

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**CULTIVO DISCONTINUO DE LA MICROALGA *Coenochloris* sp. CON
FRACCIÓN SOLUBLE DE PAPA (*Solanum phureja*) EN CONDICIONES
MIXOTRÓFICAS**

AUTORA:

VERDUGO CASTRO KARLA BEATRIZ

TUTORA:

MARÍA FERNANDA GUEVARA GRANJA

Quito, julio de 2016

Cesión de derechos de autor

Yo, Karla Beatriz Verdugo Castro, con documento de identificación N° 030261527-3, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy/somos autor/es del trabajo de grado/titulación intitulado: "Cultivo discontinuo de la microalga *Coenochloris* sp. con fracción soluble de papa (*Solanum phureja*) en condiciones mixotróficas", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Karla Beatriz Verdugo Castro

C.I. 0302615273

Quito, julio de 2016

Declaratoria de coautoría del docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el Trabajo Experimental, "Cultivo discontinuo de la microalga *Coenochloris* sp. con fracción soluble de papa (*Solanum phureja*) en condiciones mixotróficas", realizado por Karla Beatriz Verdugo Castro, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, julio de 2016


María Fernanda Guevara Granja

C.I. 1002454948

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo de titulación con todo mi corazón a mis padres por su infinito amor que gracias a su trabajo y esfuerzo me han brindado la educación y apoyo incondicional para cumplir esta gran meta. A mi hermana gracias por brindarme su apoyo y cariño.

A Ever Morales ya que más que un docente es un gran amigo al que lo considero como un padre por su apoyo absoluto, consejos y gran cariño.

A Daniel por su apoyo, motivación y cariño, estuviste a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más difíciles siempre ayudándome gracias por tu apoyo infinito.

Agradecimiento

A Dios por haberme permitido llegar a este momento especial y a mi familia por su apoyo incondicional.

A la Universidad Politécnica Salesiana por las enseñanzas impartidas durante toda la carrera universitaria.

Al Doctor Ever Morales, por incluirme en su proyecto de investigación y brindarme la guía necesaria para la elaboración de la fase experimental de mi trabajo de titulación.

A la Ing. María Fernanda Guevara por su paciencia y oportuna guía al colaborar de manera incondicional en la fase teórica de mi proyecto de titulación.

A la Msc. Laura Huachi por ser una gran amiga, guía y confidente.

A mis compañeras tesisistas que a pesar de pertenecer a otra institución logramos formar una gran amistad y fortalecer nuestros conocimientos durante la elaboración de mi trabajo de titulación; gracias amigos y amigas, Ing. Daniel Coronel, Ing. Marco Ibarra, Karina de la Cruz, Cindy Maldonado y Carolina Ñacato por ser un gran apoyo durante la elaboración de mi trabajo de investigación.

Índice

Introducción	1
Marco conceptual	6
1.1. Descripción taxonómica de <i>Coenochloris</i> sp.	6
1.1.1. Usos.....	6
1.2. Nutrición de microalgas.....	7
1.3. Métodos de cultivo de microalgas	8
1.3.1. Cultivos fototróficos.....	10
1.3.2. Cultivos heterotróficos.....	10
1.3.3. Cultivo discontinuo (<i>batch culture</i>).....	11
1.3.4. Cultivo discontinuo alimentado (batch alimentado (BA) <i>Fed Batch</i>) .	12
1.4. Descripción botánica y taxonómica de <i>Solanum phureja</i>.....	12
1.4.1. Ubicación geográfica de <i>Solanum phureja</i> en Ecuador	14
1.4.2. Composición química y nutricional de <i>Solanum phureja</i>	15
Materiales y métodos	17
2.1 Muestras: obtención y procesamiento	17
2.2. Recuento celular por cámara Neubauer	19
2.3. Análisis de resultados.....	24
Resultados y discusión	26
3.1. Identificación de <i>Coenochloris</i> sp.....	26

3.2. Generación de biomasa y análisis por recuento celular por cámara Neubauer	27
3.3. Generación de biomasa en un sistema mixotrófico	31
3.3.1. Primer ensayo: generación de biomasa en un sistema mixotrófico	31
3.3.2. Análisis proximal de la biomasa de <i>Coenochloris</i> sp. en un sistema autotrófico y mixotrófico	41
3.3.3. Análisis de metales de la biomasa de <i>Coenochloris</i> sp. en un sistema autotrófico	43
Conclusiones	45
Recomendaciones	47
Referencias	48
Anexos	57

Índice de Tablas

Tabla 1. Ubicación taxonómica de <i>Coenochloris</i> sp.	6
Tabla 2. Ubicación taxonómica de la papa chaucha (<i>Solanum phureja</i>).....	13
Tabla 3. Composición química de <i>Solanum phureja</i>.....	16
Tabla 4. Comparación morfológica de la microalga catalogada como <i>Coenochloris</i> sp.	27
Tabla 5. Densidad celular generada en 46 días en sistema autotrófico.....	29
Tabla 6. Crecimiento mixotrófico de <i>Coenochloris</i> sp. generada en 3 días en sistema mixotrófico con fracción soluble de papa a una concentración del 20% (v/v).....	32
Tabla 7. Crecimiento mixotrófico de <i>Coenochloris</i> sp. generada en 7 días en sistema mixotrófico con fracción soluble de papa a una concentración del 10% (v/v).....	33
Tabla 8. Crecimiento mixotrófico de <i>Coenochloris</i> sp. generada en 21 días en sistema mixotrófico con fracción soluble de papa a una concentración del 5%.....	34
Tabla 9. Análisis de varianza con medidas repetidas - Prueba de efectos intrasujetos.....	37
Tabla 10. Análisis de varianza con medidas repetidas - Prueba de efectos intersujetos.....	38
Tabla 11. Análisis post Hoc de Duncan.....	38
Tabla 12. Curvas de crecimiento celular en sistema mixotrófico (FSPGSC Mixotrófico y FSPGSC CDA) y autotrófico (control) con fracción	

	soluble de papa determinadas por conteo en cámara Neubauer en un período de 60 días.....	40
Tabla 13.	Análisis proximal de <i>Coenochloris</i> sp. en sistema autotrófico y mixotrófico	41
Tabla 14.	Análisis bromatológico de sustrato orgánico de papa <i>Solanum phureja</i> y composición química NITROFOSKA foliar para obtención de biomasa de <i>Coenochloris</i> sp.....	42
Tabla 15.	Análisis de metales de <i>Coenochloris</i> sp. en cultivo control autotrófico..	43

Índice de figuras

Figura 1. Sistema de escalado con solución de NITROFOSKA Foliar	18
Figura 2. Diagrama de recuento celular en hematocitómetro Neubauer	19
Figura 3. Elaboración de cultivo con fracción soluble de papa (FSP) y montaje de la experimentación con <i>Coenochloris</i> sp. y (FSP) a diferentes concentraciones.	21
Figura 4. Elaboración de cultivo con fracción soluble de papa (<i>Solanum phureja</i>) y montaje de la experimentación con <i>Coenochloris</i> sp. y (FSP) en una concentración del 5%.	22
Figura 5. Fracción soluble de papa brotada sin cáscara (<i>Solanum phureja</i>) y montaje de la experimentación con <i>Coenochloris</i> sp. con FSP con mejor evaluación a una concentración del 5%.	23
Figura 6. Curvas de crecimiento celular evaluados por su densidad en un periodo de 46 días	30
Figura 7. Curvas de crecimiento celular evaluados por su densidad en un periodo de 21 días	35
Figura 8. Curvas de crecimiento celular evaluados por su densidad en un período de 21 días.	40

Índice de Anexos

Anexo 1. Preparación de la Fracción Soluble de papa brotada con cáscara (FSPGCC), brotada sin cáscara (FSPGSC), no brotada sin cáscara (FSPNGSC) y no brotada con cáscara (FSPNGCC).	57
Anexo 2. Biomasa seca de <i>Coenochloris</i> sp. tras un proceso de secado en estufa ...	57
Anexo 3. Segundo ensayo de generación de biomasa basado en etapas de germinación de papa <i>Solanum phureja</i> - FSP brotada y no brotada a concentración 5%.	58
Anexo 4. Segundo ensayo de generación de biomasa basado en etapas de germinación de papa <i>Solanum phureja</i> - FSP brotada y no brotada a concentración 10%.	58
Anexo 5. Segundo ensayo de generación de biomasa basado en etapas de germinación de papa <i>Solanum phureja</i> - FSP brotada y no brotada a concentración 20%.	59
Anexo 6. Bidones en los que se realiza generación de biomasa en un sistema de escalado continuo	59
Anexos 7. Curvas de crecimiento de <i>Coenochloris</i> sp. en sistema autotrófico tras conteo en cámara Newbauer	60
Anexos 8. Análisis proximal del <i>Coenochloris</i> sp en cultivo autotrófico	62
Anexos 9. Análisis proximal del <i>Coenochloris</i> sp en cultivo mixotrófico	63
Anexos 10. Análisis de metales del <i>Coenochloris</i> sp en cultivo autotrófico	64

Resumen

El cultivo de microalgas constituye una alternativa biotecnológica por su mayor eficiencia en la producción de biomasa en relación a cultivos autotróficos y heterotróficos. Se estudió el crecimiento y calidad de la biomasa de la microalga *Coenochloris* sp., se cultivó en un medio control con fertilizante NITROFOSKA, un medio con fracción soluble de papa (*Solanum phureja*) y un medio con fracción soluble de papa y NITROFOSKA. Se realizaron ensayos en cultivos discontinuos alimentados (CDA) con una concentración inicial de 1×10^6 cel/mL (agitación constante a $21.5 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 20 días). En los primeros ensayos se utilizó fracción soluble de papa: brotada con cáscara (FSPGCC) y sin cáscara (FSPGSC), no brotada con cáscara (FSPNGCC) y sin cáscara (FSPNGSC); *Coenochloris* sp. alcanzó el mayor crecimiento en FSPGSC logrando una concentración de 12.54×10^6 cel/mL. A continuación se comparó el crecimiento en FSPGSC con relación al control. En el FSPNGSC con NITROFOSKA (FSPNGSC-CDA) se produjo la mayor densidad celular de 35.12×10^6 cel/mL (1.71 mg/mL de biomasa seca), superando al control que presentó una concentración de 26.72×10^6 cel/mL. La significancia estadística obtenida es de 0.479 indicando la diferencia de densidades celulares determinadas por los tratamientos. El análisis proximal reveló un contenido de proteínas de 42,00% en el control y de 33,89% en FSPNGSC-CDA. El valor de grasa para el control y FSPNGSC-CDA fue de 2,40% y 7,95%, respetivamente.

Estos resultados confirman que *Coenochloris* sp. cultivada en condiciones mixotróficas con fracción soluble de papa constituye una alternativa como sustrato orgánico para la producción de biomasa con un elevado contenido proteico.

Palabras claves: *Coenochloris*, cultivo mixotrófico, microalga, *Solanum phureja*.

Abstract

The cultivation of microalgae is a biotechnological alternative due to its greater efficiency in the production of biomass in relation to autotrophic and heterotrophic cultures. The growth and quality of the biomass of the *Coenochloris sp.* microalgae was studied and it was cultured in a medium control with NITROFOSKA fertilizer, a medium potato soluble fraction (*Solanum phureja*) and a medium potato soluble fraction and NITROFOSKA. Some tests were made in fed batch cultures (CDA) that had an initial concentration of 1×10^6 cel/mL (constant shake at $21.5 \pm 2^\circ\text{C}$ for 20 days). A potato soluble fraction was used in the first trial: sprout skin (FSPGCC) and without skin (FSPGSC), not sprout with skin (FSPNGCC) and without skin (FSPNGSC); *Coenochloris sp.* has reached the highest growing in FSPGSC and it got a concentration of 12.54×10^6 cel/mL. The growing of FSPGSC was compared related to control. A higher cellular density of 35.12×10^6 cel/mL (1.71 mg/mL of dry biomass) was produced with FSPNGSC with NITROFOSKA (FSPNGSC-CDA) and it surpassed the control that showed a concentration of 26.72×10^6 cel/mL. The obtained meaningful statistics was 0.479 showing the difference in cellular density determined by treatments. The proximal analysis revealed a protein concentration of 42.00% inside control and 33.89% in FSPNGSC-CDA. The fat value for control and FSPNGSC-CDA was 2,40% and 7,95% respectively. These results prove that *Coenochloris sp.* cultured in mixotrophic conditions with potato soluble fraction is an alternative for organic substratum in order to produce biomass with a high protein concentration.

Key Words: *Coenochloris*, mixotrophic culture, microalgae, *Solanum phureja*.

Introducción

Las microalgas conforman un grupo de los microorganismos fotosintéticos, caracterizados por el uso de la energía lumínica, para convertir el dióxido de carbono y nutrientes en energía química almacenada en los enlaces de glucosa, adicionalmente libera oxígeno. Asimismo, al poseer un alta tasa de crecimiento en comparación con otros organismos, son capaces de generar una gran cantidad de biomasa por superficie (Barsanti & Gualtieri, 2006) (Schulz, 2006). La funcionalidad de las microalgas en estado natural radica en la reducción de carbono atmosférico mediante la captura de CO₂ y como base alimenticia de muchas especies acuáticas. A nivel industrial pueden ser utilizadas como fuente de biocombustibles a partir de aceite de microalgas, ofreciendo así una opción de bioenergía; la cual es económicamente factible y ambientalmente sustentable (Li, Horsman, Wu, Lan, & Dubois Calero, 2008) (Lee & Lee, 2003).

La microalgas han sido utilizadas desde la antigüedad por el ser humano como complemento de su alimentación, son consideradas como alimentos funcionales por su capacidad para elevar el contenido nutricional y son utilizadas como biofertilizantes. En la actualidad las microalgas tienen un reconocido valor económico a nivel comercial por sus diversos componentes celulares (Albarracín, 2007), pueden incidir positivamente en la salud de animales y humanos obteniendo apreciables cantidades de proteínas, ácidos grasos, minerales y vitaminas (Martin *et al.*, 2002). Además de su uso como suplemento alimenticio, han sido atribuidas diversas propiedades farmacológicas debido a la producción de sustancias bioactivas (Cheng-Ng, 2005).

Durante los últimos 30 años se ha incrementado la producción de biomasa microalgal, la cual va a la par con el avance de la biotecnología, llegándose a producir 5000 toneladas anuales de biomasa seca microalgal (Barsanti & Gualtieri, 2006; Borowitzka, 1999).

Se considera que estos organismos poseen gran cantidad de metabolitos con utilidad para aprovechamiento comercial, no solo en la nutrición humana y animal, sino también en cosméticos, cremas, lociones y biocombustibles como biodiesel y bioetanol, aunque se estima que existen 10000 especies comercialmente se explotan solo 10 especies (Dimitrov, 2007) (Wang, Li, Wu & Lan, 2008). Los medios de cultivos facilitan el crecimiento de microalgas de algunas especies; lo que implica una rápida obtención de biomasa con relación a otras especies vegetales por lo cual permiten una mayor producción, existen a nivel industrial varias limitantes como son el costo de los componentes del medio de cultivo similares al medio BBM (Bold's Basal Medium) (NaNO_3 , MgSO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2) y el aumento de precios de fertilizantes inorgánicos (Svrin-Reyssac, 1998). Los medios de cultivo para microalgas ayudan a la generación de proteínas, lípidos y carbohidratos, que componen aproximadamente el 90% en peso seco de una célula microalgal (Brown, 1991; Gatenby *et al.*, 2003), siendo el componente principal de la biomasa la proteína, con relación a las concentraciones de lípidos y carbohidratos dependiendo estrictamente de cada especie y las condiciones de cultivo (Cano *et al.*, 2007).

