518
11	4100000	3870370	4325000	4098457 ± 227319
13	4200000	3811111	4358333	4123148 ± 281590
15	3621429	4140000	3757143	3839524 ± 268922
17	3814286	4152000	3875000	3947095 ± 180031
19	3650000	4192000	3739286	3860429 ± 290599
21	3660714	4208000	3828571	3899095 ± 280376

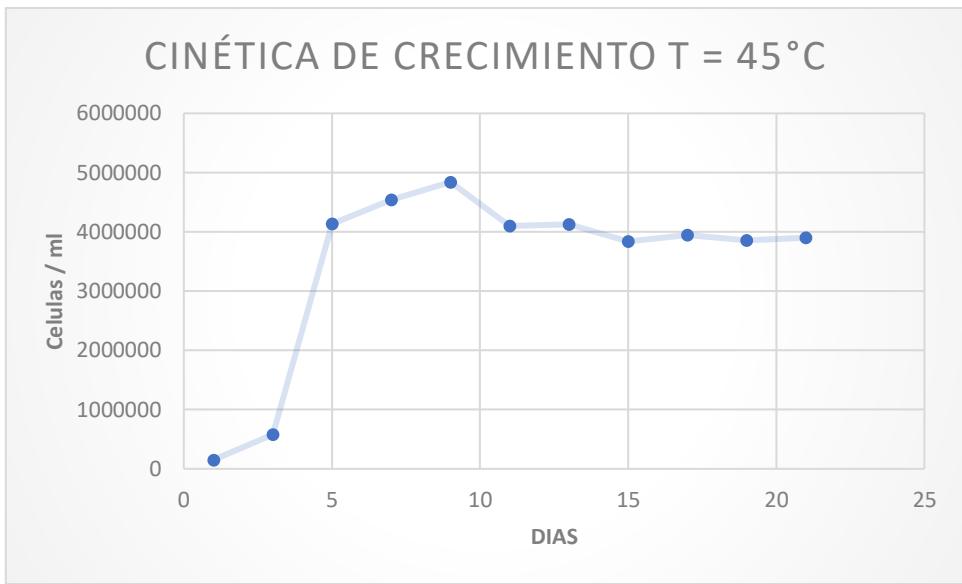


Figura 4: Cinética de crecimiento a 45°C

<i>N</i>	3899095
<i>No</i>	151385
<i>n</i>	4,66

a. Relación de la absorbancia en función del crecimiento celular de *Fischerella Muscicola*

Tabla 5: Absorbancia a 25°C, donde M1, M2, M3 representan los valores medidos de absorbancia de cada ensayo, \bar{M} el promedio de la absorbancia medida y σ la desviación estandar de los resultados

Tiempo (días)	M1	M2	M3	$\bar{M} \pm \sigma$
1	0,392	0,387	0,382	$0,387 \pm 0,005$
3	0,386	0,391	0,385	$0,387 \pm 0,003$
5	0,401	0,402	0,416	$0,406 \pm 0,009$
7	0,403	0,405	0,408	$0,405 \pm 0,003$
9	0,410	0,408	0,411	$0,410 \pm 0,002$
11	0,416	0,412	0,411	$0,413 \pm 0,003$
13	0,406	0,408	0,409	$0,408 \pm 0,002$
15	0,408	0,412	0,409	$0,410 \pm 0,002$
17	0,416	0,412	0,401	$0,410 \pm 0,008$
19	0,410	0,418	0,416	$0,415 \pm 0,004$
21	0,415	0,411	0,415	$0,414 \pm 0,002$
23	0,416	0,415	0,416	$0,416 \pm 0,001$

25	0,418	0,415	0,421	0,418 \pm 0,003
27	0,421	0,424	0,426	0,424 \pm 0,003
29	0,425	0,427	0,428	0,427 \pm 0,002
31	0,421	0,422	0,423	0,423 \pm 0,001
33	0,416	0,418	0,425	0,420 \pm 0,005
35	0,421	0,422	0,425	0,423 \pm 0,002
37	0,419	0,427	0,423	0,423 \pm 0,004

Tabla 6: Absorbancia a 35°C, donde M1, M2, M3 representan los valores medidos de absorbancia de cada ensayo, \bar{M} el promedio de la absorbancia medida y σ la desviación estandar de los resultados

Tiempo (días)	M1	M2	M3	$\bar{M} \pm \sigma$
1	0,341	0,343	0,395	0,360 \pm 0,031
3	0,389	0,386	0,401	0,392 \pm 0,008
5	0,400	0,395	0,394	0,396 \pm 0,003
7	0,415	0,418	0,410	0,414 \pm 0,004
9	0,415	0,410	0,421	0,415 \pm 0,006
11	0,419	0,417	0,420	0,419 \pm 0,002
13	0,422	0,420	0,421	0,421 \pm 0,001
15	0,427	0,425	0,422	0,425 \pm 0,003
17	0,428	0,425	0,426	0,426 \pm 0,002
19	0,433	0,432	0,428	0,431 \pm 0,003
21	0,431	0,435	0,432	0,433 \pm 0,002
23	0,427	0,437	0,435	0,433 \pm 0,005
25	0,426	0,428	0,431	0,428 \pm 0,003
27	0,423	0,431	0,446	0,433 \pm 0,012
29	0,429	0,425	0,425	0,426 \pm 0,002

Tabla 7: Absorbancia a 45°C, donde M1, M2, M3 representan los valores medidos de absorbancia de cada ensayo, \bar{M} el promedio de la absorbancia medida y σ la desviación estandar de los resultados

Tiempo (días)	M1	M2	M3	$\bar{M} \pm \sigma$
1	0,351	0,375	0,363	0,363 \pm 0,012
3	0,367	0,402	0,401	0,390 \pm 0,020
5	0,408	0,417	0,412	0,412 \pm 0,005
7	0,424	0,401	0,419	0,415 \pm 0,012
9	0,427	0,418	0,426	0,424 \pm 0,005
11	0,424	0,431	0,428	0,428 \pm 0,004
13	0,422	0,429	0,421	0,424 \pm 0,004
15	0,419	0,445	0,436	0,433 \pm 0,013

