

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**



Optimización de la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris*.

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

**PRESENTADO POR:
Bach. MAGUIÑA AVALOS, LIZBETH ANGÉLICA**

AYACUCHO – PERÚ

2011

A Dios por su bendición e inmenso amor.

Con cariño y gratitud a mis padres Cludovina y Luis, quienes con el sacrificio ejemplar hacia sus hijos me alentaron en todo momento y me brindan su apoyo para hacer realidad mis aspiraciones.

A mi hija Rocío, a mi novio Alexander y a mi hermano Juan Carlos, con cariño por ser mi apoyo y fuerza en los momentos más difíciles.

A mi tía Melchora Jacqueline, por su apoyo y comprensión incondicional en los mejores y peores momentos de mi vida.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, y a los excelentes docentes que en ella laboran, los cuales contribuyeron en el aprendizaje y orientación de mi formación universitaria.

A mi asesoras: Mg. Paula García Godos Alcázar y Mg. Marta Romero Viacava, por su apoyo permanente en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A los profesores: Dr. José YARLEQUÉ MUJICA, Mg. Elmer AVALOS PÉREZ, Ing. Edgar ARONES MEDINA y Marco ARONÉS JARA, por su apoyo en la culminación del trabajo de investigación.

A mis familiares y amigos en especial Jennyfer Humareda, Richard Gómez y Richard Gutiérrez, que de una u otra manera, colaboraron en la realización y conclusión del presente trabajo de investigación, así también por apoyarme en todo momento de mi vida.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aspectos genéricos de las microalgas	7
2.2.1. <i>Chlorella spp.</i>	8
2.2.2. <i>Chlorella vulgaris</i>	9
2.3. Producción de proteínas unicelulares	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Materiales	16
3.1.1. Materiales biológicos	16
3.1.2. Medios de cultivo	16
3.2. Metodología	17
IV. RESULTADOS	22
V. DISCUSIÓN	35
VI. CONCLUSIONES	41
VII. RECOMENDACIONES	42
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	48

Optimización de la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris*.

Autora: Bach. Lizbeth Angélica Maguiña Avalos.

Asesoras: Mg. Paula García Godos Alcázar y Mg. Marta Romero Viacava.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Botánica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, entre los meses de agosto del 2009 a enero del 2010, tuvo por objetivos: aislar la especie de *Chlorella vulgaris* de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho, identificar la especie de *Chlorella vulgaris* utilizando la clave para algas en abastecimientos de agua y determinar el pH, la temperatura y las vitaminas para la óptima producción de proteína unicelular a partir de *Chlorella vulgaris* de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho. Para optimizar los parámetros se cultivó la microalga *Chlorella vulgaris*, previamente aislada e identificada, en un medio para microlagas, estas muestras unialgales fueron incubadas a diferentes temperaturas (25, 30 y 35 °C), a pH de (7,0, 8,0 y 9,0) y con las vitaminas de biotina, cobalamina y tiamina por un periodo de 30 días. La productividad se determinó en función de la biomasa unialgal producida, medida en función de la concentración de proteínas obtenida. De acuerdo a los resultados las mejores condiciones para la mayor velocidad de crecimiento la de biomasa fueron a un nivel de pH de 9,0 a una temperatura 35 °C, con biotina se obtuvo (2,2127g), a diferencia que la mayor concentración de proteínas se obtuvo a 30 °C, pH 7,0 con biotina dándonos (11,53 mg/mL) y un porcentaje de proteínas de 28,85 %. Estos resultados nos muestran valores importantes de proteína a partir de organismos unicelulares, que es una alternativa de fácil accesibilidad, bajo costo y alto rendimiento.

Palabras clave: *Chlorella vulgaris*, proteína unicelular, microalga.

I. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de los problemas al que se enfrenta la humanidad es proporcional al crecimiento poblacional. El déficit energético, de alimentos, de agua, de terreno habitable y productivo, de medicamentos, junto a otros renglones, aumenta de manera tal que se hace imprescindible la búsqueda de nuevas fuentes de recursos que permitan disponer de materia prima para el constante desarrollo y preservar la existencia de los seres vivos (Gomes, 2006).

La producción de algas y la obtención de sus productos derivados ha sido tal vez uno de los campos menos explorados de la biotecnología a nivel mundial, en cambio ya no solo se ven a las algas, específicamente las microalgas, como las potenciales despensas mundiales de proteína, sino que se ha avanzado con grandes éxitos en la obtención de productos bioactivos tanto para la industria farmacéutica y cosmética, así como en la obtención de suplementos alimenticios y nutricionales de consumo humano y animal (Villanueva *et al.*, 1996).

La producción de alimentos con proteína de calidad nutricional se ve limitada por diversas razones como: el deterioro del suelo, el costo de los fertilizantes químicos y el agua. Por ello, se propone otras alternativas como la obtención de proteína microbiana, biomasa o conocida como "Single Cell Protein" (SCP).

El término proteína unicelular significa alimentos proteicos derivados de microorganismos unicelulares, el valor biológico de una proteína depende fundamentalmente de su composición en aminoácidos esenciales, caracterizándose las microalgas por habitar todos los cuerpos de agua donde existan las condiciones más simples para crecer (Abalde *et al.*, 1997).

Por otro lado, el cultivo de microalgas se presenta como una de las mejores alternativas para la solución de problemas mundiales como el tratamiento de aguas residuales y el calentamiento global, ya que sus propiedades fotosintéticas las llevan a ser captadores de CO₂ en altas concentraciones.

Existe hoy en día la necesidad de producir grandes cantidades de proteína a partir de productos alimenticios de fácil accesibilidad, bajo costo y alto rendimiento, lo que ha llevado a plantear investigaciones en la búsqueda de este importante alimento a partir de organismos unicelulares, pues las fuentes convencionales como la agricultura, ganadería y pesca no satisfacen totalmente la demanda, siendo la microalga *Chlorella vulgaris* una fuente importante de producción de proteínas (Salcedo, 1996). Por lo que la presente investigación se planteó los siguientes objetivos:

- Aislar la especie de *Chlorella vulgaris* de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho.
- Identificar la especie de *Chlorella vulgaris* utilizando la clave para algas en abastecimientos de agua.
- Determinar el pH, la temperatura y las vitaminas para la óptima producción de proteína unicelular a partir de *Chlorella vulgaris* de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Los microorganismos como hongos, bacterias, cianobacterias y microalgas han sido utilizados en la alimentación humana como fuente de proteínas y vitaminas durante siglos (Andreo y Vallejos, 1996).

Cuando se inició el proceso de conquista y colonización por los españoles en el antiguo Imperio Azteca, los nativos incluían en su dieta diaria una especie de espuma verde azulada que abundaba en la superficie del lago Texcoco, sobre la que estaba asentada la ciudad de Tenochtitlán, donde actualmente se encuentra Ciudad de México, los aztecas llamaban a este alimento Tecuaithal (Trujillo, 1995).

El concepto de producción masiva de microalgas se llevó a cabo por primera vez en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial, dirigido a la producción de lípidos para su uso como fuente de combustible utilizándose las microalgas *Chlorella pirenoidosa* y *Nitzschia palea* y después comenzó a considerarse las biomásas microalgales como un suplemento importante e incluso capaz de

reemplazar a las proteínas animales o vegetales convencionales para consumo directo del ganado o del hombre. Así, a partir de 1948, un grupo de científicos de la Carnegie Institución of Washington, realizaron el primer trabajo sistemático que establece los fundamentos científicos del cultivo masivo de microalgas, el objetivo de este proyecto era de utilizar la microalga verde *Chlorella* para la producción a gran escala de alimentos (Jagnow y Dawid, 1991).

Durante los años 50, el interés mundial por la búsqueda de proteínas para la alimentación amplió los estudios a otras microalgas de agua dulce como *Scenedesmus*, *Coelastrum* y *Spirulina*, encontrando otras aplicaciones. Oswald *et al.* de la Universidad de California, Berkeley, sugirieron la aplicación de cultivos masivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales y producción de proteínas simultáneamente, asimismo se desarrollaron sistemas para la producción masiva de microalgas para la bioconversión de energía solar en metano (Martín, 1992).

Bertoldi y *et al.* (2008), de la Universidad Federal de Santa Catarina (UFSC) Brasil, investigaron que el cultivo de microalgas representa una fuente potencial de biomasa rica en clorofila y minerales, tales como: fósforo, hierro, manganeso, cobre, zinc, magnesio y calcio, el cual tuvo como objetivos evaluar la composición de los minerales, así como determinar el nivel de clorofila A y B de la microalga *Chlorella vulgaris* cultivadas en las aguas residuales hidropónicas en tres concentraciones diferentes en comparación con un grupo control. Los resultados mostraron que los niveles de clorofila A y B de las microalgas no mostraron diferencias significativas entre los cultivos. En cuanto a la composición de minerales, la *Chlorella* cultivada en las soluciones residuales más concentradas, fueron más altos en comparación con los otros cultivos

establecidos. De esta manera, la biomasa de *Chlorella vulgaris* demostró ser una fuente potencial de clorofila y minerales, cuando se cultivan en una solución de aguas residuales hidropónico, el cual permite el uso de estos residuos de forma sostenible.

Ohse *et al.* (2009), de la Universidad Estatal de Ponta Grossa (UEPG). Brasil, determinaron el aumento de CO₂ y otros gases de efecto invernadero que han generado un debate mundial sobre el cambio climático y favorecer el desarrollo de estrategias de mitigación. El trabajo, incluye el secuestro de CO₂ a través de la producción de microalgas acuáticas. Por esta razón, desarrollaron un estudio para determinar el carbono, hidrógeno, nitrógeno, proteínas y la producción de biomasa seca de nueve especies de microalgas marinas (*Nannochloropsis oculata*, *Pseudonana thalassiosira*, *Tricornutum phaeodactylum*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chui*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* y *Isochrysis sp.*) y de agua dulce (*Chlorella vulgaris*), en el cultivo autotrófico parado a fin de identificar el carbono más productivas y más capaces de fijar. El experimento se realizó en la casa cada vez mayor, de la Universidad Federal de Santa Catarina, con iluminación continua y la radiación alrededor de 150 $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, temperatura de 25 \pm 2 °C, suplementario constante de aire, y los frascos utilizados con 800 ml de medio de cultivo. El diseño experimental fue de bloques al azar con tres repeticiones en el tiempo. Las especies *Chlorella vulgaris* y *Tetraselmis suecica* son menos productivos. En lo que tiene por objeto complementar la alimentación, las especies *Chlorella vulgaris* y *Tetraselmis Chui* se consideran interesantes, ya que tienen altos niveles de C, N, H y proteína. Las especies *Nannochloropsis Oculata*, *Thalassiosira pseudonana* y *Chlorella vulgaris* tienen altos niveles de C, mostrando una alta capacidad de fijar carbono.