La microalga *Coenochloris* ha sido usada como base nutricional y como un agente de biorremediación (Prabakaran & Ravindran, 2012) (Schulz, 2006) (Vinod, Ashish, &

Guru, 2012) (Díaz-Borrego, 2012). Este género ha sido poco estudiado a diferencia de *Chlorella* que se encuentran en investigación para la producción de biodiesel e inmovilización de carbono, este género posee un gran potencial en la producción de aceite y secuestro de carbono atmosférico, lo que conlleva un alta producción de biodiesel. También posee en comparación con otras especies una mayor acumulación de lípidos y metales bajo los mismos factores y condiciones de crecimiento, Fábregas y sus colaboradores (1997) corroboran esta afirmación al tratar suelos contaminados con *Chlorella* y *Coenochloris*.

Al exponer la utilidad que podría tener *Coenochloris*, es necesario conocer y determinar cuáles son las mejores condiciones de crecimiento de este organismo. Los parámetros más importantes a determinar son temperatura, nutrientes, pH, aireación y agitación los cuales no han sido descritos en anteriores investigaciones, además de conocer la calidad nutricional de esta microalga y su utilidad en el mercado. De esta manera esta investigación se enfoca en evaluar: la concentración de nutrientes a base de sustrato orgánico de papa en condiciones experimentales en comparación con sustrato inorgánico comercial. Finalmente el presente estudio determinará las pautas para que se realicen futuras investigaciones sobre productos biológicos y aplicarlas en el campo biotecnológico.

Diversas microalgas como *Coenochloris* y *Chlorella* presentan la capacidad de ser cultivadas con sustratos orgánicos tales como: aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, derivados agrícolas o de origen animal, aguas residuales y mediante la degradación parcial de hidrocarburos como fuentes de carbono. Por lo que, el manejo paralelo de luz y sustrato

orgánico en el crecimiento muestra la capacidad mixotrófica de estas (Fábregas, 1997; Sánchez, 2008). Los cultivos en mixotrofia pueden originar biomasa en altas cantidades en relación con los cultivos obtenidos en condiciones autotróficas y esto se debe al efecto de la energía de la luz y el sustrato orgánico. Debido a esto, la atención mundial se ha tornado hacia el uso de sustratos orgánicos de varios orígenes como son los recursos agrícolas (Camargo & Alonso, 2006).

En Ecuador el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) se desarrolla especialmente en la región sierra, lo que implica un excedente de residuos agrícolas que pueden ser utilizados como un sustrato, a razón de esto la elaboración de la fracción soluble de papa pretende ser para el cultivo de microalgas una fuente de nutrientes por su elevado contenido de aminoácidos, amonio, nitrato, fosfato y carbono (Vera, 2002), y la evaluación de sus resultados será determinado por análisis proximal y metales de un sistema de escalado a 20 litros para la obtención de biomasa seca necesaria para los análisis.

El presente trabajo experimental cultivó de manera discontinua la microalga *Coenochloris* sp. con fracción soluble de papa chaucha (*Solanum phureja*) en cultivos discontinuos mixotróficos. Por lo expuesto anteriormente, los objetivos de esta investigación son: determinar la factibilidad de crecimiento de la microalga *Coenochloris* sp. en fracción soluble de papa (*Solanum phureja*), en comparación al crecimiento con el fertilizante comercial Nitrofoska, para escalar los cultivos que presenten mayor producción de biomasa hasta la obtención de un volumen de 20L para ser evaluada la biomasa seca obtenida mediante para la realización de análisis proximales y de metales pesados.

Las hipótesis planteadas en este estudio fueron: Hipótesis nula (H₀): La fracción soluble de papa (*Solanum phureja*), no es un sustrato de alta calidad nutritiva para la producción de biomasa de la microalga *Coenochloris* sp. Hipótesis alternativa (H_a): La fracción soluble de papa (*Solanum phureja*), es un sustrato de alta calidad nutritiva para la producción de biomasa de la microalga *Coenochloris* sp.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1. Descripción taxonómica de *Coenochloris* sp.

Posee colonias de 4, 8, 16 células (a veces más), 4 u 8 colonias hijas dentro de una envoltura gelatinosa; restos de la pared celular de la madre presentes en torno a las células hijas; el cuerpo de la célula es esférico, tiene un pirenoide en forma de copa que posee un solo cloroplasto (Korshikov, 1953), (John, 2002).

En la Tabla 1 se puede ver la Ubicación taxonómica de *Coenochloris* sp.

Tabla 1.
Ubicación taxonómica de *Coenochloris* sp.

<i>Coenochloris</i> sp.	
Reino	Viridiplantae
Filo	Chlorophyta
Clase	Trebouxiophyceae
Orden	Chlorellales
Familia	Oocystaceae
Género	<i>Coenochloris</i>
Nombre Científico	<i>Coenochloris</i> sp.

Nota: Ubicación taxonómica de *Coenochloris* sp. en base a la descripción realizada por Korshikov.
Autor: John (2002).

1.1.1. Usos

Numerosas investigaciones detallan que las algas son capaces de transformar muchos xenobióticos incluyendo fenoles. La modificación de la estructura de xenobióticos por organismos eucariotas afecta en el aumento de la susceptibilidad del compuesto al ataque

metabólico de bacterias en un proceso de hidroxilación (Semple, 1999). En el caso de *Coenochloris pyrenoidosa* es capaz de degradar 4-nitrophenol en un tratamiento corto de 3 días dando resultados óptimos en consorcio con *Chlorella vulgaris var. vulgaris f. minuscula* (Lima, 2003).

La capacidad de biorremediación se ilustra bajo ensayos de densidad celular de las microalgas tanto en los cultivos unialgales como en el mixto, siendo *Coenochloris* sp. la que exhibe mejor crecimiento. Las bacterias asociadas a los cultivos estimularon su crecimiento en presencia del xenobiótico como puede ser sustancias fenólicas y queroseno, desempeñando un papel importante en la biodegradación. Dentro de las bacterias asociadas a las microalgas, *Xanthobacter* y *Burkholderia* han estado vinculados con la actividad biodegradativa sobre hidrocarburos (Díaz, 2012).

1.2. Nutrición de microalgas

La biotecnología algal es un campo que se compone de diversas disciplinas para lograr el aprovechamiento de microalgas (dulceacuícolas y marinas) y macroalgas (marinas) con el objetivo de generar nuevos productos de interés comercial; estas aplicaciones se deben a la intensa y diversa actividad metabólica, la cual está relacionada con su nutrición o trofia. La trofia determina las rutas metabólicas involucradas en los procesos físicos y químicos de la microalga que convierten o usan energía en los procesos de anabolismo y catabolismo (Pérez, 2009).

Kaplan, (1986) postula dos grandes formas de nutrición: autotrófica o litótrofa, y la heterotrófica, estableciéndose diferentes tipos de nutrición dependiendo de la naturaleza de la microalga.

1.3. Métodos de cultivo de microalgas

En las últimas décadas, han ganado interés las posibles utilidades que se otorgan a las microalgas, las mismas que han sido tratadas como modelo biológico en la investigación debido a su flexibilidad metabólica y características fisiológicas. La biotecnología microalgal ha permitido el desarrollo a nivel industrial y por ende comercial de cultivos de nuevas especies, sin embargo también se ha centrado en el incremento de aplicaciones de estos microorganismos y otras especies que han sido cultivadas a microescala para la obtención de sustancias de interés químico, industrial y farmacéutico que de ellas se extraen (Gómez, 2007).

Los sistemas de cultivo tienen un protagonismo en procesos biotecnológicos al ser un paso intermedio entre las materias primas y los productos finales (Cooney, 1983). Los sistemas de generación de biomasa efectivos y eficientes son aquellos que permiten la óptima utilización de los sustratos por medio de procesos de biocatálisis (Lee, 2001). El objetivo principal en el diseño de un sistema de cultivo biotecnológico es minimizar los costos de producción para la obtención de productos (biomoléculas o servicios) de alta calidad, considerando que estos sistemas incluyen procesos de síntesis, bioconversión y la recuperación del producto (Cooney, 1983).

El cultivo moderno de microalgas inició en la década de los 50's, empleando luz solar y agua marina, con lo que se logró obtener grandes cantidades de biomasa. En las décadas subsiguientes diversos grupos de investigación en países desarrollados y en vías de desarrollo, centraron sus esfuerzos en aumentar la producción de biomasa y bioproductos que pudieran generar resultados comparables a los obtenidos con microorganismos como levaduras y bacterias (Contreras-Flores, 2003).

Las microalgas han sido producidas con diferentes propósitos sean alimentarios o farmacológicos, esto se ha manejado en condiciones naturales propicias. Por lo que, se conocen lagos o sistemas lacustres en los que surgen *blooms* masivos de especies favorables para el hombre, explotándose el cultivo *in situ* de forma temporal.

El cultivo de microalgas generan ventajas que se pueden resumir según Cohen (1986) y John (2002). Es un sistema biológico que utiliza de forma eficiente energía solar para generar materia orgánica. Las microalgas se desarrollan en períodos de tiempo más cortos que las plantas terrestres, por ende se obtiene un mayor rendimiento anual.

Además la composición bioquímica de la biomasa puede alterarse para obtener bioproductos específicos variando las condiciones ambientales y/o la composición del sustrato y los compuestos considerados de interés comercial pueden ser acumulados en altas concentraciones, tales como: proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o biopolímeros.

1.3.1. Cultivos fototróficos

Los cultivos fototróficos engloban sistemas nutricionales fotoautotróficos y mixotróficos, por lo que dependen de luz como fuente de energía. Los cultivos fotótrofos se realizan en sistemas abiertos o en fotobiorreactores (PBS - *Photobioreactor System*).

Las microalgas son fotoautótrofas esto implica que la fuente de energía es la luz solar o luz blanca artificial y el dióxido de carbono (CO₂) como fuente de carbono, ambos factores son utilizados durante el proceso fotosintético. En sistemas mixotróficos la fuente de energía es provista por la luz y el sustrato, del cual se asimila el carbono necesario (Lee, 2001).

La fotosíntesis se la puede definir como una forma de transformación de la energía luminosa. Todas las formas de vida están sujetas directa o indirectamente de este proceso como fuente de energía para su metabolismo o crecimiento. En el cultivo de microalgas se utiliza la productividad fotosintética para generar bienes y servicios (Masojidek, 2004).

1.3.2. Cultivos heterotróficos

La condición heterotrófica en microalgas es capaz de conservar un crecimiento constante y sostenido en presencia de un sustrato orgánico en carencia de luminosidad, pero al utilizar de manera simultánea para su crecimiento luz y sustratos orgánicos como fuente de energía, y como fuente de carbono CO₂ la microalga manifiesta una capacidad mixotrófica (Bermúdez, 2003).

Un número significativo de microalgas poseen la capacidad de desarrollarse de forma heterotrófica (Droop, 1974). En los sistemas de cultivos cerrados, se están obteniendo

avances adaptando las tecnologías de la fermentación a microalgas, descartando los sistemas de luz y los problemas que esto conlleva (Apt y Behrens, 1999).

El crecimiento quimioheterotrófico o heterotrófico, da la posibilidad de generar altas densidades en biorreactores o fermentadores (BR - bioreactor) (Chen, 1996; Lee, 2004). Este tipo de crecimiento da la opción de un método económicamente viable a escala industrial para el cultivo de microalgas que disponen de sustancias de carbono orgánico como única fuente de carbono y energía. La quimioheterotrofia elimina total o parcialmente la necesidad de luz y brinda la opción de aumentar de forma amplia las concentraciones de microalgas o de bioproducto consiguiendo óptima producción por unidad de volumen (Chen, 1996).

Se puede tener un proceso controlado por medio de la tecnología de fermentaciones que nos permite optimizar recursos lo que implica disminuir los costos de obtención de bioproducto por las altas densidades celulares generadas (Chen & Chen, 2006).

1.3.3. Cultivo discontinuo (*batch culture*)

Este método de cultivo se presenta como el más simple, en este el microorganismo se desarrolla a partir de una cantidad restringida de medio hasta que se termina un nutriente fundamental o se almacenan sustancias tóxicas hasta niveles que limitan el crecimiento, el incremento no inicia de forma inmediata después de la inoculación del medio de cultivo, la fase previa al crecimiento activo se conoce como fase de latencia o como un período de adaptación. Este proceso culmina cuando la biomasa consume todo el sustrato (Tovar, 2012).

1.3.4. Cultivo discontinuo alimentado (batch alimentado (BA) o *Fed Batch*)

El cultivo *batch* es alimentado de forma continua con medio nutritivo fresco o alguno de sus componentes, si el nutriente que se alimenta es el limitante del desarrollo. Esta técnica consiste en controlar la velocidad de crecimiento del microorganismo. El BA es característicamente ventajoso en procesos como el crecimiento celular y la formación de producto son sensibles a la concentración del sustrato limitante es decir, cuando la productividad de la biomasa o del metabolito buscado se ven afectados. Así, este método es de gran utilidad cuando se pretende obtener una alta concentración de biomasa (Tovar, 2012).

1.4. Descripción botánica y taxonómica de *Solanum phureja*

Es una planta perenne de aproximadamente 60 cm de alto, conformada por varios tallos herbáceos con muchas ramificaciones. Presenta numerosas hojas de color verde oscuro, de pequeña longitud, alternas, pecioladas, y compuestas. Las flores hermafroditas, moradas o rojas, se hacen presentes cuando la planta alcanza una altura de 30 cm y se conservan hasta el final del ciclo (Mosquera 1992, Huamán & Spooner 2002).

El fruto de la papa es una baya esférica bilocular, contiene numerosas semillas de formas planas, ovaladas y pequeñas. El embrión tiene la forma de una “U” orientada hacia el punto de unión con la placenta. En uno de los extremos del embrión está la radícula o primordio radicular, y en el otro, la plúmula con los cotiledones (Luján, 1996). El color

de los tubérculos tiene distintos matices de amarillo y, en algunos casos, presenta tintes rojos; tiene forma de redonda a ovoide y hoyos distribuidos por toda la superficie. Visto tras un corte longitudinal, la parte exterior se denomina peridinal y es mayoritariamente de color amarillo, en seguida se reconoce una franja estrecha llamada corteza (Mosquera 1992).

En la tabla 2 se puede ver la ubicación taxonómica de la papa chaucha (*Solanum phureja*).

Tabla 2.

Ubicación taxonómica de la papa chaucha (*Solanum phureja*)

<i>Solanum phureja</i>	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Nombre Científico	<i>Solanum phureja</i>
Epíteto específico	<i>Juz. & Bukasov</i>
Nombres vulgares:	
Ecuador: Papa criolla, papa chaucha, yema de huevo	
Colombia: Papa criolla	

Nota: Ubicación taxonómica de *Solanum phureja*,

Autor: Información: Botánica Sistemática Ecuatoriana

Esta variedad de tubérculo *Solanum phureja* es altamente valorada por investigadores y agricultores indígenas, debido a sus propiedades organolépticas como: color, sabor, textura, forma y también por sus propiedades agrícolas e identidad cultural. Las variedades nativas como *Solanum phureja* poseen un alto contenido de sólidos, flavonoides, carotenoides, y antocianinas (sustancias antioxidantes naturales) por lo que son nutritivas,

haciendo de estas variedades un producto único en el mundo, esto las diferencia de las variedades de papas mejoradas, (INIAP, 2005).

1.4.1. Ubicación geográfica de *Solanum phureja* en Ecuador

Las principales zonas productoras de papa en Ecuador se identifican en Norte, Centro y Sur del país (Ramírez, 2010). Zona Norte: En la zona norte en las provincias del Carchi e Imbabura se presenta la mayor producción de papa por área a nivel nacional. El rendimiento promedio en estas provincias es de 21.7 t/ha. En Carchi el 25% de la superficie nacional se dedica al cultivo de papa (15.000 ha), la provincia produce el 40% de la cosecha anual del país. El área papera de la provincia se distribuye a lo largo de las cordilleras oriental y occidental, entre los 2.800 hasta los 3.200 m.s.n.m. y con clima frío de alta montaña (Ramírez, 2010).