17	0,421	0,455	0,435	0,437 ± 0,017
19	0,418	0,441	0,426	0,428 ± 0,012
21	0,415	0,421	0,429	0,422 ± 0,007

Tabla 8: Absorbancia vs Conteo celular promedio \bar{C} a 25°C

ABS.	\bar{C}
0,387	102222
0,387	311333
0,406	412333
0,405	467273
0,410	611246
0,413	2949206
0,408	2947965
0,410	3013704
0,410	3413580
0,415	4000256
0,414	4230556
0,416	4209259
0,418	4393109
0,424	4290640
0,427	4308113
0,423	4359843
0,420	4351932
0,423	4306692
0,423	4309425

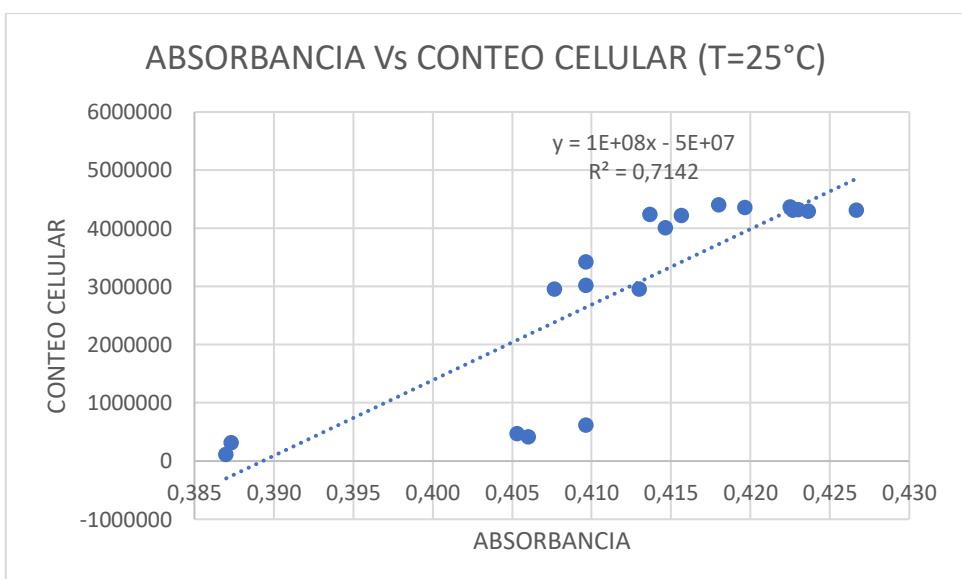


Figura 5: Correlación de la concentración celular Vs densidad óptica a 25°C

Tabla 9: Absorbancia vs Conteo celular promedio \bar{C} a 35°C

ABS.	\bar{C}
0,3597	151587
0,3920	494974
0,3963	643254
0,4143	2853685
0,4153	2982664
0,4187	3187207
0,4210	3254654
0,4247	3637721
0,4263	3682991
0,4310	3955599
0,4327	3976588
0,4330	4681332
0,4283	4613289
0,4333	4690394
0,4263	4650238

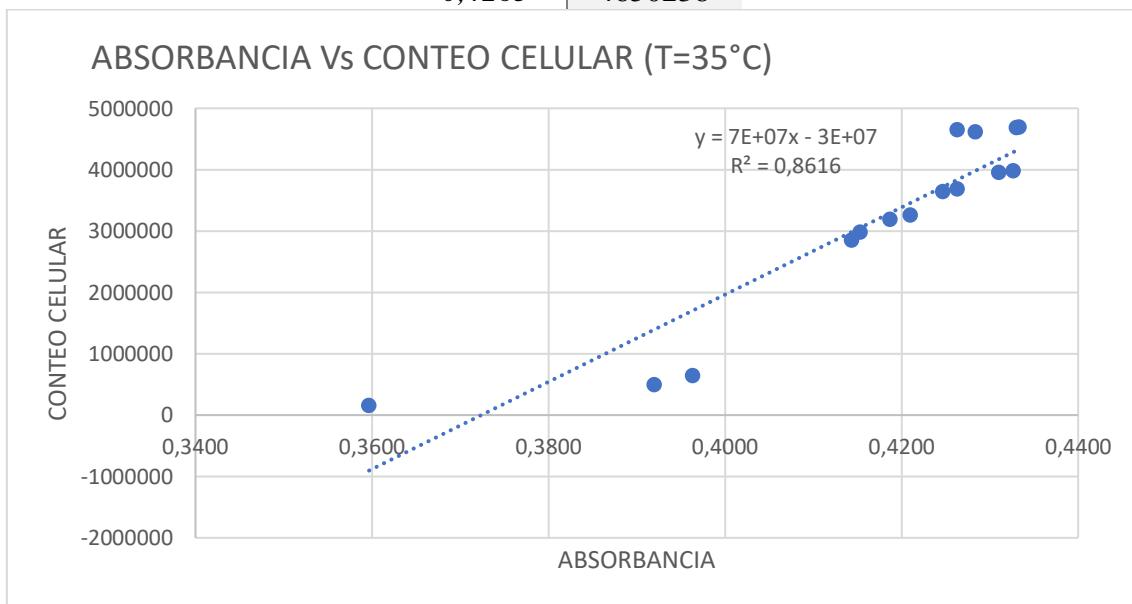


Figura 6: Correlación de la concentración celular Vs densidad óptica a 35°C

Tabla 10: Absorbancia vs Conteo celular promedio \bar{C} a 45°C

ABS.	\bar{C}
0,363	151385
0,390	575152
0,412	4134596

0,415	4541540
0,424	4840301
0,428	4098457
0,424	4123148
0,433	3839524
0,437	3947095
0,428	3860429
0,422	3899095