En 1998, Guzmán evaluó las posibilidades de algunas microalgas unicelulares con vistas a la producción de biomasa con variadas aplicaciones destacando su destino para la suplementación proteica en alimentación animal a la vez que se plantea la potencialidad para la síntesis de sustancias valiosas. Se conjuga este objetivo con la existencia en la región de Murcia de unas condiciones de temperatura y luminosidad supuestas idóneas para este cultivo. Se tiene en cuenta la disponibilidad de grandes cantidades de subproductos de origen animal, tales como los purines de cerdo para su utilización en una primera etapa como parte de los sustratos a utilizar, aprovechando la circunstancia para contribuir a la eliminación de estos subproductos altamente contaminantes y de difícil eliminación por sistemas convencionales. En conjunto esta tesis supone aportaciones al conocimiento de las microalgas y sus posibilidades desde sus distintos aspectos, entre los que pueden citarse: revisión sistemática de conocimientos sobre el cultivo de microalgas, contribución propiamente dicha al conocimiento científico y al desarrollo tecnológico de la producción intensiva de microalgas, adecuación de los sistemas de cultivo de microalgas y procesado de la biomasa a las características de clima y luminosidad de la región de Murcia, desarrollo de una planta piloto a una razonable magnitud de escala, aprovechamiento del reservorio de nutrientes que suponen los purines de cerdo para la confección de sustratos sobre los que desarrollar las microalgas y dedicación preferente de la biomasa como suplemento proteico en alimentación animal con futuras posibilidades de cultivos limpios para alimentación humana, valoración bromatológica de la biomasa. Para el estudio experimental se han seleccionado las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*. Se han realizado ensayos de digestibilidad y valor biológico de proteínas procedentes de microalgas cultivadas sobre purines, utilizando los métodos de Tomas-Mitchell, con ratas wistar jóvenes (Kuklinski, 2003).

2.2. Aspectos genéricos de las microalgas

Las microalgas son organismos que pueden vivir en estado libre, formar agregados y colonias, lo que constituye un rudimentario principio de organización superior. Las microalgas pueden ser autótrofas y heterótrofas de acuerdo a la obtención de sus nutrientes y son plantas microscópicas, fotosintéticas, no vasculares, poseen estructuras reproductoras simples y flotan libremente, pero con movilidad limitada (Diez, 2001).

En un sentido amplio y desde el punto de vista biotecnológico, el término microalgas hace referencia a aquellos microorganismos unicelulares que contienen clorofila "a" y/u otros pigmentos fotosintéticos similares, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica (Anupama y Ravindra, 2000).

La reproducción de las microalgas puede ser asexual, por división longitudinal, transversal, o por medio de esporas, como ocurre en las algas unicelulares sexuales, en la que dos células o gametos, procedentes de individuos distintos se unen para dar una célula huevo (De La Cruz y Alfonso, 1998).

Pese a las grandes diferencias estructurales, fisiológicamente ambos tipos de microalgas, procariotas y eucariotas, son similares y poseen un metabolismo fotosintético similar al de las plantas superiores. Las microalgas, seres unicelulares muy variados en tamaño y forma, existen en casi todos los hábitats conocidos. La mayor parte pertenecen a hábitats acuáticos, tanto marinos como dulceacuícolas, aunque algunas viven en tierra. Los mares y océanos contienen enormes cantidades de algas planctónicas, estimándose que el 90% de la fotosíntesis total de la tierra es realizada por estos vegetales acuáticos. El número de taxones es elevado y en la actualidad es un recurso prácticamente

inexplorado, ya que solamente unas 50 especies han sido estudiadas con detalle desde el punto de vista fisiológico y bioquímico (Andersen, 2005).

Desde una perspectiva nutricional ha sido considerada como un alimento completo (cada célula es una planta con todos sus atributos), puro (no contiene sustancias ni aditivos químicos o insecticidas) y natural (no se industrializa para su consumo) (Morist *et al.*, 2001).

2.2.1 *Chlorella spp.*

La microalga *Chlorella* es el organismo vegetal con mayor concentración de clorofila, además, es el sistema natural existente que a través de la alimentación puede transmitir al ser humano la energía procedente del sol. Una vez en el organismo la clorofila activa las enzimas imprescindibles para una adecuada asimilación de los nutrientes y para su combustión proceso que permite convertirlos en energía. Además, se da la circunstancia de que las células de clorofila y las de los glóbulos rojos presentan una estructura muy similar (únicamente se diferencian por el átomo central, en hemoglobina que es el hierro y en la clorofila que es el magnesio). Similitud que la convierte en un excelente tónico para la sangre en caso de anemias. El alga *Chlorella* también contiene cantidades muy significativas de vitamina C, betacaroteno (provitamina A), vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantoténico), B6 (ácido fólico) y B12, vitaminas E, H (biotina) y K, colina, inositol y ácido paraaminobenzoico (Madigan *et al.*, 1999).

En cuanto a sus minerales la composición incluye fósforo, potasio, magnesio, zinc, hierro, calcio, manganeso, cobre, yodo y cobalto (siendo su alto contenido en hierro y zinc de gran importancia nutricional para los vegetarianos). De los

ácidos grasos que contiene esta microalga casi el 80% son de tipo insaturado y por tanto, beneficiosos para la salud (Trevan y Boffey, 1995).

Se sabe que la *Chlorella* contiene casi un 60% de proteínas de alta calidad biológica siendo su contenido proteico mucho mayor que el de la soja o la carne de vaca. Es más, contiene todos los aminoácidos, incluidos los llamados esenciales que son necesarios obtener a través de la dieta en proporciones equilibradas, ingerir cantidades suficientes de proteínas es fundamental para mantener una buena salud y evitar por ejemplo la falta de energía, la fatiga, la pérdida de elasticidad de la piel, las dolencias de los huesos, etc. (Madigan *et al.*, 2004).

No existe ningún tipo de toxicidad con relación al consumo de *Chlorella*, es imposible la sobredosis, puede existir fotosensibilidad en personas que tomen elevadas dosis de *Chlorella*, formación de gases y flatulencias, debido al aumento del peristaltismo intestinal, no existe incompatibilidad con café, té, alcohol, tabaco, ni cualquier tipo de fármaco (Darley, 1997).

2.2.2 *Chlorella vulgaris*

Determinada según el sistema de Clasificación de Engler and Prantl, modificado por Melchor en 1904, y es como sigue:

DIVISIÓN : CHLOROPHYTA
CLASE : CHLOROPHYCEAE
ORDEN : CHLOROCOCCALES
FAMILIA : OOCYSTACEAE
GENERO : CHLORELLA
ESPECIE : *Chlorella vulgaris* Beij.

Entre las principales características físico – químicas que presenta *Chlorella vulgaris* son: es una microalga esférica, contiene los pigmentos verdes fotosintetizadores de clorofila a y b en su cloroplasto, posee aspecto regular, forma redonda ovalada, con un diámetro promedio de 8.5 µm, unicelular de agua dulce, sin flagelo, con una resistente membrana celular que protege su estructura orgánica, con o sin pirenoides dependiendo la especie, presenta un núcleo, se reproduce en corto tiempo y cada alga se puede subdividir en cuatro nuevas células cada 16 a 20 horas, ciclo de vida medio de 10,5 horas, temperatura óptima 25 °C, alto porcentaje proteico 70% de su composición química, pH 6,5 – 7,5 (Bailey y Scott, 1998).

Tabla N° 1. Composición bioquímica (%) de la biomasa de *Chlorella vulgaris*

Componentes	Porcentaje(%)
Pérdidas por desecación	7,18
Nitrógeno total	7,13
Proteína bruta	44,56
Proteína verdadera	32,25
Carbohidratos	16,00
Fibra cruda	8,20
Lípidos	0,29
Cenizas	8,90
Ácidos nucleicos totales	5,69

Fuente: Morris (1999).

La microalga *Chlorella vulgaris* contiene el llamado "Factor de Crecimiento de la *Chlorella*" (CGF), fitonutriente que la hace única. Pero también por sus innegables propiedades terapéuticas para estimular el crecimiento, fortalecer el sistema inmune, se comporta directamente como un antioxidante, eliminando los radicales libres que pudieran generar graves daños en el organismo, mejora la digestión, ayuda a cicatrizar las heridas cutáneas, a regenerar las células de la piel y desintoxicar el organismo de metales pesados y tóxicos (Arredondo y Vásquez, 1996).

2.3. Producción de proteínas unicelulares

Las microalgas pueden ser producidas usando una amplia variedad de métodos, desde métodos de laboratorio totalmente controlados a métodos en tanques abiertos y menos controlados (Crueger y Crueger, 2000).

Los recipientes de cultivo más comunes usados para el desarrollo óptimo de las microalgas son los materiales no tóxicos como las placas de Petri, matraces de Erlenmeyer, carboys, etc., adecuadas para cultivos de laboratorio. En cultivos masivos la aireación es un factor muy importante para la homogenización de los nutrientes y evitar la sedimentación de las microalgas, el crecimiento y la división celular son afectadas por la intensidad de la luz y el foto período (horas de iluminación y oscuridad) y también existe una influencia de la temperatura (Collins y Lien, 1994).

Los parámetros de optimización físico-químicos para la producción de proteína unicelular de *Chlorella vulgaris* se deben controlar diariamente para asegurar el buen desempeño del experimento (Saldaña-Acosta, 1989).

2.3.1 El pH

Es una medida de la acidez o alcalinidad de una solución, típicamente va de 0 a 14,0 en disolución acuosa, siendo ácidas las disoluciones con pH menores a 7,0 y alcalinas las que tienen pH mayores a 7,0. El pH = 7,0 indica la neutralidad de la disolución, la sigla significa "potencial de hidrógeno" (Harris, 1992).

El pH óptimo para la microalga *Chlorella vulgaris* es de 7,0 – 8,0 para obtener mayor cantidad de biomasa.

2.3.2 La temperatura

Está relacionada directamente con la parte de la energía interna conocida como "energía sensible", que es la energía asociada a los movimientos de las partículas del sistema, a medida que es mayor la energía sensible de un sistema, se observa que está más "caliente"; es decir, que su temperatura es mayor (Chang, 2006).

A un promedio de 30 °C, se observa que las microalgas de *chlorella vulgaris* tienen mayor producción de proteínas unicelulares.

2.3.3 Las vitaminas

2.3.3.1 Vitamina B₁ (Tiamina). Desempeña un papel fundamental en el metabolismo de los glúcidos y lípidos, es decir, en la producción de energía y favorece el crecimiento y ayuda a la digestión de carbohidratos.

2.3.3.2 Vitamina H (Biotina). Es una coenzima que participa en la transferencia de grupos carboxilo, interviene en las reacciones que producen energía y en el metabolismo de los ácidos grasos, interviene en la formación de la glucosa a partir de los carbohidratos y de las grasas.