En la región céntrica del país se localizan las provincias de Bolívar, Chimborazo, Tungurahua, Cotopaxi y Pichincha. Chimborazo tienen una mayor representatividad papera con respecto a las otras de esta zona, con una producción de 11 t/ha. En cuanto a la zona sur, Cañar es la provincia más papicultora, donde su producción es de las 8 a 10 toneladas por hectárea. En esta zona de transición sub-húmeda (2.000 a 2.600 m.s.n.m.), se presentan una temperatura de 13°C a 15°C y precipitaciones anuales entre 750 a 1.100mm. En la zona de Cañar el cultivo es temporal, además de papa, la rotación habitual incluye arveja, maíz, fréjol y pasto nativo (Ramírez, 2010).

1.4.2. Composición química y nutricional de *Solanum phureja*

La papa *Solanum tuberosum* es el alimento de mayor consumo en el mundo ocupando el cuarto lugar este tubérculo posee alto contenido de agua en un 72-75%, es un alimento de alto valor energético por su alta concentración de carbohidratos, pero con bajo contenido de grasa, en menor medida aporta proteínas (Borba, 2008). Este tubérculo presenta gran cantidad de micronutrientes como vitamina C, también de forma moderada hierro además posee vitaminas B1, B3 Y B6, tiamina, niacina, riboflavina y minerales como: ácido pantoténico, calcio, folato, fósforo, magnesio y potasio (FUNSEPA, 2009).

La papa chaucha (*Solanum phureja*) que se empleó en el presente estudio posee un alto poder nutritivo, ya que reporta el doble de nutrientes con relación a la papa común. La papa chaucha como alimento, ofrece un excelente valor nutricional de vitaminas A, B y C, carbohidratos, niacina, tiamina, y minerales como el sodio, calcio, fósforo, hierro magnesio y potasio, aporte nutricional importante en la dieta diaria. (FAO, 2008).

Para realizar este ensayo se seleccionó la *Solanum phureja* debido a su rápida generación de brotes además de ser un cultivo tradicional en la región sierra de nuestro país y debido a su alto contenido de nutrientes (CORPOICA, 2000). En la tabla 3 se puede ver la composición química de *Solanum phureja*.

Tabla 3.
Composición química de *Solanum phureja*.

Composición química del <i>Solanum phureja</i>	UNIDADES	NIVEL	+/-
Contenidos Aproximados			
Humedad	(g/100g FW*)	74,80	0.20
Grasas	(g/100g FW)	0,10	0.04
Proteína	(g/100g FW)	2,50	0.02
Cenizas	(g/100g FW)	1,10	0.03
Carbohidratos totales	(g/100g FW)	21,60	0.10
Fibras totales	(g/100g FW)	2,20	0,25
Fibras solubles	(g/100g FW)	1.21	1.00
Fibras insolubles	(g/100g FW)	3,62	1,81
Minerales			
Fe	(mg/100g FW)	0,77	0.20
K	(mg/100g FW)	337,30	730
Ca	(mg/100g FW)	8,20	2.30
Mg	(mg/100g FW)	10.20	1.10
Cu	(mg/100g FW)	-	-
Zn	(mg/100g FW)	-	-

I.C.B.F (Instituto Colombiano del Bienestar Familiar).2005

*: F.W= *Fresh Weight* (peso fresco)

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Muestras: obtención y procesamiento

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana. Las muestras de la microalga *Coenochloris* sp. fueron donadas por el cepario de la Universidad Central del Ecuador.

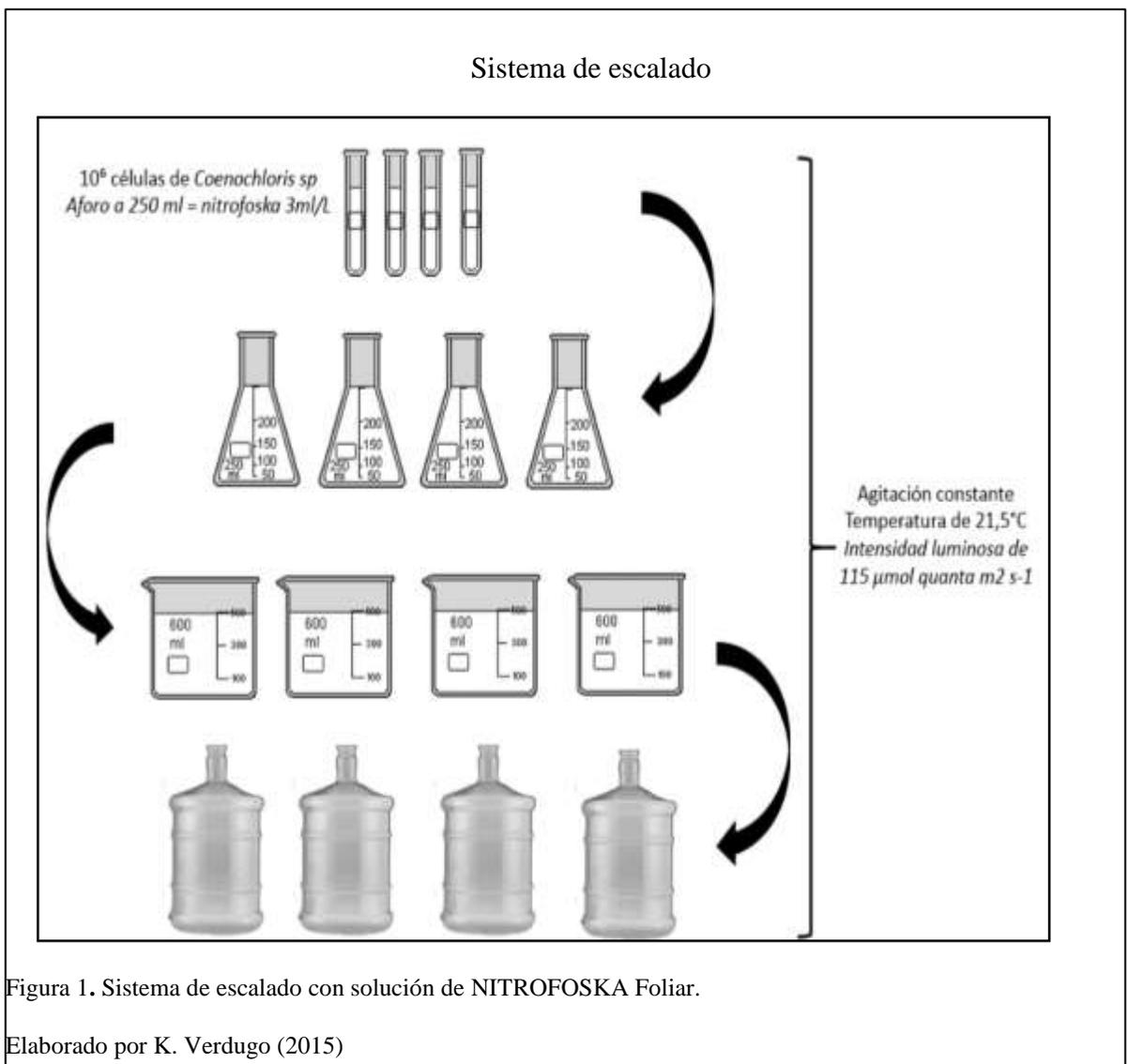
Se ejecutaron dos experimentaciones: la primera fue la identificación de *Coenochloris* sp. de manera que las colonias de la microalga chlorophyta *Coenochloris* sp. fueron caracterizadas de acuerdo a la coloración, tamaño, aspecto a nivel de microscopía óptica y patrón de crecimiento (Gao, 1998) (Su J, Jia S, Chen X & Yu H, 2008).

Posteriormente se efectuó una segunda experimentación basada en el escalado en sistema autotrófico, este consiste en incrementar el volumen de cultivo en un sistema discontinuo alimentado para obtener mayor producción de biomasa.

El escalado se inició en tubos de ensayo con un volumen de 20 mL en un medio de cultivo NITROFOSKA foliar (Tabla 11) sin aireación, luego de ello se incrementó el volumen a 200 mL, en envases de vidrio de 473 mL, teniendo en cuenta la densidad celular de *Coenochloris* sp. mediante recuento celular.

Para considerar el aumento de volumen del cultivo en la siguiente etapa de escalado, a partir de una población de 1×10^6 cel/mL, se incrementó al volumen de la solución

NITROFOSKA Foliar en una concentración de 3 mL en un litro de agua destilada, a envases de 1000 mL. Progresivamente, el volumen de la solución de NITROFOSKA Foliar se fue aumentando y consecuentemente el volumen de los envases se incrementó a partir de 10 millones y 20 millones a envases de 5 litros y 20 litros respectivamente. Las condiciones de escalado fueron: agitación constante las 24 h a 21.5°C de temperatura ambiental y a una intensidad lumínica de 115 $\mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$.



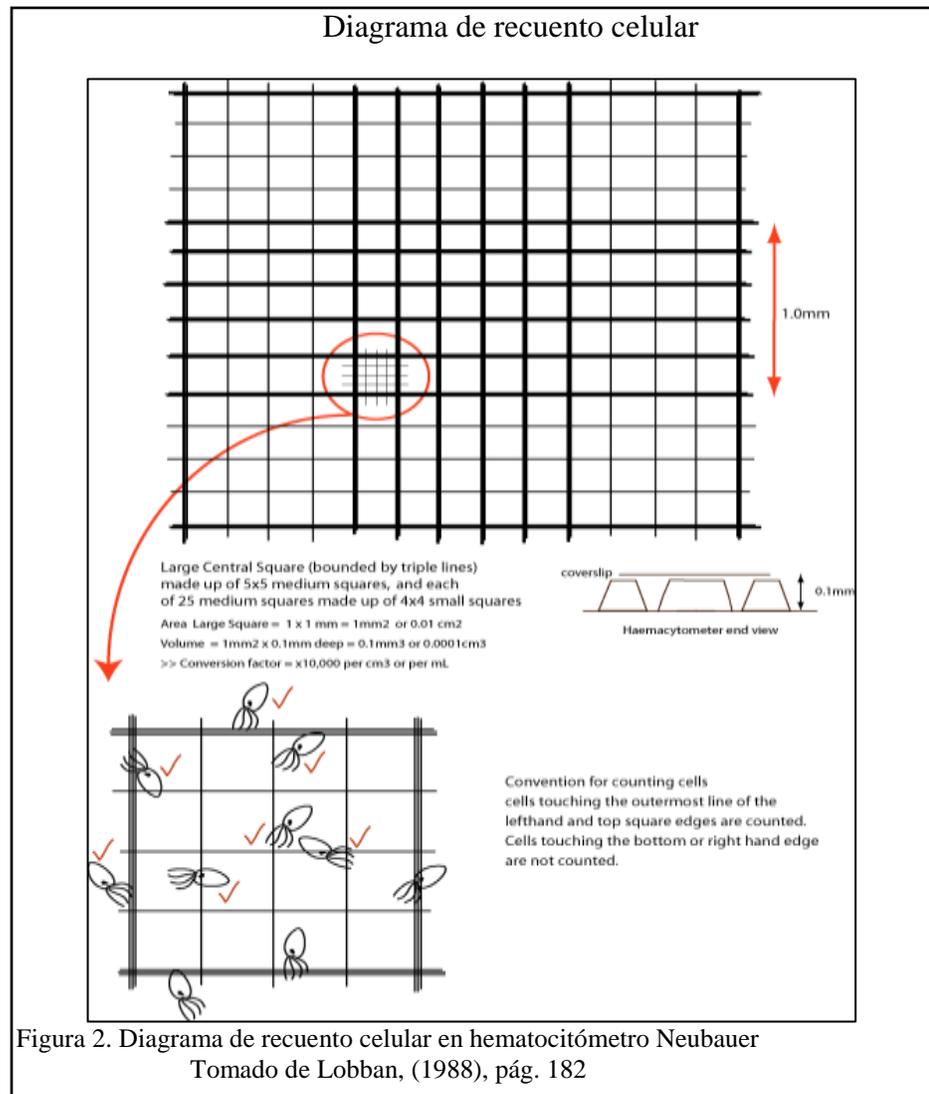
2.2. Recuento celular por cámara Neubauer

El recuento en microscopio se establece para determinar la etapa estacionaria, utilizando un contador hematocitómetro Neubauer. La cuantificación de la cinética de crecimiento se calculó a partir de los datos obtenidos relacionados a la densidad celular en fase exponencial, por medio de las formulas planteadas por Lobban, (1988).

Conteo = n células (promedio de recuento de cuadrantes)

Factor de Dilución = cci

Concentración muestra inicial = $n \times 10^4 \times cci = \# \text{ células/ML}$



La preparación de fracción soluble de papa (*Solanum phureja*) se realizó considerando las diferentes etapas de madurez de la papa. Para los tratamientos se utilizó 100 g. de papa no brotada sin cáscara, 100 g de papa brotada sin cáscara, 100 g. de papa no brotada con cáscara y 100 g de papa brotada con cáscara. Cada uno de los tratamientos fueron licuados en 250 mL de agua destilada y tamizados, se dejó reposar durante 3 horas cada uno de los tratamientos y con ayuda de una pipeta se removió la fase líquida libre de sólidos perceptibles la cual fué esterilizada a 121°C y conservó en un congelador.

La tercera experimentación se fundamentó en 4 tratamientos con fracción soluble de papa (*Solanum phureja*) (FSP) como medio de cultivo para microalgas. Los tratamientos se basaron en diferentes concentraciones de FSP (5%, 10% y 20%) y en el desarrollo germinativo de papa (*Solanum phureja*), brotada con cáscara (FSPGCC), brotada sin cáscara (FSPGSC), no brotada con cáscara (FSPNGCC) y no brotada sin cáscara (FSPNGSC). Las condiciones de escalado fuerón: agitación constante las 24 h a 21.5°C y a una intensidad luminosa de 115 $\mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$. Los cultivos mixotróficos se compararon con un control autotrófico en un medio líquido de NITROFOSKA a una concentración de 3mL/L.

Elaboración de cultivo con fracción soluble de papa (FSP) y montaje de la experimentación con *Coenochloris* sp. y FSP a diferentes concentraciones

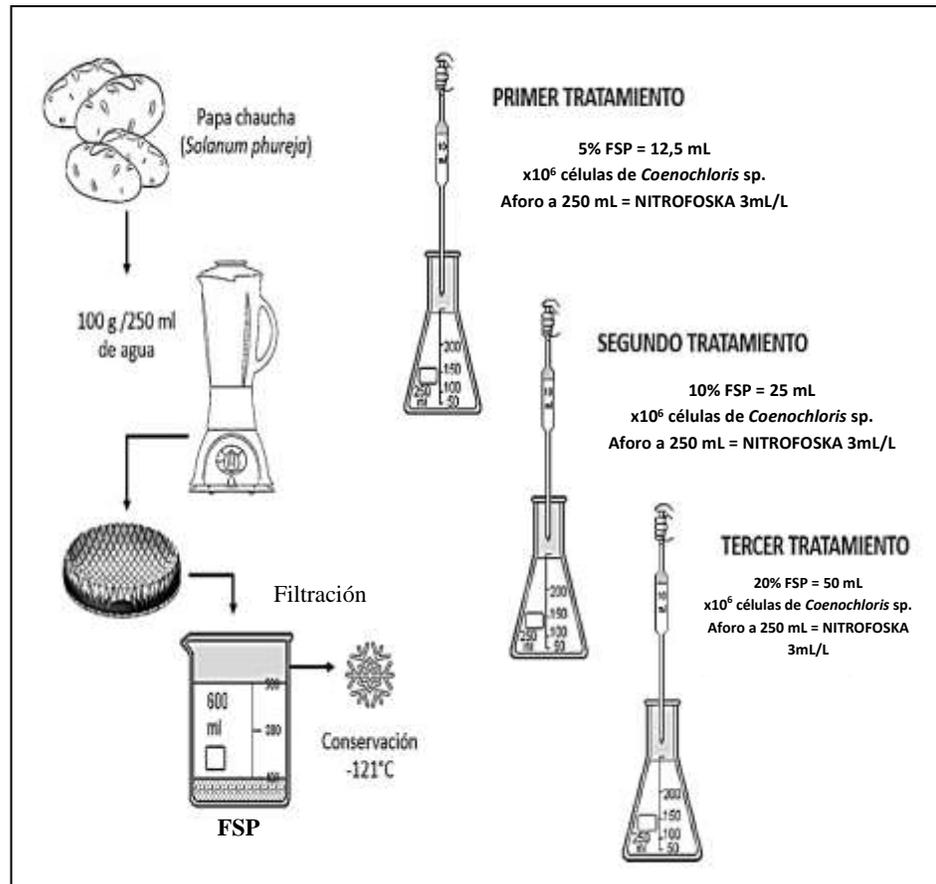


Figura 3. FSP- Fracción soluble de papa.