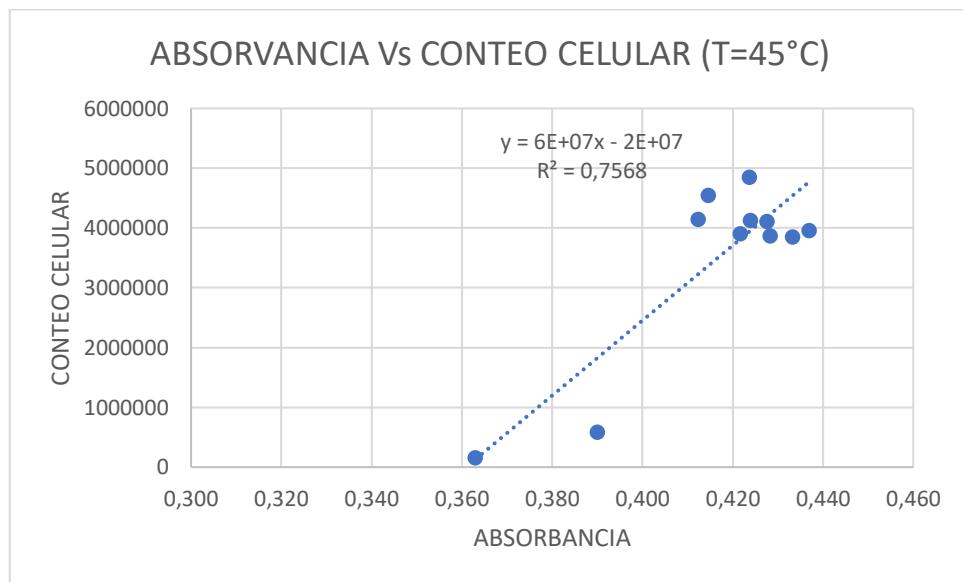


Figura 7: Correlación de la concentración celular Vs densidad óptica a 45°C

ESCALADO

A pesar de haber determinado que la temperatura óptima de crecimiento es de 35°C, al no contar con planchas de calentamiento suficientes para el número de fotobiorreactores utilizados se decidió trabajar a 25°C (temperatura ambiente).

a. *Cálculo de la cinética de crecimiento celular de Fischerella Muscicola a 25°C en fotobiorreactores*

Tabla 11: Conteo celular a 25°C, donde C1, C2, C3, C4, C5 y C6 representa el conteo celular de FOTOBIORRECTOR, \bar{C} conteo celular promedio y σ la desviación estándar de las mediciones

<i>DÍAS</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	$\bar{C} \pm \sigma$
1	200000	224000	219347	228475	268697	220287	226801 ± 22725
3	207500	260000	239700	250000	226667	215785	233275 ± 20244
5	413333	437475	424854	425884	457372	415962	429147 ± 16242
7	420000	455556	457985	445803	492500	467890	456622 ± 23981
9	4833333	5137903	5000000	4733333	5780000	5857143	5223619 ± 481865
11	5693333	5521168	5826082	5873322	5946454	5925132	5797582 ± 162636
13	7666667	7500000	7507533	7703645	7430487	6480000	7381389 ± 453900
15	8307692	8204750	8292683	8364550	8401282	8302934	8312315 ± 67392
17	8462069	8503542	8507345	8405665	8517746	8540000	8489394 ± 48258
19	8712000	8638464	8735343	8634495	8573645	8754840	8674798 ± 70189
21	8857143	8724232	8873635	8622753	8734332	8825343	8772906 ± 96327
23	9864211	8825343	8963534	8826343	8962423	9935344	9229533 ± 523263
25	12000000	11937464	12736430	12000083	12039475	12374643	12181349 ± 313315
27	12800000	12093746	12937454	12486220	12844532	12445652	12601267 ± 318347
29	12133333	12194756	12848464	12349857	12847565	12044653	12403105 ± 358720
31	12384211	12048465	12937454	12765433	12343470	12475653	12492448 ± 317447
33	12326667	12948544	12948765	12345664	12365442	12735454	12611756 ± 301680
35	12390000	12394743	12049875	12345673	12837564	12937465	12492553 ± 333047

Tabla 12: Modelo de crecimiento exponencial a 25°C

	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>
<i>N</i>	12390000	12394743	12049875	12345673	12837564	12937465
<i>No</i>	200000	224000	219347	228475	268697	220287
<i>n</i>	5,91	5,75	5,74	5,72	5,54	5,84

