

Producción de proteína unicelular a partir de *Arthrospira maxima*



Rafael Ángel Castillo García

Universidad de pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Biología

Colombia

2018

Producción de proteína unicelular a partir de *Arthrospira maxima*



Rafael Ángel Castillo García

Ph.D Alba lucia Roa Parra

Directora

McS. David Silva Rodríguez

Co-director

Proyecto de grado para optar el título de Biólogo

Universidad de pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Biología

Colombia

2018

Dedicatoria

A Dios, Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi madre por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Mamá gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ti.

De manera especial a Mis abuelos Carmen Cecilia Vera de García (QEPD) y José Amadeo García Jaimes (QEPD), por quererme y apoyarme siempre, esto también se lo debo a ustedes.

A mi tutora de tesis, por haberme guiado, no solo en la elaboración de este trabajo de titulación, sino por haberme brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente y seguir cultivando mis valores.

Todos aquellos familiares y amigos que no recordé al momento de escribir esto. Ustedes saben quiénes son.

Agradecimientos

El presente trabajo de tesis primeramente me gustaría agradecerle a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A la UNIVERSIDAD DE PAMPLONA por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A la MSc Gladys Montañez Acevedo por la orientación y ayuda en la realización de los análisis estadísticos de mi trabajos.

Al ingeniero David Silva Rodríguez por el análisis de ácidos grasos realizado mediante convenio internacional con la universidad de los lagos de Chile.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a la Dra. Alba Lucía Roa Parra, principal colaboradora durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

Contenido

	Págs.
Resumen.....	13
Abstract	15
Capítulo I.....	17
Introducción	17
Formulación del problema	17
Justificación del problema.....	18
Pregunta biológica.....	19
Objetivos	20
Objetivo general.	20
Objetivos específicos	20
Capitulo II	21
Marcos de Referencia.....	21
Antecedentes	21
Antecedentes Internacionales.....	21
Antecedentes Nacionales	25
Marco teórico	28
Proteína unicelular (single cell protein).	28
Aspectos generales.	28

Valor nutricional de los microorganismos.	31
Aspectos económicos de la producción de biomasa microbiana.	32
Biología de las microalgas	34
Aspectos generales	34
Composición.	35
Aplicación.	38
<i>Microalgas como alimento dietético.</i>	38
<i>Producción de biodiesel a partir de microalgas</i>	40
<i>Microalgas como biofertilizante,</i>	40
<i>Microalgas en la industria de la cosmética.</i>	41
<i>Ácidos grasos poliinsaturados.</i>	42
<i>Pigmentos carotenoides y ficobiliproteínas</i>	42
Cultivo.....	43
Fotobioreactores.	45
Capitulo III.....	47
Metodología	47
Selección de la Microalga	47
Selección de los Medios de cultivo	47
Medio de cultivo 1	47
Medio de cultivo 2	48
Selección del Fotoreactor airlift.	49
Realización de las cinéticas de crecimiento para la puesta en marcha del bioproceso	50

Curva de correlación.	50
<i>Peso seco.</i>	50
<i>Densidad óptica (D.O.).</i>	52
Cinética de crecimiento.....	53
Producción de la biomasa microalgal.	54
Análisis bromatológico.	55
<i>Determinación de la Humedad.</i>	55
<i>Determinación de cenizas.</i>	55
<i>Determinación de la proteína.</i>	55
<i>Determinación de la grasa.</i>	56
<i>Determinación de la fibra cruda.</i>	56
<i>Determinación de los carbohidratos totales y el valor calórico.</i>	57
Perfil de ácidos grasos.....	57
Análisis Microbiológicos.	58
Análisis costo beneficio	59
Análisis Estadísticos.....	59
Capitulo IV	60
Resultados y discusión	60
Selección de los elementos del bioproceso	60
Curva de correlación	61
Cinética de crecimiento.....	65
Análisis bromatológico	70

Análisis de ácidos grasos	73
Análisis Microbiológico.....	74
Análisis costo beneficio	76
Conclusiones	82
Recomendaciones.....	83
Referencias.....	84
Apéndice	90

Listado de tablas

	Págs.
Tabla 1. Características nutricionales generales de microalgas, bacterias, levaduras y harina de pescado.....	32
Tabla 2. Composición bioquímica de algunas microalgas comestibles marinas y de agua dulce.	37
Tabla 3. Peso seco y densidad óptica de la serie 1 de patrones de <i>Arthrospira maxima</i>	61
Tabla 4. Peso seco y densidad óptica de la serie 2 de patrones de <i>Arthrospira maxima</i>	62
Tabla 5. Paralelo entre los resultados del análisis de regresión lineal aplicado a las dos series de patrones.	63
Tabla 6. Producción de biomasa de <i>Arthrospira maxima</i> en el medio comercial y el medio económico durante 24 días.....	65
Tabla 7. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales.	68
Tabla 8. Resultados análisis bromatológicos de la biomasa obtenida a partir de medio comercial y el medio económico, realizados en el laboratorio de alimentos CICTA de la universidad industrial de Santander UIS. Ver apéndice F,G,H,I.....	70
Tabla 9. Perfil lipídico <i>Arthrospira maxima</i>	73
Tabla 10. Análisis microbiológico de <i>Arthrospira maxima</i>	75
Tabla 11. Precios de los reactivos para la preparación de 500 ml de solución madre.....	76
Tabla 12. Precio de los reactivos para la preparación de 100 ml de solución FeEDTA.....	77
Tabla 13. Precio de los reactivos para preparar la parte A del medio <i>Spirulina</i>	77
Tabla 14. Precio de los reactivos para preparar la parte B del medio <i>Spirulina</i>	78

Tabla 15. Precio de los reactivos para preparar:

Tabla 16. Precio de los reactivos para preparar la parte B del medio Spirulina. 79

Tabla 17. Comparación entre los costos de producción y la biomasa generada en los dos medios
..... 81

Listado de figuras

	Págs.
Figura 1. Fotoreactor Airlift.....	49
Figura 2. Patrones de Arthrospira maxima.	50
Figura 3. Incubadora BINDER.	51
Figura 4. Desecador.	51
Figura 5. Montaje de Filtración por Membrana.	52
Figura 6. Espectrofotómetro Genesys 10uv.	53
Figura 7. Fotoreactor Airlift día 1.	54
Figura 8. Fotoreactor Airlift con los Medios Seleccionados.....	60
Figura 9. Observación Microscópica de Arthrospira maxima..	61
<i>Figura 10.</i> Línea de tendencia entre el peso seco y la densidad óptica de los patrones de la serie 1.	64
Figura 11. Contraste entre los valores de peso seco obtenidos a partir de dos medios (Comercial A y Económico B)..	66
Figura 12. Cinética de crecimiento entre el medio comercial y el medio económico.	69
Figura 13. Costos de producción de biomasa en medio comercial y el medio económico.....	80

Listado de apéndices

	Págs.
Apéndice A Determinación de humedad	91
Apéndice B. Determinación de cenizas.	92
Apéndice C. Determinación de proteínas.....	93
Apéndice D. Determinación de grasas	96
Apéndice E. Determinación de fibra cruda.	97
Apéndice F. Análisis bromatológico de la biomasa del medio económico	98
Apéndice G. Análisis bromatológico de la biomasa medio comercial	100
Apéndice H. Parámetros microbiológicos de alimentos para animales	102
Apéndice I. Costos de producción	102
Apéndice J. Costo de mano de obra	104
Apéndice K Gastos de fabricación	105

Resumen

Arthrospira sp (Espirulina) es una cianobacteria filamentosa, habitante de lagos alcalinos, que presenta una serie de propiedades que la convierten en un organismo de gran interés para la industria alimenticia, ejemplo de esto se encuentran los pigmentos como son las ficobiliproteínas y los carotenoides, así como de otros compuestos como polisacáridos, ácidos grasos, proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales. En la actualidad la biomasa microalgal está siendo considerada como una gran alternativa para reemplazar algunas fuentes tradicionales de proteína (soya, harina de pescado, suero descremado de leche) para el consumo animal e incluso para el consumo de seres humanos como suplementos alimenticios.

De modo que la producción de biomasa ha sido objeto de un nuevo desarrollo, la producción de proteína unicelular. En el caso de las microalgas, cabe destacar que por razones técnicas y económicas el proceso no se centra únicamente en aislar y utilizar únicamente la proteína, sino que por el contrario se busca propagar toda la biomasa microalgal. El siguiente estudio tuvo como objetivo la obtención de biomasa de la cianobacteria *Arthrospira maxima* con la finalidad de ofrecer una fuente alterna de alimentación para especies menores (peces, conejos, aves). Inicialmente se estandarizaron los ámbitos del bioproceso: Microalga, substratos (medio enriquecido y medio formulado) y ámbito físico (Fotoreactor airlift). Luego se llevó a cabo el bioproceso para la obtención de la biomasa. Posteriormente se realizó un análisis bromatológico

de las biomásas producidas para determinar un análisis costo beneficio de la producción en los medios utilizados.

De los resultados obtenidos en la producción de biomasa se definió que el medio económico obtuvo mejores resultados pero sin llegar a darse una diferencia significativa con el medio enriquecido con un $P > 0,5729$; con lo que respecta al análisis bromatológico se obtuvo los valores porcentuales de humedad, proteína, fibra, grasa, ceniza, carbohidratos y contenido calórico en el cual el medio económico también presentó una ligera ganancia con respecto al medio comercial en este caso con un contenido proteico de 49,58% mientras que el comercial obtuvo un 44,84%.

La investigación de costos de producción permitió determinar que el medio comercial es 131% más costoso que el medio económico. De los resultados obtenidos se definió el medio económico como la mejor alternativa, debido a que presentó el mayor crecimiento de biomasa con 2,31 gramos por 1 litro y un contenido proteico de 49,58% en peso seco. En este trabajo se buscó avanzar en el desarrollo de productos de origen microalgal utilizando alternativas en cuanto a la producción que favorezcan la masificación de nuevas prácticas cada vez más asequibles y amables con el medio ambiente que permitan obtener un producto final a más bajos costos sin dejar a un lado la calidad que debe tener el mismo.

Palabras Claves: *Arthrospira maxima*, biomasa, análisis bromatológico, cianobacteria, ficobiliproteínas, bioproceso, especies menores.

Abstract

Arthrospira sp (*Spirulina*) is a filamentous cyanobacterium, inhabitant of alkaline lakes, which presents a series of properties that are translated into an organism of great interest for the food industry, for example, this is found in pigments such as phycobiliproteins, as well like other compounds like polysaccharides, fatty acids, proteins, amino acids, vitamins and minerals. Currently microalgal biomass is being used as a great alternative to replace some traditional sources of protein (soy, fishmeal, low-fat milk) for animal consumption and even for human consumption as food supplements.

So the production of biomass has undergone a new development, the production of unicellular protein. In the case of microalgae, it should be noted that for technical and economic reasons, the process does not focus on the isolation and use of the protein, but rather the entire biomass of microalgae is propagated. The next study aimed to obtain the biomass of the cyanobacterium *Arthrospira maxima* with the purpose of offering an alternative source of food for the smaller species. Initially the areas of the bioprocess are standardized: microalgae, substrates (half enriched and half formulated) and physical field (Photoreactor airlift). Then a bioprocess was carried out to obtain the biomass. Subsequently, a bromatological analysis of the biomass produced was carried out to determine a cost benefit analysis of the production in the means used.

From the results in the production of biomass it was defined that in the economic environment was obtained the results in the production of biomass was defined in the environment enriched with a $P > 0.5729$; with regard to the bromatological analysis, the percentage values are obtained: moisture, protein, fiber, fat, ash, carbohydrates and their content. The economic environment is also a slight advantage compared to the commercial medium in this case with a protein content of 49.58% while the commercial one obtained a 44.84%.

The investigation of the costs of production is more important than the commercial medium 131% more expensive than the economic environment. From the results the economic environment was defined as the best alternative, due to the higher growth of biomass with 2.31 grams per 1 liter and a protein content of 49.58% in dry weight. In this work we sought to advance in the development of products of microalgal origin alternative production alternatives in production that favors the massification of new practices increasingly affordable and friendly to the environment that produces a final product at lower costs without leaving aside the quality that it should have.

Key words: *Arthrospira maxima*, biomass, bromatological analysis, cyanobacteria, phycobiliproteins, bioprocess, minor species.

Capítulo I

Introducción

Formulación del problema

Arthrospira maxima es una cianobacteria considerada como una excelente fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales, con alto valor proteico y su crecimiento se ve favorecido en medio alcalino. Además, esta cianobacteria ha establecido ciertas ventajas sobre otros microorganismos, como fuente de proteína unicelular “single-cell protein” y es comercializada a escalas industriales (Muniz, Silva, Garcez, Silva, & Almeida, 2011).

El crecimiento poblacional en especial en las naciones en vía de desarrollo es abrumador; la agricultura y ganadería tradicional muy posiblemente no serán capaces de suplir la demanda proteica de esta población emergente. Este problema no solo involucra a los seres humanos sino también a los animales; el alimento o concentrado animal de igual forma presentará una escasez debido a que se necesitará más carne animal para suplir la demanda.

El principal problema ante esta situación radica sustancialmente en los altos costos para la elaboración de alimentos balanceados que contenga los compuestos químicos necesarios para cubrir adecuadamente las funciones metabólicas de los organismos. La proteína es uno de los componentes más caros en la dieta de cualquier organismo en cultivo y el costo de este nutriente y los niveles de inclusión en la dieta, afectan directamente los costos del alimento y finalmente la producción en los sistemas de cultivo.

Por este motivo es importante evaluar los requerimientos nutricionales de cada especie y realizar estudios para tratar de encontrar substitutos proteicos más económicos.

Justificación del problema

La biomasa microbiana ofrece una alternativa para remplazar algunas de las fuentes tradicionales de proteína (soya, harina de pescado, suero), en el caso del consumo animal, e incluso en porciones para humanos después de ser tratada adecuadamente. Por ello el desarrollo e implementación de técnicas de producción industrial de proteína unicelular SCP ayudará a solventar el problema de la cada vez más limitada disponibilidad e ingesta de proteína (Phetteplace, Jarosz, Uctuk, & Sporleder, 2003).

Diversos estudios han demostrado que algunas especies de levaduras, bacterias y microalgas son candidatos viables para ser cultivados y además muestran excelentes características nutricionales y sobresalientes ventajas para la producción de SCP, en comparación con fuentes convencionales de nutrientes. Los microorganismos crecen rápidamente y tienen un alto rendimiento, las microalgas cultivadas en estanques pueden producir más de 20 toneladas de proteína por acre al año (Weyer, 2010).

En comparación, este rendimiento es de 10 a 15 veces más alto que la producción estándar de soya, y 25 a 50 veces más alto que la producción de maíz (Pelczar & Chan, 2010) Las microalgas tienen un alto contenido proteico y son altamente eficientes al convertir una gran variedad de substratos, lo que conduce a la rápida producción de biomasa.

La generación continua de biomasa microbiana en foto-biorreactores, (microalgas) ha alcanzado una escala industrial. Una serie de metodologías estandarizadas han permitido un significativo incremento en el número de aplicaciones en la nutrición de especies menores. Una serie de nuevos métodos de producción independientes de las condiciones estacionales ya han sido patentados y pueden generar biomasa microbiana a partir de sustratos alternativos (Glencross, Irvin, Arnold, Blyth, Bourne, & Preston, 2014). Algunos de estos métodos alternativos han sido capaces de mantener una producción continua y bromatológicamente consistente de biomasa microbiana a partir de microalgas, levaduras y bacterias.