Primer tratamiento – 5% Fracción soluble de papa; **Segundo tratamiento** – 10% Fracción soluble de papa. **Tercer tratamiento** – 20% Fracción soluble de papa.

Elaborado por K. Verdugo (2015)

Elaboración de cultivo con fracción soluble de papa (FSP) y montaje de la experimentación con *Coenochloris* sp. y FSP en una concentración del 5%

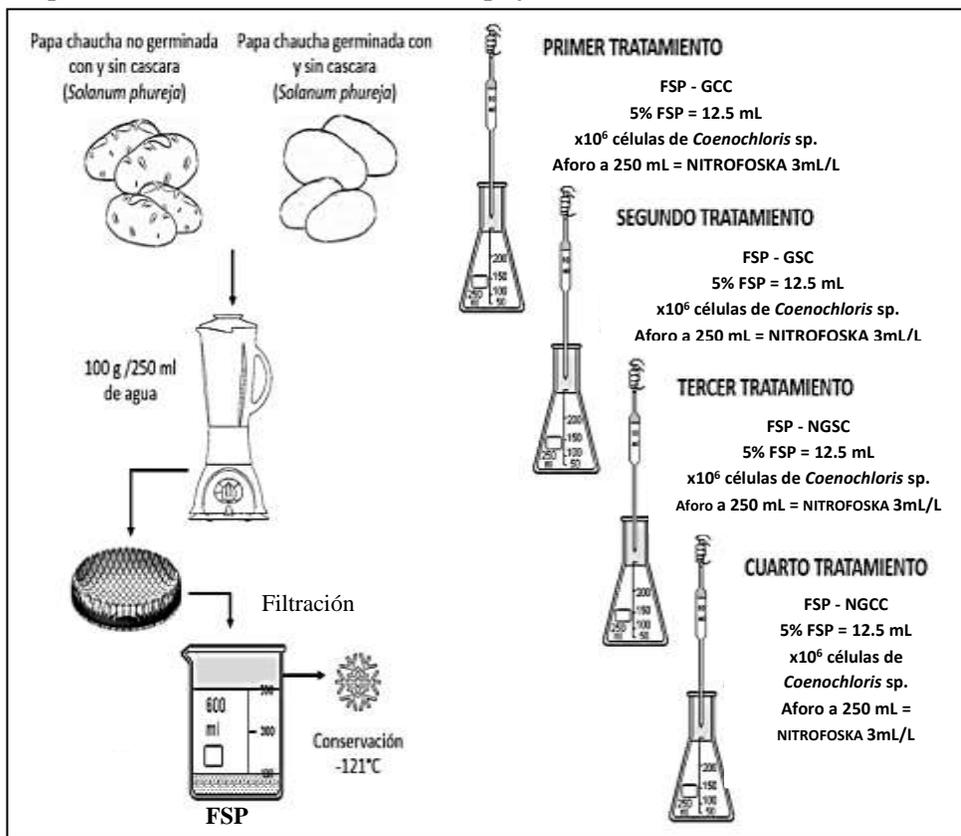


Figura 4. FSP- Fracción soluble de papa.

Primer tratamiento – (FSP-GCC) Fracción soluble de papa brotada con cáscara; **Segundo tratamiento – (FSP-GSC)** Fracción soluble de papa brotada sin cáscara; **Tercer tratamiento – (FSP-NGSC)** Fracción soluble de papa no brotada sin cáscara; **Cuarto tratamiento – (FSP-NGCC)** Fracción soluble de papa no brotada con cáscara.

Elaborado por K. Verdugo (2015)

Para el crecimiento de *Coenochloris* sp. con fracción soluble de papa (*Solanum phureja*) a una concentración del 5% (v/v) se realizó el ensayo mediante tratamientos (cultivo mixotrófico discontinuo alimentado y CDA -cultivo discontinuo alimentado) con fracción soluble de papa (FSP) como medio de cultivo para microalgas, basándonos en el tratamiento de mejor resultado. Las condiciones de escalado fueron agitación constante las 24 h a 21.5°C y a una intensidad luminosa de 115 $\mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$. Los cultivos

mixotróficos se compararon con un control autotrófico en un medio líquido de NITROFOSKA a una concentración de 3 mL/L.

Fracción soluble de papa brotada sin cáscara (*Solanum phureja*) y montaje de la experimentación con *Coenochloris* sp. con FSP con mejor evaluación a una concentración del 5%.

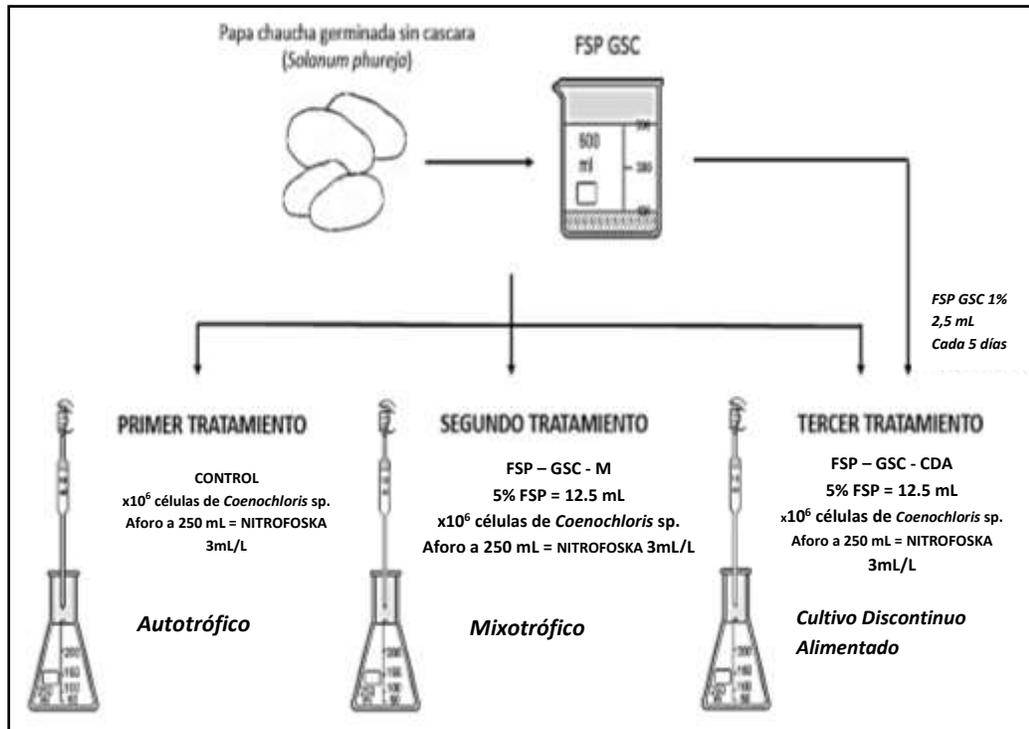


Figura 5. **FSP-GSC** - Fracción soluble de papa brotada sin cáscara.

Primer tratamiento – Autotrófico (Control); **Segundo tratamiento** – (FSP-GSC-M) Fracción soluble de papa brotada sin cáscara-mixotrófico. **Tercer tratamiento** – (FSP-GSC-CDA) Fracción soluble de papa brotada sin cáscara- cultivo discontinuo alimentado).

Elaborado por K. Verdugo (2015).

2.3. Análisis de resultados.

El peso seco se determinó tras un proceso de decantación donde la fase líquida se sometió a centrifugación (30 minutos a 1200 rpm) para obtener mayor cantidad de biomasa para el proceso de secado. La fase sólida obtenida del proceso de decantación junto con el *pellet* resultante de la centrifugación fueron sometidas a secado en una cámara climática para condiciones constantes (BINDER KBF 240) a 60°C durante 24 h.

Los análisis de laboratorio se centraron en el análisis proximal de la biomasa algal, para determinar su alta calidad nutricional, a partir de alimentación con fracción soluble de papa (*Solanum phureja*) los mismos que fueron efectuados en el Centro de soluciones analíticas integrales Centro CESAL.

Los ensayos realizados fueron de humedad (INEN 518), esta norma establece el método para determinar el contenido de humedad y otras materias volátiles en las harinas de origen vegetal. El método se basó en calentar las harinas de origen vegetal a $130 \pm 3^\circ\text{C}$ y pesar (NTE INEN 0518, 1981).

Proteína (INEN 519), la norma detalla el método para la determinación del contenido de proteína en las harinas de origen vegetal. El contenido de proteína se determina mediante el método Kjeldahl el valor obtenido se multiplica por un factor y este resultado es expresado como proteína (NTE INEN 0519, 1981).

Grasa (INEN 523), la norma detalla el método para establecer el contenido de grasa o extracto etéreo en harinas de origen vegetal. Mediante un solvente orgánico el contenido de materia grasa fue extraído de una muestra de harina de origen vegetal (NTE INEN 0523, 1981).

Ceniza (INEN 520), la norma detalla el método para establecer la cantidad de cenizas en las harinas de origen vegetal, para esta determinación se incineró la muestra a $550 \pm 15^{\circ}\text{C}$ y pesó el residuo que corresponde a las cenizas en las harinas de origen vegetal (NTE INEN 0520, 1981).

Fibra (INEN 522), la norma detalla el método para establecer el contenido de fibra cruda en harinas de origen vegetal. Se digirió la muestra sin grasa con solución de ácido sulfúrico, se lavó y nuevamente se digirió con solución de hidróxido de sodio, se lavó, secó y pesó. La muestra calcinó hasta destrucción de la materia orgánica. La pérdida de peso después de la calcinación es el contenido de fibra cruda en la muestra (NTE INEN 0522, 1981).

La determinación la cantidad de metales de la biomasa algal, se realizó en el Centro de Soluciones Analíticas Integrales (Centro CESAL), se analizó calcio, sodio, potasio, magnesio, hierro, plomo y cobre mediante método interno de absorción atómica y azufre mediante método interno espectrofotométrico (Anexo 10).

La estadística realizada fue un análisis de varianza con medidas repetidas (ANOVA - MR), que nos permitió estudiar el efecto de uno o más tratamientos cuando al menos uno de ellos es un tratamiento intrasujetos. Un tratamiento intrasujeto o con medidas repetidas se caracteriza porque todos los niveles del tratamiento se aplican a las mismas muestras (Pardo, 2000), para definir similitudes entre muestras se aplicó una análisis post Hoc de Duncan. Estos análisis se realizaron mediante el programa de SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) Versión 21.0.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Identificación de *Coenochloris* sp.

Las colonias de la microalga Chlorophyta *Coenochloris* sp. fueron caracterizadas de acuerdo a los parámetros establecidos por Gao (1998) y Su *et al.* (2008), que involucra su diferenciación por la coloración, tamaño, aspecto a nivel de microscopía óptica y patrón de crecimiento (Tabla 4).

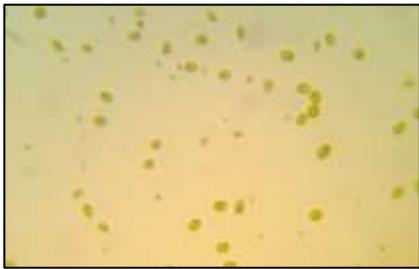
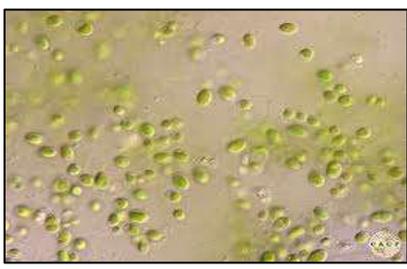
La caracterización por medio de su coloración es un parámetro básico de identificación que no involucra su diferenciación a nivel de género y especie. Sin embargo, este parámetro permite diferenciar de manera general microalgas con un alto contenido de clorofila *a* y clorofila *b* color verde característico de microalgas clorofitas, de las microalgas con un alto contenido de pigmentos carotenoides que otorga a la microalga coloración rojiza como es el caso de las microalgas xantofilas (Abbayes, 1989).

Coenochloris sp. por su descripción taxonómica se encuentra en el orden de los Chlorellales, denominadas algas verdes (Graham, L. 2000), la coloración observada en la muestra de estudio es un color verde intenso que corrobora la coloración observada por Mikhaïlovna (1998) quien describe a *Coenochloris* sp. como una microalga de color verde brillante.

La descripción de *Coenochloris* sp, observada revela colonias de 4 células que suelen presentarse en envolturas gelatinosas y de forma esférica. Esta descripción es corroborada por Korshikov (1953), al describir a *Coenochloris pyrenoidosa*, como una microalga que forma colonias de 4, 8, 16 células planctónicas; dentro de una vaina

mucilaginoso, que puede presentar restos de la pared celular de la madre en torno a las células hijas, de forma célula esférica; con un solo cloroplasto y un pirenoide.

Tabla 4.
Comparación morfológica de la microalga catalogada como *Coenochloris* sp.

Descripción práctica		Descripción bibliográfica	
Color	Verde	Color	Verde
Tamaño	aprox. 12 µm	Tamaño	aprox. 15 µm
Aspecto	Circulares	Aspecto	Esférico
D. MICROSCÓPICA		D. MICROSCÓPICA	
FOTOGRAFÍA PRÁCTICA		FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA	
			
(Verdugo, 2015)		(Korshikov, 1953)	

Nota: Identificación microscópica de células de *Coenochloris* sp. vaina mucilaginoso, que puede presentar restos de la pared celular de la madre en torno a las células hijas, de forma célula esférica. Elaborado por: K. Verdugo (2015)

3.2. Generación de biomasa y análisis por recuento celular por cámara

Neubauer

Como se explicó en el capítulo anterior la experimentación fue realizada con 4 repeticiones (Tabla 5) con el objetivo de obtener la mayor cantidad de biomasa e ir comparando el crecimiento celular en un período de tiempo de 46 días. Se puede observar que las muestras no poseen una diferenciación considerable en la densidad celular hasta el día 14, la densidad celular de la muestra 3 fue de 13.79×10^6 cel/mL en este día, lo que representa que esta muestra posee 1.6 veces mayor crecimiento con relación a la muestra de menor densidad celular (muestra 2); en el día 39, la muestra 4 presenta la densidad celular más elevada en 0.815, 0.824 y 0.899 veces más con relación a las muestras 1, 2 y 3 respectivamente.