2.3.3.3 Vitamina B₁₂ (Cobalamina). Interviene en la síntesis de ADN y ARN. Es necesaria para la formación de nucleoproteínas, proteínas, glóbulos rojos y para el funcionamiento del sistema nervioso, para la movilización (oxidación) de las grasas y para mantener la reserva energética de los músculos, coenzima de diversas reacciones enzimáticas, no se halla fácilmente disponible en la alimentación (Harper y Murray, 2001).

Las ventajas de la producción de *Chlorella vulgaris* son:

- ✓ Las microalgas pueden ser cultivadas bajo condiciones agro-climáticas difíciles, como por ejemplo en desiertos, no existen partes inservibles de la biomasa (Cisneros y Vinatea, 2002).
- ✓ Muchas microalgas crecen en ambientes salinos e hipersalinos, por lo que no compiten con la agricultura tradicional por los limitados recursos de tierra arable y agua fresca (Coll, 1997).
- ✓ Todos los procesos pueden ser automatizados.
- ✓ Los tiempos de duplicación de la biomasa son cortos.
- ✓ La posibilidad de experimentación genética para mejorar el contenido proteico puede efectuarse en corto tiempo (Dufossé *et al.*, 2005).

Propiedades terapéuticas consultadas de *Chlorella vulgaris* son:

- En el fortalecimiento del sistema inmunológico del ser humano.
- La aceleración del proceso de curación de heridas, lesiones y úlceras.

- La protección contra contaminantes tóxicos.
- La normalización de los procesos digestivos y la función intestinal.
- La estimulación del crecimiento y la reparación de los tejidos.
- La retardación del proceso de envejecimiento.
- La protección contra los efectos de la radiación.
- Reduce de hipertensión y el colesterol.
- Presentan acción anticarcinogénica, antimutagénica (Castro *et al.*, 2003).

Se han obtenido también sustancias bactericidas y anticoagulantes de la sangre, terapéuticos y preventivos de colitis ulcerativas, gastritis, anemia entre otras múltiples aplicaciones (ASTM, 2004).

Las microalgas pueden ser utilizadas en otras aplicaciones como biofertilizantes, en la purificación de aguas residuales, como acondicionadores de suelo y como alimento en acuicultura. Asimismo, se ha puesto de manifiesto la potencialidad de las microalgas para la producción de gran variedad de sustancias, algunas de ellas de elevado precio, como ácidos grasos, pigmentos, vitaminas, antibióticos, productos farmacéuticos y otros productos químicos de interés, así como hidrógeno, hidrocarburos y otros combustibles biológicos (Trujillo, 1994).

Rentabilidad de la producción de proteínas unicelulares se debe a:

Los principales factores económicos como la productividad, rendimiento, precio de venta y el costo del sustrato lo que representa una gran proporción del costo de fabricación de la mayoría de los productos de proteínas de organismos unicelulares, por lo que es esencial que el rendimiento celular (peso de células producido por unidad de peso de sustrato) sea elevado y la formación de sub-productos sea mínima. El mejoramiento de los procesos tecnológicos y diseños

de sistemas integrados para el uso de subproductos generados en el cultivo de microalgas, permitiría optimizar la relación costo-beneficio en los proyectos (Espinola, 1997).

Los costos de cosecha y transporte de algas es menor comparado con los cultivos agrícolas, y su tamaño pequeño permite opciones de procesamiento efectivas en cuanto a costo (Mendiola, 2006). Conforme se desarrolla la tecnología para su cultivo, los costos de producción se abaratan de manera sorprendente, lo que significa un estímulo para los países emergentes, ya que pueden resolver el problema de falta de alimento por un lado, y por otro, generar recursos (Sánchez *et al.*, 2009).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Botánica y Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.1.1. Materiales biológicos

Cultivo unialgal de tres muestras de *Chlorella vulgaris*, las que fueron aisladas del río Alameda, de las pozas del Centro Recreacional de "Totorilla" y de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales "Totora", de la localidad de Ayacucho.

3.1.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados para el aislamiento y purificación de las microalgas fueron: solución concentrada AB, medio de cultivo de *Chlorella* y para la producción se utilizaron medios para microalgas con micronutrientes y solución de antibióticos anexos (anexo 01).

3.2. Metodología

a. Población

La población con que se trabajó estuvo conformada por las microalgas del genero *Chlorella* presentes en los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho.

b. Muestra

La muestra estuvo constituida por cultivos unialgales de *Chlorella vulgaris* aislados de tres fuentes de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho.

c. Recolección de la muestra

- Se recolectaron aguas que contengan microalgas posiblemente *Chlorella vulgaris* de diversas fuentes, utilizando bolsas de polietileno debidamente codificadas y siguiendo con las técnicas establecidas de manipulación.

d. Aislamiento de *Chlorella vulgaris*

- Se cultivó las muestras recolectadas con dos medios de cultivo específicos: para *Chlorella* y solución concentrada AB.
- Se cultivó en seis balones de vidrio conteniendo 100 ml de agua destilada cada uno y se adicionó con una pipeta de 10 ml diferentes concentraciones (2, 5, 8, 10, 15 y 20 mg/mL) de solución concentrada AB y se inoculó 10 ml de muestra recolectada, se incubaron por dos semanas en condiciones de luz constante, agitación cada 12 horas por 5 min. y temperatura de 25 °C. (con los dos diferentes medios).
- Luego, se realizaron diluciones sucesivas de la muestra para aislar la

microalga, realizando observaciones macroscópicas y microscópicas.

- Luego se procedió al cultivo en medio sólido, en placas de Petri con Agar-agar, para obtener un cultivo unialgal.

e. Identificación del cultivo de *Chlorella vulgaris*

- Se observó la microalga *Chlorella vulgaris* aislada, en el microscópico a una ampliación de 40X.
- La identificación de su morfología se realizó según el sistema de Clasificación de Engler and Prantl, modificado por Melchior en 1904 (Anexo N° 02).

f. Purificación y producción de biomasa microalgal

- Se transfirió las tres muestras aisladas e identificadas del medio sólido a tres botellas de vidrio estériles conteniendo 100 ml de medio de cultivo para microalgas, extrayéndose mediante la técnica del raspado, la totalidad de las muestras con la ayuda del asa de Kolle.
- Se inoculó 4 ml de solución de antibióticos a las respectivas botellas de vidrio conteniendo 100 ml de medio de cultivo estéril. Todo procedimiento se realizó en condiciones de esterilización, por tratarse de muestras unialegales puras y para eliminar la posible presencia de bacterias.
- Se dejó incubar por un período de tres días a iluminación, agitación y temperatura constante.

- Luego se adicionó los 10 ml del cultivo algal inicial a cada botella de vidrio que contengan 100 ml de medio de cultivo para microalgas y el antibiótico. Se incubó homogeneizando la muestra por espacio de tres días a temperatura constante.
- Luego se procedió a observar al microscopio las muestras que deben de estar totalmente puras y libres de cualquier microorganismo.
- Se transfirió 10 ml de la muestra incubada a cada botella de vidrio conteniendo 100 ml de medio de cultivo estéril sin antibiótico a 25 °C por 3 días, para finalmente proceder a la optimización.

g. Optimización de la producción de la proteína unicelular

- Se instalaron los equipos para la optimización a temperaturas de: 25, 30 y 35 °C, con ayuda de los termostatos para cada temperatura.
- Dentro de cada equipo calibrado, se colocaron las botellas de vidrio con 250 ml de medio para microalgas, adicionándole 2 ml muestra unialgal pura de *Chlorella vulgaris* a cada botella por separado, ajustando a diferentes pHs de 7,0, 8,0 y 9,0 y adicionando en cada botella una de las vitaminas: biotina, cobalamina y tiamina a una concentración de (0,06 mg/mL), en forma independiente.
- Se incubaron las muestras durante 30 días con los parámetros establecidos, como de agitación y aireación moderadas con la ayuda de la compresora, regulando el ingreso de aire con las respectivas válvulas colocadas en la parte superior de cada botella.

h. Rendimiento de biomasa de *Chlorella vulgaris*

- Se separó la biomasa algal por centrifugación a 3,000 rpm por 10 minutos.
- Se taró la placa Petri limpia y seca, luego se adicionó la biomasa algal y se llevó al horno a 60 °C por 24 horas, para el secado respectivo.
- Se volvió a pesar la muestra seca y por diferencia de pesos se obtuvo el peso de la biomasa y el respectivo porcentaje.

i. Determinación del porcentaje de proteínas

- Los resultados del porcentaje de proteínas, se obtuvieron por el Método cuantitativo de Biuret. A 1 mL de suspensión se añadió 2 mL de solución de NaOH 3,0 N en baño María por 5 min. Luego de enfriar se adicionó 2 mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos y leímos el sobrenadante a una longitud de onda de 554 nm. Después se transformó los valores de absorbancia a concentración de proteínas usando la curva patrón que se trabajó con la muestra estándar de (2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL) de ovoalbúmina. Todos los datos obtenidos se ajustaron mediante el método de regresión lineal.

j. Análisis estadístico

- Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza factorial $A \times B \times C$ ($3 \times 3 \times 3$), con un nivel de significancia α 0,05, donde:

A= pH (7,0, 8,0 y 9,0).

B= Temperatura °C (25, 30 y 35).

C= Vitaminas (biotina, cobalamina y tiamina).

Para el resultado de las comparaciones múltiples de Duncan y para los valores de producción máxima de las proteínas unicelulares, se aplicaron tablas de frecuencias. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15, considerándose para todos los análisis un nivel de significancia α 0,05.

IV. RESULTADOS

Tabla N° 2. Microalga identificada de la especie *Chlorella vulgaris* obtenida de los recursos hídricos de la ciudad. Ayacucho - 2011.

DIVISIÓN	CHLOROPHYTA
CLASE	CHLOROPHYCEAE
ORDEN	CHLOROCOCCALES
FAMILIA	OOCYSTACEAE
GÉNERO	CHLORELLA
ESPECIE	<i>Chlorella vulgaris</i> Beij.

Fuente: Clasificación de Engler and Prantl, modificado por Melchior (1904).

Tabla N° 3. Valores promedio de la producción de biomasa (g) obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* en diferentes niveles de pH, temperaturas y vitaminas. Ayacucho - 2011.