Considerando que la alimentación y nutrición adecuada son la base para la supervivencia, salud y crecimiento del ser humano, resulta útil proponer ésta fuente alternativa e innovadora de proteína, la adaptación de técnicas enfocadas en el mejoramiento de las condiciones de cultivo y materia prima con el fin de satisfacer las necesidades nutricionales (Wilkie, Edmundson, & Duncan, 2011).

Pregunta biológica

¿La biomasa producida a partir de *Arthrospira* spp tendrá las características bromatológicas requeridas como fuente potencial de proteína?

Objetivos

Objetivo general.

Producir biomasa de *Arthrospira maxima* como fuente alternativa de proteína con potencial aplicación en alimentación animal.

Objetivos específicos.

Seleccionar los elementos del bioproceso para la producción de biomasa microalgal.

Realizar las cinéticas de crecimiento de la microalga para la puesta en marcha del bioproceso.

Caracterizar bromatológica y microbiológicamente la biomasa microalgal producida.

Capítulo II

Marcos de Referencia

Antecedentes

Antecedentes Internacionales.

En el proyecto titulado “Modelling and simulation of a U-loop Reactor for Single Cell Protein Production”, MengzheWu, Jakob Kjøbsted Huusom, Krist V, Gernaeya UlrichKrühne. (2016) afirman que el objetivo del trabajo fue investigar cómo los parámetros del proceso como la tasa de dilución (D) o la concentración de metanol deben seleccionarse para optimizar la producción. Se propone un modelo monofásico tridimensional utilizando métodos de Dinámica de Fluidos Computacional (CFD).

Al introducir los saldos de momento en la simulación, los resultados pueden capturar los campos de velocidad de flujo en tres dimensiones. De este modo, es posible indicar la influencia del diseño geométrico en el rendimiento de producción. Esta metodología permite una mayor investigación sobre el efecto de las elecciones de diseño en la operación óptima, como la determinación de dónde ubicar la entrada de sustrato, la posición del mezclador estático o la posición de inyección de gas.

El proyecto titulado Cultivo de *Arthrospira platensis* (Spirulina) en fotobiorreactor tubular doblemente curvado a condiciones ambientales en el sur del Perú. Ronald Huarachi-Olivera, Úrsulo Yapo-Pari, Alex Dueñas-Gonza, José Condori-Huamanga, D.G. Pacheco-Salazar, Joe

Soto-Flores. (2015). El presente trabajo investigó el cultivo de la microalga *Arthrospira platensis* (Spirulina) en valores de productividad cultivado en fotobiorreactor tubular doblemente curvado a condiciones ambientales con el fin de aprovechar la alta radiación solar de la región Arequipa en el sur de Perú ($16^{\circ}24'50''$ LS; $71^{\circ}32'02''$ LO; 2344 msnm). El fotobiorreactor fue construido con un tubo transparente de policloruro de vinilo (PVC). La productividad del cultivo fue de 13.9 g/m^2 en 14 días ó $1 \text{ g/ m}^2/\text{día}$ y una concentración de clorofila - "a" de 0.00785 mg/L con una máxima radiación de 1179 W/m^2 , y una iluminación de 121500 lux , convirtiendo sus filamentos helicoidales a morfologías anormales, tales como formas irregulares curvas e incluso lineales con fragmentaciones, demostrando que el cultivo se vio afectado por la alta radiación y las variaciones de temperaturas de Arequipa.

Proyecto titulado Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. Fedekar Fadel Madkour, Abd El-Wahab Kamil, Hoda Shafik Nasr. (2012). Este estudio tuvo como objetivo proporcionar una producción de *Spirulina platensis* a un costo medio y a gran escala. Se implementó un cultivo sustituyendo los nutrientes presentes del medio de cultivo Zarrouk (SM) con fertilizantes y químicos comerciales más baratos y disponibles a nivel local. Se trabajó con cuatro concentraciones de nitrógeno (10%, 20%, 30% y 40%) de la concentración de nitrógeno SM (29.42 mM-N) a partir de nitrato de amonio (Tratamientos 1-4) o urea (Tratamientos 5-8) respectivamente, para pruebas. El alga se cultivó durante 33 días a $30 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 9, $30 \text{ lEm}^2 \text{ s}^{-1}$ de irradiancia. Las características de crecimiento (biomasa máxima X_m , productividad celular P_x , tasa de crecimiento específica μ_m y concentración de clorofila) y composición bioquímica (proteínas, carbohidratos y lípidos) del alga cultivada en estos medios se compararon con las cultivadas en SM. Los resultados indicaron que el medio formulado se

puede usar de forma rentable para la producción masiva a gran escala de *Spirulina* sp rica en proteínas y produce un rendimiento similar con un costo efectivo para el medio de Zarrouk.

Proyecto titulado A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. Liang Wang, Yunguang Li, Milton Sommerfeld, Qiang Hu. (2012). En este estudio, se introdujo una nueva estrategia que emplea una sola cepa de microalgas *Scenedesmus dimorphus* cultivada en una sola plataforma de cultivo para producir biomasa rica en proteínas, carbohidratos o lípidos, como se deseaba. Con la manipulación combinada de la disponibilidad de nitrógeno y la densidad de luz y la densidad de inoculación de células, se demostró con éxito que los rendimientos más altos para proteínas e hidratos de carbono fueron 0,2 y 0,7 g L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, se obtuvieron en las primeras etapas de cultivo, mientras que el rendimiento más alto para los lípidos, 0,17 g L⁻¹ d⁻¹, se produjo en una etapa tardía del cultivo.

El proyecto titulado Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Spirulina platensis*. Lidiapéndice Muniz Moreira, Andréa da Silva Ramos Rocha, Carmen Lúcia Garcez Ribeiro, Rosapéndice da Silva Rodrigues, Leonor Almeida de Souza Soares. (2011). El objetivo de esta investigación fue evaluar las características nutricionales y los posibles efectos tóxicos de la microalga *Spirulina* LEB-18, desarrollada en el sur de Brasil. La biomasa se evaluó durante 40 días a través de respuestas nutricionales, obtenidas por el desarrollo de ratas Wistar y también por estudio bioquímico y hematológico de la sangre de estos animales. Se prepararon cuatro dietas isoproteicas (12% de proteína): (1) dieta de control, 12% (p / p) de caseína; (2) Dieta S1, 8.8% (p / p) de espirulina; (3) Dieta S2, 17.6% (p / p) de espirulina; (4) Dieta S3, 26,4% (p / p)

de espirulina, distribuida a los animales de acuerdo con su tratamiento (n = 6). En cuanto a los parámetros nutricionales, el tratamiento S1 fue más eficiente.

Los grupos no difirieron en cuanto a las determinaciones bioquímicas en sangre, con la excepción de S2, que mostró niveles de creatinina más bajos que todos los demás. En el perfil hematológico, el tratamiento S3 mostró niveles de hematocrito y hemoglobina mayores que la dieta de control. Estos resultados no revelaron toxicidad por el uso de microalgas y sugieren el uso de Spirulina como fuente potencial de proteína de célula única.

El proyecto titulado Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. Leila Queiroz Zepka, Eduardo Jacob Lopes, Rosana Goldbeck, Leonor Almeida Souza-Soares Maria Isabel Queiroz.(2010). El objetivo de esta investigación fue evaluar las características nutricionales de las microalgas *Aphanothece spp.* desarrolladas en el efluente del arroz precocido. La biomasa se evaluó biológicamente mediante crecimiento de ratas, durante 10 días para estudios de balance de nitrógeno y 28 días para análisis de sangre.

La alimentación de las dietas de biomasa *Aphanothece spp.* resultó en un balance de nitrógeno de 1.42 g / rata / día, un valor biológico aparente de 73.33%, una digestibilidad aparente de 82.12%, una aparente utilización neta de proteína de 60.21% y una retención neta de proteína de 2.40. No se observaron diferencias significativas entre los índices glucémicos de las ratas alimentadas con *Aphanothece spp.* y las alimentadas con la dieta control. Sin embargo, los niveles de colesterol total en el plasma de ratas alimentadas con la dieta de prueba demostraron ser significativamente más bajos.

Según (Prakash & Tiwari, 2010) Optimization of Biomass Production of *Spirulina maxima*. El objetivo de este estudio fue el de investigar cómo la combinación de un conjunto de parámetros, a saber, la temperatura, la intensidad de la luz, el pH y la agitación, afectan la producción máxima de biomasa, clorofila a y proteína. Mediante la manipulación del estado ambiental del crecimiento de las algas, se puede modificar la producción de biomasa. En la presente investigación, la producción de *Spirulina máxima* se optimizó en términos de biomasa y metabolitos.

El peso seco de *Spirulina maxima* fue 0,73 g / 500 ml y el contenido de proteína y clorofila a 63,8% y 13,1 mg / g respectivamente a pH 9. A 5 Klux intensidad de luz el peso seco de *Spirulina maxima* fue de 0,72 g / 500 ml mientras que el contenido de proteína y la clorofila a fue 64.2% y 9.5 mg / g respectivamente. La aireación es también un factor muy importante para la producción de *Spirulina*. Se requiere una mezcla continua del medio de cultivo para evitar el hundimiento celular y la estratificación térmica para mantener la distribución uniforme de nutrientes y eliminar el exceso de oxígeno. En términos de aireación y no aireación, los valores fueron 2.35 g / 500 ml en el sistema de aireación y 1.81 g / 500 ml en el sistema sin aireación.

Antecedentes Nacionales.

Proyecto titulado Utilización de espirulina (*Spirulina maxima*) en la alimentación de alevinos de trucha arco iris (*oncorhynchus mikyss*). Juan Felipe Díaz Lozano, Julián Guillermo León. (2014). El presente estudio se realizó con el fin de evaluar la inclusión de *Spirulina máxima* en la dieta de alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mikyss*) por un periodo de 90 días. Con este propósito se emplearon 406 ejemplares larvas de trucha de 5 días de edad con un

peso promedio de $0,15 \pm 0,005$ g y talla de $2,2 \pm 0,1$ cm. Los datos de ganancia de peso y talla fueron recopilados cada 18 días en muestras provenientes de cada uno de los grupos experimentales. Se evaluaron niveles de inclusión de espirulina de 0% (T0), 5% (T5), 10% (T10) y 15% (T15). La mortalidad sí presentó diferencias significativas ($P < 0,05$), los tratamientos con inclusión de espirulina, T5 (4,02%), T10 (1,99%) y T15 (3,57%) presentaron un menor porcentaje de mortalidad en relación al grupo control T0 (6,9%) ($P < 0,05$).

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para el factor de condición (k) y conversión alimenticia. Para los parámetros ganancia de peso, longitud y tasa de crecimiento específica (TCE), los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento con mayor nivel de inclusión de espirulina T15 (15%) generando diferencias significativas ($P < 0,05$) frente al grupo control con una TCE de $12,48 \pm 0,9$ g, $9,96 \pm 0,14$ cm y $4,92 \pm 0,08\%$ respectivamente.

Proyecto titulado Desarrollo, producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. La experiencia en La Guajira, Colombia. Mario A. Colorado Gómez, Diego A. Moreno Tirado, Jéssica I. Pérez Posada. (2013). Este trabajo buscó por un lado, avanzar en el desarrollo de subproductos de origen microalgal a escala industrial en Colombia utilizando sistemas de cultivos cerrados que no compiten con la producción de alimento humano sobre suelos de uso agrícola y por otro lado, destacar el beneficio ambiental que esta producción representa.

Proyecto titulado Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Luis Miguel Serrano Bermúdez, (2012). La presente

investigación evaluó la composición y capacidad de acumulación de lípidos en cuatro microalgas nativas de Colombia y un alga de referencia como fuentes potenciales para la producción de biodiesel. Las microalgas *Scenedemus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* presentaron las mayores productividades de lípidos con 18,8 y 18,7mg•L⁻¹•día⁻¹, respectivamente, equivalentes a 4,1 veces la productividad de aceite de la palma africana, actual materia prima empleada en Colombia para la producción industrial de biodiesel. De acuerdo con la caracterización de los ácidos grasos producidos por las microalgas estudiadas, todas pueden ser empleadas en la producción de biodiesel, debido a la similitud de estos con aceites ya empleados en la producción de biodiesel, por lo cual fue escogida la microalga *Chlorella vulgaris* para estudios posteriores, los cuales consistieron en la optimización de la acumulación y productividad de lípidos variando los factores contenido de CO₂, irradiancia, fotoperiodo y aireación.

Proyecto titulado Diseño conceptual de un proceso de cultivo y obtención de Cyanobacteria *Arthrospira platensis*. Bernardo David Torres Urango, Daniel Correa Trujillo. (2008). Se evaluó el crecimiento del alga *Spirulina platensis* en la ciudad de Medellín a presión y temperatura promedio de 0.84 atm y 24°C respectivamente, en tres medios de cultivo: Medio Zarrouk, Medio UTEX y Medio Urea (experimental). Las pruebas fueron realizadas a escala de laboratorio en tanques de 2 l, con aireación constante, la agitación fue proporcionada por la aireación, rango de pH entre 9-11; se realizaron mediciones diarias para controlar la variable de crecimiento mediante el cálculo del peso seco y se cuantificó el contenido proteico del alga cultivada en cada uno de los medios. De los resultados obtenidos se definió el medio UTEX como la mejor alternativa, debido a que presentó el mayor crecimiento, 11 g/l partiendo de una concentración inicial de 1.5 g/l y un contenido proteico de 46.8% en peso seco.

Se presenta un diseño conceptual para la producción de Spirulina partiendo de los resultados obtenidos y escalando el proceso para obtener una producción de 11 Kg de Spirulina por semana. La capacidad de producción se definió para un proceso a baja escala, de modo que personas de bajos recursos puedan realizar pequeñas producciones para consumo familiar y local, recibiendo beneficio económico de ventas y beneficio nutricional del consumo del alga.

Marco teórico

Proteína unicelular (single cell protein).

Aspectos generales.

El término "proteína unicelular" (SCP) se refiere a la biomasa microbiana que se utiliza como aditivo alimenticio la cual tiene un alto valor nutricional a causa de su alto contenido de vitaminas, lípidos, y proteínas de alta calidad biológica (la presencia de todos los aminoácidos esenciales: lisina, triptófano, treonina, y también metionina y cisteína). Se refiere a biomasa microbiana de algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos, cultivados en condiciones fermentativas apropiadas y controladas que garanticen una adecuada tasa de crecimiento por medio del aprovechamiento de sustratos de bajo costo o enriquecidos con carbono, nitrógeno y fósforo (Chacón, 2004).

Las microalgas son consideradas como organismos útiles para la producción de proteína unicelular (SCP) debido a que presentan ciertas características como son: fijan CO₂ durante su crecimiento, poseen un elevado contenido en lípidos por unidad de biomasa (mayor que el de

otros tipos de plantas y además, puede ser incrementado bajo ciertas condiciones de estrés), su variedad permite la obtención de multitud de tipos de productos y, algunas de ellas, pueden desarrollarse en medios de cultivo muy baratos, incluso aprovechando aguas residuales. Estudios muestran que una adecuada combinación de diferentes procesos de transformación, junto con la gran variedad de productos que se pueden generar a partir de las microalgas, darían lugar a sistemas productivos altamente eficaces y sostenibles (Espada & Moreno, 2016).

La biomasa microbiana ha sido dirigida a una amplia variedad de propósitos, como en el caso de la nutrición humana que ha utilizado el hongo unicelular *Fusarium venenatum* durante décadas para manufacturar un amplio rango de productos comerciales a partir de una mico proteína.

Por otro lado, diversas microalgas como es el caso de la *Spirulina maxima* y *Chlorella vulgaris* tienen presencia en el mercado actual como suplementos dietarios. En la alimentación animal, productos microbianos, principalmente derivados de levaduras y microalgas, son suministrados en dietas formuladas como fuente de vitaminas, pigmentos, proteínas y aminoácidos específicos.