Esto se puede atribuir a la adaptación de las microalgas a un mayor volumen del sistema de cultivo en el que está desarrollado. Esto es corroborado en el estudio realizado por Richmond (2004), quien manifiesta que el retraso en el crecimiento de una microalga se atribuye a la adaptación fisiológica del metabolismo de la célula para el crecimiento; tales como, el aumento de los niveles de enzimas y metabolitos implicados en la división celular y la fijación de carbono.

En la tabla 5 se puede ver la densidad celular generada en 46 días en un sistema autotrófico

Tabla 5.
Densidad celular generada en 46 días en sistema autotrófico

		Densidad celular en sistema autotrófico ($\times 10^6$ cel/mL)											
Edad del Cultivo (Días)		0	3	4	8	14	18	21	25	32	39	42	46
M 1		1,000	6,915	6,930	9,480	11,7970	19,5900	24,020	26,6700	33,1200	45,120	11,6775	5,0325
M 2		1,000	6,375	6,660	10,832	8,6175	21,7125	16,720	16,9900	39,5800	45,610	22,5675	5,8950
M 3		1,000	4,440	5,947	12,795	13,7925	19,5075	21,790	23,5500	33,7900	49,750	24,6975	5,8425
M 4		1,000	4,665	5,992	6,0275	9,5250	33,2100	42,495	49,5775	52,0300	55,330	23,6625	8,0250

Nota: Recuento celular en cámara de Neubauer en un periodo de 46 días en las 4 muestras de análisis. La densidad inicial fue de 1×10^6 cel/mL.

M: muestra. (M1-Cultivo autotrófico, M2- Cultivo autotrófico, M3- Cultivo autotrófico, M4- Cultivo autotrófico). Elaborado por: K. Verdugo (2015)

Curvas de crecimiento celular (cel/mL) en cultivos discontinuos autotróficos
(control) alimentado

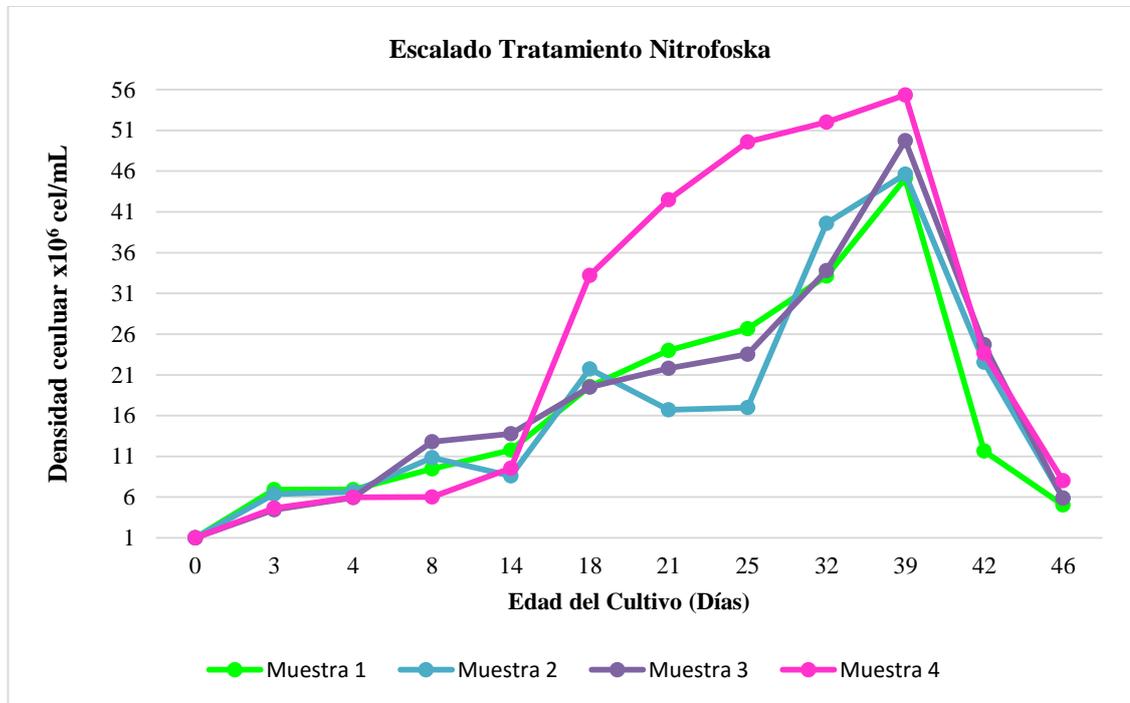


Figura 6. Curvas de crecimiento celular evaluados por su densidad en un periodo de 46 días, se evaluaron 4 muestras escaladas en un sistema autotrófico. Densidad celular vs. Edad del cultivo expresado en días. **M1**-Cultivo autotrófico, **M2**- Cultivo autotrófico, **M3**- Cultivo autotrófico, **M4**- Cultivo autotrófico
Elaborado por: K. Verdugo (2015)

A partir del día 42 se evidencia la fase de muerte en la que la densidad celular tiene un promedio de 20.651×10^6 cel/mL al alcanzar 20 litros en el sistema de escalamiento, lo que involucra un decrecimiento en los nutrientes del medio, estudios de Hernández (2013) manifiestan que la fase de muerte se inicia cuando los nutrimento que están en medio de cultivo no son suficientes para que los microorganismos puedan reproducirse.

3.3. Generación de biomasa en un sistema mixotrófico

3.3.1. Primer ensayo: generación de biomasa en un sistema mixotrófico

Se presentaron 4 tratamientos de sustrato con fracción soluble de papa (*Solanum phureja*) (FSP) en diferentes concentraciones de 5%, 10% y 20%, basados en desarrollo germinativo de papa: brotada con cáscara (GCC), brotada sin cáscara (GSC), no brotada con cáscara (NGCC), no brotada sin cáscara (NGSC). Todas estas fracciones solubles, en idénticas condiciones para el crecimiento celular (agitación constante las 24 h a 21.5°C y a una intensidad luminosa de 115 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Se analizó la densidad celular por recuento en cámara Neubauer en los 4 tratamientos y 3 ensayos en un período de 21 días.

El tratamiento 1 basado en una concentración de fracción soluble de papa al 20% inició con una densidad celular de 1×10^6 cel/mL, a los 3 días de recuento este disminuyó en un promedio de 0.276×10^6 cel/mL, esto es atribuido a una alta concentración de materia orgánica lo que implica competencia con bacterias y microorganismos fermentativos, esta observación es corroborada por Berland (1972) quien asegura que existen sustancias liberadas por algunas bacterias que inhiben el crecimiento de algunas algas, hasta sobrevenir la muerte. En la Tabla 6 podemos ver la densidad celular generada en 3 días en sistema mixotrófico con fracción soluble de papa a una concentración del 20% (v/v) (tratamiento 1).

Tabla 6.

Crecimiento mixotrófico de *Coenochloris* sp. generada en 3 días en sistema mixotrófico con fracción soluble de papa a una concentración del 20% (v/v)

Densidad Celular $\times 10^6$ mL/L					
	Edad del Cultivo (Días)				
	0	3	7	14	21
FSPNGSC	1	0,32167	El ensayo no continuó por un proceso de fermentación del cultivo al haber gran cantidad de materia orgánica.		
FSPGCC	1	0,25667			
FSPGSC	1	0,35750			
FSPNGCC	1	0,16917			

Nota: Crecimiento celular determinado por la densidad celular en un periodo de 3 días en 4 ensayos con fracción soluble de papa a una concentración del 20% (**FSPNGSC**-Fracción soluble de papa no brotada sin cáscara, **FSPGCC**-Fracción soluble de papa brotada con cáscara, **FSPGSC**-Fracción soluble de papa brotada sin cáscara, **FSPNGCC**-Fracción soluble de papa no brotada con cáscara)

Elaborado por: K. Verdugo (2015)

El tratamiento dos basado en una concentración de fracción soluble de papa al 10% (v/v) inició con una densidad celular de 1×10^6 cel/mL al igual que el tratamiento anterior, a los 3 días de recuento este disminuyó en un promedio de 0.285×10^6 células, se realizó un recuento a los 7 días, sin embargo, de los 4 ensayos, el ensayo correspondiente a Fracción Soluble de Papa Brotada con Cáscara (FSPGCC) tuvo crecimiento en 0.99×10^6 cel/mL más con relación al día 0, este tratamiento fue descartado a razón de contaminación y un proceso fermentativo por bacterias, este resultado es similar al obtenido por Prieur y Carval (1979) y Brown (1989) quienes mencionan que algunas especies bacterianas con necesidad de sustrato orgánico para su crecimiento se asocian a cultivos microalgales generando enfermedades y por ende la muerte de la microalga.

En la Tabla 7 podemos ver la densidad celular generada en 7 días en sistema mixotrófico con fracción soluble de papa a una concentración del 10% (v/v).

Tabla 7.

Crecimiento mixotrófico de *Coenochloris* sp. generada en 7 días en sistema mixotrófico con fracción soluble de papa a una concentración del 10% (v/v)

Densidad Celular $\times 10^6$ mL/L					
	Edad del Cultivo (Días)				
	0	3	7	14	21
FSPNGSC	1	0,190833	0,11000	El ensayo no continuó por un proceso de fermentación del cultivo al haber gran cantidad de materia orgánica.	
FSPGCC	1	0,203333	1,99167		
FSPGSC	1	0,430833	0,60833		
FSPNGCC	1	0,318333	0,37833		

Nota: Crecimiento celular determinado por la densidad celular en un periodo de 7 días en 4 ensayos con fracción soluble de papa a una concentración del 10% (**FSPNGSC**-Fracción soluble de papa no brotada sin cáscara, **FSPGCC**-Fracción soluble de papa brotada con cáscara, **FSPGSC**-Fracción soluble de papa brotada sin cáscara, **FSPNGCC**-Fracción soluble de papa no brotada con cáscara)

Elaborado por: K. Verdugo (2015)

En el tratamiento tres basado en una concentración de fracción soluble de papa al 5% (v/v) inició con una densidad celular de 1×10^6 células, al igual que los otros tratamientos, presenta desde el primer recuento crecimiento exponencial siendo el ensayo de Fracción Soluble de Papa Brotada Sin Cáscara (FSPGSC), el que presenta una densidad celular de 3.9167×10^6 células, este tratamiento es el que mayor densidad celular muestra en el transcurso de 21 días. Esto puede ser atribuido a que la cáscara de papa posee ácido clorogénico que inhibe la actividad fosforilasa (Plaza y Valdés, 2003, p. 286), lo que revela que en ausencia de la cáscara de papa *Coenochloris* sp. puede crecer de manera óptima.

El ensayo con FSPGSC comprado con FSPNGSC, FSPGCC y FSPNGCC presenta una densidad celular mayor en 5.78034, 2.79985 y 6.64254 cel/mL veces más respectivamente.

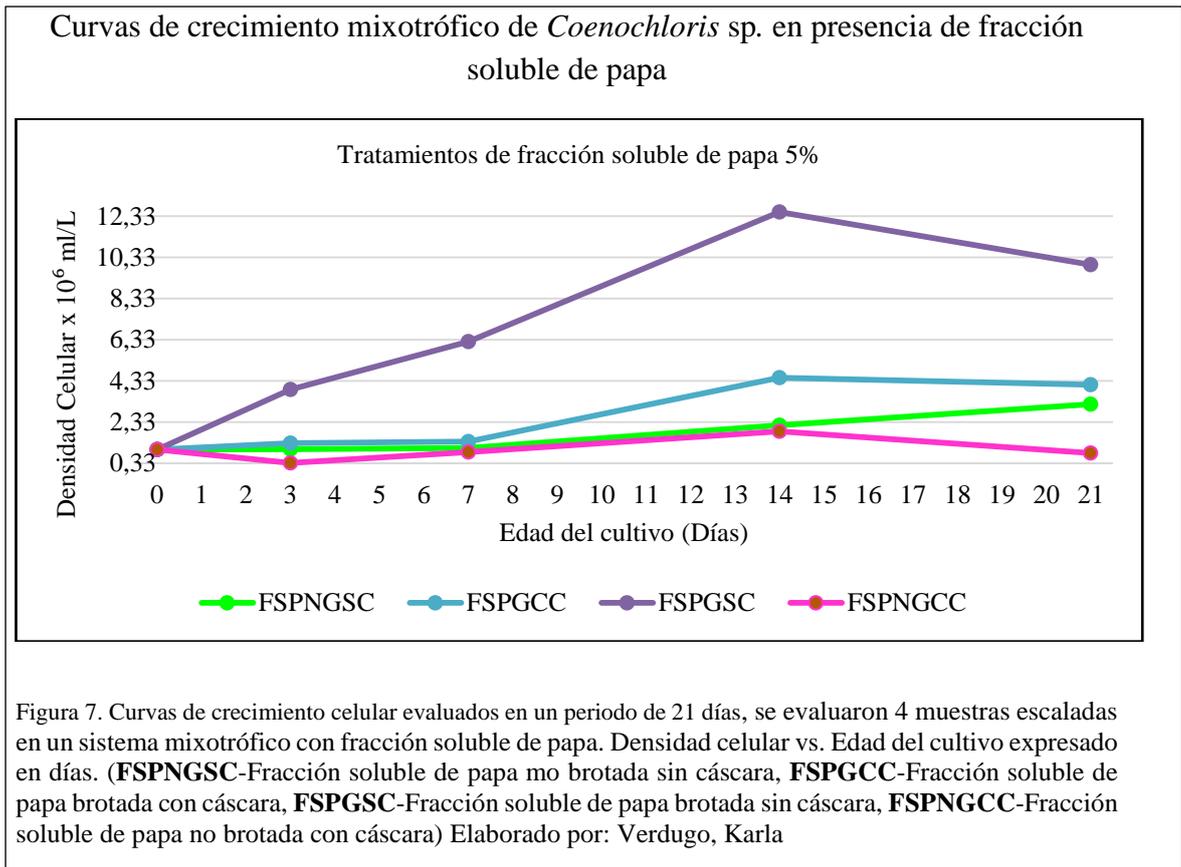
En la Tabla 8 podemos ver la densidad celular generada en 21 días en sistema mixotrófico con fracción soluble de papa a una concentración del 5% (v/v).

Tabla 8.

Crecimiento mixotrófico de *Coenochloris* sp. generada en 21 días en sistema mixotrófico con fracción soluble de papa a una concentración del 5%

Densidad Celular $\times 10^6$ mL/L					
	Edad del Cultivo (Días)				
	0	3	7	14	21
FSPNGSC	1	1,0192	1,0683	2,1700	3,2050
FSPGCC	1	1,3058	1,3867	4,4800	4,1500
FSPGSC	1	3,9167	6,2392	12,5433	9,9700
FSPNGCC	1	0,3383	0,8800	1,8883	0,8200

Nota: Crecimiento celular determinado por la densidad celular en un periodo de 21 días en 4 ensayos con fracción soluble de papa a una concentración del 5% (**FSPNGSC**-Fracción soluble de papa no brotada sin cáscara, **FSPGCC**-Fracción soluble de papa brotada con cáscara, **FSPGSC**-Fracción soluble de papa brotada sin cáscara, **FSPNGCC**-Fracción soluble de papa no brotada con cáscara)
Elaborado por: K. Verdugo (2015)



A partir de estos resultados se extrajo la mayor cantidad de biomasa posible para analizar el peso seco de *Coenochloris* sp. por mililitro de muestra, la muestra correspondiente a FSPGSC generó 1.7089 g de materia seca algal por cada mililitro de muestra para su posterior análisis proximal.

El segundo ensayo se centró en 3 repeticiones con el objetivo de obtener la mayor cantidad de biomasa e ir comparando el crecimiento celular en un período de tiempo de 60 días, los tratamientos de cultivo mixotrófico y CDA -cultivo discontinuo alimentado- con fracción soluble de papa (FSP) son los analizados en este ensayo.