Temperatura	25°C								
pH	7,0			8,0			9,0		
Vitamina	B	C	T	B	C	T	B	C	T
Biomasa (g)	0,893	0,931	0,991	1,402	1,261	1,205	2,017	1,795	1,546
Temperatura	30°C								
pH	7,0			8,0			9,0		
Vitamina	B	C	T	B	C	T	B	C	T
Biomasa (g)	1,104	1,283	1,573	1,574	1,337	1,686	2,201	2,008	2,054
Temperatura	35°C								
pH	7,0			8,0			9,0		
Vitamina	B	C	T	B	C	T	B	C	T
Biomasa (g)	0,813	1,036	1,066	1,941	1,528	1,530	2,213	2,127	2,077

B = Biotina (0,06 mg/mL).
 C = Cobalamina (0,06 mg/mL).
 T = Tiamina (0,06 mg/mL).

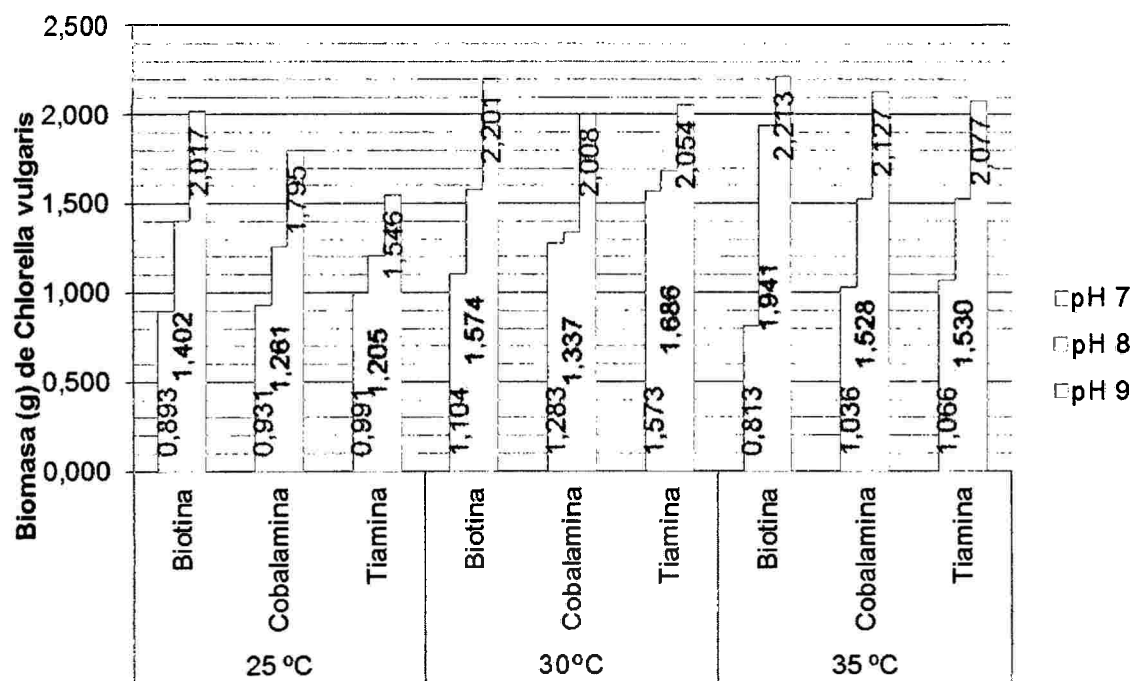


Gráfico N° 1 Valores promedio de la producción de biomasa (g) obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* con diferentes niveles de pH, temperaturas y vitaminas. Ayacucho - 2011.

Tabla N° 4. Promedio de la concentración de proteína (mg/mL), obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* en diferentes niveles de pH, temperaturas y vitaminas, aisladas de los recursos hídricos de la ciudad. Ayacucho - 2011.

Temperatura	25°C								
pH	7,0			8,0			9,0		
Vitamina	B	C	T	B	C	T	B	C	T
Concentración (mg/mL)	3,820	2,647	4,110	3,171	3,173	5,029	4,320	2,392	3,489
Temperatura	30°C								
pH	7,0			8,0			9,0		
Vitamina	B	C	T	B	C	T	B	C	T
Concentración (mg/mL)	11,541	4,656	5,184	3,602	5,711	5,493	5,691	3,092	3,627
Temperatura	35°C								
pH	7,0			8,0			9,0		
Vitamina	B	C	T	B	C	T	B	C	T
Concentración (mg/mL)	3,929	4,181	3,860	3,599	2,584	3,121	2,806	2,319	2,501

B = Biotina (0,06 mg/mL).
 C = Cobalamina (0,06 mg/mL).
 T = Tiamina (0,06 mg/mL).

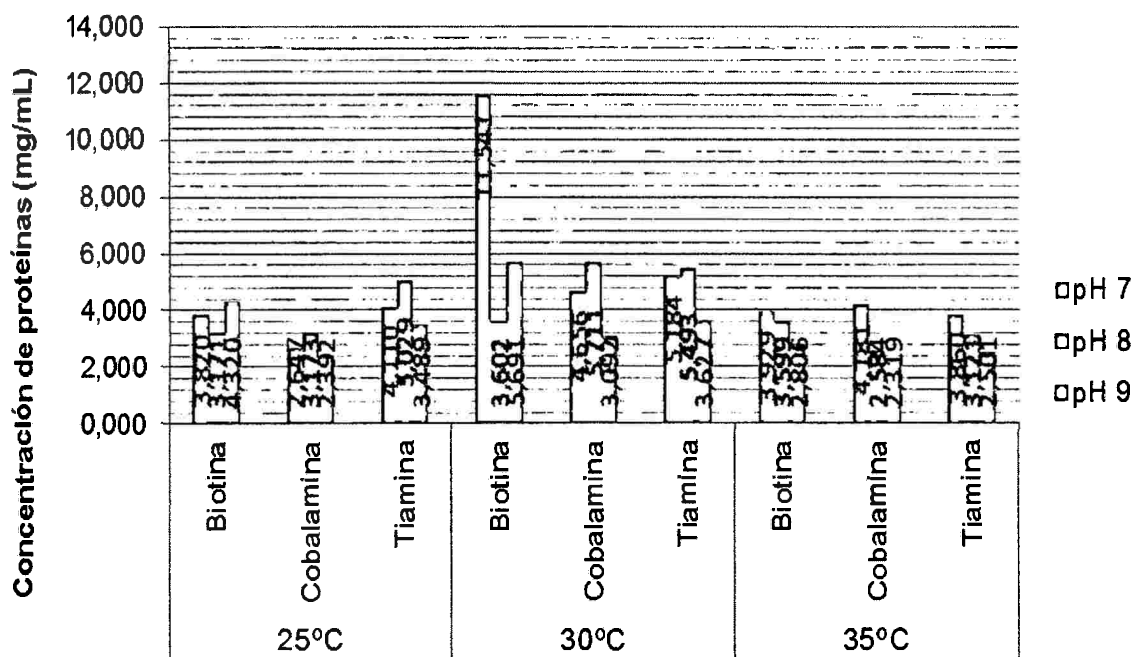


Gráfico Nº 2. Promedio de la concentración de proteína (mg/mL) obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* con diferentes niveles de pH, temperaturas y vitaminas. Ayacucho - 2011.

Tabla N° 5. Promedio de la concentración de proteína (mg/mL) obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*, con diferentes niveles de pH, temperaturas y con biotina. Ayacucho - 2011.

Concentración de Proteína (mg/mL)			
T (°C)	pH		
	7,0	8,0	9,0
25	3,820	3,171	4,320
30	11,541	3,602	5,691
35	3,929	3,599	2,806

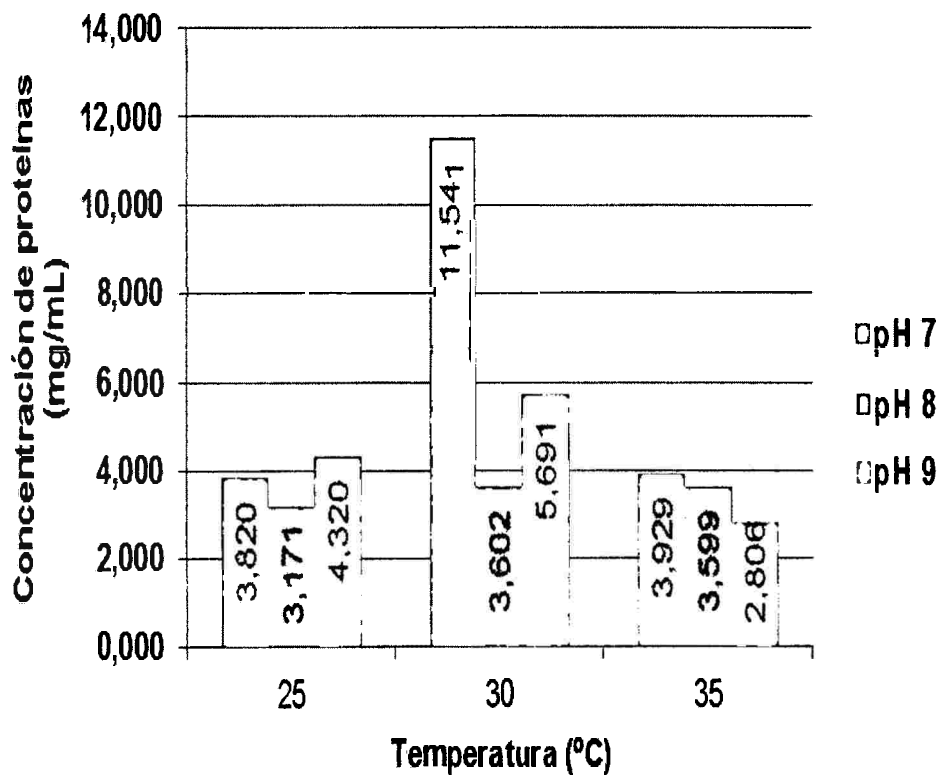


Gráfico N° 3. Evaluación de la concentración de proteína unicelular (mg/mL), obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*, con diferentes niveles de pH, temperaturas y con biotina. Ayacucho – 2011.

Tabla N° 6. Promedio de la concentración de proteína (mg/mL) obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*, con diferentes niveles de pH, temperaturas y con cobalamina. Ayacucho - 2011.