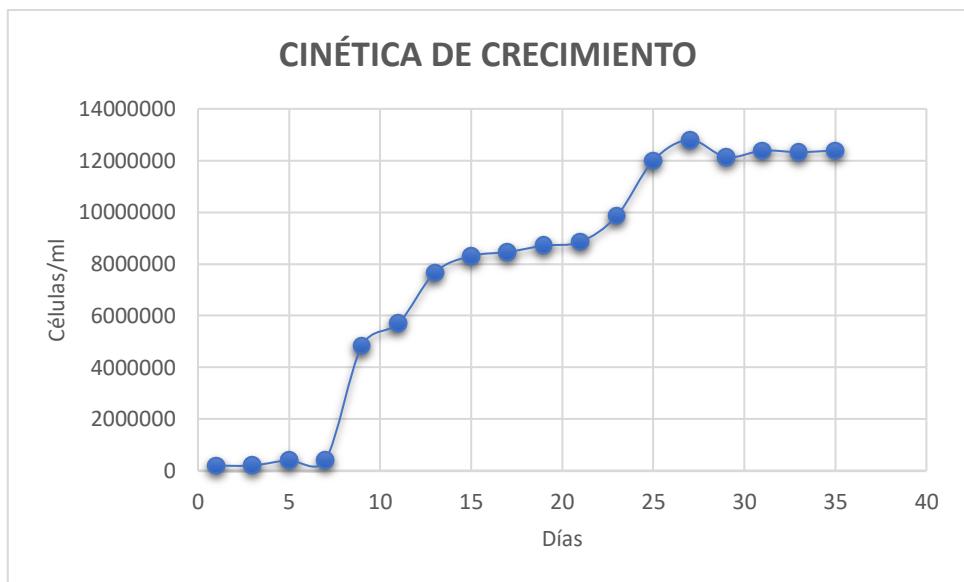


Figura 8: Cinética de Crecimiento (Fotobiorreactor 1) a 25°C

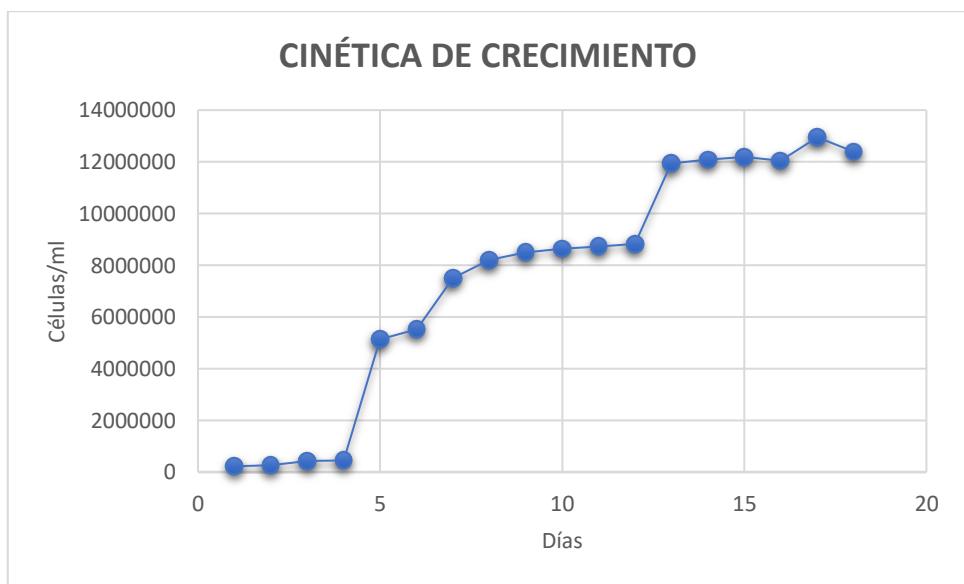


Figura 9: Cinética de Crecimiento (Fotobiorreactor 2) a 25°C



Figura 10: Cinética de Crecimiento (Fotobiorreactor 3) a 25°C

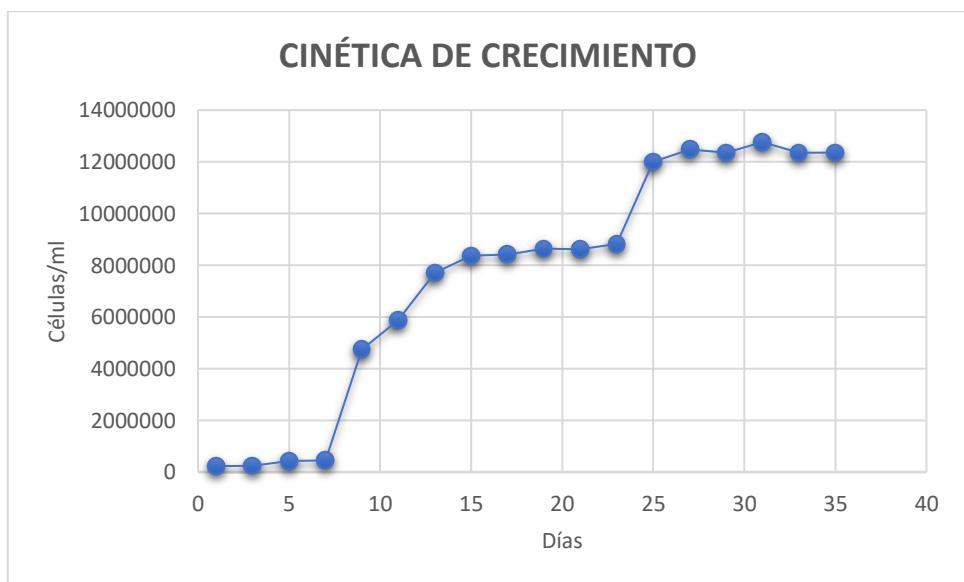


Figura 11: Cinética de Crecimiento (FOTOBIORREACTOR 4) A 25°C

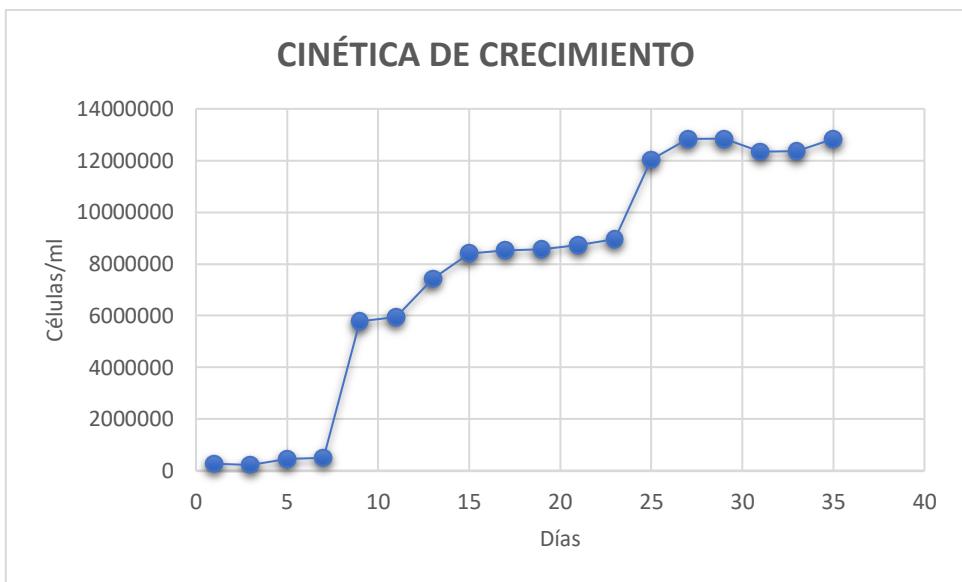


Figura 12: Cinética de Crecimiento (Fotobiorreactor 5) a 25°C

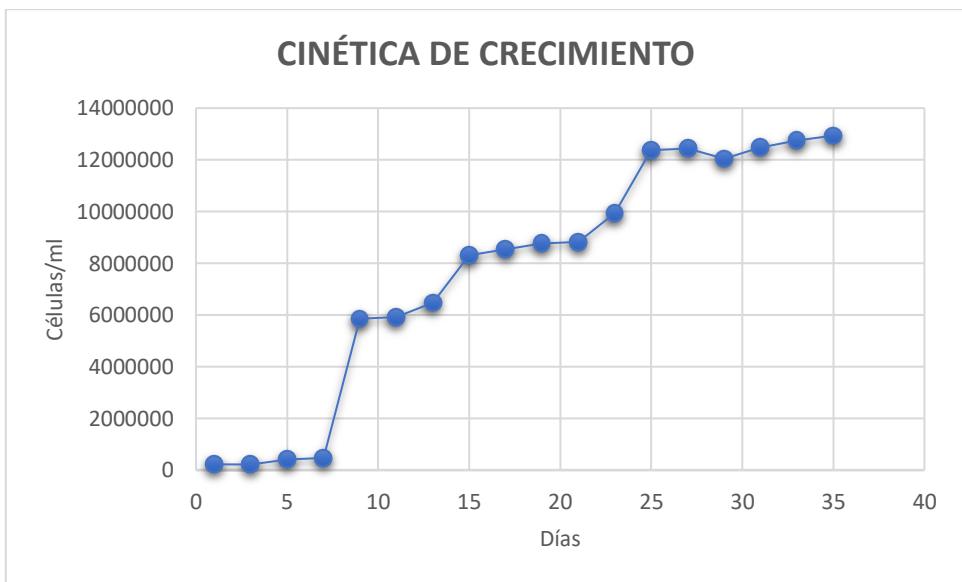


Figura 13: Cinética de Crecimiento (Fotobiorreactor 6) a 25°C

b. Resultado del tiempo de sedimentación de la biomasa proveniente de *Fischerella Muscicola*

Tabla 13: Resultados de sedimentación

<i>t (hr)</i>	<i>h (mL)</i>
0	980
1	854
2	711
3	601
4	511

5	419
6	325
7	231
8	222
9	219
10	217
11	215
12	215
13	214
14	214
15	214

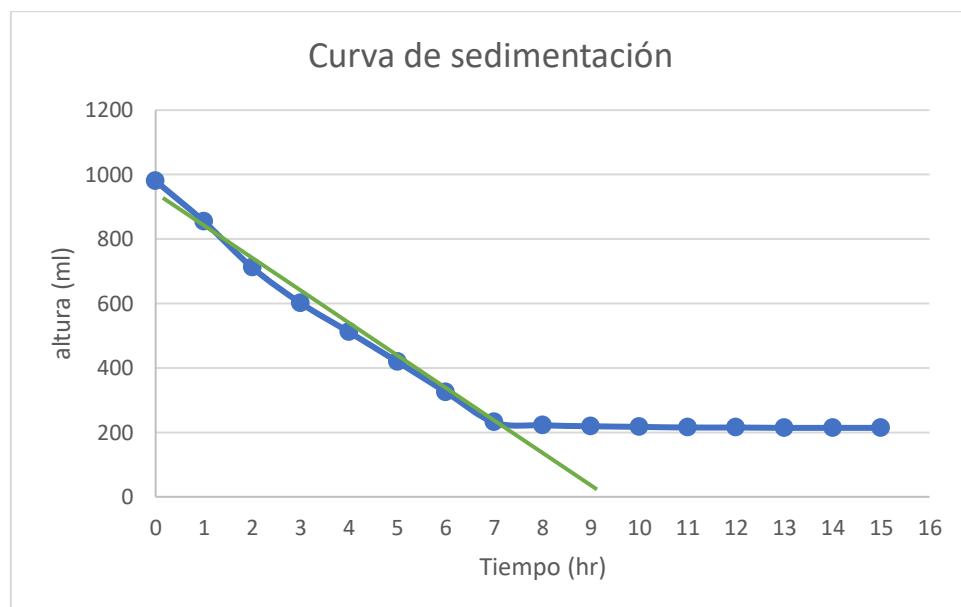


Figura 14: Curva de sedimentación

a. Productividad de biomasa seca

Tabla 14: Productividad de biomasa seca de *Fischerella Muscicola*

Fotobiorreactor	g	L	g/L
1	17,20	2,15	8,00
2	17,80	2,01	8,85
3	17,70	2,04	8,67
4	18,25	2,03	8,99
5	19,92	2,07	9,62
6	19,90	2,08	9,57
TOTAL, BIOMASA	110,77		

b. pH de trabajo

Tabla 15: pH de trabajo

Fotobiorreactor	<i>pHi</i>	<i>pHf</i>
1	7,69	9,56
2	7,46	8,62
3	7,58	9,65
4	7,30	9,13
5	7,84	9,30
6	7,03	9,72

c. Cuantificación de Proteínas

Tabla 16: Porcentaje de proteínas de diferentes microalgas

Microalga	%Proteína
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58