Con esta consideración se puede observar que las muestras no poseen una diferenciación considerable en la densidad celular hasta el día 18, la densidad celular de la muestra control del alga *Coenochloris* sp. en un sustrato de NITROFOSKA (CNFK) a una concentración de 3 mL/L. es de 52.26×10^6 células, lo que representa

que esta muestra posee 1.30 veces mayor crecimiento con relación a la muestra de menor densidad celular correspondiente a la muestra de FSPGSC en sistema mixotrófico.

En el día 25, se presenta el mayor índice de densidad celular, aunque la muestra CNFK presenta la densidad celular más elevada con 132.77×10^6 células que corresponde a un crecimiento de 2.367 y 2.096 veces más con relación a las muestras de FSPGSC en condiciones mixotróficas (FSPGSC M) y FSPGSC en sistema de alimentación discontinua (FSPGSC CDA) respectivamente. Estos resultados se confirman en base a la investigación realizada por Ortiz (2012), quien evaluó el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas, el estudio revela que en condiciones autotróficas existe un rápido crecimiento celular sin embargo esto no posee un efecto prolongado con relación a cultivos mixotróficos.

A partir del día 39 se presenta un descenso en la densidad celular de la muestra CNFK, esto puede atribuirse al consumo de nutrientes inmediatos que posee el sustrato inorgánico comercial, se puede observar que las muestras de FSPGSC M y FSPGSC CDA otorgan nutrientes al medio de cultivo de manera prolongada sin que se presente un descenso considerable en la densidad celular, Richmond (2004), confirma esto al asegurar que el retraso en el crecimiento de una microalga se atribuye a la adaptación fisiológica del metabolismo de la célula para el crecimiento, tales como el aumento de los niveles de enzimas y metabolitos implicados en la división celular y la fijación de carbono en un medio orgánico.

En la Tabla 12 podemos ver las curvas de crecimiento celular en sistema mixotrófico (FSPGSC Mixotrófico y FSPGSC CDA) y autotrófico (control) con fracción soluble de papa determinadas por conteo en cámara Neubauer en un período de 60 días.

El análisis estadístico definió el mejor tratamiento con un análisis de varianza con medidas repetidas (ANOVA – MR), en el que se plantean dos hipótesis: nula (La densidad celular de *Coenochloris* sp. cultivada con tratamientos distintos tiene un crecimiento estadístico similar); alternativa (Al menos uno de los promedios de densidad celular de *Coenochloris* sp. cultivada con tratamientos distintos tiene un crecimiento estadístico diferencial).

La prueba de efectos intra-sujetos (Tabla 9) revela que los tratamientos analizados por Día y por Día x Tratamiento tienen una baja significancia esto implica que las diferencias observadas no se deben al azar sino a una respuesta biológica relacionada a los tratamientos utilizados.

Tabla 9.

Análisis de varianza con medidas repetidas - Prueba de efectos intrasujetos.

Fuente	Análisis estadístico	Tipo III Suma de Cuadrados	DF	Promedio de cuadrados	F	Significancia
Día	Greenhouse-Geisser	67086,109	1,514	44305,858	13,195	0,003
	Huynh-Feldt	67086,109	2,592	25881,698	13,195	0,000
Día x tratamiento	Greenhouse-Geisser	18541,366	3,028	6122,662	13,195	0,212
	Huynh-Feldt	18541,366	5,184	3576,612	13,195	0,165
Error(Día)	Greenhouse-Geisser	30505,637	9,085	3357,820		
	Huynh-Feldt	30505,637	15,552	1961,503		

Nota: Análisis de varianza con medidas repetidas - Prueba de efectos intra-sujetos relacionada al crecimiento celular en un periodo de 60 días en 3 ensayos con (FSP) a una concentración del 5%.

(DF) – Factor diferencial (F) - Factor

Tratamientos: (FSP-GSC-M) Fracción soluble de papa brotada sin cáscara cultivo mixotrófico; (FSP-GSC CDA) Fracción soluble de papa brotada sin cáscara cultivo discontinuo alimentado) y un cultivo autotrófico (nitrofoska foliar - CNFK). Análisis realizados con SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Elaborado por: K. Verdugo (2015)

La prueba de efectos inter-sujetos (Tabla 10) revela que los tratamientos analizados tienen una baja significancia, esto nos permite concluir que las diferencias observadas se deben a una respuesta biológica en base a la densidad celular influenciada a los tratamientos utilizados.

Tabla 10.

Análisis de varianza con medidas repetidas - Prueba de efectos inter sujetos

Fuente	Tipo III Suma de Cuadrados	DF	Promedio de cuadrados	F	Significancia
Tratamiento	5454,035	2	2727,018	7,936	0,021
Error	2061,682	6	343,614		

Nota: Análisis de varianza con medidas repetidas - Prueba de efectos inter sujetos relacionada al crecimiento celular en un periodo de 60 días en 3 ensayos con (FSP) a una concentración del 5%.

(**DF**) - Factor diferencial, (**F**) – Factor. Tratamientos: (**FSP-GSC-M**) Fracción soluble de papa brotada sin cáscara cultivo mixotrófico; (**FSP-GSC CDA**) Fracción soluble de papa brotada sin cáscara cultivo discontinuo alimentado) y un cultivo autotrófico (nitrofoska foliar - **CNFK**). Análisis realizados con SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Elaborado por: K. Verdugo (2015)

El análisis post Hoc realizado fue Duncan, el que nos permite comparar los tratamientos realizados sobre las muestras (Tabla 11).

Tabla 11.

Análisis post Hoc de Duncan

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
FSPGSC M	3	44,851	
FSPGSC CDA	3	48,019	
CNFK	3		60,6559
Sig.		0,479	1,000

Nota: Análisis post Hoc de Duncan relacionada al crecimiento celular en un periodo de 60 días en 3 ensayos con (FSP) a una concentración del 5%.

(**N**) Número de repeticiones por tratamiento

Tratamientos: (**FSPGSC-M**) Fracción soluble de papa brotada sin cáscara cultivo mixotrófico; (**FSPGSC CDA**) - Fracción soluble de papa brotada sin cáscara cultivo discontinuo alimentado) y un cultivo autotrófico (nitrofoska foliar - **CNFK**). Análisis realizados con SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Elaborado por: K. Verdugo (2015).

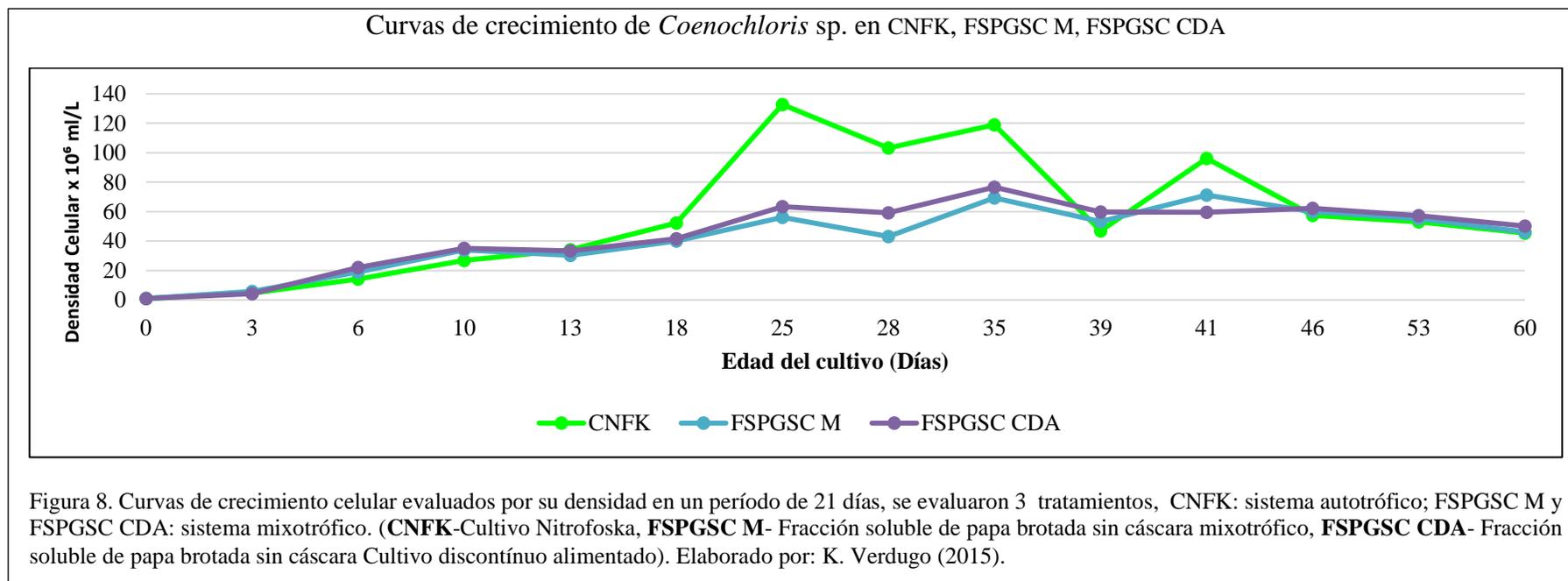
El análisis de Duncan evidencia dos grupos claros, el primer grupo conformado por FSPGSC – M y FSPGSC CDA, el segundo grupo conformado por CNFK, la significancia obtenida es de 0.479 mayor al alpha de comparación, lo que nos permite aceptar la hipótesis alternativa que se refiere a que al menos uno de los promedios de densidad celular de *Coenochloris* sp. cultivada con tratamientos distintos tiene un crecimiento estadístico diferencial.

El cultivo de CNFK (Cultivo NITROFOSKA Foliar), presenta una mayor densidad celular promedio en el día 25 correspondiente a 132.77×10^6 cel/mL, comparándolo con los cultivos Mixotrófico y Cultivo Discontinuo Alimentado cuya densidad celular promedio es de 59.71×10^6 cel/mL, esto permite inferir que el cultivo CNFK permite obtener mayor biomasa celular, sin embargo la densidad celular promedio del cultivo CNFK en el día 46 es de 57.50×10^6 cel/mL y la de los cultivos Mixotrófico y Cultivo Discontinuo Alimentado corresponde a 59.93 y 62.23×10^6 cel/mL, respectivamente. Estos resultados permiten inferir que los cultivos Mixotróficos y Cultivo Discontinuo Alimentado otorgan nutrientes al medio de cultivo de manera prolongada, con una densidad celular estable a lo largo del tiempo, el análisis estadístico y cuantitativo permite revelar que el Cultivo Discontinuo Alimentado puede ser considerado la mejor alternativa para la producción de biomasa de microalgas con valores de 62.23×10^6 cel/mL y una significancia de 0.479.

Tabla 12.

Curvas de crecimiento celular en sistema mixotrófico (FSPGSC Mixotrófico y FSPGSC CDA) y autotrófico (control) con fracción soluble de papa determinadas por conteo en cámara Neubauer en un período de 60 días

	Edad del Cultivo (Días) - Densidad Celular x 10 ⁶ cel/mL													
	0	3	6	10	13	18	25	28	35	39	41	46	53	60
CNFK 1	1,00	5,58	18,51	26,69	27,57	61,76	250,89	97,23	84,00	48,30	88,20	57,60	64,70	61,70
CNFK 2	1,00	5,63	12,54	39,14	38,28	43,35	62,22	111,80	155,70	49,30	120,90	50,10	34,00	49,80
CNFK 3	1,00	2,42	11,33	14,34	36,12	60,68	85,20	100,60	117,20	43,00	79,50	64,80	60,40	24,50
FSPGSC M 1	1,00	1,11	17,69	32,76	37,29	39,78	48,53	45,05	92,60	60,90	80,75	56,40	52,80	41,30
FSPGSC M 2	1,00	9,74	17,18	36,84	25,55	39,08	79,55	45,00	59,90	51,90	66,20	69,00	67,90	54,00
FSPGSC M 3	1,00	6,17	21,80	32,18	27,86	41,16	40,20	39,10	55,70	47,00	66,60	54,40	44,80	43,40
FSPGSC - CDA 1	1,00	1,82	21,62	38,12	41,21	58,32	65,54	61,00	74,20	57,60	63,70	63,10	49,10	48,70
FSPGSC - CDA 2	1,00	4,73	21,81	33,00	29,72	33,68	70,23	57,90	84,10	74,70	39,50	62,90	53,40	74,00
FSPGSC - CDA 3	1,00	5,85	22,34	34,25	29,28	32,49	54,23	58,80	71,60	47,10	75,40	60,70	69,30	27,70



3.3.2. Análisis proximal de la biomasa de *Coenochloris* sp. en un sistema autotrófico y mixotrófico

El análisis proximal se realizó a partir de la biomasa obtenida tanto en los cultivos mixotróficos (FSPGSC) como en los autotróficos (CNFK). En la Tabla 13 se puede ver el análisis proximal de *Coenochloris* sp. en sistema autotrófico y mixotrófico (Anexo 8).

Tabla 13.

Análisis proximal de *Coenochloris* sp. en sistema autotrófico y mixotrófico

Parámetro	Método	Unidades	Autotrófico	Mixotrófico
Humedad	INEN 518	% p/p	11,12	10,24
Proteína	INEN 519	% p/p	42,00	33,89
Grasa	INEN 523	% p/p	2,40	7,95
Ceniza	INEN 520	% p/p	15,34	15,05
Fibra	INEN 522	% p/p	4,14	3,78
Carbohidratos	Cálculo	% p/p	25,00	29,08
Energía	Cálculo	K cal/ 100g	289,60	323,44

Nota: Análisis proximal de *Coenochloris* sp. en sistemas autotrófico y mixotrófico, los ensayos fueron realizados por Centro CESAL.

Elaborado por: K. Verdugo (2015)

Este análisis revela 2 puntos comparativos de alta relevancia, bajo el método INEN 519 para determinación de proteínas establece que *Coenochloris* sp. en el medio de cultivo control correspondiente al sistema autotrófico genera un valor de 42,00% p/p, y en el sistema mixotrófico con FSPGSC un valor de 33.89%.

Esta diferencia puede ser determinada en base a la composición de los medios de cultivo, ya que el medio de cultivo NITROFOSKA foliar posee una cantidad de nitrógeno directamente asimilable (Nitrógeno amoniacal –NH₄⁺ - y nítrico –NO₃) que permite una mayor generación de compuestos proteicos, en el caso del medio de cultivo en base a papa

Solanum phureja este posee altos índices de aminoácidos no asimilables de forma inmediata como es el caso de metionina, lisina y treonina, (IICA 1984).

En la Tabla 14 podemos ver el análisis bromatológico de sustrato orgánico de papa *Solanum phureja* y composición química NITROFOSKA foliar para obtención de biomasa de *Coenochloris* sp.

Tabla 14.

Análisis bromatológico de sustrato orgánico de papa *Solanum phureja* y composición química NITROFOSKA foliar para obtención de biomasa de *Coenochloris* sp.

Papa chaucha- <i>Solanum phureja</i>		NITROFOSKA FOLIAR PS	
Humedad	75,66%	Nitrógeno (N)	25%
Grasa	0,14 g/100g	Fósforo (P ₂ O ₅)	10%
Proteína	2,56 g/100g	Potasio (K ₂ O)	17,50%
Carbohidratos	18,23 g/100g	Magnesio (MgO)	1,57%
Fibra	0,99 g/100g	Manganeso (Mn)*	3mg/100g
Cenizas	1,45 g/100g	Hierro (Fe)*	4mg/100g
Magnesio	21,5 mg/100g	Cobre (Cu)*	0,5 mg/100g
Potasio	569,6 mg/100g	Boro (B)	1,5 mg/100g
Calcio	9,0 mg/100g	Molibdeno (Mo)	0,05 mg/100g
Vitamina C	30,63 mg/100g	Zinc (Zn)*	4 mg/100g
Oferta de Servicios y Productos OSP - UCE		*ME: microelementos quelatizados con EDTA	

Nota: La comparación realizada está basada en la composición de sustratos orgánico e inorgánico comercial para obtención de biomasa de *Coenochloris* sp. Elaborado por: K. Verdugo (2015)

Bajo el método INEN 523 para determinación de grasa se establece que *Coenochloris* sp. en el sistema mixotrófico FSPGSC fue de 7.95% siendo superior al control en 3.312 veces más.