Concentración de Proteínas (mg/mL)			
T (°C)	pH		
	7,0	8,0	9,0
25	2,647	3,173	2,392
30	4,656	5,711	3,092
35	4,181	2,584	2,319

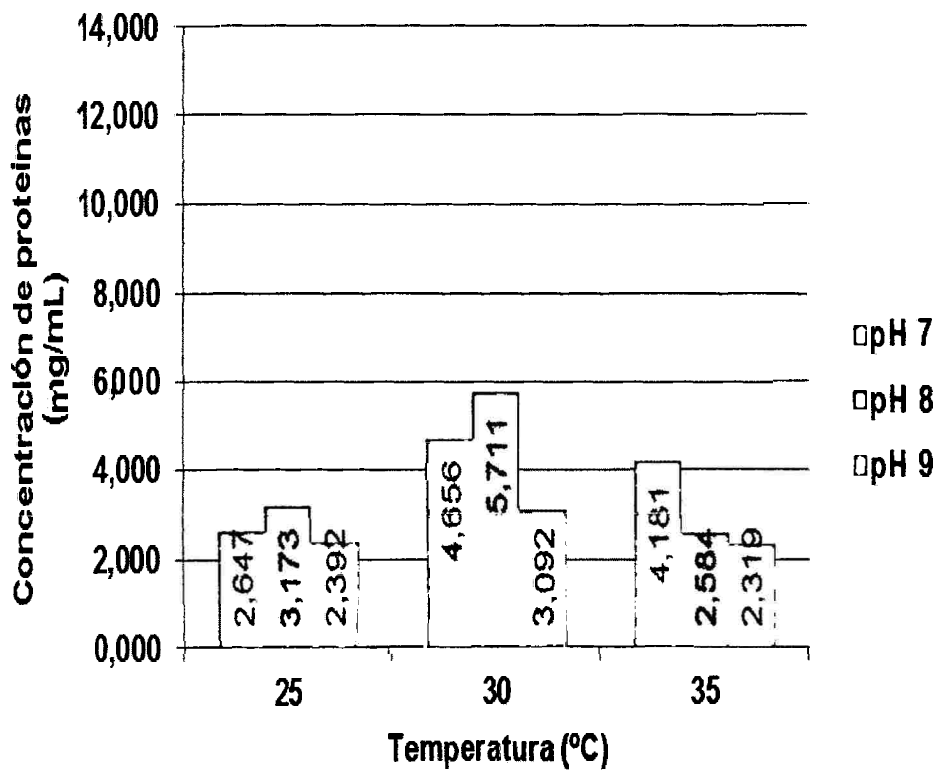


Gráfico N° 4. Evaluación de la concentración de proteína unicelular (mg/mL), obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*, en diferentes niveles de pH, temperaturas y con cobalamina. Ayacucho– 2011.

Tabla N° 7. Promedio de la concentración de proteína (mg/mL) obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*, en diferentes niveles de pH, temperaturas y con tiamina. Ayacucho - 2011.

Concentración de Proteínas (mg/mL)			
T (°C)	pH		
	7,0	8,0	9,0
25	4,110	5,029	3,489
30	5,184	5,493	3,627
35	3,860	3,121	2,501

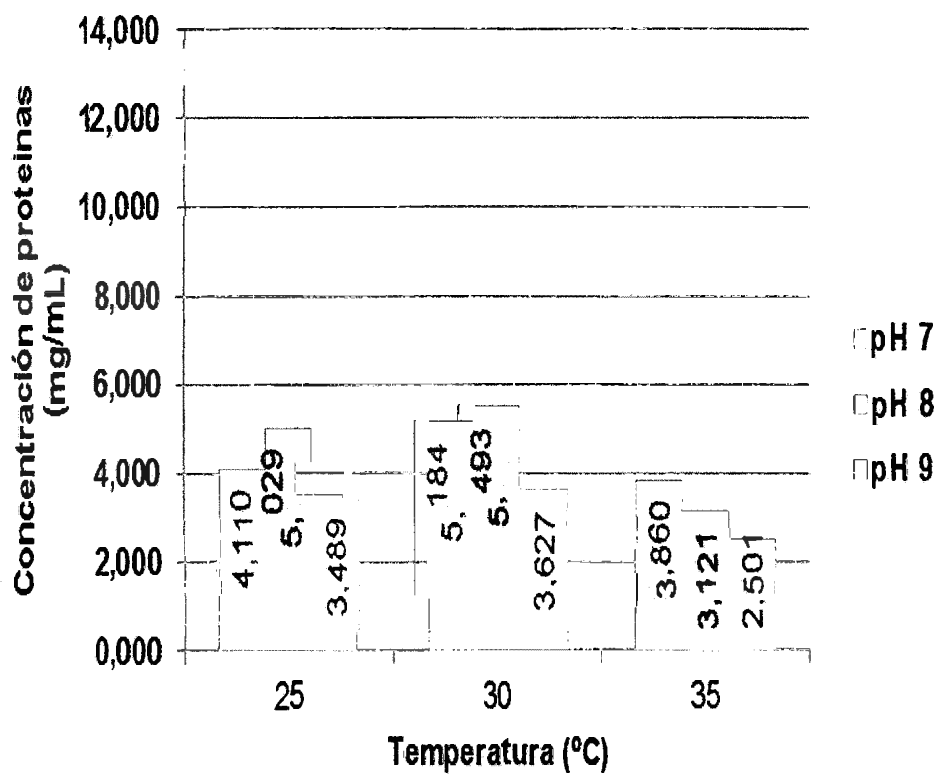


Gráfico N° 5. Evaluación de la concentración de proteína unicelular (mg/mL), obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* en diferentes niveles de pH, temperaturas y con tiamina. Ayacucho – 2011.

Tabla N° 8 Valores promedio del porcentaje de proteína (%) obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*, en diferentes niveles de pH, temperaturas y vitaminas. Ayacucho - 2011.

Temperatura	25°C								
pH	7,0			8,0			9,0		
Vitamina	B	C	T	B	C	T	B	C	T
Porcentaje (%)	9,55	6,62	10,28	7,93	7,93	12,57	10,80	5,98	8,72
Temperatura	30°C								
pH	7,0			8,0			9,0		
Vitamina	B	C	T	B	C	T	B	C	T
Porcentaje (%)	28,85	11,64	13,00	9,00	14,28	13,73	14,23	7,73	9,07
Temperatura	35°C								
pH	7,0			8,0			9,0		
Vitamina	B	C	T	B	C	T	B	C	T
Porcentaje (%)	9,82	10,45	9,65	9,00	6,46	7,80	7,02	5,80	6,25

B = Biotina (0,06 mg/mL).

C = Cobalamina (0,06 mg/mL).

T = Tiamina (0.06 mg/mL).

V. DISCUSIÓN

Aunque las investigaciones sobre la utilización de las microalgas en la alimentación parecen ser un tema relativamente reciente, en realidad su consumo por los habitantes de determinadas zonas data de tiempos inmemoriales; sin embargo, los primeros ensayos con *Chlorella* en la dieta humana fueron realizados en la década de los 60, unido a la ejecución de estudios adicionales demostrativos de que *Scenedesmus* era una excelente fuente de proteínas para el hombre. Estas evidencias motivaron a los nutricionistas a continuar investigando las posibilidades de empleo de la biomasa obtenida a partir de cultivos masivos de microalgas en la formulación de tabletas, extractos, hidrolizados y otros productos dietéticos (Tchorbanov y Bozhkova, 1990).

Se cultivaron muestras que contenían microalgas de la especie *Chlorella vulgaris*, obtenidas de las aguas del río Alameda de la parte alta, de las pozas del centro recreacional "Totorilla" y del efluente de la Planta de tratamiento de Aguas Residuales "La Totorá". Estas muestras se seleccionaron de acuerdo a las características físicas observadas en el lugar del muestreo, el que se realizó de acuerdo a los protocolos establecidos para una adecuada toma de muestra y el

desarrollo de las técnicas de aislamiento, purificación y mantenimiento de la misma, para obtener una microalga unialgal.

Se aisló la microalga *Chlorella vulgaris* (Tabla N° 2), con diferentes medios de cultivo llegando a obtener muestras unialgales, las características morfológicas observadas fueron: microalgas unicelulares con escaso movimiento, sin constricción en la parte media de la célula, de forma esférica, con pared celular lisa y con un cloroplasto en forma de copa, las colonias de *Chlorella vulgaris* a veces rodeadas de mucílago y la modalidad de la agregación de la célula es característica de las especies lo que facilita su identificación. La biomasa producida fue más que suficiente para nuestro trabajo de investigación, tratada con los diferentes parámetros planteados en la investigación, cuyos resultados se muestran en la Tabla N° 3. Quintana (2000), en su investigación presentó los resultados que sugieren la utilización de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris* como materia prima en la formulación de suplementos dietéticos y preparados bioestimulantes, en virtud de su composición bioquímica y calidad proteica.

En la Tabla N° 3 a la temperatura de 35 °C, se observa que a pH 9,0 con la vitamina biotina se obtuvo la máxima biomasa de 2,213 g, seguida de la cobalamina a pH 9,0, con una temperatura de 35 °C, se obtuvo una biomasa de 2,127 g y de la tiamina con 2,077g, a pH 9,0 y a la temperatura de 30 °C. La mínima biomasa se observa a la temperatura de 35 °C con un pH de 7,0 y con la vitamina Biotina, siendo de 0.813 g. Todos estos valores son los promedios de las biomásas, ya que se trabajó con dos repeticiones por experimento.

En el Gráfico N° 1, se da a conocer los valores promedio de la producción de biomasa (g) obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* según tres niveles de pH, tres diferentes temperaturas y tres vitaminas utilizadas en los medios de cultivo, con este observamos los distintos pesos de las muestras unialgales. Chlorella España (2011), en su investigación de la producción de biomasa de la microalga *chlorella vulgaris* utilizando aguas residuales de pescadería concluyó que la biomasa seca cosechada en agua residual de pescadería consistió mayormente de materia orgánica, reportando un contenido mineral (cenizas) menor al control. Ambos tratamientos estuvieron por debajo del valor reportado para algas marinas, lo que se debe a la diferencia en los medios de cultivos utilizados, ya que, el medio marino a diferencia del residual de pescadería, es rico en elementos minerales y las algas presentan una gran capacidad para almacenarlos. Según Brown y colaboradores (1994), determinaron que el contenido proteico de las microalgas depende de la fuente de nitrógeno suministrada. De tal manera, que para la producción de proteínas es necesario nitrógeno disponible en cantidad suficiente. En este ensayo los valores de proteínas superaron hasta dos veces los de algas verdes marinas (proteína cruda < 11,5%). Así como, el presentado por algunos cereales como el maíz, trigo y avena e ingredientes usados en la alimentación animal. Estos resultados también fueron similares a los reportados por Quintana (2000), quien evaluó el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes medios de cultivo reportando porcentajes de proteína en la biomasa seca que variaron entre 24,9 y 35,2%.

En la Tabla N° 4, respecto a las concentraciones de proteínas se obtuvo una máxima concentración de 11,53 mg/mL con una temperatura de 30 °C, a pH 7,0 con la vitamina biotina. La mínima concentración obtenida fue de 2,487 mg/mL, con una temperatura de 35 °C, a pH 9,0 y con la vitamina cobalamina. Quintana

(2000) concluyó que las concentraciones de proteínas bruta y verdadera detectadas en su estudio revelaron una calidad razonablemente buena en contraste con otras fuentes proteínicas reconocidas; asimismo, los carbohidratos presentes (16,00 %) suelen formar parte del material de reserva y desempeñan una importante función en la digestibilidad de la biomasa total de microalgas.