Recientemente se ha explorado nuevas fuentes de biomasa microbiana dirigidas a la nutrición animal. Como por ejemplo, (Zhao, y otros, 2012) reportan que un 25% de reemplazo de proteína de soya por harina de origen bacteriano no afectó el metabolismo del nitrógeno en cerdos.

Según, (Zhang, y otros, 2013) demostraron que una SCP (obtenida a partir de *Corynebacterium glutamicum*) fue capaz de reemplazar el 50% de la harina de pescado en dietas para cerdos y generó un crecimiento, digestibilidad de nutrientes y morfología intestinal similares a aquellos registrados en animales alimentados con una dieta que contenía sólo harina de pescado como fuente de proteína. De manera similar, empresas recientemente establecidas se han centrado en producir biomasa bacteriana a partir de sustratos alternativos y económicos (algunos sin costo), empleando métodos innovadores de producción de biomasa microbiana tales como el uso de metano y desechos derivados de las actividades agrícolas y de las industrias de los alimentos (Glencross, Irvin, Arnold, Blyth, Bourne, & Preston, 2014).

Por otro lado la producción intensiva de diferentes especies de microalgas marinas ha sido una actividad intrínseca de varias operaciones acuícolas. Por ejemplo, la alimentación larval y el enriquecimiento del alimento vivo con microorganismos son fuertemente dependientes del abasto de microalgas; sin embargo, en las últimas décadas, varias empresas se han orientado a producir biomasa de microalgas para la producción de biocombustibles. La demanda de fuentes alternativas de energía ha llevado al desarrollo de bio-refinerías, las cuales se definen como instalaciones en las que se integran procesos y equipos con el propósito de convertir biomasa orgánica en biocombustibles, energía y productos químicos específicos (Cherubini, 2010).

Otros sectores industriales han desarrollado tecnologías para generar biomasa de microalgas para la generación de productos funcionales específicos como carotenoides y ácidos grasos poli-insaturados. Por ejemplo, la microalga *Haematococcus pluvialis* se ha producido intensivamente

en foto-biorreactores para generar biomasa y extraer astaxantina bajo métodos comercialmente viables (Olaizola, 2000).

El subproducto principal de los procesos de extracción de biocombustibles y pigmentos es una biomasa de microalgas de la cual se extrajeron los lípidos. Biomasa secundaria de este tipo ha sido probada con éxito como una fuente adecuada de proteína en dietas para crustáceos y peces (Ju, Deng, & Dominy, 2012).

Características bromatológicas.

En general, las células completas de microalgas, levaduras y bacterias contienen un alto contenido de proteína en base seca (ver tabla 1). El contenido proteico y los perfiles de aminoácidos de muchos microorganismos han sido reportados y algunos de estos son considerados como portadores de un alto valor biológico (Loosli & McDonald, 1968). El contenido de lípidos tiende a ser significativamente mayor en la biomasa derivada de microalgas que en la biomasa de bacterias y levaduras. Mientras que las dos últimas son ricas en proteína, pigmentos, co-factores biológicos y vitaminas.

Adicionalmente, un aspecto muy importante que ha sido reportado consiste en que el perfil nutricional de bacterias y microalgas puede ser significativamente modificado al usar medios de cultivo específicos y condiciones particulares de crecimiento (Loo, Vikineswary, & Chong, 2013).

Tabla 1.

Características nutricionales generales de microalgas, bacterias, levaduras y harina de pescado.

	Proteínas	Lípidos	Cenizas	Ácidos nucleótidos
Microalgas	6-62	3-45	8-43	3-8
Levaduras	45-55	1-6	5-10	6-15
Bacterias	50-65	1-3	3-7	8-12
Harina de pescado	59-74	8-14	10-22	0,2-0,6

Fuente: Miller & Litsky 1976; Brown et al. 1997; Becker 2007, Villareal Cavazos 2010; Adedayo et al. 2011; NRC 2011; Bi & He 2013; Huang & Su 2014.

Aspectos económicos de la producción de biomasa microbiana.

El incremento en la demanda de productos ha ejercido una fuerte presión que se ha visto reflejado en incrementos constantes de precio. Por ejemplo, el precio de la harina de pescado se ha incrementado de \$ 600 USD por tonelada en 1995 a \$ 1700 USD por tonelada en 2015 (IM 2016). Claramente se requieren fuentes alternativas de proteína, y esta necesidad ha conllevado a la investigación intensiva. Los costos estimados de producción para generar un kilogramo de biomasa microbiana son altamente variables, pero en general también se ha experimentado una reducción progresiva tanto en los costos de producción como en los precios de venta gracias a nuevas tecnologías implementadas.

Según, (Loo, Vikineswary, & Chong, 2013) Han reportado que los costos estimados de producción de microalgas y levaduras para operaciones de larvicultivo se encontraban previamente en un amplio rango de 46 a 600 USD por kilogramo de biomasa seca. Sin embargo, métodos recientes de producción para bacterias y levaduras han disminuido significativamente estos números y se encuentran actualmente en un rango de 1 a 79 USD por kilogramo de biomasa seca (Rosenberry, 2011).

Los principales costos de producción están representados por la obtención de sustratos de cultivo y la energía requerida para las operaciones de cultivo, cosecha, secado, etc. Por lo tanto, las nuevas técnicas de producción se han enfocado en el uso de sustratos no convencionales para producir biomasa microbiana en una forma sustentable y económica. Por ejemplo, (Lee & Kim, 2001). Demostraron que los costos de producción de la levadura torula *Candida utilis* pueden reducirse hasta 1.08 - 2.76 USD kg usando melaza en lugar de medios de cultivo complejos.

De la misma forma, (Norsker, Barbosa, Vermuë, & Wijffels, 2011). Calcularon los costos de producción para generar biomasa de microalgas en tres diferentes sistemas operando a escala comercial: estanques abiertos, foto-biorreactores tubulars horizontales y foto-biorreactores en papéndicel. Para los tres sistemas, los costos de producción para un kilogramo fueron 5.50, 4.45 y 6.62 USD, respectivamente. Los elementos más costosos en el proceso de producción estuvieron representados por el establecimiento de condiciones de irradiación óptima, el mezclado de fluidos, la alta eficiencia fotosintética, los medios de cultivo y el dióxido de carbono suplementario.

Después de optimizar la producción respecto a cada uno de estos factores, el precio resultante de la biomasa microalgal fue de 0.77 USD kg. Los autores declaran que a este nivel de precio, las microalgas denotarían ser un insumo promisorio como alimento o suplemento nutricional, así como una fuente rentable de biocombustibles y de compuestos orgánicos específicos.

Biología de las microalgas.

Aspectos generales.

El término microalga incluye aquellos microorganismos unicelulares capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. En esta categoría quedan agrupadas las cianobacterias (conocidas tradicionalmente como algas verdeazuladas) junto con algas eucariotas (tradicionalmente algas verdes, rojas y doradas). Las microalgas son en general organismos fotoautótrofos, es decir, obtienen la energía de la luz proveniente del sol y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer empleando materia orgánica como fuente de energía o de carbono. Según esto, la producción de microalgas se divide en:

Fotoautótrofa: las algas obtienen la energía del sol y el carbono de compuestos inorgánicos (sales).

Fotoheterótrofa: obtienen la energía del sol y emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono.

Mixotrófica: muchas algas son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de modo que la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica.

El carbono lo obtienen por tanto de compuestos orgánicos y de CO₂. Algunas de estas algas son *Arthrospira maxima* y *Chlamydomonas reinhardtii*.

Heterótrofa: los compuestos orgánicos proporcionan tanto la energía como la fuente de carbono. Es decir, existen en efecto algas que pueden desarrollarse bajo ausencia de luz, como por ejemplo *Chlorella protothecoides*.

La producción fotoautótrofa de algas (para uso distinto al energético) es actualmente la única técnica y económicamente viable a gran escala (Brenan & Owende, 2010)

Composición.

Si se compara la composición bioquímica de las microalgas con la de los alimentos tradicionales, éstas aumentan el contenido nutricional de los alimentos tradicionales e incluso pueden afectar positivamente tanto a la salud humana como a la animal, convirtiéndose en excelentes alimentos funcionales. La tabla 2 presenta la composición general de fuentes nutritivas de algunas microalgas comestibles marinas y de agua dulce.

El alto contenido proteico de varias especies microalgales es una de las principales razones para considerarlas como una fuente de proteína no convencional. A su vez, el perfil de aminoácidos de casi todas las algas es más favorable que el comparado con las fuentes

convencionales. Los carbohidratos en microalgas pueden ser encontrados en forma de almidón, glucosa, azúcares u otros polisacáridos. Su digestibilidad es alta, por lo que no hay limitación de uso en preparados alimenticios tanto para animales como para humanos.

Los lípidos en las microalgas están compuestos de glicerol, bases esterificadas de ácidos grasos saturados e insaturados (12 a 22 átomos de carbono). Entre todos los ácidos grasos en microalgas tienen especial interés algunos de las familias omega3 y omega6 (ácido eicosapentaenoico, 20:5n3 o ácido docohexaenoico, 22:6n3). La cantidad y la relativa proporción de ácidos grasos puede estar afectada por factores nutricionales y medioambientales, por ejemplo la limitación por nitrógeno y el estrés producido por un exceso de luz o salinidad que pueden producir un aumento considerable del contenido en ácidos grasos (ejemplo de plasticidad metabólica).

La composición de las microalgas (contenido en lípidos, carbohidratos y proteínas) es variable según la especie considerada y, dentro de una misma especie, según el sistema y condiciones de cultivo. En general, las cianobacterias tienen un contenido en lípidos de hasta 20 %, mientras que las algas Prochlorófitas oscila entre un 20 y 50 % en peso seco.

Tabla 2.

Composición bioquímica de algunas microalgas comestibles marinas y de agua dulce.

Especies Comestibles	Composición Bioquímica		
	Proteínas%	Lípidos %	Carbohidratos%
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48	15	27
<i>Dunaliella salina</i>	39-61	14-20	14-18
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	4-9	8-14
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	9-14	40-57

Fuente: (Cerón, 2013)

La cianobacteria conocida como *Arthrospira maxima* es un microorganismo que posee un gran interés en el campo de la biotecnología, debido a que se cultiva en muchos lugares del mundo por su alto valor nutricional, es un organismo fotosintético que tiene forma de espiral, es de color azul verdoso por la presencia de clorofila que le da el color verde y de ficocianina, pigmento que le da el color azulado.

Es capaz de mantener altas tasas de crecimiento en medios alcalinos que limitan el crecimiento de especies contaminantes, esto permite la explotación en sistemas semi-extensivos en grandes lagos en los que esta microalga crece de forma natural. El interés del cultivo de esta especie radica en sus elevados contenidos en proteínas, que pueden llegar a representar hasta un

60% del peso seco, y su alto contenido en diversas vitaminas; es debido a este motivo que esta cianobacteria merece especial atención como fuente de proteína unicelular (SCP).

Aplicación.

El cultivo de algas ha sido objeto de estudio durante las últimas décadas debido al interés suscitado tanto por su capacidad para combatir el efecto invernadero (eliminar el CO₂ de corrientes gaseosas industriales) como para la obtención de productos de valor añadido (nutrición, farmacia, química fina, etc.) y, principalmente, como fuente alternativa a los combustibles fósiles tradicionales (producción de biodiesel, biometano, biohidrógeno y bioetanol).

Microalgas como alimento dietético.

En los inicios de los años cincuenta los humanos comenzaron a usar microalgas en sus dietas, principalmente como suplementos dietéticos (proteicos y vitamínicos), en forma de polvo, cápsulas, pastillas o tableta (Pulz & Gross, 2004). Estas suelen ser incorporadas en alimentos tales como pasta, galletas, pan, caramelos, yogures o refrescos. A su vez, se estima que aproximadamente el 30 % de las algas producidas en el mundo es usado en nutrición humana debido a su alto contenido en proteína.

Hoy en día las microalgas sobresalen en la industria de la alimentación porque se han convertido en los nuevos estandartes de una dieta saludable. Hoy existe un sinnúmero de suplementos alimenticios a base de microalgas como *Chlorella spp.* y, principalmente, *Spirulina spp.*, los cuales prometen ayudar a la preservación de la salud o incluso mejorarla, convirtiéndose

en una muy interesante alternativa además de aportar macro y micronutrientes, también serían una fuente muy adecuada de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL), omega-3, principalmente de ácido docosahexaenoico (DHA), en la forma de triglicéridos y de fosfolípidos de alta biodisponibilidad, en forma limpia, eficiente y renovable.

Estas características transforman a las microalgas en una modalidad de suplementación nutricional para la alimentación tanto humana como animal (Valenzuela, Sanhueza, & Valenzuela, 2013).

Arthrospira spp. y *Chlorella spp.* Son cultivadas extensamente para uso alimenticio. Mientras que *Arthrospira spp.* posee grandes cantidades de 18:3n6 (GLA), tiene falta de cantidades de ácidos grasos omega-3, tales como el ácido eicosapentaenoico (20:5n3, EPA o el ácido docohexanoico (22:6n3, DHA). La especie más empleada para este fin es la cianobacteria *Spirulina*, la cual se usa como alimento de alto valor proteico en poblaciones de México y África Central.

Actualmente, en muchos países se extrae la biomasa microalgal en forma tecnificada en grandes piscinas de cultivo. Los principales productores son EE.UU., Japón, India, China, entre otros. Estudios y producciones importantes se realizan también en Rusia, Francia, Alemania, Israel, Italia y España, por mencionar algunos (Ponce, 2013).

Arthrospira spp. Cuando es incorporada en los alimentos ayuda al tránsito digestivo estimulando el desarrollo de diferentes especies de *Lactobacillus spp.*, también presenta diversas

aplicaciones terapéuticas. Así, se comercializan compuestos nutraceuticos con propiedades como la protección anticancerígena por su contenido en b-caroteno (Richmond y Becker, 1986), la prevención de malnutrición en vitamina A y niveles de azúcar en sangre, la estimulación de ciertas prostaglandinas (PGE1), la prevención de enfermedades degenerativas y la cicatrización acelerada de heridas (Yoshida, 1977).

Producción de biodiesel a partir de microalgas.

Se sabe que el uso excesivo de combustibles ha generado una gran problemática ambiental a nivel de desechos y el cambio climático causado por gases invernadero. Este hecho no sorprende, conociendo que los combustibles usados en el mercado, provienen en un 90% de recursos fósiles (Barraza, Collao, Espinoza, Moya, Thun, & Torres, 2009).

Surge entonces como alternativa sostenible el uso de microalgas como fuente primaria para la producción de biocombustibles. Gracias a que estos microorganismos pueden llegar a generar un alto número de biomasa, consecuencia de la transformación de la energía solar en compuestos carbonados, la acumulación de lípidos y triacilglicerolos que pueden ser transformados en bioetanol, biometanol y biodisel (Maity, Bundschuh, Chen, & Bhattacharya, 2014).

Microalgas como biofertilizante,

Otra aplicación es la de biofertilizante (Abdel-Raouf, Al-Homaidan, & Ibraheem., 2012). Algunas tecnologías de conversión de la biomasa microalgal, especialmente la pirólisis, originan un residuo carbonoso que tiene aplicaciones potenciales en agricultura como biofertilizante,

aprovechando la capacidad de las cianobacterias para fijar el nitrógeno atmosférico y para controlar la erosión.

Algunos de sus extractos se han revelado como buenos promotores de la germinación y la floración (Brenan & Owende, 2010).

Algunas técnicas de conversión (especialmente la pirólisis) producen carbón vegetal, llamado Biochar o Biocarbón, que posee un alto potencial como fertilizante en la agricultura (Brenan & Owende, 2010).

Microalgas en la industria de la cosmética.