Estos valores implican un aumento considerable de lípidos generados por el metabolismo de *Coenochloris* sp. este valor de grasa no puede ser otorgado por la fracción soluble de papa considerando que los valores de grasa en papa es 0.1 gramos por cada 100 gramos

de papa cruda, esta aseveración es confirmada por estudios realizados por Feng (2011), en la que se evaluó la producción de lípidos en *Chlorella vulgaris*, y en estudios de Fernández (2013), quien revela una obtención de 147 mg/l/día de ácidos grasos a partir de *Chlorella vulgaris* en un medio autotrófico cuya variable fue el fotoperíodo.

3.3.3. Análisis de metales de la biomasa de *Coenochloris* sp. en un sistema autotrófico

El análisis de metales se realizó a *Coenochloris* sp. en el medio de cultivo control (CNFK). En la Tabla 15 podemos ver el análisis de metales de *Coenochloris* sp. en cultivo control autotrófico (Anexo 10).

Tabla 15.

Análisis de metales de *Coenochloris* sp. en cultivo control autotrófico

Ensayo	Método	Unidades	Autotrófico
Calcio	Interno Absorción atómica	g/Kg	4.70
Sodio	Interno Absorción atómica	g/Kg	16.65
Potasio	Interno Absorción atómica	g/Kg	166.25
Magnesio	Interno Absorción atómica	g/Kg	8.71
Hierro	Interno Absorción atómica	mg/Kg	314.93
Plomo	Interno Absorción atómica	mg/Kg	1.29
Azufre	Interno Espectofotométrico	g/Kg	36.21
Cobre	Interno Absorción atómica	mg/Kg	46.51

Nota: Análisis de metales de *Coenochloris* sp. en un sistema autotrófico, los ensayos fueron realizados por Centro CESAL.

Elaborado por: Verdugo, Karla.

El análisis de metales revela dos valores elevados que corresponden a hierro y potasio con valores de 314.39 mg/Kg y de 166.25 g/Kg respectivamente.

La elevada concentración de hierro y potasio puede justificarse considerando la relación directa de estos metales en el crecimiento del alga y en la formación de clorofila y por ende un elevado poder de fotosíntesis, esto es corroborado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, 1991), quienes sustentan que la reducción del contenido de clorofila de hasta un 90 a un 100% se debe a la deficiencia de hierro, provocando caídas en la absorción de luz y por Kratz (1995) quien sostiene que los niveles de potasio mejora la acción enzimática en algas y se asocia a la osmoregulación.

Conclusiones

La biomasa de *Coenochloris* sp. obtenida en el cultivo mixotrófico (fracción soluble de papa brotada sin cáscara) contiene un elevado contenido de proteínas en un valor de 33.89% p/p, 29.08 % p/p de carbohidratos y un aporte energético de 323.44 Kcal/100g comparado con la biomasa de *Coenochloris* sp. en un sistema autotrófico (fertilizante foliar NITROFOSKA) que contiene un valor de 42% p/p de proteínas, 25.00 p/p de carbohidratos y energía de 289.60 Kcal/100g, esto nos indica la posible utilidad de esta microalga como un complemento alimenticio, de igual manera se puede aseverar que el uso de la fracción soluble de *Solanum phureja* brotada sin cáscara constituye una alternativa como sustrato orgánico asimilable por la microalga, lo que nos permite aceptar la hipótesis alternativa.

La generación de biomasa tratada con altas concentraciones de sustratos orgánicos mayores al 10% provocan una disminución en la densidad celular, esto es atribuido a una competencia con bacterias y microorganismos fermentativos que se desarrollan en altas concentraciones de materia orgánica, sin embargo *Coenochloris* sp. es capaz de crecer adecuadamente con condiciones mixotróficas en medios a base de residuos agrícolas de papa en una concentración de 5 % (v/v) alcanzando el mayor rendimiento a los 21 días con una densidad celular de 9.97×10^6 cel/mL a un volumen de 240 mL de agua destilada.

El crecimiento de la microalga *Coenochloris* sp. en sustratos orgánicos (fracción soluble de papa) muestra una densidad celular de 59.93×10^6 células/mL en 46 días de cultivo escalar, esta densidad es mayor a la generada en el cultivo autotrófico (fertilizante

NITROFOSKA foliar) cuya densidad celular fue de $57,50 \times 10^6$ células/mL, esta observación permite concluir de manera cuantitativa que los cultivos mixotróficos otorgan nutrientes al medio de cultivo de manera prolongada sin que se presente un descenso considerable en la densidad celular.

El análisis estadístico permite concluir que los cultivos mixotróficos con fracción soluble de papa brotada sin cáscara en cultivo discontinuo y con fracción soluble de papa brotada sin cáscara en cultivo discontinuo alimentado, poseen crecimiento similar en el día 25 y a lo largo de los 60 días de evaluación evidenciado por la densidad celular promedio de $59,71 \times 10^6$ cel/mL , con una significancia estadística de 0.479, sin embargo el cultivo conformado por el tratamiento autotrófico (fertilizante NITROFOSKA foliar) generó una mayor densidad celular en el día 25 correspondiente $132,77 \times 10^6$ cel/mL con una significancia estadística de 1.00.

El cultivo en fracción soluble de papa (*Solanum phureja*) es una alternativa para la producción de cultivos de microalgas de forma orgánica, puesto que genera buen rendimiento de generación de biomasa.

Recomendaciones

Se recomienda generar cultivos mixotróficos en rangos de concentración intermedios de 5 a 10% con fracción soluble de residuos agrícolas ya sea arroz, otras variedades de papa o yuca, especies que por su composición bromatológica parecida pueden ser un buen sustrato.

Se sugiere que se realicen ensayos similares con fracción soluble de papa (*Solanum phureja*), con diferentes algas, considerando múltiples tratamientos basados en la concentración de sustrato, intensidad lumínica, horas luz y consorcios para aumentar la densidad celular y por ende obtener mayor biomasa, esto permitirá corroborar que este medio se preste como una alternativa orgánica para la generación de complementos alimenticios.

El uso de la microalga *Coenochloris* sp. puede abrir nuevos campos de investigación fundamentados en la obtención de biomasa con fines de producción de pigmentos como clorofila y carotenoides útiles en la industria química y alimenticia.

Dado que *Coenochloris* sp. formar grasa en cantidades representativas en el sistema mixotrófico, genera la posibilidad de su obtención para la producción de biocombustibles o lípidos esenciales en la nutrición animal.

Referencias

- Abbayes. (1989). Botánica: vegetales inferiores, Volumen 1. Editor Reverte. Barcelona- España. pp. 768
- Albarracín, I. (2007). Microalgas: potenciales productoras de biodiesel. La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. XV Simposio Electrónico Internacional.
- Apt, K. E., Behrens, P. W. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. Review. Journal of Phycology. Vol. 35. pp. 215–226.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. Boca Ratón: CRC Press
- Bermúdez, J., Sánchez, G., Fuenmayor, G. & Morales, E. (2003). Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de pigmentos de la microalga marina *Chroomonas* sp. Review. Journal from the Experimental Faculty of Sciences. Vol. 11. pp. 266.
- Borba, N (2008). La papa un alimento básico Posibles impactos frente a la introducción de papa transgénica. RAP-AL. pp. 2.
- Borowitzka, M (1999). Commercial Production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Recuperado 15 de abril del 2014, de Journal of Biotechnology: <http://www.sciencedirect.com/>

- Brown M. R. (1991). The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Vol. 145. pp. 79-99.
- Chen, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in biotechnology*. Vol. 14. pp. 421-426.
- Chen, G.-Q., Chen, F. (2006). Growing phototropic cells without light. *Biotechnology Letters*. Vol. 28. pp. 607-616.
- Cheng-Ng. (2005). Efectos de los extractos de las cianobacterias *Limnothrix* sp. y *Spirulina* subsala sobre la actividad proliferativa y fagocítica de células mononucleares humanas y múridas. Tesis de maestría para optar al Título de Magister Scientiarum en Biología, Mención Inmunología. Venezuela: Universidad de Zulia.
- Cohen, Z. (1986). Products from Microalgae. In: *Handbook for Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (Ed). CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 421-454.
- Contreras-Flores, C., Peña-Castro, J. M., Flores-Cotera, L. B., Cañizares-Villanueva, R. O. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobioreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. Vol. 28. . pp. 450-456.
- Cooney, C. L. (1983). *Bioreactors: Design and Operation*. Science. Vol. 219. pp. 728-733.

- CORPOICA. (2000). Manejo Integrado del Cultivo de la Papa. Editorial
Cooperación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Bogotá-
Colombia. pp.196.
- Dimitrov, K. (2007). Green Fuel Technologies: A case Study for Industrial
Photosynthetic Energy Capture. Recuperado el 16 de abril del 2014, de
<http://www.ecolo.org/>
- Díaz, L. (2012). Growth of microalgae and associated bacteria from an oil pit in
presence of kerosene and its effect in microalgal pigment production and
biochemical composition. Trabajo de Ascenso. Universidad del Zulia.
Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Biología.
Maracaibo – Venezuela. pp 130
- Droop, M. R. (1974). Heterotrophy of carbon. En: Stewart, W. D. P (ed.). Algal
physiology and biochemistry. Botanical Monographs Volumen 10.
University of California Press. Los Ángeles. pp.530.
- Fábregas J., Morales E., García D., Cabezas B. y Otero A. (1997). Soluble fraction
of *Solanum tuberosum* enhance growth and pigmentation of the
microalgae *Tetraselmis suecica* in photoheterotrophic conditions.
Bioresource Technology, 59: 263-266
- FAO. (2008). Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, base de datos
nacional de los nutrientes. Las papas, la nutrición y la alimentación.
Nutrientes de la papa. pp.1.

- Feng, Y., Li, C., Zhang, D (2011). Lipid Production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater médium. *Bioresource Technology* 102:101-105.
- Fernández, D. (2013). Obtención de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal cultivada bajo diferentes condiciones de iluminación. Universidad de América. Bogotá – Colombia. 112 -119.
- FUNSEPA. (2009). La papa. Fundación Sergio Paiz Andrade. Guatemala – Guatemala. pp. 1- 36
- Gao KS (1998) Chinese studies on edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: a review. *J Appl Phycol*. Vol. 10. pp. 37–49.
- Gatenby C. M. (2003). Biochemical composition of the three algal species proposed as food captive freshwater mussels. *J.Appl. Phycol*. Vol. 15(1). pp. 1-11.
- Graham, L.E & Wilcox (1998). Lake Baikal: evolution and biodiversity *Biology of inland waters*. Backhuys Publishers. Segunda Edición. Michigan – Estados Unidos.
- Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied phycology. Blackwell publishing. Oxford. pp. 116.
- Hernández, A. (2013). Microbiología industrial. Universidad Estatal a Distancia (EUNED). Costa Rica.

Huamán, Z y Spooner, D. (2002). Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum sect. Petota*). American Journal of Botany. Vol. 89(6). pp. 947 – 965.

I.C.B.F. (2005). Tabla de composición de alimentos colombianos – Papa criolla. http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co/alimentos_colombianos/consulta_alimento.asp

INIAP. (2005). Las papas nativas en el Ecuador. Biodiversidad de las papas nativas ecuatorianas. Ed 1. pp. 9-10

John, D. Whitton, A & Brook, A. (2002). The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae, Volumen 1. Editorial Cambridge University Press. Cambridge University Press. Cambridge - Inglaterra. pp. 342.

Kratz, W., & Myers, J. (1955). Nutrition and Growth of Several Blue-Green Algae. American Journal of Botany, 42(3), 282-287.

Korshikov, O. (1953). Vznachnik prysnovodnihk vodorostey Ukrainsykoï RSR V. Pidklas Protokokovi (Protococcineae). Bakuol'ni (Vacuolales) ta Protokokovi (Protococcales) [The Freshwater Algae of the Ukrainian SSR. V. Sub-Class Protococcineae. Vacuolales and Protococcales]. pp. 1-439

- Lee T., Chen Y. y Hong N. (1999). Toxicity assay of cyanobacterial strain using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. *Acta Zool. Taiwanica*, Vol, 10(1). pp. 1-9.
- Lee, Y.-K. (2001). Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*. Vol. 13. pp. 307-315.
- Lee, Y.-K. (2004). Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. En: Richmond, A. (ed.).
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C., & Dubois-Calero, N. (3 de Diciembre de 2008). Biofuels from Microalgae. Recuperado el 25 de marzo del 2014, de American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers: <http://by.genie.uottawa.ca/>
- Lima, S. (2004). Biodegradation of chlorophenol by a microalgae consortium. *Water Research Diario de Ficología Aplicada*, Volumen 15, Edición 2 pp 137-142.
- Lobban, C. S., Harrison, P. J, Duncan, J. J. (1988). The physiological ecology of seaweeds. Cambridge Univ. Press, New York
- Lujan, L. (1996). Historia de la papa. *Revista Papa*. N° 16. Federación Colombiana de Productores de Papa. 32 p.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and

thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. Proc Natl Acad Sci USA Vol. 99. pp. 12246–12251

Masojidek, J., Koblizek, M., Torzillo, G. (2004). Photosynthesis in microalgae. En: Richmond, A. (ed.). Handbook of Microalgal culture: biotechnology and applied phycology Blackwell Publishing. Oxford. pp. 20.

Mosquera, J. (1992). La modesta papa criolla. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. pp. 40

NTE INEN 0518. (1981). Harinas de origen vegetal. Determinación de la pérdida por calentamiento. Norma Técnica Ecuatoriana. Instituto Ecuatoriana de Normalización INEN. Quito – Ecuador

NTE INEN 0519. (1981). Harinas de origen vegetal. Determinación de la proteína. Norma Técnica Ecuatoriana. Instituto Ecuatoriana de Normalización INEN. Quito – Ecuador

NTE INEN 0523. (1981). Harinas de origen vegetal. Determinación de la grasa. Norma Técnica Ecuatoriana. Instituto Ecuatoriana de Normalización INEN. Quito – Ecuador

NTE INEN 0520. (1981). Harinas de origen vegetal. Determinación de la ceniza. Norma Técnica Ecuatoriana. Instituto Ecuatoriana de Normalización INEN. Quito – Ecuador

NTE INEN 0522. (1981). Harinas de origen vegetal. Determinación de la fibra cruda. Norma Técnica Ecuatoriana. Instituto Ecuatoriana de ormalización INEN. Quito – Ecuador

Official Methods of Analysis (1990) 15th Ed., AOAC, VA, Methods 999.11.

Plomo, cadmio, cobre, hierro y zinc en alimentos. Espectrofotometría de absorción atómica tras incineración en seco. Arlington.

Pardo, A. (2000). Análisis de varianza con medidas repetidas: El procedimiento MLG: Medidas repetidas. Análisis estadístico SPSS. pp. 1

Pérez, R. (2009). Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizado microalga-bacteria en crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico. Centro de Investigaciones Biológicas del Norte. La Paz – Bolivia. pp. 161.