<i>Spirulina maxima</i>	60-71
<i>Dunaliella Salina</i>	57
<i>Fischerella muscicola</i>	33,26

DISCUSIÓN

Cinética de Crecimiento

En el diseño experimental el crecimiento celular de la microalga *Fischerella Muscicola* soporta temperaturas de entre 25 °C a 45°C, sin embargo en las figuras (2), (3) y (4) se observa que la fase exponencial de crecimiento durante tres semanas reporta lo siguiente:

Tabla 17: Generación de millones de células/mL de microalgas y tiempo en el que inicia la fase exponencial de crecimiento

Temperatura °C	Generación de células/mL	Tiempo (días)
25	5.36	11
35	4.91	7
45	4.66	5

Con el análisis realizado se determina que la mejor temperatura de trabajo es 35°C, pero, al no contar con las suficientes planchas de calentamiento que permanezcan a esta temperatura, se decidió trabajar a temperatura ambiente.

En el escalado, la cinética de crecimiento del régimen de operación elegido se partió de una concentración determinada de microalga con un medio de cultivo BG-11, la concentración de la biomasa fue incrementándose hasta agotar nutrientes y/o la luz llegue a ser limitante. En este sentido todos los fotobiorreactores se ajustaron a las fases de un cultivo microbiano: aclimatación, crecimiento exponencial y fase estacionaria, sin embargo en las figuras (2), (3), (4), (8), (9), (10), (11), (12) y (13) presentan un salto significativo en la fase exponencial debido a que los fines de semana no se siguió la cinética en días alternos por lo que no existen datos continuos de medición en ese tramo.