Algunas especies de microalgas son utilizadas en la industria de la cosmética para el cuidado de la piel, tales como *Arthrospira spp.* y *Chlorella spp.* (i.e., cremas antiedad, productos refrescantes o regenerantes de la piel, emolientes y antiirritantes). Extractos ricos en proteínas de

Arthrospira spp. reparan los signos prematuros de envejecimiento de la piel, ejercen un efecto tensor y previenen la formación de estrías. Extractos de *C. vulgaris* estimulan la síntesis de colágeno, apoyando la regeneración de tejidos y la reducción de arrugas, mientras que *Nannochloropsis oculata* posee excelentes propiedades para el estiramiento de la piel (Spolaore, Joannis, Duran, & Isambert, 2006).

Ácidos grasos poliinsaturados.

Los ácidos poliinsaturados (PUFAs por sus siglas en inglés Poly- Unsaturated Fatty Acids) son esenciales en el desarrollo y fisiología humana, además de tener un rol importante en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Actualmente, las fuentes más importantes de estos compuestos son los peces, donde la utilización de sus aceites es limitada debido al riesgo de acumulación de toxinas en el pez, olor y sabor a pescado, pobre estabilidad oxidativa y mezcla entre diferentes tipos de ácidos grasos (Brenan & Owende, 2010) (Spolaore, Joannis, Duran, & Isambert, 2006).

Es destacable que de hecho, los PUFAs se encuentran en los peces debido a la alimentación de microalgas, por lo que es lógico considerar a las microalgas como potenciales fuentes de estos componentes esenciales (Spolaore, Joannis, Duran, & Isambert, 2006). Las microalgas son una fuente importante de estos ácidos aunque, actualmente, el ácido docosahexaenoico (DHA) es el único disponible comercialmente (Brenan & Owende, 2010) (Spolaore, Joannis, Duran, & Isambert, 2006).

Cherng & Shih (2005) en estudios en ratones y hámsteres, determinaron que la alimentación con *Chlorella* spp era beneficiosa para estos animales, disminuyendo la cantidad de triglicéridos, colesterol total y colesterol LDL, previniendo hiperlipidemia y arteriosclerosis.

Pigmentos carotenoides y ficobiliproteínas.

De los más de 400 tipos de los pigmentos carotenoides, solo unos pocos son comercializados: β -caroteno, astaxantina y en menor importancia, luteína, zeaxantina y bixina. El

uso más importante de éstos es como colorante natural para alimentos y como aditivo para animales y en cosmética. La relevancia nutricional y terapéutica de algunos carotenoides radica en su capacidad de actuar como provitamina A, convirtiéndose en vitamina A. Además, poseen propiedades antiinflamatorias y se les ha atribuido propiedades anticancerígenas, aunque esto último aún está en investigación (Spolaore, Joannis, Duran, & Isambert, 2006).

Los mayores productores comerciales de ficobiliproteínas (ficoeritrina y ficocianina) son:

La cianobacteria Arthrospira spp y la rodophyta Porphyridium spp. La principal aplicación de estos compuestos es como colorante natural, pero han aumentado las investigaciones sobre sus propiedades en la salud humana ampliando su consumo al mercado farmacológico (Spolaore, Joannis, Duran, & Isambert, 2006).

Cultivo.

Las microalgas se pueden cultivar de manera fotoautótrofa, heterótrofa o en condiciones de mixotrofia. Según (Brenan & Owende, 2010) la producción fotoautótrofa es hoy en día el único método de producción de microalgas a gran escala que resulta económicamente rentable y técnicamente viable en el caso de que no haya producción de energía.

Muchos factores contribuyen para el desarrollo óptimo de los cultivos de microalgas, algunos de éstos afectan las características del crecimiento.

En cultivos masivos la aireación es un factor muy importante para la homogenización de los nutrientes y para evitar la sedimentación de las microalgas. Las diatomeas suelen acumularse en lugares donde el agua no se mezcla, esto también depende de la forma del recipiente de cultivo que cuando no es adecuado retarda el crecimiento.

Otro factor importante es la penetración de la luz en el cultivo; en los cultivos masivos la profundidad es tan grande que la intensidad de la luz incidente no es suficiente para la fotosíntesis, hasta el fondo del tanque. En los cultivos masivos a la intemperie la penetración de la luz es más efectiva, pero se debe reducir la intensidad de la luz fuerte, cubriendo estos estanques con una malla. En cultivos a gran escala es recomendable la inyección de CO₂ (0.5%) para contribuir al proceso fotosintético.

Respecto a los sistemas de cultivo, éstos se suelen clasificar, según su configuración y tipo de funcionamiento, en cultivo abierto (canales o estanques) y fotobiorreactores. Los cultivos abiertos son una tecnología relativamente simple que consiste en realizar el cultivo de microalgas en estanques o en canales de unos 20 a 50 centímetros de profundidad. Los fotobiorreactores, por el contrario, se basan en el cultivo de algas en espacios cerrados con geometrías de diverso tipo.

La elección de un diseño óptimo de fotobiorreactor para el cultivo masivo de microalgas es un factor importante que rige la productividad general fotosintética.

Fotobioreactores.

Los fotobioreactores de tipo tubular son el diseño más sustentable para cultivos en sistemas cerrados; tienen un gran área de iluminación con una buena tasa de producción de biomasa y son relativamente económicos puesto que son construidos en vidrio o plástico (Pulz & Gross, 2004).

El diseño de tipo flat-plate es generalmente construido con materiales transparentes con la finalidad de maximizar el empleo de la luz solar. Este tipo de reactores permite una buena inmovilización de las microalgas y una sustentable utilización de la energía, además de un fácil mantenimiento y limpieza (Reyna, Cristiani, Hernández, Thalasso, & Cañizares, 2010).

Los diseños de tipo columna vertical son compactos, económicos y fáciles de operar, lo que los hace factibles al escalamiento (Ugwu, Aoyagi, & Uchiyama, 2008).

Los fotobioreactores cerrados proporcionan muchas ventajas como mayor disponibilidad de luz (alta relación superficie/ volumen), control de temperatura, alta concentración de biomasa, disminución de costos en la cosecha, baja tasa de contaminación, y facilidad de automatizar el proceso con el fin de lograr una mejor utilización de la energía solar y temperatura en todo momento.

Por lo tanto, el propósito del diseño y desarrollo de los fotobioreactores a condiciones ambientales es aprovechar la luz solar, disminuir costos y lograr la máxima producción de algas. En comparación con los reactores clásicos que generan grandes gradientes de esfuerzo de corte que causan en las células tensión mecánica en áreas de alta turbulencia, en los reactores de tipo

Airlift no hay puntos de disipación de energía y los esfuerzos de corte son homogéneos por lo que causan poco estrés celular.

En las regiones relativamente cálidas, donde se produce la mayor parte de la biomasa algal, se ha supuesto que el principal factor limitante para el crecimiento es la luz. Muchos estudios han tratado de aumentar la luz disponible para las células de las algas cultivadas a condiciones ambientales (Oliveira et al, 2015).

La producción en masa de Arthrospira spp. En estanques tiene una producción anual estimada de 8000 toneladas métricas. Un mayor desarrollo de esta industria es dependiente de la capacidad de reducir los costos de producción con el fin de permitir la comercialización.

Arthrospira spp. Una forma de lograr este objetivo es mediante el aumento de la productividad de los cultivos a condiciones ambientales mediante la superación de los factores ambientales limitantes como la temperatura y luz. Los cultivos de algas a condiciones ambientales están expuestos a fluctuaciones diurnas de la luz que pueden limitar no sólo la luz, sino también causar fotoinhibición del cultivo durante una parte significativa del día (Oliveira et al, 2015).

Capítulo III

Metodología

La metodología que se llevó a cabo en la investigación se describe a continuación:

Para dar cumplimiento al primer objetivo: Selección de los elementos del bioproceso para la obtención de biomasa microalgal se desarrollaron las siguientes actividades.

Selección de la Microalga

Se utilizó una cepa nativa colombiana de *Arthrospira maxima*. suministrada por el laboratorio del Centro de Biotecnología de la Universidad de Pamplona.

Selección de los Medios de cultivo

Se seleccionaron dos medios de cultivo:

Medio de cultivo 1.

Medio de cultivo comercial para Espirulina.

Solución madre de elementos traza (500ml)

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,018g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,010g), $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,016g).

Solución FeEDTA (100ml)

$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,455g), $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,058g).

La preparación de 1 litro de medio completo se realiza en dos partes.

Primera parte (200ml).

NaHCO_3 (13,61g), NaCO_3 (4,03g), K_2HPO_4 (0,5g).

Segunda parte (800ml)

NaNO_3 (2,5g), K_2SO_4 (1g), NaCl (1g), $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2g), $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,04g), elementos traza 1ml, solución de hierro 1ml.

Se esterilizo a 121°C y 15 LP por 15min cada parte. Almacenándola a temperatura ambiente.

Fuente: Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia.

Medio de cultivo 2.

(ESPCEBIO17).

El medio 2 o medio económico está compuesto por los mismos ingredientes de la parte B del medio de cultivo 1 o medio comercial y una parte A de composición definida la cual se encuentra en total reversa por el laboratorio (PACEBIO). La preparación y esterilización se realiza de igual forma que el medio 1.

Selección del Fotoreactor airlift.

Se trabajó con reactores airlift de 20 litros de capacidad (figura 1) en condiciones controladas de temperatura (20°C), flujo de aire (1 L/min), a una densidad de flujo fotónico (DFF) de 250 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, durante un periodo de 30 días.



Figura 1. Fotoreactor Airlift. Laboratorio Centro de Biotecnología. Universidad de Pamplona. Castillo, R. 2018.

Para el cumplimiento del segundo objetivo específico: la realización de la cinética de crecimiento de la microalga se desarrollaron las siguientes actividades.

Realización de las cinéticas de crecimiento para la puesta en marcha del bioproceso

Curva de correlación.

Inicialmente se realizó una curva de correlación entre un método de crecimiento microbiano directo (peso seco) y uno indirecto (Turbidimetría por densidad óptica).

A partir de una solución concentrada de la microalga de un mes de cultivo se realizan diluciones seriadas de 2 en 2. A cada una de las diluciones (patrones) se le determino el Peso Seco y la Densidad óptica a 600 nm. (Ver figura 2). Elaboración de patrones de *Arthrospira maxima* se realizo por duplicado.



Figura 2. Patrones de *Arthrospira maxima*. Laboratorio centro de biotecnología. Universidad de Pamplona. Castillo, R. 2018.

Peso seco.

Para la determinación del peso seco se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se colocaron los filtros GF/C circles 47mm cat no 1822 047 a 60 grados Celsius por 24 horas en la incubadora binder. (Ver figura 3).



Figura 3. Incubadora BINDER. Laboratorio Centro de Biotecnología. Universidad de Pamplona. Castillo, R. 2018.

Posteriormente se ubicaron en un desecador para mantener limpios y deshidratados los filtros (ver figura 4).



Figura 4. Desecador. Laboratorio Centro de Biotecnología. Universidad de Pamplona. Castillo, R. 2018.

Luego se pesaron los filtros hasta obtener peso constante (peso inicial).

Posteriormente utilizando el método de filtración por membrana se hizo pasar cada uno de los patrones por el sistema y obtener los filtros con las respectivas biomasas (ver figura 5).



Figura 5. Montaje de Filtración por Membrana. Laboratorio Centro Biotecnología. Universidad de Pamplona. Castillo, R. 2018.

Luego se ubicaron los filtros nuevamente a 60 grados Celsius por 24 horas en la incubadora, se llevaron al desecador hasta peso constante y finalmente se obtuvo la diferencia entre el peso final y el peso inicial.

Peso final- peso inicial = peso seco del patrón respectivo.

Densidad óptica (D.O.).

Se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10uv (ver figura 6) y se realizaron las determinaciones a 600 nm con blanco de medio de cultivo respectivo.



Figura 6. Espectrofotómetro Genesys 10uv. Laboratorio Centro de Biotecnología. Universidad de Pamplona.

Castillo, R. 2018.

Los resultados de cada patrón (densidad óptica y peso seco) se consignaron en una tabla para el posterior análisis estadístico y la obtención de la curva de correlación.

Cinética de crecimiento.

Luego se montaron dos fotoreactores airlift de 20 litros (medio económico y medio enriquecido) bajo las siguientes condiciones: temperatura (20°C), flujo de aire (1 L/min), a una densidad de flujo fotónico (DFP) de $250 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, durante un periodo de 24 días y se realizó el seguimiento del crecimiento indirectamente a través de la determinación de la densidad óptica y utilizando la curva de correlación.

Los resultados obtenidos fueron graficados para determinar el crecimiento de la cianobacteria en función del tiempo.

Producción de la biomasa microalgal.

Para la producción de la biomasa microalgal se pusieron en marcha los dos fotoreactores airlift (medio de cultivo 1 y 2) bajo las condiciones mencionadas anteriormente. (Ver figura 7).



Figura 7. Fotoreactor Airlift día 1. Laboratorio Centro de Biotecnología. Universidad de Pamplona. Castillo, R. 2018.

Luego se realizó la recuperación de la biomasa por filtración con lienzo fino y su posterior secado en horno seco a 45 grados Celsius durante 12 horas. Posteriormente se llevó a cabo el macerado de la biomasa microalgal seca con ayuda de un mortero, se guardó en una bolsa ziploc, se cubrió con papel aluminio y se almaceno en la nevera.

Para el cumplimiento del tercer objetivo: Caracterización bromatológica y microbiológica de la biomasa microalgal producida se llevaron a cabo las siguientes actividades.

Análisis bromatológico.

Los análisis bromatológicos que se realizaron fueron los siguientes.

Determinación de la Humedad.

Se determinó por medio de secado en estufa siguiendo la metodología descrita en la Norma internacional AOAC 925.10 18th Edición.

Fundamento. La determinación de la humedad en sustancias orgánicas e inorgánicas se basa en la pérdida de peso que experimenta una porción inicial de muestra luego de ser sometido a una operación de secado bajo ciertas condiciones de presión y temperatura. (Ver procedimiento Apéndice A).

Determinación de cenizas.

Se realizó en un horno hasta peso constante siguiendo la Norma internacional AOAC 923.03 18th Edición.

Fundamento. Se basa en la eliminación de materia orgánica y la humedad contenida en una muestra por calentamiento a temperaturas entre 500°C Y 700°C. (Ver procedimiento en Apéndice B).

Determinación de la proteína.

La proteína se realizó por el método de Kjeldahl, procedimiento interno validado GOMEPH.01, versión 5,2014-04-23 basado en AOAC 920.87 Ed.18:2005.

Fundamento. El método kjeldahl es un proceso de análisis químico para determinar el contenido en nitrógeno de una muestra, el contenido en proteína se puede calcular seguidamente, presuponiendo una proporción entre la proteína y el nitrógeno para el alimento específico que está siendo analizado (Ver procedimiento en Apéndice C).

Determinación de la grasa.

Se determinó por extracción con solvente en equipo Soxhlet siguiendo la Norma internacional AOAC 920.85 Ed.18:2005.

Fundamento. Es una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente. Posteriormente éste es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso (Ver apéndice D).

Determinación de la fibra cruda.

Se llevó a cabo siguiendo la norma internacional AOAC 930.20 18Th Edición mediante una hidrólisis básica y ácida a la muestra.

Fundamento. Su determinación se basa en la simulación de la digestión en el organismo por tratamientos ácidos y alcalinos, separando los constituyentes solubles de los insolubles que constituyen los desperdicios orgánicos a través de las heces. (Ver procedimiento en Apéndice E).

Determinación de los carbohidratos totales y el valor calórico.

Fueron calculados matemáticamente según la resolución 333 del 2011 del Ministerio de Protección Social.