En el Gráfico N° 2, se observan los resultados promedio de la concentración de proteína (mg/mL) obtenida a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* bajo tres niveles de pH, tres diferentes temperaturas y tres vitaminas, utilizadas en los medios de cultivo; en términos generales se puede apreciar que los mayores niveles de producción se registra a niveles de pH 7,0 y 8,0 para luego ir disminuyendo hacia pH 9,0, registrándose valores de 11,53, 5,71 y 5,49 mg/mL respectivamente. Al realizar el análisis de varianza (tabla N° 09) de acuerdo al diseño factorial AxBxC (3x3x3) donde A representa a los tres niveles de pH, B a los tres diferentes tipos de temperatura y C a los tres niveles de temperaturas, se encontró que existe significancia estadística ($p < 0,05$) entre los niveles de pH, lo que quiere decir que al menos uno de los niveles difiere del resto, por lo mismo se procedió a realizar el análisis de comparaciones múltiples mediante el método de Duncan, en el que se determinó que el pH donde se obtuvo mayor producción de proteína unicelular, fue el de pH 7,0, seguidos de los pH 8,0 y 9,0, que estadísticamente son iguales ($p > 0,05$).

En Tabla N° 5 y el Gráfico N° 3, se muestra los valores promedios de la producción de proteína unicelular producida por la microalga *Chlorella vulgaris*, bajos la combinación de dos parámetros presentes en el medio de cultivo; pH (7,0, 8,0 y 9,0), temperatura (25, 30 y 35 °C) y la vitamina biotina, resalta el hecho de que los mayores niveles de producción se presentan a nivel de pH 7,0 y a la temperatura de 30 °C, así mismo se aprecia que la producción disminuye a nivel

de la temperatura mayor a (35 °C), comportamiento similar se puede apreciar en el pH de 9,0.

En el Gráfico Nº 3, 4 y 5 se muestra los niveles medios de producción de proteína unicelular por parte de *Chlorella vulgaris*, según la temperatura del medio de cultivo y el tipo de vitamina empleada, se aprecia que la tendencia es similar en la cobalamina y tiamina empleada, es decir que a una temperatura de 25°C existe una menor producción, para luego a 30 °C incrementarse ostensiblemente, para luego a 35 °C declinar a niveles menores incluso que 25°C, con la finalidad de describir más detalladamente los niveles de producción de proteína unicelular en función de los factores temperatura y pH en función de los diferentes vitaminas empleados en los medios de cultivo, las cuales se visualizan en los Gráficos Nº 6, 7 y 8 (ver anexos). Así, en los medios con niveles de pH 7,0 como 8,0 la tendencia de producción de la *Chlorella vulgaris*, es similar a la descrita líneas arriba; en el Gráfico Nº 9 se observa la tendencia de la biotina, cobalamina y tiamina, la máxima producción fue a la temperatura de 30 °C, para luego disminuir a 35 °C

En los Gráficos Nº 6, 7 y 8 (ver anexos) se muestran las tendencias descritas varían radicalmente cuando los medios de cultivo con la microalga *Chlorella vulgaris*, tuvieron un pH de 9,0 en presencia de biotina y la producción mayor se logró a 30 °C, seguida de 25 °C y finalmente una menor producción en 35 °C, en los medios con tiamina las mayores producciones se obtuvieron a una temperatura de 30 °C para luego ir disminuyendo paulatinamente hacia temperaturas superiores, para el caso de cobalamina los mayores niveles de producción se logró a 30 °C, seguida inmediatamente por 25 °C para luego disminuir a 35 °C, en los tres experimentos tuvo el mismo comportamiento en términos generales los niveles de producción de proteína unicelular fueron menores en pH 9,0.

En la Tabla N° 8 se observan un mayor porcentaje de proteína con la vitamina biotina a un pH de 7,0 con una temperatura de 30 °C, dando como resultado 28,85 % de concentración de proteína, seguido de la cobalamina y tiamina a pH 8,0 temperatura 30 °C, con los valores de 14,28 y 13,73 % respectivamente de la *Chlorella vulgaris*

VI. CONCLUSIONES

1. Se aisló muestras unialgales a partir de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho.
2. Se identificó la presencia de la microalga de especie *Chlorella vulgaris*, que se realizó según el sistema de Clasificación de Engler and Prantl, modificado por Melchior en 1904.
3. Se optimizó los parámetros para la producción de proteína unicelular a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*, obteniéndose una mayor producción a la temperatura de 30 °C, a un pH de 7,0, con la presencia de biotina y reportando una concentración máxima de 11,53 mg/mL.

VII. RECOMENDACIONES

1. Promover la producción de la microalga *Chlorella vulgaris* como biomasa celular para la utilización de las proteínas unicelulares.
2. Realizar el análisis fotoquímico a la microalga *Chlorella vulgaris*.
3. Formular un preparado a base de la proteínas aisladas de la microalga *Chlorella vulgaris* en formas farmacéuticas ya sea en tabletas, cápsulas, comprimidos y comprobar el efecto terapéutico con evaluaciones clínicamente diseñadas.
4. Realizar estudios farmacológicos distintos a la microalga *Chlorella vulgaris*, puesto que se menciona otras propiedades que son de gran importancia en la actualidad.
5. Proponer el estudio de la factibilidad para la producción de la biomasa unicelular de *Chlorella vulgaris* en los laboratorios de nuestra universidad.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. **Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, J., Torres, E. y Herrero, C.** 1997. Microalgas: cultivo y aplicación. Monografías N°26. de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. Servicio de Publicaciones de la Universidad de España. La Coruña – España.
2. **Aldave, A.** 1989. Algas. Primera Edición. Editorial La Libertad. Trujillo.
3. **American Societ y of Testing and Materials (ASTM).** 2004. Standardguide for conducting static toxicity tests with microalgae, International, West Conshohocken. United States.
4. **Andersen, R.** 2005. Algal Culturing Techniques. Phycological Society of América, Elsevier Academic Press. Amsterdam.
5. **Andreo, C. y Vallejos, R.** 1996. Fotosíntesis. Monografía N° 30. Departamento de Asuntos Científicos y Tecnológicos de la Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos.
6. **Anupama, P. and Ravindra, R.** 2000. Value-added food: Single Cell Protein. Biotechnology Advances. Spencer Weart.
7. **Arrendondo, B. y Vásquez, R.** 1996. Aplicaciones Biotecnológicas en el Cultivo de Microalgas. Tercera Edición. La Habana.
8. **Bailey, W. y Scott, E.** 1998. Diagnóstico Microbiológico: Aislamiento e Identificación de Microorganismos. Cuarta Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires.
9. **Bertoldi, C., Fabiano, B., Ernani, S., Barcelos, J. y Oliveira, L.** 2008. Contenido de clorofila y el perfil de minerales en las microalgas de *Chlorella vulgaris* cultivadas en una solución hidropónica de aguas residuales.

- Laboratorio de Biotecnología de los Alimentos, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología, Universidad Federal de Santa Catarina (UFSC). Brasil.
10. **Brown, M., Jeffrey, S. y Garland, C.** 1994. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature Review. C. Siro Marine Laboratories. Report, 205 p.
 11. **Castro, T., Lara, A., Castro, G., Mejía, J. y Malpica, A.** 2003. Alimento Vivo en la Acuicultura. N° 3. Departamento el Hombre y su Ambiente. División de CBS. Universidad Autónoma de México, D.F.
 12. **Chang, R.** 2006. Principios Esenciales de Química General. Cuarta edición. Editorial McGraw - Hill. Madrid.
 13. **Cisneros, R. y Vinatea, E.** 2002. Producción de biomasa de *Artemia franciscana kellogg* 1906 utilizando diferentes dietas. Tesis UMSM. Maestría. Lima.
 14. **Coll, J.** 1997. Acuicultura Marina Animal. Tercera Edición. Ediciones Mundi - Prensa. España.
 15. **Collins, C. y Lien, P.** 1994. Métodos Microbiológicos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza-España.
 16. **Crueger, W. y Crueger, A.** 2000. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Tercera edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza - España.
 17. **Darley, W.** 1997. Biología de las Algas. Enfoque Fisiológico. Editorial Limusa. México.
 18. **De la Cruz, A. y Alfonso, E.** 1998. Cultivo Masivo de Algas Planctónicas Marinas Mediante Fertilización. Editorial Madrileña. España.
 19. **Diez, B.** 2001. Diversidad de fitoplacton eucariótico marino mediante métodos moleculares. Tesis Doctoral. (Ciencias Marinas). Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona - España.

20. **Dufossé, L., Galaup, L., Yaron, A., Arad, M., Blanc, P., Murthy, C. and Ravisankar, G.** 2005. Microorganism and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. Nº 16. Trends in Food Science & Technology.
21. **Espínola, F.** 1997. Cultivo de la microalga marina *Isochrysis galbana* en fotobiorreactores discontinuos. Universidad de Jaén. Doctorado en biotecnología e ingeniería agroalimentaria. Perú.
22. **Gomes, J.** 2006. Probiótico. Boletín Microbiología en Protección de Alimentos. Nº 02. UDES – Colombia.
23. **Guzmán, V.** 1998. Contribución al cultivo de microalgas unicelulares sobre sustratos residuales, para aprovechamiento inicial de su biomasa como suplemento proteico. Universidad de Murcia, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura. Murcia - España.
24. **Harper, A. y Murray, R.** 2001. Bioquímica de Harper. Tercera Edición. Editorial El Manual Moderno S.A. México, D.F.
25. **Harris, D.** 1992. Análisis Químico Cuantitativo. Tercera Edición. Editorial Americana. S.A. México, D.F.
26. **Jagnow, G. y Dawid, W.** 1991. Biotecnología: Introducción con Experimentos Modelo. Editorial Acriba S.A. Zaragoza – España.
27. **Kuklinski, C.** 2003. Nutrición y Bromatología. Tercera Edición. Ediciones Omega S.A. Madrid.
28. **Madigan, M., Martinko, M. y Parker, J.** 1999. Brock: Biología de Los Microorganismos. Octava edición. Editorial Prentice Hall. Madrid.
29. **Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J.** 2004. Brock Biología de los Microorganismos. Décima edición. Editorial Prentice Hall. Madrid.
30. **Martín, A.** 1992. Introducción a la Microbiología del Suelo. Cuarta edición. Editorial AGT S.A. México, D.F.