Para poder entender la cinética de crecimiento se debe considerar que las principales variables que pudiesen convertirse en limitantes son, pH, temperatura, medio de cultivo y luz, por lo que para el escalado se trabajaron con las siguientes condiciones:

Tabla 18: Variables de trabajo consideradas en la experimentación

VARIABLES	VALORES
<i>pH</i>	7 – 8
<i>Luz</i>	Artificial (LED)
<i>Temperatura</i>	25 – 30 °C
<i>Medio de cultivo</i>	BG - 11

Así también se debe considerar que la microalga debe receptar varias sales para que su crecimiento cumpla con todas las fases de cultivo microbiano por lo que el medio de cultivo BG – 11 aporta con fuentes de carbono, compuestos orgánicos, N, P, S, Mg, Ca, K y algunos metales.

Para asegurar que dentro de los fotobiorreactores se dé la reacción fotosintética, se debe proporcionar aire, que en este caso fue inyectado por bombas de peceras, con una potencia de 3.5 W, presión de aire 19kPa y salida de aire por hora de 360l/h, sin embargo, no existió una distribución uniforme ya que el aire fue inyectado perpendicularmente, motivo por el cual se podría aducir que la velocidad de crecimiento se detuvo aproximadamente a los 25 días y posiblemente si se hubiese inyectado aire de manera uniforme el tiempo en que la microalga llegue a su fase estacionaria sería menor, así también al obtener el pH entre 9, supone que la cantidad de nutrientes se consumieron o en su defecto se corrobora que el aire no tuvo una distribución uniforme.

Para próximos estudios se debe considerar que la distribución de aire debe asegurar que la mezcla de nutrientes sea uniforme, esto también permitirá que las microalgas no sedimenten o se peguen en las paredes de los fotobiorreactores y que su proceso fotosintético se dé correctamente, pudiendo disminuir el tiempo de crecimiento celular.

Al llegar a la fase estacionaria se realizó la separación de la biomasa por decantación. Previamente se elaboró la curva de sedimentación donde se obtuvo que el tiempo óptimo es de 7 horas, tiempo en el cual se verificó que no existía presencia de microalgas en el sobrenadante por conteo celular.

Se recomienda que para recuperar la biomasa que se queda en la fase líquida, esta sea tratada posteriormente con un floculante orgánico para separar las partículas coloidales que pudiesen permanecer posterior al proceso de sedimentación.

Debido al alto contenido de humedad de la biomasa, se debe colocar la misma proporción en las bandejas utilizadas y el secado debe ser controlado constantemente, ya que la biomasa seca puede llegar a quemarse lo que ocasionaría la perdida de sus propiedades.

Densidad óptica

Los datos de absorbancia versus cantidad de células registradas por mL para las temperaturas de 25°, 35° y 45°C, de las figuras (5), (6) y (7) no guardan una relación lineal, observándose que en la fase estacionaria del crecimiento celular los valores de absorbancia van en aumento y no se mantienen constantes, como teóricamente debería ocurrir, por lo que el método de densidad óptica no es viable para la determinación de la concentración celular de la microalga *Fischerella Muscicola*., ya que los *clusters* formados impiden la formación de cultivos homogéneos.

Según David Dunning de la revista Geniolandia (2018), menciona que “*A densidades ópticas por encima de 0,4, los grados en los que las células pueden ser ensombrecidas por otras células o la luz reflejada muchas veces es apreciable. A densidades ópticas mayores la densidad óptica no corregida de las suspensiones celulares ya no es directamente proporcional al número de células*”, en este caso los valores registrados en el espectrofotómetro se encuentran en el rango de 0,2 a 0,4, registrados en las tablas 6,7,8, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, por lo que se debió realizar diluciones y tomar las muestras en las mismas condiciones para cada fotobiorreactor, explicando de esta manera las curvas obtenidas en las figuras (5),(6),(7),(14),(15),(16),(17),(18) y (19).

Productividad de biomasa seca

La productividad de biomasa seca de cada uno de los fotobiorreactores tiende ser la misma debido a que las condiciones de cultivo se mantuvieron constantes y no existió contaminación externa, por lo que se obtuvo un total de 110,77 gramos en 24 litros medio de cultivo.

La biomasa seca fue enviada al laboratorio Acreditado por el SAE Multianalytica Cía. Ltda., quien a través del método kjeldhal, determinó que la microalga *Fischerella musciola* contiene un aporte del 33.26 %; este porcentaje es menor a los que contienen microalgas como *Scenedesmus obliquus* (50-56 %), *Chlorella vulgaris* (51-58 %), *Spirulina máxima* (60-71 %), por lo que es aconsejable realizar un análisis técnico – económico respecto a la viabilidad de utilizar la biomasa de *Fischerella musciola*, como proteína para la industria alimenticia en especies animales.

Para determinar que la microalga *Fischerella muscicola*, puede ser utilizada como suplemento alimenticio por la cantidad de proteínas presentes, es necesario considerar que para alimentación humana existen estrictas normas de seguridad alimentaria, por lo

que se deben realizar ensayos de aminoácidos, ácidos nucleicos, entre otros especificados en las normas ecuatorianas, sin embargo, estas pueden ser consideradas para alimentación animal.

CONCLUSIONES

1. La productividad de biomasa seca es superior a la obtenida de estudios previos en consorcios de *Vischeria/Scenedesmus sp*, *Chlorella/Monoraphidium Contortum sp*, provenientes de la laguna de Limoncocha.
2. El método de densidad óptica no fue un método viable para *Fischerella Muscicola*, ya que crece formando *clusters* que impiden la formación de cultivos homogéneos.
3. Para el crecimiento celular de la microalga *Fischerella Muscicola*, se debe considerar, intensidad de la luz dentro del reactor y la mezcla del medio de cultivo por inyección de aire y los *clusters* que presenta.
4. El aumento del pH es un indicador de que los nutrientes del medio de cultivo se están agotando y que empieza la fase estacionaria.
5. La microalga *Fischerella Muscicola* no requiere de la utilización de floculantes para su separación ya que las partículas presentan la facilidad de agruparse para aplicación de la técnica de decantación, siendo la principal ventaja para ser introducido en la industria alimenticia ya que no requiere la utilización de productos químicos.
6. El porcentaje de proteínas obtenido de la microalga *Fischerella Muscicola* se potencializa como un nutriente de alta calidad comparable con las proteínas vegetales convencionales, así como las presentes en las microalgas *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina maxima* y *Dunaliella Salina* dándole un potencial valor agregado en la industria alimenticia como fuente proteica.
7. A escala industrial la principal ventaja de microalga *Fischerella Muscicola*, es que con el aumento de temperatura se puede evitar contaminación de microorganismos externos que pudiesen presentarse en la producción de biomasa a gran escala.