Perfil de ácidos grasos.

Procedimiento. Se pesó 6 g de biomasa liofilizada de la microalga y se le añadió 210 ml de la mezcla de solventes cloroformo/metanol 1:2, este preparado se le colocó en un baño de ultrasonido con hielo por espacio de 15 min y luego se le guardó en una congeladora durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se repitió el baño de ultrasonido con hielo por espacio de 15min, luego se filtró el preparado en un filtro de celulosa regenerada de 0.45. Se añadió agua ultrapura al extracto lipídico en relación de 2mL H₂O/4.5mL de filtrado y se separó la fase orgánica.

Se evaporó el cloroformo de la fase orgánica con nitrógeno gas y se almacenó los lípidos secos en un desecador al vacío cubierto con una manta oscura durante toda la noche. Al día siguiente se pesó 0.2500g de los lípidos secos en una fiola de 25ml y se le enrasó con cloroformo, obteniendo la muestra en una concentración de 10 mg/ml en cloroformo.

Derivatización de los ácidos grasos. A un tubo de ensayo de 10 ml con tapa de teflón, se le añadió 1 mg (100 µl) de la muestra preparada en cloroformo (10 mg/ml cloroformo) y 100 µg (100 µl) del estándar interno C23:0 (1 mg/ml cloroformo). Se evaporó el solvente con nitrógeno gas hasta sequedad y se le añadió 0.2ml de tolueno, se agitó el tubo a 500 rpm con el vortex durante

10 s, seguidamente se le añadió 1.5ml de metanol y se le agitó a 500 rpm con el vortex durante 10 s. Luego, se le añadió 0.3ml del catalizador constituido por una mezcla de 9.7ml de ácido clorhídrico 37% y 41.5ml metanol.

Se usó nitrógeno gas para desplazar el aire dentro del tubo por espacio de 1 min y se agitó a 800rpm con el vortex durante 1 min. Se colocó el tubo en baño maría a 45 °C por 16 horas. Al día siguiente se retiró el tubo y se le dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se le añadió 1.5ml de hexano, se desplazó el aire con nitrógeno gas por 1 min y se agitó a 800rpm con el vortex durante 60s. Luego se le añadió 1 ml de agua ultrapura, se desplazó el aire con nitrógeno gas por 1 min y se agitó a 800rpm con el vortex durante 60s. Se centrifugó el tubo a 1500rpm durante 5min y se separó la fase orgánica a un vial de 2ml con tapa de teflón con la ayuda de una pipeta Pasteur. Esta prueba se realizó por duplicado.

Análisis Microbiológicos.

De igual forma se realizó un análisis microbiológico de las biomasas obtenidas. Estos análisis consistieron en: bacterias aerobias totales, mohos y levaduras, bacterias coliformes totales y bacterias coliformes fecales por el método de recuento en placa.

Procedimiento.

El procedimiento se realizó de la siguiente manera. Se tomó 1gramo de cada una de las biomasas, se adiciono a 90 ml de agua peptonada para formar la dilución 10E1; posteriormente se transfirió 1 ml de esta dilución a un tubo con agua pectonada con 9 ml para formar la dilución 10E2 y así sucesivamente hasta alcanzar la dilución 10E5.

Luego a partir de cada una de las diluciones se siembran 0,1 ml de cada dilución y se extiende homogéneamente sobre la superficie con un asa hockey en los medios respectivos (Mohos y levaduras, Rosa de bengala, incubación a 25 grados Celsius por 5 días; Bacterias coliformes fecales y totales, agar Chromocult, incubación a 36 grados Celsius por un periodo de 24-48 horas; *Salmonella* spp, agar Salmonella-Shigella, incubación a 36 grados Celsius por un periodo de 24-48 horas ;Aerobios totales Plate count agar, incubación 36 grados Celsius por un periodo de 24-48 horas).

Análisis costo beneficio.

Se realizó una investigación cuantitativa de producción donde se determinaron costos directos e indirectos como son la mano de obra, los costos de la materia prima y los costos indirectos de fabricación de las biomasas producidas a partir de los dos medios ensayados.

Análisis Estadísticos.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se aplicó un análisis estadístico de regresión lineal para la obtención de la curva de correlación. Esta es una técnica utilizada para estudiar la relación entre variables, con el propósito de estimar el valor promedio de una variable, variable dependiente, con base en los valores de una o más variables adicionales, variables explicativa

Capítulo IV

Resultados y discusión

Los resultados de la investigación se analizan a continuación.

Selección de los elementos del bioproceso

Las figuras 8 y 9 muestran los elementos seleccionados para el bioproceso.



Figura 8. Fotoreactor Airlift con los Medios Seleccionados. Castillo, R. 2018.



Figura 9. Observación Microscópica de *Arthrospira maxima*. Castillo, R. 2018.

Curva de correlación

Los resultados de los de patrones de *Arthrospira maxima* por duplicado (serie 1 y serie 2) se muestran en la tabla 3 y 4.

Tabla 3.

Peso seco y densidad óptica de la serie 1 de patrones de Arthrospira maxima.

A	PESO FILTRO	PESO BIOMASA + FILTRO	PESO SECO	D.O
1	0,091	0,117	0,026	0,576
2	0,092	0,1091	0,0171	0,279
3	0,09	0,1043	0,0143	0,167
4	0,091	0,1038	0,0128	0,072
5	0,091	0,1021	0,0111	0,047

6	0,089	0,101	0,012	0,019
7	0,089	0,1003	0,0113	0,011
8	0,09	0,098	0,008	0,005

Fuente: Castillo, R. 2018.

Tabla 4.

Peso seco y densidad óptica de la serie 2 de patrones de Arthrospira maxima.

B	PESO FILTRO	PESO BIOMASA + FILTRO	PESO SECO	D.O
1	0,089	0,1219	0,0329	0,597
2	0,089	0,108	0,019	0,304
3	0,091	0,1075	0,0165	0,159
4	0,09	0,1067	0,0167	0,079
5	0,091	0,1061	0,0151	0,032
6	0,089	0,1055	0,0165	0,021
7	0,09	0,1049	0,0149	0,01
8	0,089	0,1025	0,0135	0,004

Fuente: Castillo, R. 2018.

Posteriormente se realizó un análisis estadístico de regresión lineal a los valores de peso seco y densidad óptica de las dos series de patrones, para la obtención de la curva de correlación correspondiente (Ver tabla 5).

Tabla 5.

Paralelo entre los resultados del análisis de regresión lineal y correlación lineal aplicado a las dos series de patrones.

	SERIE 1	SERIE 2
Correlación	0,98	0,95
R ajustado	95.09%	88.87%

Fuente: Castillo, R. 2018.

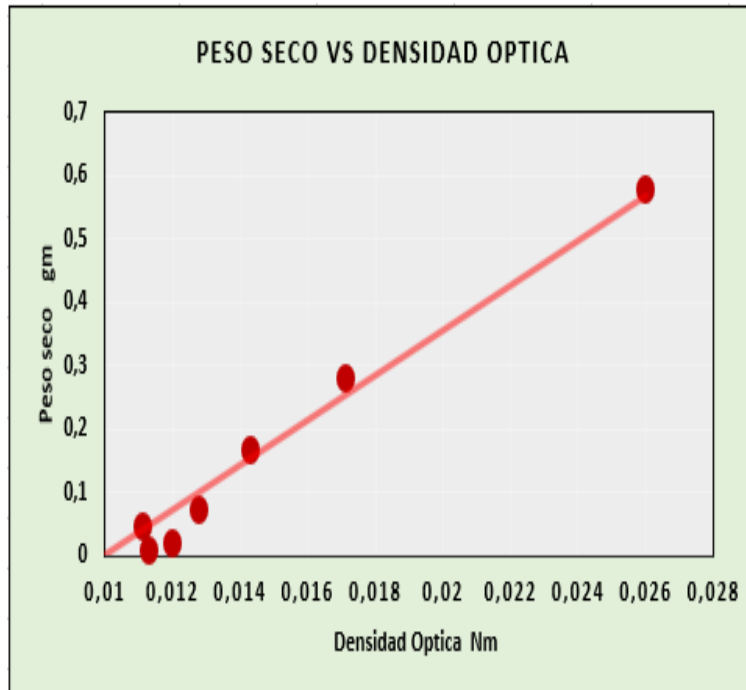
La tabla 5, muestra diferencias entre los valores correspondientes a la correlación lineal y al coeficiente de determinación o porcentaje de varianza R^2 , dichos coeficientes indican el porcentaje en el cual los conjuntos de datos se encuentran relacionados el uno con el otro, los patrones de la serie 1 presenta un coeficiente de correlación lineal de aproximadamente un 98%, lo que me indica que existe una correlación lineal aproximadamente del 98% entre la densidad óptica y el peso seco, mientras que en la serie 2 encontramos un valor aproximado de 95%, lo que me estaría indicando una correlación lineal del 95% entre la densidad óptica y el peso seco.

Para la serie 1 el coeficiente de determinación R^2 fue aproximadamente de 95%, lo que me estaría indicando que en un 95% la densidad óptica estaría haciendo variar el peso seco, en el caso de la serie 2 encontramos un 89% aproximadamente, lo cual me estaría indicando que en un 89% la densidad óptica está haciendo variar al peso seco.

Dichas diferencias indican que los patrones de la serie 1 evidencia un mayor ajuste entre sus dos conjuntos de datos.

Por lo anterior se realiza la línea de tendencia para los patrones de la serie 1.

Por otra parte la figura 10 muestra la línea de tendencia de los patrones de la serie 1.



$$\text{peso seco} = 0,0101 + 0,0272 \times \text{DO}$$

Figura 10. Línea de tendencia entre el peso seco y la densidad óptica de los patrones de la serie 1. Castillo, R. 2018.

En la figura 10 encontramos la ecuación del modelo matemático, la cual me permite estimar el peso seco a través de la densidad óptica para la producción de biomasa de *Arthrospira maxima*.

Cinética de crecimiento

Los resultados del monitoreo de los dos bioprocesos (medio comercial A y medio económico B) en un periodo de 24 días se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.

Producción de biomasa de Arthrospira maxima en el medio comercial y el medio económico durante 24 días.

DIA	COMERCIAL A		ECONOMICO B	
	D.O	PESO SECO	D.O	PESO SECO
1	0,032	0,0109704	0,049	0,0114328
4	0,11	0,013092	0,085	0,012412
7	0,198	0,0154856	0,202	0,0155944
9	0,282	0,0177704	0,372	0,0202184
11	0,379	0,0204088	0,52	0,024244
14	0,532	0,0245704	0,64	0,027508
18	0,736	0,0301192	0,923	0,0352056
21	0,938	0,0356136	1,171	0,0419512
24	1,056	0,0388232	1,328	0,0462216

Fuente: Castillo, R. 2018.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento se realizó el montaje durante 24 días para la obtención de las biomásas y posteriores análisis bromatológicos.

Los resultados se muestran en la figura 11.

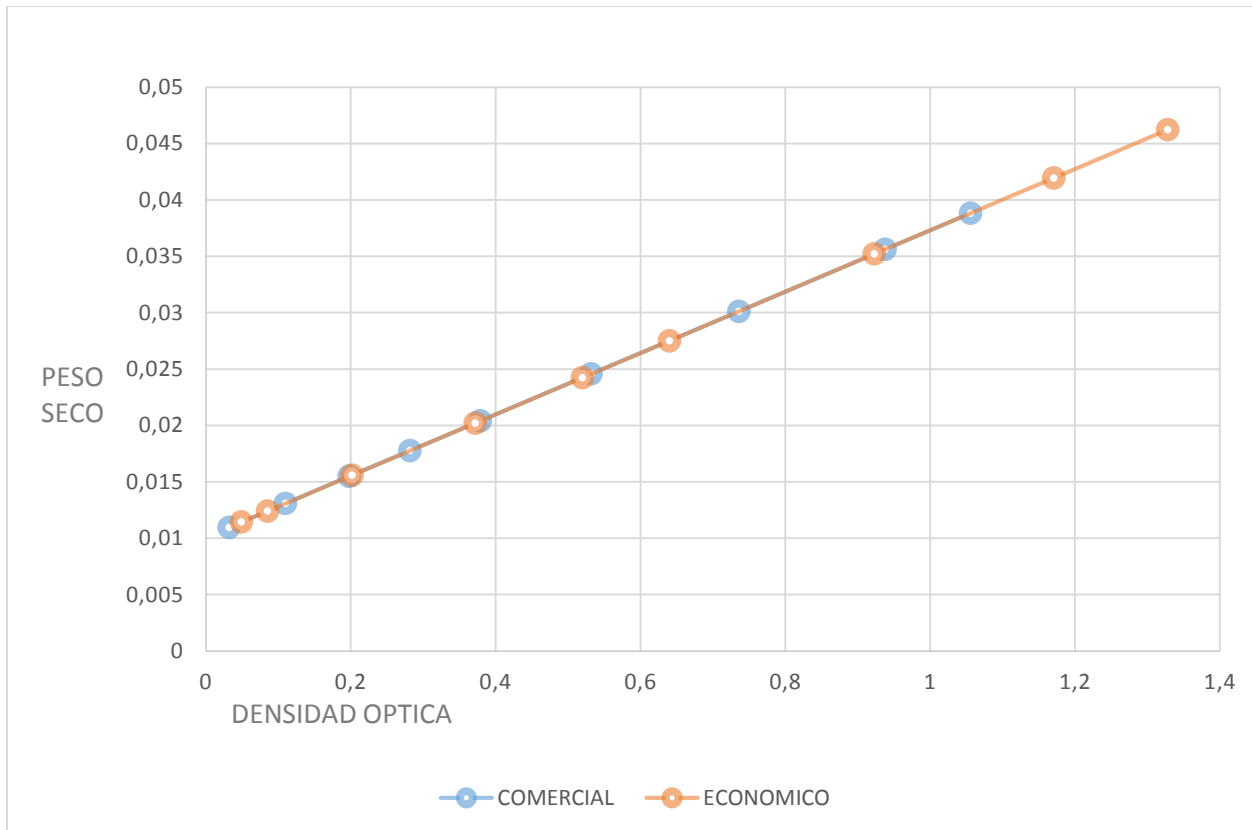


Figura 11. Contraste entre los valores de peso seco obtenidos a partir de dos medios (Comercial A y Económico B).

Castillo, R. 2018.

La figura 11, muestra la correlación entre los valores de peso seco del medio comercial y el medio económico, donde se puede observar un mejor comportamiento en cuanto a la producción de biomasa por parte del medio económico alcanzando un valor de 46,22 gramos por 20 litros en un periodo de 24 días, lo que equivale a 2,31 gramos por litro de cultivo, en contraste con el

medio comercial que solo consiguió 38,82 gramos en el mismo periodo de tiempo, un equivalente a 1,941 gramos por litro de cultivo. Resultados muy similares a los obtenidos por (Prakash & Tiwari, 2010).

En condiciones de aireación constante y en un periodo de tiempo similar obtuvieron una relación de 2,35 gramos por litro de cultivo de biomasa seca. Así mismo, un estudio realizado por (Colorado & Moreno, 2017) obtuvieron en promedio una relación de 1,2 gramos de biomasa seca de *Arthrospira maxima* por cada litro de cultivo de 8 días en fotobioreactores de 50 litros mediante un cultivo escalonado, un resultado similar al obtenido por parte del medio económico que obtuvo una relación de 1,02 gramos de biomasa por litro en 8 días.

Por lo expuesto anteriormente se puede evidenciar una clara diferencia entre los resultados obtenidos en lo que respecta a la producción de biomasa en los dos medios (comercial y económico), pero no se puede definir dicha diferencia como significativa, por tal motivo se ha llevado a cabo una ANOVA de un factor para estimar si existió diferencias entre las dos producciones de biomasa (Ver tabla 7).