31. **Mendiola, A.** 2006. Ciencias de Los Alimentos. Cuarta Edición. Editorial Chemical Engineering and Processing. México, D.F.
32. **Morist, A., Montesnos, L., Cusidó, A. and Gódia, F.** 2001. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor food. Nº 37. Process Biochemistry.
33. **Morris, H.** 1999. Influencia del tratamiento de la biomasa y la naturaleza de las enzimas proteolíticas en la hidrólisis de las proteínas celulares de *Chlorella vulgaris*. Rev Cubana Quím.
34. **Ohse, S., Bianchini, R., Derne, L., Ozorio, R., Avila, M., Villela, D., Costa, P., Braga, P., Cunha, C., Pavan, J., Lamarca, A., Estevão, M. y Dos Santos, R.** 2009. Producción de biomasa y el contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno y las proteínas en las microalgas. Departamento de Ciencia de los Cultivos y Sanidad Vegetal. División de Ciencias Agrícolas y Tecnología. Universidad Estatal de Ponta Grossa (UEPG). Brasil.
35. **Quintana, H.** 2000. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. Nº 02. Revista cubana.
36. **Salcedo, D.** 1996. La Microbiología Clínica y el Laboratorio Bioquímico. Segunda Edición. Editorial Gráfica Impresiones. Lima.
37. **Sánchez, S., Torres, H., Juscamaita, R., Morales, J., Vargas, L. y Cardenas, J.** 2009. Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima.
38. **Saldaña-Acosta, J.** 1989. Obtención de biomasa a partir de ácido acético por *Saccharomyces*. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Nuevo León. Monterrey– México.
39. **Sheveleva, E. y De Paz, N.** 1996. Hidroponía en las Instituciones

Educativas. Primera edición. Editorial Unión. Lima.

40. **Tchorbanov, B. y Bozhkova, M.** 1990. Enzymatic hidrolisis of cell proteins in green algae *Chlorella* and *Scenedesmus* after extraction with organic solvents.Vol. I. Enzyme Microbiol Technol.
41. **Trevan, M. y Boffey, S.** 1995. Biotecnología: Principios Biológicos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza - España.
42. **Trujillo, M.** 1994. Evaluaciones de dos sistemas para la producción masiva de microalgas, empleando un medio de cultivo artificial. Tesis para obtener el grado de Maestro en ciencias (CICESE). Ensenada – México.
43. **Trujillo, M.** 1995. La Colección de Microalgas (CICESE). Informe Técnico. Comunicaciones Académicas. Serie Acuicultura. México.
44. **URL2:** <http://www.chlorella.es>
45. **Villanueva, R., Dominguez, M. and Cruz, M.** 1996. Chemical composition of cyanobacteria grown in diluted, aerated swine wastewater. Bioresource Technology.

ANEXOS

ANEXO Nº 01:

Medios de cultivo

A. Solución concentrada AB

Ingredientes:

- Solución concentrada A

Superfosfato triple	50 g
Nitrato de potasio	220 g
Nitrato de amonio	140g
Agua destilada	2000 ml

- Solución concentrada B

Sulfato de magnesio	19 g
Fertilón Combi	5,2 g
Ácido bórico	0,6g
Agua destilada	1000 ml

Preparación.- Se disolvieron completamente los ingredientes con agua destilada en baño María.

Fuente: Sheveleva y De Paz (1998).

B. Medio de cultivo para *Chlorella*

Ingredientes:

- Macronutrientes

KNO ₃	7 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	14 g
KH ₂ PO ₄	7 g
K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .H ₂ O	8 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	8 mg
Agua destilada	1000 ml

- Micronutrientes

ZnSO ₄ .7H ₂ O	100 mg
H ₃ BO ₃	100 mg
SO ₄ Mn.4H ₂ O	150 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	3,0 mg
Agua destilada	10 ml

Preparación.- Luego de pesar los reactivos se disolvieron completamente uno por uno luego se esterilizó a 121 °C por 15 minutos.

Fuente: Aldave (1989).

C. Medio de cultivo para microalgas

Ingredientes:

- Macronutrientes

NH ₄ Cl	0,50 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01 g
K ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,72 g
Agua destilada	1000 ml

- Micronutrientes

EDTA	50g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22 g
H ₃ BO ₃	11,4 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	5,1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0 g
CoCl ₂	1,6 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,6 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1,1 g
Agua destilada	750 ml

D. Solución de antibióticos

Ingredientes:

Penicilina	100 mg.
Streptomycin	50mg.
Agua destilada	100 ml.

Fuente: Jagnow y Dawid (1991).

ANEXO N°02

**Certificación de la microalga *Chlorella vulgaris*, otorgado por el
Laboratorio de Botánica Sistemática de la UNSCH.**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA;

CERTIFICA

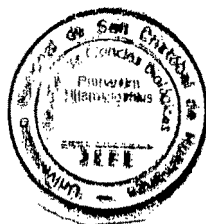
Que, la Srta Lizbeth Angélica MAGUIÑA AVALOS estudiante de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido determinada según el sistema de Clasificación de Engler and Prantl, modificado por Melchior en 1904, y es como sigue:

DIVISIÓN	: CHLOROPHYTA
CLASE	: CHLOROPHYCEAE
ORDEN	: CHLOROCOCCALES
FAMILIA	: OOCYSTACEAE
GÉNERO	: CHLORELLA
ESPECIE	: <i>Chlorella vulgaris</i> Beij.

Se expide la presente constancia a petición escrita de la interesada, para los fines que crea conveniente.

Ayacucho, 15 de noviembre del 2010.




Blga. Laura Aucasime Medina
Jefe del Herbario

ANEXO N° 03

Análisis estadístico

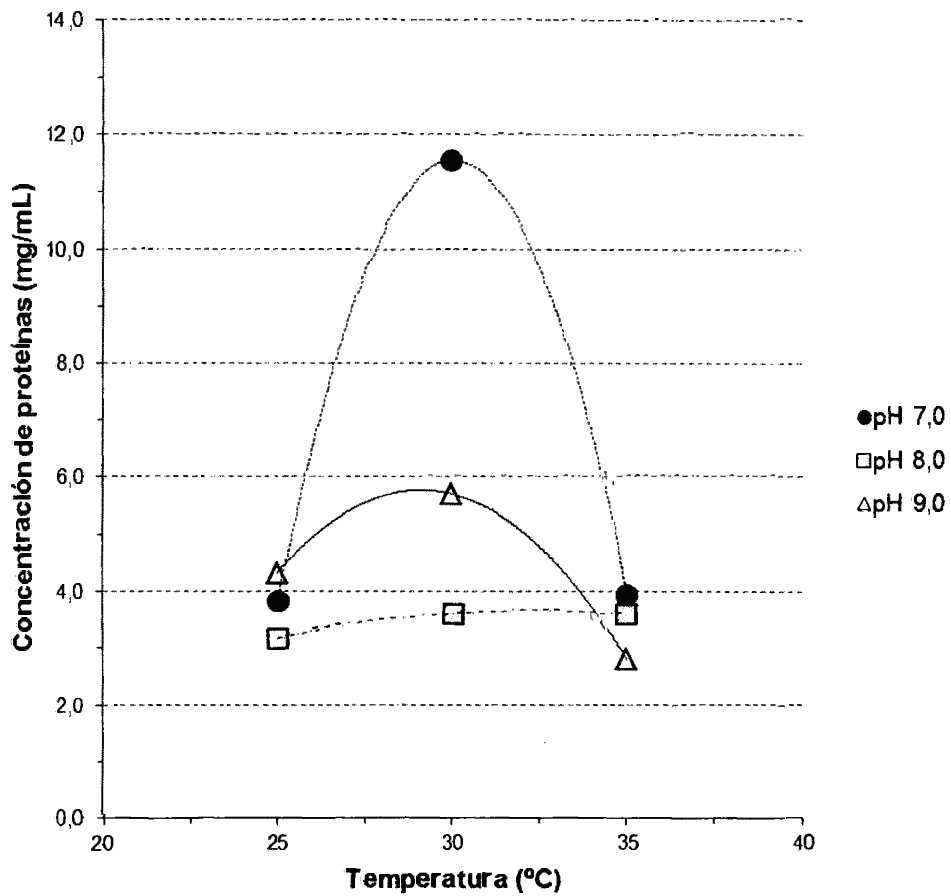


Gráfico N° 6. Variación de la concentración promedio de la producción de proteína unicelular (mg/mL) a partir de *Chlorella vulgaris* en función de los niveles de pH, a distintas temperaturas, para la biotina. Ayacucho - 2011.

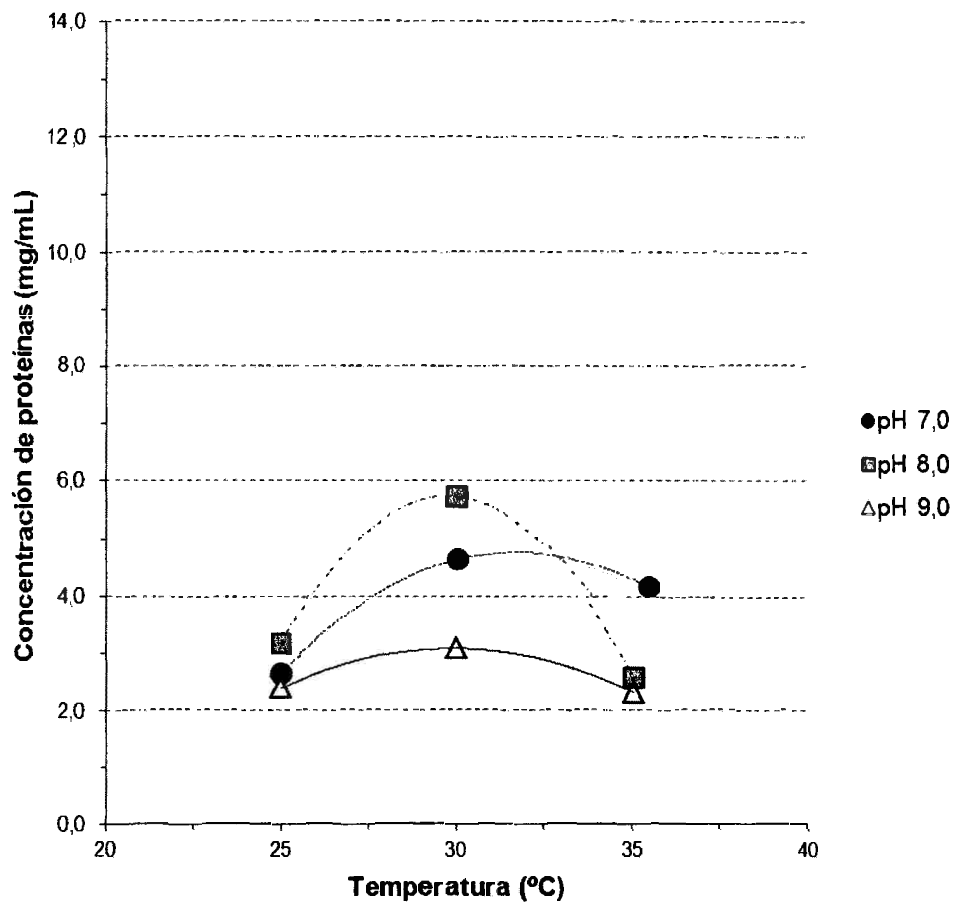


Gráfico N° 7. Variación de la concentración promedio de la producción de proteína unicelular (mg/mL) a partir de *Chlorella vulgaris* en función de los niveles de pH, a distintas temperaturas, para la cobalamina. Ayacucho - 2011.