Prabakaran, P., & Ravidran, D. (2012). Scenedesmus as a potential source of biodiesel among selected microalgae. Recuperado el 29 de mayo del 2014, de Current Science: <http://es-test.ias.ac.in/>

Ramírez, D. (2010). Caracterización física, química y nutricional de la papa chaucha (*Solanum phureja*) cultivado en dos suelos edafoclimáticos del Ecuador, como base de estudio para la elaboración de una norma técnica (papa chaucha fresca requisitos 2010) por parte del INEN. Universidad Tecnológica Equinoccial. Quito – Ecuador.

Richmond, A (2004), Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology. Oxford: Blackwell Science

Schulz, T. (2006). The economics of micro-algae production and processing into biodiesel. Recuperado el 10 de abril del 2014, de <http://www.agric.wa.gov.au/>

- Semple K, Ronald C & Schmidt S. (1999). Bidegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol. Let.* 170, pp. 291-300.
- Sevrin-Reyssac J. (1998). Biotreatment of swine manure by production of aquatic valuable biomasses. *Agriculture, Ecosystem and Environment.* Vol. 68 pp 177-186
- Sun, Z; Jin, L; Junchao, H. (2011). Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology.* Volume 102, Issue 1. Elsevier. pp. 106–110
- Tovar, F. (2012). *Cultivo Industrial de Microorganismos: Tipos de cultivo.* Colegio Nacional de Educación Profesional Técnica. Oaxaca México. pp. 2
- Vera, A., Yépez, M., Martínez, M., & Pinto, L (2002). Crecimiento mixotrófico de *Chlorella* sp. cultivada en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia tortuosa*. *CENIC*, Vol. 33(1) pp. 19–22.
- Vinod, M., Ashish, W., & Guru, C. (2012). Carbon sequestration potential of *Scenedesmus* species (Microalgae) under the fresh water ecosystem. Recuperado el 20 de marzo del 2014, de *African Journal of Agricultural Research*: <http://www.academicjournals.org/>
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. Recuperado el 16 de abril del 2014, de *Appl. Microbiol, Biotechnol.*; <http://wenku.baidu.com>

Anexos

Anexo 1.

Preparación de la Fracción Soluble de papa brotada con cáscara (FSPGCC), brotada sin cáscara (FSPGSC), no brotada sin cáscara (FSPNGSC) y no brotada con cáscara (FSPNGCC).



Foto: Verdugo, Karla (2015)

Anexo 2.

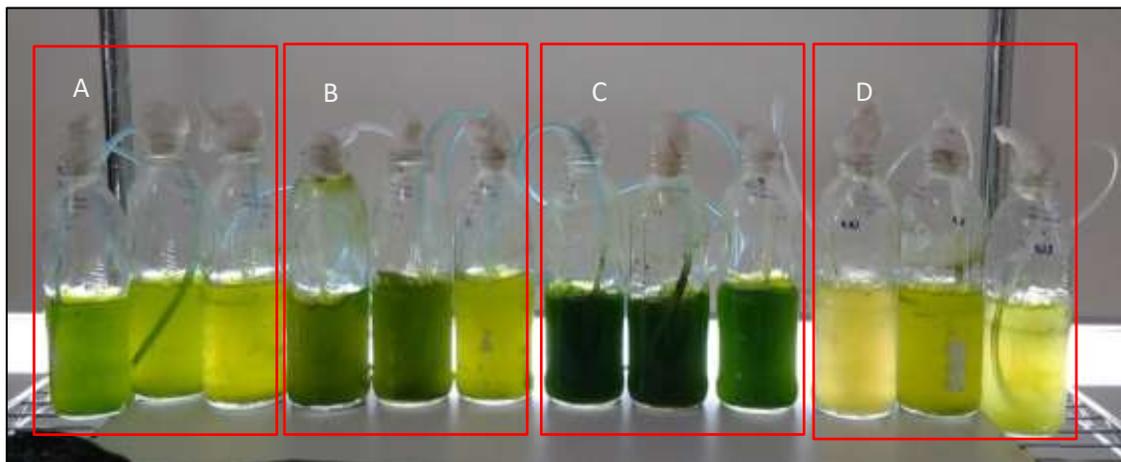
Biomasa seca de *Coenochloris* sp. tras un proceso de secado en estufa



Foto: Verdugo, Karla (2015)

Anexo 3.

Segundo ensayo de generación de biomasa basado en etapas de germinación de papa *Solanum phureja* - FSP brotada y no brotada a concentración 5%.



A: **FSPNGSC**-Fracción soluble de papa no brotada sin cáscara. B: **FSPGCC**-Fracción soluble de papa brotada con cáscara. C: **FSPGSC**-Fracción soluble de papa brotada sin cáscara. D: **FSPNGCC**-Fracción soluble de papa no brotada con cáscara

Foto: Verdugo, Karla (2015)

Anexo 4.

Segundo ensayo de generación de biomasa basado en etapas de germinación de papa *Solanum phureja* - FSP brotada y no brotada a concentración 10%.



A: **FSPNGSC**-Fracción soluble de papa no brotada sin cáscara. B: **FSPGCC**-Fracción soluble de papa brotada con cáscara. C: **FSPGSC**-Fracción soluble de papa brotada sin cáscara. D: **FSPNGCC**-Fracción soluble de papa no brotada con cáscara

Foto: Verdugo, Karla (2015)

Anexo 5.

Segundo ensayo de generación de biomasa basado en etapas de germinación de papa *Solanum phureja* - FSP brotada y no brotada a concentración 20%.



A: FSPNGSC-Fracción soluble de papa no brotada sin cáscara. B: FSPGCC-Fracción soluble de papa brotada con cáscara. C: FSPGSC-Fracción soluble de papa brotada sin cáscara. D: FSPNGCC-Fracción soluble de papa no brotada con cáscara

Foto: Verdugo, Karla (2015)

Anexo 6.

Bidones en los que se realiza generación de biomasa en un sistema de escalado continuo



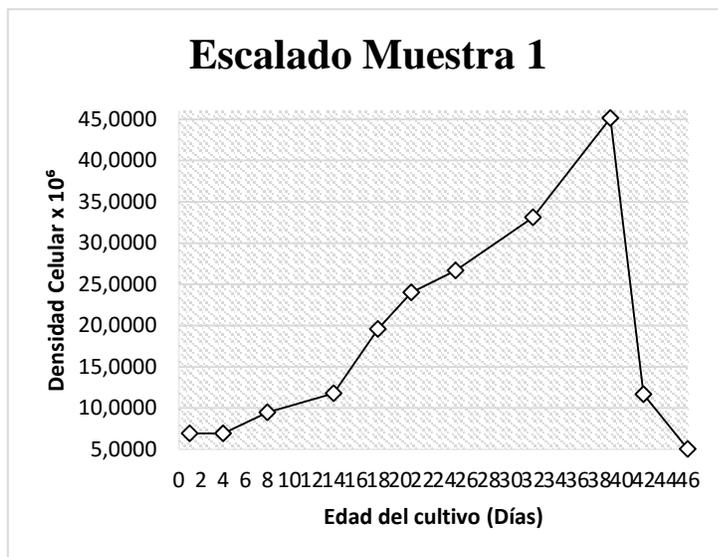
Foto: Verdugo, Karla (2015)

Anexos 7.

Curvas de crecimiento de *Coenochloris* sp. en sistema autotrófico tras conteo en cámara

Newbauer

Primera Muestra		
Fecha	Días	Dens. Cel x10 ⁶ cel/mL
24-jul	1	6,9150
28-jul	4	6,9300
05-ago	8	9,4800
11-ago	14	11,7970
15-ago	18	19,5900
18-ago	21	24,0200
25-ago	25	26,6700
01-sep	32	33,1200
08-sep	39	45,1200
11-sep	42	11,6775
15-sep	46	5,0325



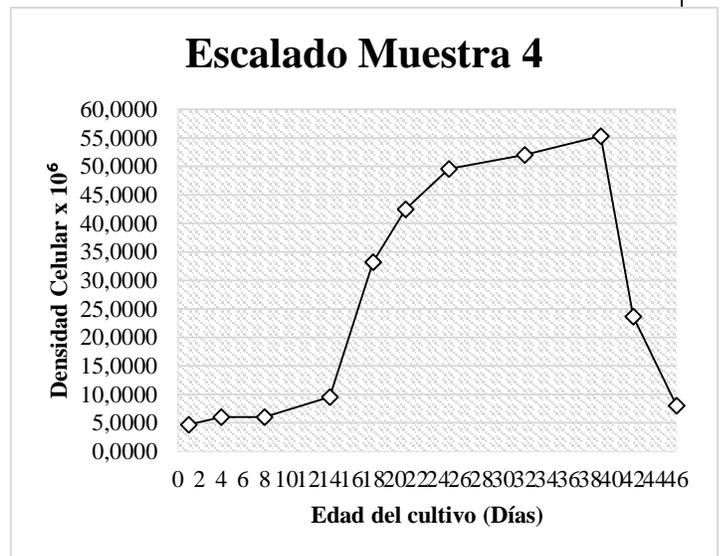
Segunda Muestra		
Fecha	Días	Dens. Cel 10 ⁶
24-jul	1	6,3750
28-jul	4	6,6600
05-ago	8	10,8325
11-ago	14	8,6175
15-ago	18	21,7125
18-ago	21	16,7200
25-ago	25	16,9900
01-sep	32	39,5800
08-sep	39	45,6100
11-sep	42	22,5675
15-sep	46	5,89500



Tercera Muestra		
Fecha	Días	Dens. Cel 10 ⁶
24-jul	1	4,4400
28-jul	4	5,9475
05-ago	8	12,7950
11-ago	14	13,7925
15-ago	18	19,5075
18-ago	21	21,7900
25-ago	25	23,5500
01-sep	32	33,7900
08-sep	39	49,7500
11-sep	42	24,6975
15-sep	46	5,8425



Cuarta Muestra		
Fecha	Días	Dens. Cel 10 ⁶
24-jul	1	4,6650
28-jul	4	5,9925
05-ago	8	6,0275
11-ago	14	9,5250
15-ago	18	33,2100
18-ago	21	42,4950
25-ago	25	49,5775
01-sep	32	52,0300
08-sep	39	55,3300
11-sep	42	23,6625
15-sep	46	8,0250



Anexos 8.

Análisis proximal del *Coenochloris* sp. en cultivo autotrófico



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cia. Ltda.

AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 14232-02-26-02-15-Q

Empresa: EVER MORALES
Nombre de representante: Ever Morales
Dirección: Toledo y Madrid Edificio Santamaria 24-48 La Floresta
Teléfono: 979349152 **FAX:**
Identificación de la muestra: CHOENODORIS
Descripción de la muestra: Hojas secas de color verde oscuro
Contenido declarado: 25g
No. de Lote o código: ND
Fecha de elaboración: NA **Fecha de caducidad:** NA

Muestreo: Por el cliente **Fecha de toma de muestra:** ND
Fecha de recepción: 26-feb-15
Fecha de ensayo: 1-6-Mar-2015
Fecha de reporte: 09-mar-15

Resultados analíticos:

Pag.: 1 de 1

ENSAYO	METODO	UNIDADES	RESULTADO
Humedad	INEN 518	% p/p	11.12
Proteína	INEN 519	% p/p	42.00
Grasa	INEN 523	% p/p	2.40
Ceniza	INEN 520	% p/p	15.34
Fibra	INEN 522	% p/p	4.14
Carbohidratos Totales	Cálculo	% p/p	25.00
Energía	Cálculo	K cal/ 100g	289.60

DICF Raquel Rojas R.
CENTROCESAL Cia. Ltda.
Responsable de Análisis



Q.F. Andrea Cumba A.
CENTROCESAL Cia. Ltda.
Responsable de Supervisión

Notas:

ND: No declara
NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
 Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.
 Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.
 La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio
 y será informada cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

Form. POC 8 10 1 Rev. 08 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Av. América 901-232 y Av. Maritima de Jarama
 Telf: (001 2) 2202140
 Fax: Ext. 102 Celular: 099449612
 e-mail: info@centrocesal.com
 www.centrocesal.com
 QUITO - ECUADOR

Anexos 9.

Análisis proximal del *Coenochloris* sp. en cultivo mixotrófico

 **CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES**
CENTROCESAL Cia. Ltda.

AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 14328-03-11-03-2015-Q

Empresa: EVER MORALES
Nombre de representante: Ever Morales
Dirección: Toledo y Madrid Edificio Santamaria 24-48 La Floresta
Teléfono: 979349152 **FAX:**
Identificación de la muestra: COENOCLHORIS SP *PODA*
Descripción de la muestra: Sólido heterogéneo de color verde oscuro
Contenido declarado: 21g.
No. de Lote o código: ND
Fecha de elaboración: ND **Fecha de caducidad:** ND

Muestreo: Por el cliente **Fecha de toma de muestra:** ND
Fecha de recepción: 11-mar-2015
Fecha de ensayo: 16-18-mar-2015
Fecha de reporte: 18-mar-2015

Resultados analíticos: **Pag.:** 1 de 1

ENSAYO	METODO	UNIDADES	RESULTADO
Humedad	INEN 518	% p/p	10.24
Proteína	INEN 519	% p/p	33.89
Grasa	INEN 523	% p/p	7.95
Ceniza	INEN 520	% p/p	15.05
Fibra	INEN 522	% p/p	3.78
Carbohidratos Totales	Cálculo	% p/p	29.08
Energía	Cálculo	K cal/ 100g	323.44

Dr. Carlos López M.
CENTROCESAL Cia. Ltda.
Responsable de Análisis

 **Q.F. Andrea Cumbá A.**
CENTROCESAL Cia. Ltda.
Responsable de Supervisión

Notas:
ND: No declara
NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.
Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.
La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio
y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

Fol. POE 5.10.1 Rev. 05 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Av. América 931-232 y Av. Mariposa de Jirón
Tel: (002 2) 2230342
Fax: Ext. 102 Celular 099549873
e-mail: info@centrocesal.com
WWW.CENTROCESAL.COM
QUITO - ECUADOR

Anexos 10.

Análisis de metales del *Coenochloris* sp. en cultivo autotrófico



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cia. Ltda.

AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 14250-01-02-03-15-Q

Empresa: EVER MORALES
Nombre de representante: Ever Morales
Dirección: Toledo y Madrid Edificio Santamaría 24-48 La Floresta
Teléfono: 9979349152 **FAX:**
Identificación de la muestra: COENOCLHORIS SP
Descripción de la muestra: Sólido heterogéneo de color verde
Contenido declarado: 18g
No. de Lote o código: ND
Fecha de elaboración: ND **Fecha de caducidad:** ND

Muestra: Por el cliente **Fecha de toma de muestra:** ND
Fecha de recepción: 02-mar-15
Fecha de ensayo: 4/9-mar-15
Fecha de reporte: 10-mar-15

Resultados analíticos: Pag.: 1 de 1

Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Calcio	Interno absorción atómica	g/Kg	4.70
Sodio	Interno absorción atómica	g/Kg	16.65
Potasio	Interno absorción atómica	g/Kg	166.25
Magnesio	Interno absorción atómica	g/Kg	8.71
Hierro	Interno absorción atómica	mg/Kg	314.93
Plomo	Interno absorción atómica	mg/Kg	1.29
Azufre	Interno espectrofotométrico	g/Kg	36.21
Cobre	Interno absorción atómica	mg/Kg	46.51

Ing. Juan Pablo Rosero
CENTROCESAL Cia. Ltda.
J. Rosero
Responsable de Análisis



CENTROCESAL Cia. Ltda.

Q.F. Andrea Cumba A.
CENTROCESAL Cia. Ltda.
Andrea Cumba
Responsable de Supervisión

Notas:
 ND: No declara
 NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
 Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.
 Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.
 La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será informada cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

FORM. PQR-010-1 Rev. 06 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Av. América 921-232 y Av. Mariana de Jesús
 Telf: (91) 2 272940
 Fax: 912 232 0000
 e-mail: info@centrocesal.com
 www.centrocesal.com
 QUITO - ECUADOR