Tabla 7.

Prueba ANOVA de un factor.

TÉCNICA ESTADÍSTICA: ANOVA DE UN FACTOR				
SOFTWARE ESTADÍSTICO: SPSS, STATISTIX				
NIVEL DE SIGNIFICANCIA: 5%				
VARIABLE DEPENDIENTE: PESO SECO				
Contraste de hipótesis				
$H_0: \mu_{comercial} = \mu_{Económico}$				
$H_1: \mu_{comercial} \neq \mu_{Económica}$				
FACTOR	NIVELES	PROMEDIOS	P-VALOR	INTERPRETACION
TIPO DE BIOMASA	COMERCIAL	0,0210	0,2426	NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.
	ECONÓMICA	0,0274		

Fuente: Castillo, R. 2018.

La tabla 7, muestra un P-Valor=0,2426, por encima del nivel de significancia del 5% por consiguiente no existe diferencias significativas entre las dos muestras de datos.

La figura 12 muestra el crecimiento de la cianobacteria en los dos medios ensayados.

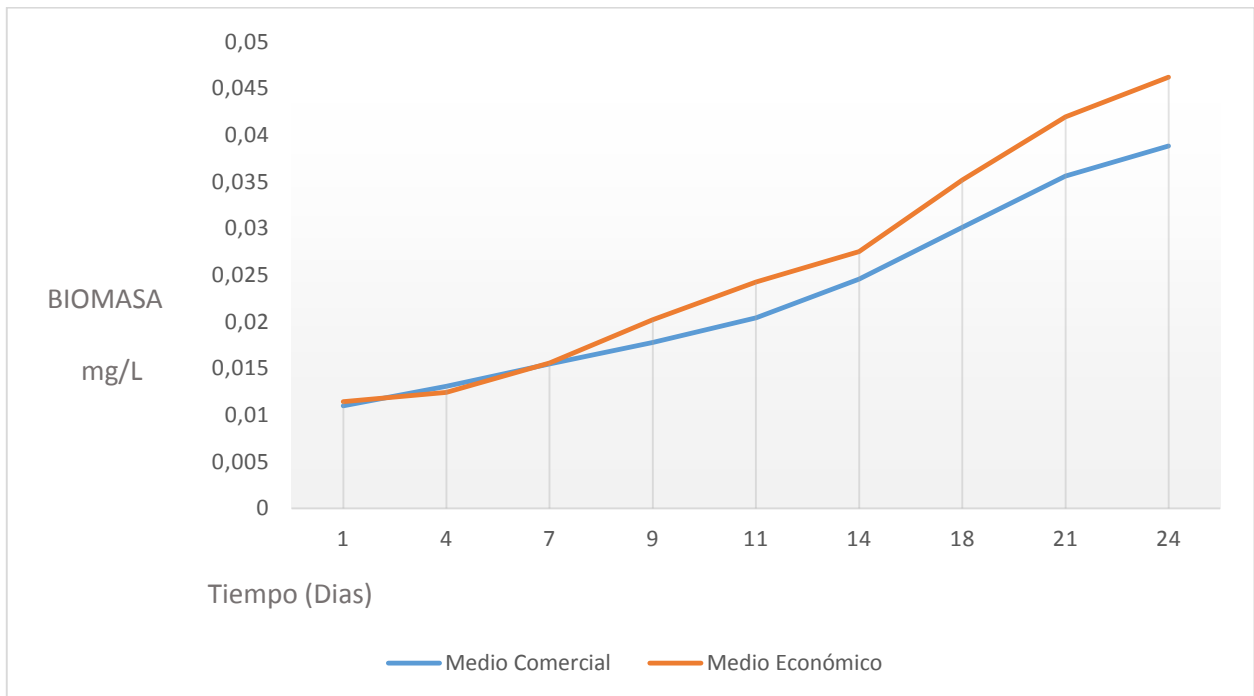


Figura 12. Cinética de crecimiento entre el medio comercial y el medio económico. Castillo, R. 2018.

Se observa un comportamiento estable hasta el séptimo día correspondiente a la fase de adaptación, fase en la cual el cultivo de *Arthrospira maxima* se acopla a las condiciones establecidas, a partir de la cual comienza a darse una marcada diferencia en los dos medios a favor del medio económico, la cual se sostiene hasta el día 24 donde se alcanza la fase estacionaria en la cual no se experimenta un cambio en el crecimiento celular. El medio económico evidencio una fase exponencial definida desde el 1 al día 24, alcanzando una concentración celular de 46,22 gramos por 20 litro de cultivo, por otra parte el medio comercial en ese mismo periodo alcanza una concentración celular de 38,82 gramos por 20 litro de cultivo.

Análisis bromatológico

Los resultados de los análisis bromatológicos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8.

Resultados análisis bromatológicos de la biomasa obtenida a partir de medio comercial y el medio económico, realizados en el laboratorio de alimentos CICTA de la universidad industrial de Santander UIS. Ver apéndice F,G,H,I.

Parámetros	Unidad	Método de analisis	Resultados	Resultados
			medio enriquecido	medio económico
Humedad	%	gravimétrico	11,51	11,06
Ceniza	%	gravimétrico	20,67	20,03
Grasa	%	extracción por Soxhlet	1,35	1,22
Nitrógeno	%	kjeldahl	7,1741	7,932
Proteína	%		44,84	49,58
Fibra	%	hidrólisis acida y básica	0,39	0,28
Carbohidratos	%		21,64	18,12
Totales				
Valor calórico	kcal/100 g muestra		278,01	281,77

Fuente: Castillo, R. 2018.

Los resultados muestran un valor proteico alto en las dos biomasas analizadas, la biomasa correspondiente al medio económico presento un valor de 49,58% y la biomasa correspondiente al medio comercial un 44,84%, en comparación con otras fuentes de proteína como el germen de trigo con un contenido proteico de 27% o la soya entera en harina con un contenido proteico de 35%, el resultado obtenido en las dos biomasas evidencia una concentración excepcional, que ubica a *Arthrospira maxima* como una buena alternativa para la alimentación de especies menores por su alto contenido proteico, por otro lado esta cianobacteria no contiene paredes celulósicas, sino por el contrario presentan una cubierta de mureina, que facilita la buena digestibilidad de sus proteínas, que es del 83 al 90%.

Así mismo el contenido proteico de 49,58% obtenido en la biomasa a partir del medio económico fue mayor en comparación al 44,84% obtenido en la biomasa a partir del medio comercial con una diferencia de 4,74% de contenido a favor del medio económico.

La producción de proteína obtenida a partir del medio económico fue de 49,58% muy similar a la reportada por (Colorado & Moreno, 2017), donde el rendimiento fue de 50,1% empleando el medio Zaurrock con un fotoperiodo 12:12 y al empleado por (Madkou, Kamil, & Nasr., 2012) donde se obtuvo un rendimiento del 52,62% empleando medio Zaurrock modificado con un fotoperiodo 12:12 por un lapso de 33 días, así mismo el rendimiento resulto ser igual al obtenido por (Torres & Correa, 2008) con un valor proteico de 49,50% empleando el medio urea. Por otra parte (Prakash & Tiwari, 2010) obtuvieron un valor porcentual de proteína de 61,3% en condiciones de aireación constante.

El valor de humedad obtenido en la biomasa a partir del medio económico fue de 11,06% mientras que el obtenido en la biomasa a partir del medio comercial fue de 11,51%, ambos resultados estuvieron por encima de lo permitido según la norma colombiana NTC4888-2000 donde el contenido máximo de humedad en alimentos concentrados es del 10.20%. lo que indica que para estudios posteriores hay que establecer un mejor protocolo de secado de la biomasa debido que un alto contenido de humedad me puede ocasionar focos de contaminación en la muestra.

El porcentaje de carbohidratos de la biomasa obtenida a partir del medio económico fue de 18,12% y el porcentaje obtenido en la biomasa comercial fue de 21,64% en ambos casos fue mayor a la reportada por (Colorado & Moreno, 2017), donde el rendimiento fue del 14,6% empleando el medio Zaurrock con un fotoperiodo 12:12.

Análisis de ácidos grasos

La tabla 9 muestra el perfil de ácidos grasos realizado a las muestras producidas.

Tabla 9.

Perfil lipídico Arthrospira maxima.

	Ácidos grasos (% ésteres metílicos)						
	<i>Cáprico</i>	<i>Palmítico</i>	<i>Palmitoleico</i>	<i>Linoleico</i>	<i>Gamma</i>	<i>ARA</i>	<i>EPA</i>
	C10:0	C16:0	C16:1n7	C18:2	C18:3n6	C20:4n	C20
				cis		6	:5
Medio Comercial	4,92	29,68	3,09	13,4	18,18	0,66	1,1
Medio Económico	5,06	28,94	3,47	14,39	18,75	0,48	0,7
Medio Económico	5,43	31,15	3,58	14,86	19,76	0,32	0,95

Fuente: Castillo, R. 2018.

La tabla 9, representa el perfil lipídico de *Arthrospira maxima*, donde los ácidos grasos mayoritarios fueron: palmítico (16:0), linoleico (18:2n-6) y gammalinoléico (18:3n-6), conformando entre el 60 a 66% del total de ácidos grasos analizados para las dos biomasa (comercial y económica), un porcentaje realmente bajo si lo comparamos con lo obtenido por (Mühling, Belay, & Whitton, 2005), quienes indicaron que los ácidos grasos palmítico, linoleico y gammalinoleico constituyeron entre el 70 a 80% del total de los ácidos grasos totales.

El ácido graso saturado encontrado en mayor proporción fue el palmítico (16:0) con valores de 26,68%, 28,94% y 31,15% y el ácido graso poliinsaturado fue el (18:3n-6) con valores de 18,18%, 18,75% y 19,76.

El total de ácidos grasos de la serie omega 6 es de 32,24% para la biomasa del medio comercial y del 33,62 al 34,94% para el medio económico, destacándose como el ácido graso poliinsaturado en mayor proporción en las dos biomásas el gammalinolenico con valores que oscilan de 18,18% al 19,76% con relación al total de los ácidos grasos, este ácido en especial es de mucha importancia ya que ayuda a reducir los niveles de triacilglicérolos en la sangre (Leaf & Weber, 1988) y estimular el sistema inmune (Wu & Meydani, 1996), el otro ácido graso asociado a la familia de los omega-6 encontrado en mayor proporción fue el linoleico, se ha reportado que ayuda a subir las defensas, disminuye los niveles de grasa corporal, disminuye la presión arterial, ayuda a controlar el colesterol y los triglicéridos, reduce el riesgo de enfermedades del sistema circulatorio, ayuda a eliminar las grasas perjudiciales para el organismo, interviene en un buen funcionamiento de los sistemas nervioso y visual.

Análisis Microbiológico

La tabla 10 muestra los resultados de las pruebas microbiológicas realizadas a las muestras de biomasa producidas por duplicado.

Tabla 10.

Análisis microbiológico de Arthrospira maxima.

ANALISIS MICROBIOLÓGICO	BIOMASA MEDIO COMERCIAL	BIOMASA MEDIO ECONOMICO
Bacterias Coliformes Totales	0 U.F.C./gr	0 U.F.C./gr
Bacterias Coliformes Fecales	0 U.F.C./gr	0 U.F.C./gr
Aerobios Totales	10 U.F.C./gr	20 U.F.C./gr
Mohos y levaduras	0 U.F.C./gr	0 U.F.C./gr
<i>Salmonella spp</i>	0 U.F.C./gr	0 U.F.C./gr

Fuente: Castillo, R. 2018.

La tabla 10, indica la no presencia de bacterias coliformes totales, coliformes fecales, salmonella, mohos y levaduras en las muestras correspondiente a los medios comercial y económicos con valores de 0 U.F.C./gr respectivamente, por otro lado si se determinó la presencia de aerobios totales con una presencia de 10 U.F.C/gr para la biomasa comercial y 20 U.F.C./ gr para la biomasa económica respectivamente, no obstante dichos valores fueron bajos según lo establecido por el ICA en la norma parámetros microbiológicos de alimentos para animales donde se evidencia valores de permisibilidad que van desde los 10×10^3 para el caso de la canina, cunicola y felina hasta valores de 10×10^7 para la especie porcina. (Ver Apéndice J)

Análisis costo beneficio

Se realizó una investigación cuantitativa de producción (ver Apéndice K), donde se determinaron costos directos e indirectos como son la materia prima, la mano de obra (ver Apéndice L) y costos indirectos de fabricación (ver Apéndice M).

Los resultados del análisis de las dos biomásas se muestran a continuación.

Medio espirulina. Solución madre 500ml.

Tabla 11.

Precios de los reactivos para la preparación de 500 ml de solución madre.

Elemento	Precio por kilo (\$)	Gramos Utilizados	Precio Gramos Utilizados
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3,265,000.00	0,018	58,77
CuSO ₄ 5H ₂ O	5,321,000,00	0,010	53,21
CoSO ₄ .7H ₂ O	8,270,000.00	0,016	132,32
ZnSO ₄ .7H ₂ O	194,000.00	0,053	10,37
MnSO ₄ .H ₂ O	951,000.00	0,110	104,61
H ₃ BO ₃	219,000.00	0,310	67,89
Totales	18.215.000,00	0,5175	427,17

Fuente: Merckmillipore, 2018.

$$427,17\$ \div 500\text{ml} = 0,85 \$ \text{ por cada ml} \times 20 \text{ ml} = 17,00\$$$

Solución FeEDTA 100ml

Tabla 12.

Precio de los reactivos para la preparación de 100 ml de solución FeEDTA.

Elemento	Precio por kilo (\$)	Gramos Utilizados	Precio Gramos Utilizados
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	126.000,00	0,455	57,33
FeSO ₄ .7H ₂ O	351.000,00	0,058	20,35
Totales	477.000,00	0,513	77,68

Fuente: Merckmillipore, 2018.

$$77,68 \$ \div 100\text{ml} = 0,7768\$ \text{ por cada ml} \times 20 \text{ ml} = 15,536 \$$$

Medio comercial. Parte A.

Tabla 13.

Precio de los reactivos para preparar la parte A del medio Spirulina.

Elementos	Precio por kilo (\$)	Gramos Utilizados	Precio Gramos Utilizados
NaHCO ₃	128.000,00	272,2	34,841.6
NaCO ₃	175.000,00	80,6	14,105
K ₂ HPO ₄	738.000,00	10	7,380
Totales	1.041.000,00	362,8	56,326.6

Fuente: Merckmillipore, 2018.

Parte B.

Tabla 14.

Precio de los reactivos para preparar la parte B del medio Spirulina.

Elementos	Precio por kilo	Gramos	Precio
	(\$)	Utilizados	Gramos Utilizados
NaNO ₃	626.000,00	50	31,300
K ₂ SO ₄	369.000,00	20	7,380
NaCL	93.000,00	20	1,860
MgSO ₄ .7H ₂ O	388.000,00	4	1,552
CaCL ₂ .2H ₂ O	307.000,00	0,8	245,6
Totales	1.783.000,00	94,8	42,337.6

Fuente: Merckmillipore, 2018.

Total de costos parte B:

$$17,00 \$ + 15,536 \$ + 42,337.6 \$ = 42,370.136 \$$$

Total de costos parte A+B:

$$56,326.6 \$ + 42,370.136 \$ = \mathbf{98,696.736\$}$$

Medio económico - Parte A.

Tabla 15.

Precio de los reactivos para preparar la parte A del medio económico Spirulina.

Elementos	Precio por kilo (\$)	Gramos Utilizados	Precio Gramo Utilizados
Fuente de bicarbonato	1.000,00	352.8	352.8
Totales	1.000,00	352.8	352.8

Fuente: Castillo, R. 2018.