BIBLIOGRAFÍA

Acién Fernández FG, F.-S. J. (2012). Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos Valorization of microalgal biomass: Exploitation of proteins, carbohydrates and lipids. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 3(2), 147–161.

Barker, D. J. P. (1997). Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition*, 13(9), 807–813.

Bleakley S, Hayes M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods (1)*

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151, 315–331.

Cárdenas, M., Conde, E., Escamil, M., Luna, M., (2006). The impact of microbial communities for agriculture. Advances in Agricultural and Food Biotechnology. *Research Signpost*, Celeya Guanajuato, México, 135-174

Cobos Ruiz, M., Paredes Rodríguez J.D., & Castro Gómez, J. C. (2015). Introducción de la Producción de Lípidos totales en Microalgas Sometidas a estrés nutritivo. *Acta Biológica Colombiana*, 21(1), 17–26.

Duran, C., Bulut, N., Gundogdu, A., Soylak, M., Belduz, A., Beris, s., (2009). Biosorption of heavy metals by Anoxybacillus gonensis immobilized on Diaion HP-2MG. *Separation Science and Technology*, 44(2), 335-358.

Fernández, E., & Galván, A. (2006). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Departamento de Bioquímica*, 1–7.

Fleurence, J. Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Technol.* 1999, 10, 25–28.

Flotats X, HL Foged, AB Blasi, J Palatsi, A Magri & KM Schelde. 2011. Manure Processing Activities in Europe - Project reference: ENV.B.1/ETU/2010/0007 Manure Processing Technologies. Technical Report 2, European Commission, *Directorate-General Environment*, 184 pp.

Gándara, G., & Janet, M. (2004). Crecimiento exponencial en una población, 1–26. Retrieved from http://lya.fciencias.unam.mx/gfgf/ode/ode_files/result5b.pdf

Gouveia, L.; Batista, A.P.; Sousa, I.; Raymundo, & A.; Bandarra, N. (2008) Microalgae in Novel Food Products. In *Food Chemistry Research Development*; Konstantinos, N., Papadopoulos, P.P., Eds.; *Nova Science Publishers*: New York, NY, USA; pp. 75–112.

Gerken, H. G., Donohoe, B., & Knoshaug, E. P. (2013). Enzymatic cell wall degradation of Chlorella vulgaris and other microalgae for biofuels production. *Planta*, 237(1), 239–253.

Godfray, H.C.J.; Beddington, J.R.; Crute, I.R.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J.F.; Pretty, J.; Robinson, S.; Thomas, S.M.; & Toulmin, C. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* 2010, 327, 812–818.

Marin, J. M. (2011). Modelo de diseños factoriales y diseños 2k. *Universidad Carlos III de Madrid*.

Markou G & D Georgakakis. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88: 3389-3401

Medina Jasso, A., P. Pia Valdez, M. Nieves Soto, J.F. Arzola Gonzalez & M. Guerrero Ibarra. 2012. La importancia de las microalgas. *CONABIO. Biodiversitas*, 103: 1 – 5.

Mercedes, A., Carvajal, V., & Solbas, A. (2009). "Nuevos alimentos funcionales a partir de microalgas."

Norton, T.A.; Melkonian, M.; & Andersen, R.A. Algal biodiversity. *Phycologia* 1996, 35, 308–326.

Olguín EJ. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances* 22: 81-91.

Oliart, R. M., Manresa, Á., & Sánchez, O. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *Ciencia UAT*, 11(1), 79-90.

Rodríguez, A. R., Corral, O. L., & Linares, L. (2006). Aislamiento de microorganismos termófilos con capacidad de degradar hidrocarburos.

Rodríguez, C. (2005). Biotecnología ambiental. *Editorial Tebar*.

Sampath-Wiley, P.; Neefus, C.D.; Jahnke, & L.S. Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* kützing (Rhodophyta, Bangiales). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2008, 361, 83–91.

Sharoba, A. (2014). Nutritional value of spirulina and its use in the preparation of some complementary baby food formulas. *Journal of Food and Dairy Sci., Mansoura Univ*, 5(4), 517–538. Retrieved from

Van Krimpen, M.; Bikker, P.; Van der Meer, I.; Van der Peet-Schwering, C.; & Vereijken, J. (2013) Cultivation, Processing and Nutritional Aspects for Pigs and Poultry of European Protein Sources as Alternatives for Imported Soybean Products; *Wageningen UR Livestock Research: Lelystad, The Netherlands*; p. 48.