Parte B.

Tabla 16.

Precio de los reactivos para preparar la parte B del medio Spirulina.

Elementos	Precio por kilo (\$)	Gramos Utilizados	Precio Gramos Utilizados
NaNO ₃	626.000,00	50	31,300
K ₂ SO ₄	369.000,00	20	7,380
NaCL	93.000,00	20	1,860
MgSO ₄ .7H ₂ O	388.000,00	4	1,552
CaCL ₂ .2H ₂ O	307.000,00	0,8	245,6
Totales	1.783.000,00	94,8	42,337.6

Fuente: Merckmillipore, 2018.

Total de costos parte B:

$$17,00 \$ + 15,536 \$ + 42,337.6 \$ = 42,370.136 \$$$

Total de costos parte A+B:

$$352.8 \$ + 42,370.136\$ = \mathbf{42,722.936}.$$

La figura 13 muestra la comparación de costos entre el medio comercial y el medio económico.

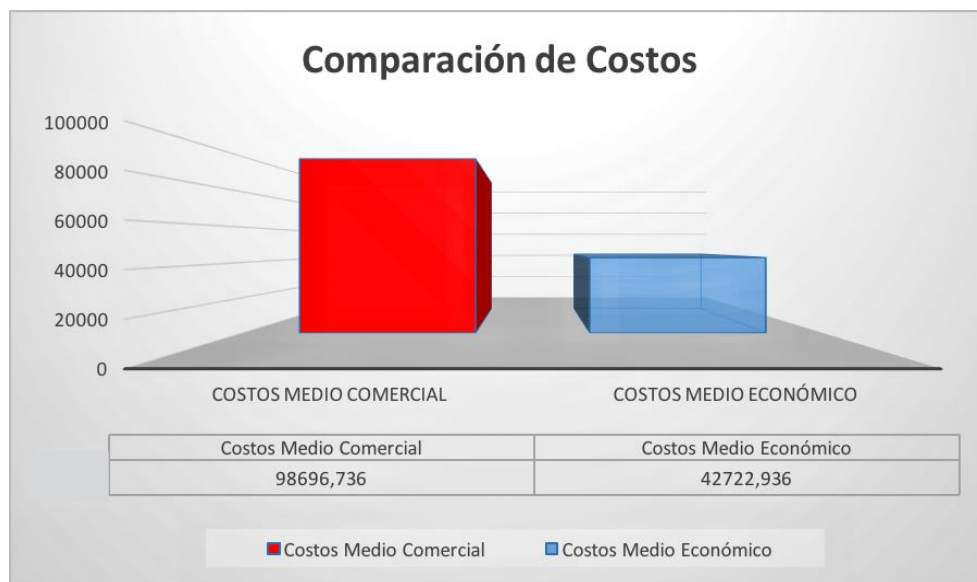


Figura 13. Costos de producción de biomasa en medio comercial y el medio económico. Castillo, R. 2018.

En la figura 13 se observa una marcada diferencia en cuanto a los costos de producción referentes a la materia prima para la elaboración de los dos medios de cultivo, en el que se puede apreciar que el medio comercial es más costoso que el medio económico en un 131%.

La Tabla 17 presenta los costos de producción de las biomásas producidas.

Tabla 17.

Comparación entre los costos de producción y la biomasa generada en los dos medios

	Costo de producción	Biomasa producida (gramos)	Costo por gramo de biomasa
Medio comercial	98696,736\$	38,82	2542\$
Medio económico	42722,936	46,22	924\$

Fuente: Castillo, R. 2018.

La tabla 17, muestra un medio comercial mucho más caro y una cantidad de biomasa obtenida inferior a la obtenida con el medio económico, por lo cual la relación costo-beneficio termina siendo desfavorable con una relación de un gramo de biomasa equivalente a 2542\$ en contrastes con el medio económico que presento una relación de 924\$ por gramo de biomasa obtenida. Al comparar estos valores podemos inferir una diferencia neta del 175% a favor del medio económico. Por lo cual se elige a este medio como el más viable para la obtención de biomasa microalgal.

Cabe destacar que pese a los resultados favorables obtenidos con el medio económico este estudio se encuentra aún en una fase preliminar y en posteriores estudios se buscara llevar a una mayor escala, donde se pueda apreciar un mayor rendimiento que permita un análisis más competitivo a nivel nacional con otros productores de biomasa microalgal.

Conclusiones

La investigación realizada en el laboratorio del Centro de Biotecnología de la Universidad de Pamplona arrojó resultados positivos, ya que se obtuvo un modelo matemático con el cual se realizó la estimación del peso seco en la producción de la biomasa.

De igual forma, se consiguió el objetivo de obtener biomasa microalgal con un alto contenido proteico a partir de *Arthrospira maxima*, alcanzando una producción aproximada de más de 2 gramos por litro de cultivo en un periodo de 24 días.

Así mismo, se logró establecer que no existió diferencias significativas en lo que respecta a la producción de biomasa microalgal y a su composición bioquímica en los dos medios ensayados, pero cabe destacar que la investigación cuantitativa de costos determinó que el medio comercial es 131% más costoso.

Por otra parte, de acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación cuantitativa de costos podemos inferir que el costo de producción de un kilogramo de biomasa microalgal en el caso del medio comercial sería de \$2.542.420 y de \$924.318 para el medio económico, los cuales estarían muy por encima del promedio nacional, pero cabe destacar que pese a los altos costos de producción de nuestra biomasa esta cuenta con una calidad bromatológica y microbiológica muy buena.

Recomendaciones

Llevar el proceso a una escala mayor para determinar si la producción de biomasa presenta el mismo comportamiento en condiciones ensayadas. De igual forma se deben buscar otros substratos y condiciones ambientales que conduzcan a la estandarización del bioproceso para reducir los costos de producción y obtener un producto más competitivo en el mercado nacional.

Para estudios posteriores se recomienda la utilización de la biomasa microlagal de *Arthrospira maxima* como aditivo alimenticio para especies menores, debido alto valor nutricional demostrado en la presente investigación y a su calidad microbiológica.

Referencias

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A., & Ibraheem., I. (2012). Microalgae and wastewater treatment. . *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19, 257-275.
- Barraza, C., Collao, V., Espinoza, C., Moya, F., Thun, G., & Torres, M. (2009). *Producción de Biodiesel a partir de microalgas*. Valparaiso: Pontificia Universidad Católica de Valparaiso. .
- Brenan, M., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577.
- Cerón, M. (2013). Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales. Almeria: cuadernos de estudios agroalimentarios. 83-101.
- Chacón, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y la industria. . *Agronomía Mesoamericana*(15), 93-106.
- Cherubini, F. (2010). The Biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51, 1412–1421.
- Cherng, J.Y y Shih, M.F. (2005). Prevención de la dislipidemia por *Chlorella pyrenoidosa* en ratas y hámsters después del tratamiento crónico de dieta alta en grasas. *Life Sciences*, 76, 3001-3013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.055>
- Colorado, M., & Moreno, D. (2017). *Economía de recursos naturales a partir de la producción de Spirulina (Arthrospira maxima) en fotobioreactores*.

- Espada, J., & Moreno, J. (2016). *Aplicaciones industriales de la espirulina*. Madrid: Comunidad de Madrid.
- Glencross, B., Irvin, S., Arnold, S., Blyth, D., Bourne, N., & Preston, N. (2014). Effective use of microbial biomass products to facilitate the complete replacement of fishery resources in diets for the black tiger shrimp. (Aquaculture, Ed.) *Penaeus monodon*.(431), 12-19.
- IM, Index Mundi (2016) Index Mundi data portal. <http://www.indexmundi.com> Accessed January 2016.
- Ju, Z., Deng, D., & Dominy, W. (2012). A defatted microalga (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture*, 50-55; 354–355:.
- Leaf, A., & Weber, P. (1988). Cardiovascular effects of n-3fatty acids. . *New England J. of Medicine.*, 38(9), 549-557.
- Lee, B., & Kim, J. (2001). Production of *Candida utilis* on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering* , 25, 111–124.
- Liang, W., Yunguang, L., Sommerfeld, M., Qiang, H. (2012). A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresource Technology* 129C:289-295 · November 2012 *with* 107 Reads
Doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.062 · Source: PubMed
- Loo, P., Vikineswary, S., & Chong, V. (2013). Nutritional value and production of three species of purple non-sulphur bacteria grown in palm oil mill effluent and their application in rotifer culture. . *Aquaculture Nutrition*, 19, 895–907.
- Loosli, J., & McDonald, I. (1968). *Nonprotein nitrogen in the nutrition of ruminants*. . No. 75.:
FAO Agricultural Studies .

- Madkou, Kamil, & Nasr. (2012). *Producción y valor nutritivo de Spirulina platensis en medios de coste reducido*.
- Maity, J., Bundschuh, J., Chen, C., & Bhattacharya, P. (2014). Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives. *A mini review. Energy*, 78(13), 104.
- Mengzhe, W., Jakob K., Krist, V., Ulrich K. (2016). Modelling and simulation of a U-loop Reactor for Single Cell Protein Production. *Computer Aided Chemical Engineering. Ingeniería química asistida por ordenador Volumen 38*, 2016, páginas 1287-1292
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63428-3.50219-8>
- Moreira, L., Rocha, A., Ribeiro, C., Rodrigues, R., Soares, L. (2011). Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Spirulina platensis*. *African Journal of Food Science* Vol. 5(15), pp. 799-805, 15 December, 2011 Available online <http://www.academicjournals.org/ajfs> ISSN 1996-0794 ©2011 Academic Journals DOI: 10.5897/AJFS11.184
- Mühling, M., Belay, A., & Whitton, B. (2005). Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. *J. Appl. Phycol*, 17, 137-146.
- Muniz, L., Silva, A., Garcez, C., Silva, R., & Almeida, L. (2011). Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Spirulina platensis*. *African Journal of Food Science*, 5(15), 799-805.
- Norsker, N., Barbosa, M., Vermuë, M., & Wijffels, R. (2011). Microalgal production – A close look at the economics. *Biotechnology Advances*, 29, 24–27.
- Olaizola, M. (2000). Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 12, 499–506.

- Olivera, R., Pari, U., Gonza, A., Huamanga, J., Salazar, D., & Florez J.(2015). *Cultivo de Arthrospira platensis (Spirulina) en fotobiorreactor tubular doblemente curvado a condiciones ambientales en el sur del Perú*. Rev. colomb. biotecnol., Volumen 17, Número 1, p. 143-150, 2015. ISSN electrónico 1909-8758. ISSN impreso 0123-3475. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50679>
- Pelczar, M., & Chan, E. (2010). Microbiology - An Application Based Approach. *Tata McGraw Hil*, 919.
- Phetteplace, H., Jarosz, M., Uctuk, D., & Sporleder, R. (2003). *Evaluation of single cell protein as a protein supplement for finishing cattle*.
- Ponce, E. (2013). Superalimento para un mundo en crisis: Spirulina a bajo costo. . *31*(1), 135-139.
- Prakash, J., & Tiwari, A. (2010). *Optimization of Biomass Production of Spirulina maxima*. Govt. T.R.S. College, Rewa (M.P.): Department of Biotechnology.
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*, *6*(65), 635-648.
- Reyna, R., Cristiani, E., Hernández, D., Thalasso, F., & Cañizares, R. (2010). Hydrodynamic and mass transfer characterization of a flat-panel airlift photobioreactor with high light path. . *Chemical Engineering and Processing*, *49*, 97–103.
- Rosenberry, B. (2011). *Shrimp News International*. Oberon FMR.
- Spolaore, P., Joannis, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(2), 87-96.
- Torres, B., & Correa, D. (2008). *Diseño conceptual de un proceso de cultivo y obtención de Cyanobacteria Arthrospira platensis*.

- Ugwu, C., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. . *Bioresource Technology*, *99*, 4021–4028.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., & Valenzuela, R. (2013). *Las microalgas: una fuente renovable para la obtención de ácidos grasos omega-3 de cadena larga para la nutrición humana y animal*. . Santiago de Chile: Chile: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos Fernando Monckeberg Barros (INTA) .
- Weyer, K. B. (2010). Theoretical maximum algal oil production. *Bioenergy Research*, *3*, 204–213.
- Wilkie, A., Edmundson, S., & Duncan, J. (s.f.). Indigenous algae for local bioresource production: Phycoprospecting. *Energy for Sustainable Development*. *15*, 365-371.
- Wu, D., & Meydani, N. (1996). *Gamma-Linolenic acid and immune function*. In: *Gamma-Linolenic acid: Metabolism and its roles in nutrition and medicine*. Huang, S. and Mills, D. (Eds). AOCS Press. U.S.A.
- Yoshida, R. (1977). Spirulina hydrolysates for cosmetic packs . *Kokai*, *77*(31), 836.
- Zhang, H., Piao, X., Li, P., Yi, J., Zhang, Q., Li, Q., y otros. (2013). Effects of single cell protein replacing fish meal in diets on growth performance, nutrient digestibility, and intestinal morphology in weaned pigs. . *Journal of Animal Sciences*, *26*, 1320–1328.
- Zepka, L., Lopes, E., Goldbeck, R., Souza, L., Queiroz, S.(2010). Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Bioresource Technology* Volume 101, Issue 18, September 2010, Pages 7107-7111.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.001>

Zhao, Y., Yu, B., Mao, X., He, J., Huang, Z., Mao, Q., y otros. (2012). Effect of dietary bacterial lysine by-product meal supplementation on growth performance and excretion of purine base derivatives in growing-finishing pig. *Livestock Science*(149), 18-24.

Apéndice

Apéndice A Determinación de humedad

Se pesaron 3 g de muestra en un pesafiltro con apa (previamente pesado después de tenerlo a peso constante 2 h a 130° C) se secó la muestra en la estufa por 2 h a 90 - 110° C. Se retiró de la estufa, se tapó, se dejó enfriar en el desecador y se pesó tan pronto como se equilibró con la temperatura ambiente. Se repitió hasta peso constante.

Apéndice B. Determinación de cenizas.

Las muestras se recolectaron en un recipiente (crisol) para análisis del contenido de ceniza y se calcinaron a 525-600°C para eliminar las sustancias orgánicas. El peso total mineral de la muestra remapéndicente se considera el contenido de ceniza.

Apéndice C. Determinación de proteínas

La técnica comprende tres pasos los cuales se describen a continuación:

Digestión

Se adiciono en cada tubo más o menos 0,5 g de muestra y se anotó el peso de cada muestra identificando el tubo al cual se adiciono la muestra. Se preparó una muestra en blanco.

Se adiciono 0,5 g de sulfato cúprico.

Se agregó 20 mililitros de ácido sulfúrico concentrado (98%).

Se colocaron los tubos que contienen la muestra y se ajustaron a la trompa extractora.

Se precalentó el equipo digestor k-425 colocando el botón del termostato en posición 10 durante 15 minutos y posteriormente se bajó a la posición de 8 hasta terminar la digestión (la digestión termina cuando el contenido en el tubo toma una coloración verde fosforescente. (Aproximadamente 2 horas).

Una vez hecha la digestión se procedió a bajar el termostato a 0 y a apagar el equipo y desconectarlo. Se debe dejar correr el agua de extracción de la bomba jetobacter por unos minutos hasta que no se detecte la emanación de gases. Asimismo, se debe lavar con agua abundante la trompa de extracción y las mangueras con el fin de eliminar todo residuo contenido en ello.

Se secaron los tubos del digestor y se adicionaron 20 mililitros de agua destilada a cada tubo.

Destilación

Condiciones de la unidad de destilación k-355

El equipo de destilación k-355 se encuentra automatizado para realizar la destilación.

El equipo contiene un tanque para agua destilada, otro para ácido bórico al 2% p/v y otro para hidróxido de sodio al 30% p/v debidamente marcado y el nivel recomendado.