ANEXO A: REGISTRO FOTOGRÁFICO

A1. DISEÑO EXPERIMENTAL



Figura 15: Diseño Experimental

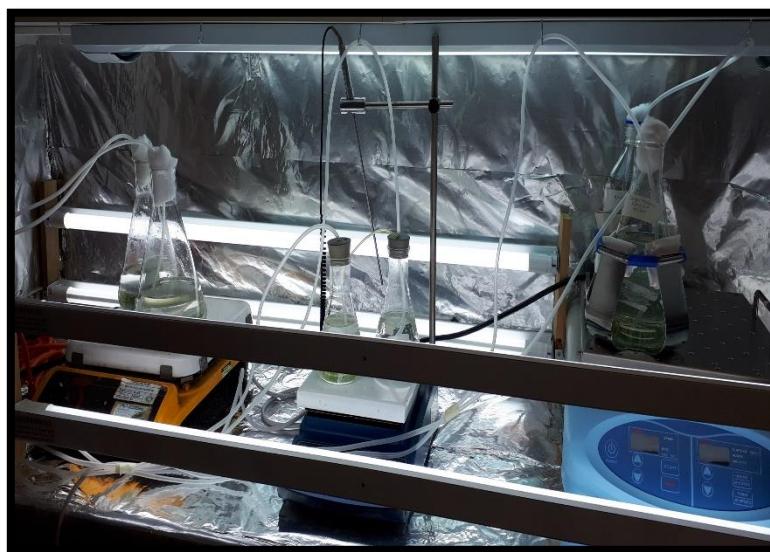


Figura 16: Crecimiento celular a diferentes temperaturas

A2. MONTAJE DE FOTOBIORREACTORES



Figura 17: Fotobiorreactores en la fase de aclimatación



Figura 18: Fotobiorreactores en la fase de crecimiento celular



Figura 19: Fotobiorreactores en la fase estacionaria

A3. CONTEO CELULAR

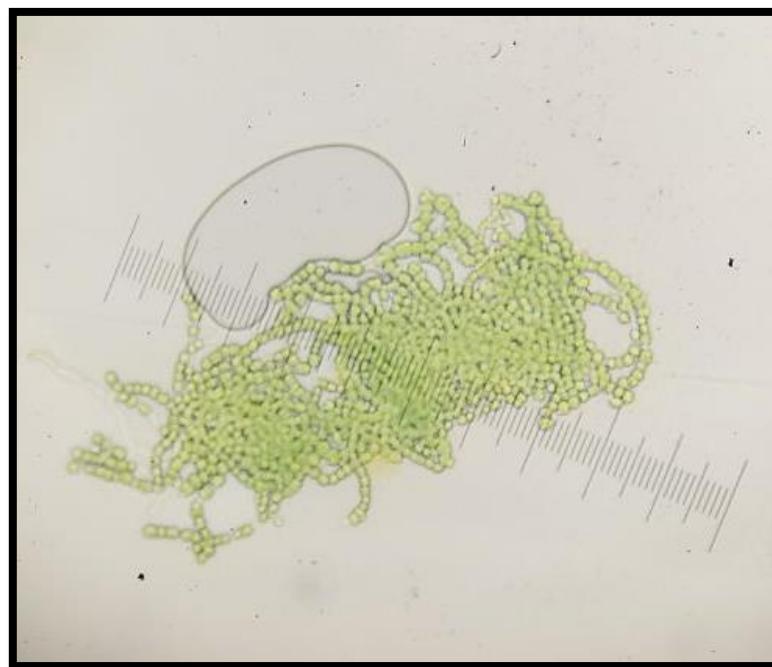


Figura 20: *Fischerella Muscicola* vista al microscopio

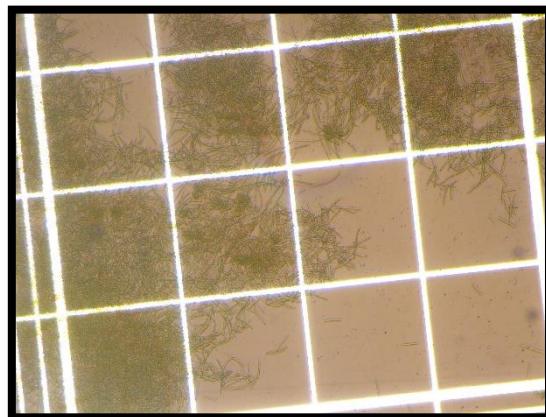
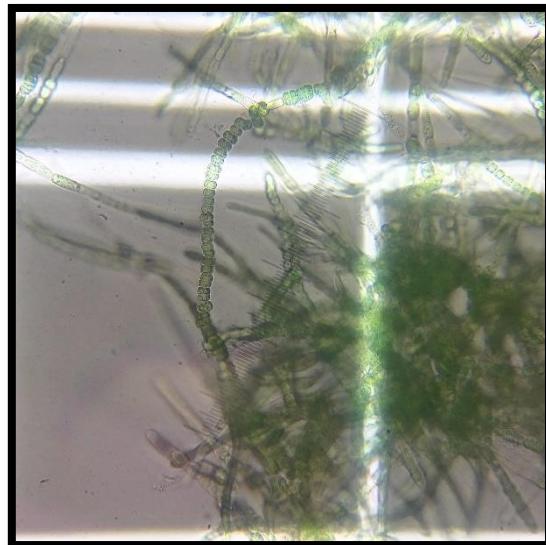


Figura 21: Conteo en cámara de Neubauer de *Fischerella Muscicola*

A4. COSECHA DE BIOMASA



Figura 22: Medición de pH final



Figura 23: Determinación de la curva de sedimentación



Figura 24: Separación de fases

A6. SECADO DE BIOMASA



Figura 25: Pesaje de biomasa húmeda



Figura 26: Pesaje de biomasa seca



Figura 27: Biomasa seca y triturada

ANEXO B: RESULTADO DE LABORATORIO

B1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

 Multianalityca Cía.Ltda Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de Calidad		INFORME DE RESULTADOS															
INF.DIV-FQ.30040																	
SA		38666a															
Cliente:	YUNGA ATAPUMA JOHANA	Lote:	---														
Dirección:	COLIBRI	Fecha Elaboración:	---														
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Vencimiento:	---														
Muestra de:	MATERIA PRIMA	Fecha Recepción:	23/02/2018														
Descripción:	MICROALGA FISCHERELLA MUSCICOLA	Hora Recepción:	9:33														
		Fecha Análisis:	26/02/2018														
		Fecha Entrega:	01/03/2018														
		Código:	-----														
<table border="1"><thead><tr><th colspan="2">Características Muestra</th></tr></thead><tbody><tr><td>Color:</td><td>Característico</td></tr><tr><td>Olor:</td><td>Característico</td></tr><tr><td>Estado:</td><td>Sólido</td></tr><tr><td>Contenido Declarado:</td><td>10g</td></tr><tr><td>Contenido Encontrado:</td><td>-----</td></tr><tr><td>Observaciones:</td><td>Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio</td></tr></tbody></table>				Características Muestra		Color:	Característico	Olor:	Característico	Estado:	Sólido	Contenido Declarado:	10g	Contenido Encontrado:	-----	Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio
Características Muestra																	
Color:	Característico																
Olor:	Característico																
Estado:	Sólido																
Contenido Declarado:	10g																
Contenido Encontrado:	-----																
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio																
RESULTADO FISICO-QUIMICO																	
PARAMETROS	UNIDAD	RESULTADO	METODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA													
PROTEINA (F: 6.25)	%	33.26	MFQ-01	AOAC 2001.11													
 Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de Calidad Multianalityca Cía.Ltda Quito - Ecuador		 Ing. Lizeth Guevara JEFE DIVISIÓN FISICO-QUIMICO															