Se conectó el equipo, se abrió el grifo del agua.

Se precalentó el sistema pulsando (STAR) hasta que se escuche un sonido.

Se Realizó el precalentamiento (5 minutos x 100%) al inicio y al final de la utilización del equipo.

Finalizado el precalentamiento.

Se tomó la muestra y se colocó en el lugar de destilación.

Se Colocó un erlenmeyer en la salida del destilado adicionando 3 gotas de indicador mixto (la no existencia de nitrógeno se presenta un color morado, para posteriormente durante la destilación se torne en un color verde indicando la presencia de nitrógeno).

Se Acciono el interruptor 1 del ácido bórico y se dejó caer 100 mililitros de solución bórica.

En el tubo de la muestra se dejó caer hidróxido de sodio hasta que de una coloración azul accionando el interruptor de reactivo 2(más o menos 300 mililitros).

Se puso en marcha la destilación dando en START (5 minutos x 100%). El equipo se apaga automáticamente.

Se obtuvo un extracto o destilado de alrededor de 200 mililitros.

Se quitó el extracto o destilado del equipo y el tubo donde estaba inicialmente la muestra, quedando listo para la siguiente muestra.

Titulación

La titulación se hace con ácido clorhídrico al 0,1 N.

Se tituló hasta obtener una coloración morada nuevamente.

Se realizaron los cálculos correspondientes.

Expresión de resultados

$$\% N = 14 \times N \times V \times 100 / m \times 1000$$

$$\% \text{ Proteína} = 14 \times N \times V \times 100 \times \text{factor} / m \times 1000$$

V: 50 mililitros H₂SO₄ 0,1 N – gasto NaOH 0,1N o gasto de HCL 0,1N

m: masa de la muestra, en gramos.

Factor: 6,25: para carne, pescado, huevos y proteínas en general.

5,7: para cereales y derivados de soya.

6,38: leche.

5,55: gelatina.

Repetibilidad del método: la diferencia entre los resultados de las determinaciones efectuadas una después de otra, por el mismo analista, no debe exceder 0,06% de nitrógeno o 0,38% de proteína.

Apéndice D. Determinación de grasas

Se colocó a un peso constante un matraz bola de fondo plano con perlas o piedras de ebullición en la estufa a 110° C, aproximadamente 2 h. Se pesó de 4 a 5 g de muestra sobre un papel poroso y sin colorantes. Se enrolló la muestra en el papel y se colocó dentro de un cartucho de celulosa, tapando con algodón (no apretar el algodón contra la muestra) y se colocó el cartucho con muestra en el extractor Soxhlet. Se adaptó el matraz bola al extractor conteniendo el cartucho de celulosa con muestra, y posteriormente se ajustó el refrigerante sobre el extractor, cuidando de no poner grasa en las juntas. Se agregaron dos cargas del disolvente (éter etílico o éter de petróleo) por el extractor. Se montó el sistema de destilación y se calentó el matraz con parrilla a ebullición suave hasta la extracción total del material lipídico. Para verificar que se ha extraído toda la grasa, se dejó caer una gota de la descarga sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa. Una vez extraída toda la grasa, se esperó a que se enfríe el equipo de destilación. El exceso de disolvente contenido en el matraz de bola con grasa, se elimina por destilación a presión reducida empleando un rotavapor. Se desmontó el matraz del rotavapor, de ser necesario volatilizar el disolvente remapéndicente sobre parrilla de calentamiento. Se secó el extracto en estufa a 80° C por 30 min, se enfrió en desecador y se pesó; el cálculo del porcentaje de grasa cruda se realizó por gravimetría.


Apéndice E. Determinación de fibra cruda.

Se pesó 0,1 mg de muestra, se adicionó a la muestra 150ml de ácido sulfúrico 1,25%; se sometió a ebullición durante 30 minutos en el digestor de fibra con enfriamiento cuando este haya alcanzado una temperatura de 200° C, se filtró al vacío cuando termino el tiempo de ebullición, se transfirió el líquido a un crisol de gooch dispuesto con una capa de cuarzo. Se usó una varilla para retirar la fibra cruda que este adherida a las paredes del vaso de precipitado y se empleó agua desionizada caliente para realizar los lavados, se transfirió todo el contenido del crisol de gooch nuevamente al mismo vaso de precipitado de 600 mL que se utilizó para la digestión ácida y se agregaron 150 mL de la solución de hidróxido de potasio 1.25%, lavando las paredes del crisol. Se sometió a ebullición durante 30 minutos en el digestor de fibra con enfriamiento cuando éste alcanzó una temperatura de 200° C, se filtró al vacío cuando terminó el tiempo de ebullición, se transfirió el líquido a un crisol de Gooch dispuesto con una capa de cuarzo. Se usó una varilla para retirar la fibra cruda que está adherida a las paredes del vaso de precipitado y se empleó agua desionizada caliente para realizar los lavados, se colocó el crisol de Gooch con el filtrado en la estufa de secado a 105 °C, por mínimo 4 horas, se retiró el crisol en el desecador y se dejó enfriar por espacio de 1 hora. Se pesó el crisol (p1) inmediatamente después de retirarlo del desecador. Se colocó el crisol en la mufla y se redujo el contenido a cenizas a una temperatura de 525 °C por 3 horas, se retiró el crisol de la mufla al desecador cuando alcanzó mínimo 100°C, se dejó enfriar por espacio de 1 hora. Se pesó el crisol (p2) inmediatamente después de retirarlo del desecador.

$$\% \text{ fibra cruda} = \frac{p1-p2}{m} * 100$$

Donde: P1: Peso en gramos del crisol después de secado; P2: Peso en gramos del crisol después de incinerado; m: Es el peso en gramos de la muestra.

Apéndice F. Análisis bromatológico de la biomasa del medio económico

	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	INFORME DE ENSAYO	FOITIE.01
			Versión: 05
		Número: 035-18	Página 1 de 2

INFORME DE ENSAYO

FECHA: 2018-02-02
NOMBRE/EMPRESA: ALBA LUCIA ROA PARRA
DIRECCIÓN: Km 1 vía a Bucaramanga-Pamplona
TELÉFONO: 3125207635

CÓDIGO DE LA MUESTRA: M035-18
PRODUCTO: Biomasa microalga de espirulina medio económico Lote 20171219

FECHA DE RECEPCIÓN: 2018-01-24
REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: 2018-01-26 a 2018-01-30

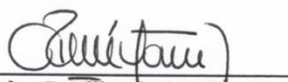
DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS:

1. La humedad se determinó por medio de secado en estufa de aire hasta peso constante.
2. La determinación de cenizas se realizó en un horno a 550°C hasta peso constante.
3. La proteína fue analizada por el método de Kjeldahl que consiste en la determinación de nitrógeno total y posterior conversión a proteína.
4. La determinación de grasa se realizó por extracción con solvente en equipo Soxhlet.
5. La fibra cruda se realizó mediante un ataque ácido y posteriormente un ataque básico. Se calcina el residuo obtenido de la hidrólisis.
6. Los carbohidratos totales y el valor calórico fueron calculados matemáticamente según la resolución 333 del Ministerio de Protección Social.

TABLA 1. RESULTADOS ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO M035-18

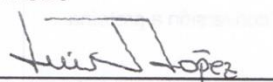
PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADOS	MÉTODO DE ANÁLISIS
Humedad	%	11,06	- Gravimétrico-
Ceniza	%	20,03	- Gravimétrico-
Grasa	%	1,22	- Extracción por Soxhlet-
Nitrógeno	%	7,9320	- Kjeldahl-
Proteína	%	49,58	
Fibra	%	0,28	- Hidrólisis ácida y básica-
Carbohidratos totales	%	18,12	--
Valor calórico	kcal/100 g muestra	281,77	--

REVISÓ



Arley R. Villamizar J.
Químico PQ2839
 Coordinador de Calidad

APROBÓ




Luis Javier López Giraldo
PhD Qca. Bioquímica y Ciencia de Alimentos
 Director

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA, NO PUEDE SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDO SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO

FIN DEL INFORME

Apéndice G. Análisis bromatológico de la biomasa medio comercial

	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	INFORME DE ENSAYO	FOITIE.01
		Número: 034-18	Versión: 05 Página 1 de 2

INFORME DE ENSAYO

FECHA: 2018-02-01
NOMBRE/EMPRESA: ALBA LUCIA ROA PARRA
DIRECCIÓN: Km 1 vía a Bucaramanga-Pamplona
TELÉFONO: 3125207635

CÓDIGO DE LA MUESTRA: M034-18
PRODUCTO: Biomasa microalga de espirulina medio enriquecido Lote 20171219

FECHA DE RECEPCIÓN: 2018-01-24
REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: 2018-01-26 a 2018-01-30

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS:

1. La humedad se determinó por medio de secado en estufa de aire hasta peso constante.
2. La determinación de cenizas se realizó en un horno a 550°C hasta peso constante.
3. La proteína fue analizada por el método de Kjeldahl que consiste en la determinación de nitrógeno total y posterior conversión a proteína.
4. La determinación de grasa se realizó por extracción con solvente en equipo Soxhlet.
5. La fibra cruda se realizó mediante un ataque ácido y posteriormente un ataque básico. Se calcina el residuo obtenido de la hidrólisis.
6. Los carbohidratos totales y el valor calórico fueron calculados matemáticamente según la resolución 333 del Ministerio de Protección Social.

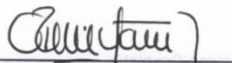
CICTA - Laboratorio de Alimentos
Km. 2 Vía al Refugio, Sede UIS Guatiguará, Piedecuesta - Santander
Telefax (7) 6 55 08 04
cicta@uis.edu.co



TABLA 1. RESULTADOS ANÁLISIS FISICOQUÍMICO M034-18

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADOS	MÉTODO DE ANÁLISIS
Humedad	%	11,51	- Gravimétrico-
Ceniza	%	20,67	- Gravimétrico-
Grasa	%	1,35	- Extracción por Soxhlet-
Nitrógeno	%	7,1741	- Kjeldahl-
Proteína	%	44,84	
Fibra	%	0,39	- Hidrólisis ácida y básica-
Carbohidratos totales	%	21,64	--
Valor calórico	kcal/100 g muestra	278,01	--

REVISÓ



Arley R. Villamizar J.
Químico PQ2839
Coordinador de Calidad

APROBÓ




Luis Javier López Giraldo
PhD Qca. Bioquímica y Ciencia de Alimentos
Director

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA, NO PUEDE SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDO SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO

FIN DEL INFORME

Apéndice H. Parámetros microbiológicos de alimentos para animales

	ALIMENTOS PARA ANIMALES PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS	DIRECTIVA DIP – 30 - 100 - 003
		Página 2 de 3

NORMA: Los alimentos para cada especie animal no deben sobrepasar los siguientes límites permisibles en recuentos microbiológicos:

ESPECIE: AVICOLA	
Parámetros Microbiológicos	UFC/g
Recuento microorganismos mesofilos	10×10^5
Recuento microorganismos coliformes	10×10^4
Recuento clostridios sulfito reductores	20×10^1
Recuento hongos	10×10^4
Aislamiento Salmonella spp en 25 g	Ausente
Aislamiento Escherichia coli	Ausente

ESPECIE: CANINA	
Parámetros Microbiológicos	UFC/g
Recuento microorganismos mesofilos	50×10^3
Recuento microorganismos coliformes	10×10^2
Recuento clostridios sulfito reductores	10×10^1
Recuento hongos	50×10^2
Aislamiento Salmonella spp en 25 g	Ausente
Aislamiento Escherichia coli	Ausente

ESPECIE: CUNICOLA	
Parámetros Microbiológicos	UFC/g
Recuento microorganismos mesofilos	10×10^3
Recuento microorganismos coliformes	50×10^1
Recuento clostridios sulfito reductores	10
Recuento hongos	50×10^2
Aislamiento Salmonella spp en 25 g	Ausente
Aislamiento Escherichia coli	Ausente

ESPECIE: FELINA	
Parámetros Microbiológicos	UFC/g
Recuento microorganismos mesofilos	50×10^3
Recuento microorganismos coliformes	10×10^2
Recuento clostridios sulfito reductores	10×10^1
Recuento hongos	50×10^2
Aislamiento Salmonella spp en 25 g	Ausente
Aislamiento Escherichia coli	Ausente

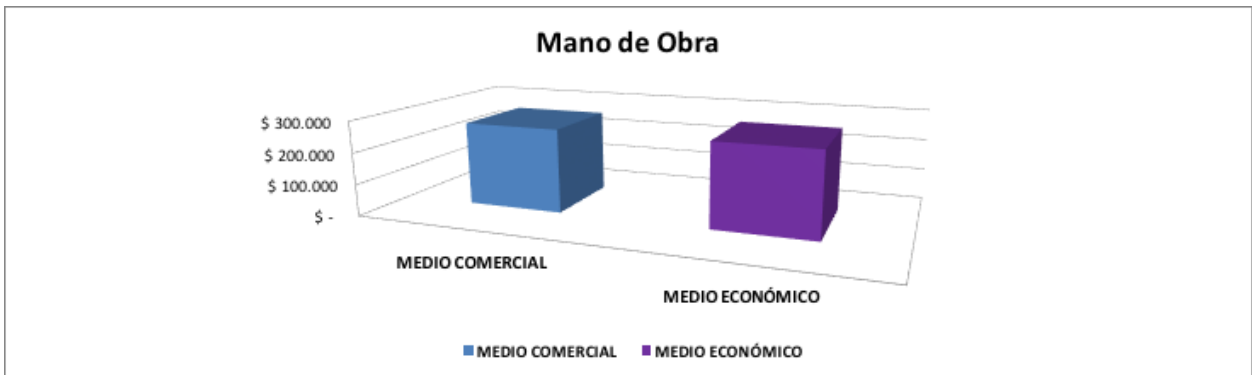
ESPECIE: PISCICOLA	
Parámetros Microbiológicos	UFC/g
Recuento microorganismos mesofilos	10×10^4
Recuento microorganismos coliformes	10×10^2
Recuento clostridios sulfito reductores	10×10
Recuento hongos	50×10^2
Aislamiento Salmonella spp en 25 g	Ausente
Aislamiento Escherichia coli	Ausente

ESPECIE: PORCINA	
Parámetros Microbiológicos	UFC/g
Recuento microorganismos mesofilos	10×10^7
Recuento microorganismos coliformes	10×10^4
Recuento clostridios sulfito reductores	20×10^1
Recuento hongos	10×10^4
Aislamiento Salmonella spp en 25 g	Ausente
Aislamiento Escherichia coli	Ausente

Apéndice I. Costos de producción

MATERIA PRIMA	Detalle	MEDIO ENRIQUECIDO	MEDIO ECONÓMICO
	Materiales utilizados	\$ 98.697	\$ 42.722
	Total de Materias Primas	\$ 98.697	\$ 42.722
	Costo de Materias Primas	\$ 98.697	\$ 42.722
MANO DE OBRA	Mano de Obra Directa	\$ 266.910	\$ 266.910
Costos Indirecto de Fabricación	Costos de Fabricación	\$ 800.000	\$ 800.000
Total Costo de Producción		\$ 1.165.607	\$ 1.109.632
Producción Mensual Kg.		\$ 1	\$ 1
Costos Unitarios Mensuales		\$ 1.165.607	\$ 1.109.632
Costos Unitarios Individuales	Costo Unit. MP	\$ 98.697,00	\$ 42.722,00
	Costo Unit. Mano de Obra	\$ 266.910,00	\$ 266.910,00
	Costo Unit. Gastos de Fabricación	\$ 800.000,00	\$ 800.000,00

Apéndice J. Costo de mano de obra



Apéndice K Gastos de fabricación