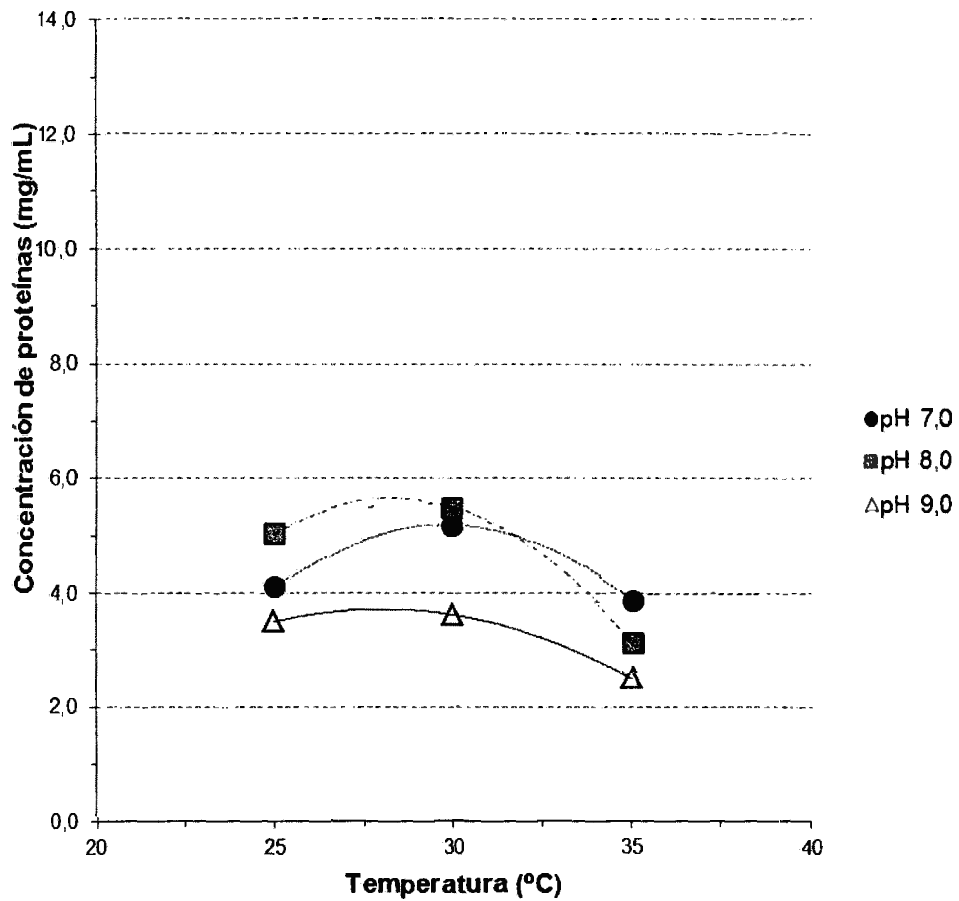
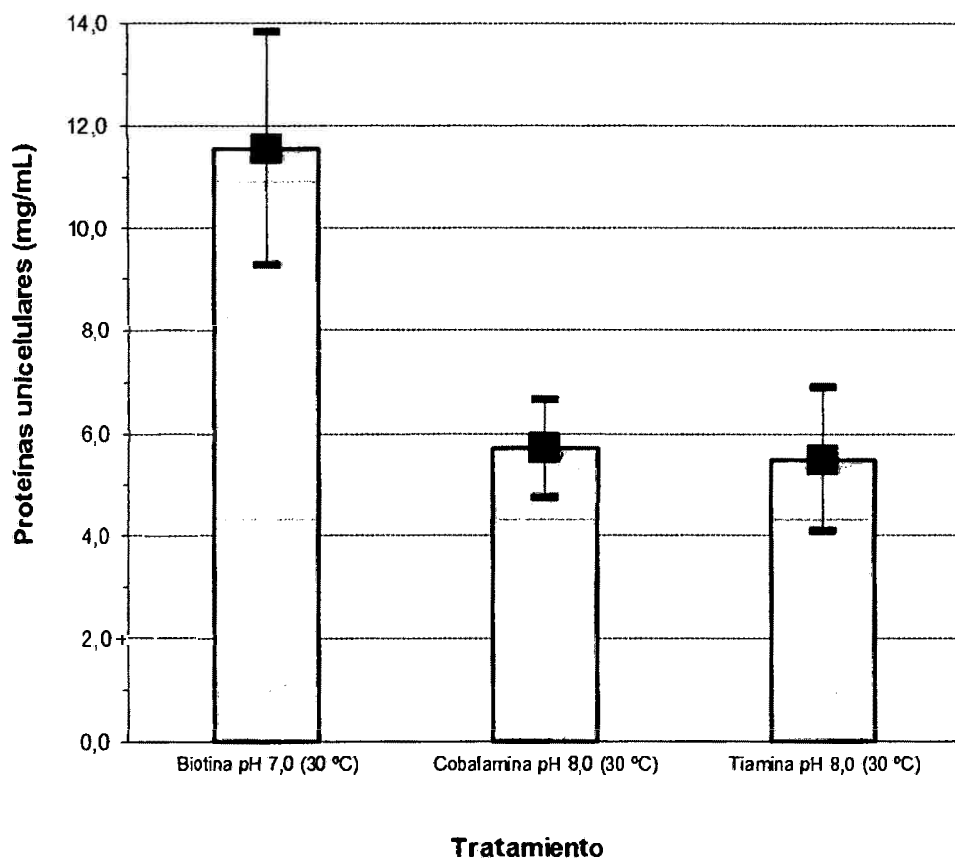


Gráfico N° 8. Variación de la concentración promedio de la producción de proteína unicelular (mg/mL) a partir de *Chlorella vulgaris* en función de los niveles de pH, a distintas temperaturas, para la tiamina. Ayacucho - 2011.



ANOVA: $\alpha < 0,05$: SIGNIFICATIVO

Gráfico N° 9. Producción máxima de la concentración de proteína unicelular (mg/mL) a partir de *Chlorella vulgaris* a 30 °C, con los niveles de pH de 7,0 y 8,0; de las vitaminas biotina, cobalamina y tiamina. Ayacucho - 2011.

Tabla N° 9. Resultado de las comparaciones múltiples de Duncan para los valores de producción máxima de la concentración proteínas unicelulares a 30 °C y tres niveles de pH de las vitaminas biotina, cobalamina y tiamina. Ayacucho - 2011.

Factor	N	Subconjuntos homogéneos	
		1	2
Tiamina pH 8,0 (30 °C)	3	5,49	
Cobalamina pH 8,0 (30 °C)	3	5,71	
Biotina pH 7,0 (30 °C)	3		11,53
Sig.		0,701	1,00

Tabla N° 10. Resultado de los valores descriptivos de la producción máxima de proteínas unicelulares a 30 °C y valores pH de las vitaminas biotina, cobalamina y tiamina. Ayacucho - 2011.

Tratamiento	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Biotina pH 7,0 (30 °C)	3	11,54	0,92	0,53	9,26	13,81	10,64	12,47
Cobalamina pH 8,0 (30 °C)	3	5,71	0,38	0,22	4,77	6,65	5,33	6,09
Tiamina pH 8,0 (30 °C)	3	5,49	0,57	0,33	4,09	6,90	4,93	6,06
Total	9	7,58	3,02	1,01	5,26	9,90	4,93	12,47

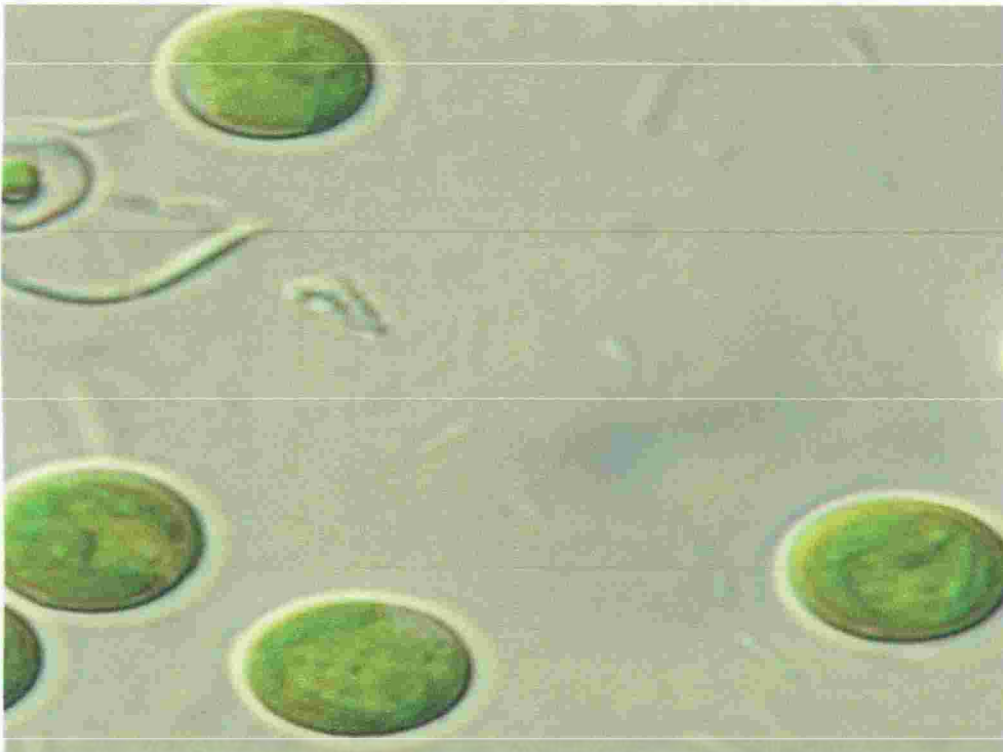
Tabla N° 11. Resultado del análisis de varianza de la producción máxima de proteínas unicelulares a 30 °C y valores pH de las vitaminas biotina, cobalamina y tiamina. Ayacucho - 2011.

	Suma de cuadrados	g.l.	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	70,52	2	35,26	81,256	4,5148E-05
Intra-grupos	2,60	6	0,434		
Total	73,12	8			

ANEXO N° 04



Fotografía N°01: Lugar de toma de muestra del río Alameda.



Fotografía N°02: Microalga *Chlorella vulgaris*, vista en el microscopio a 40 X.



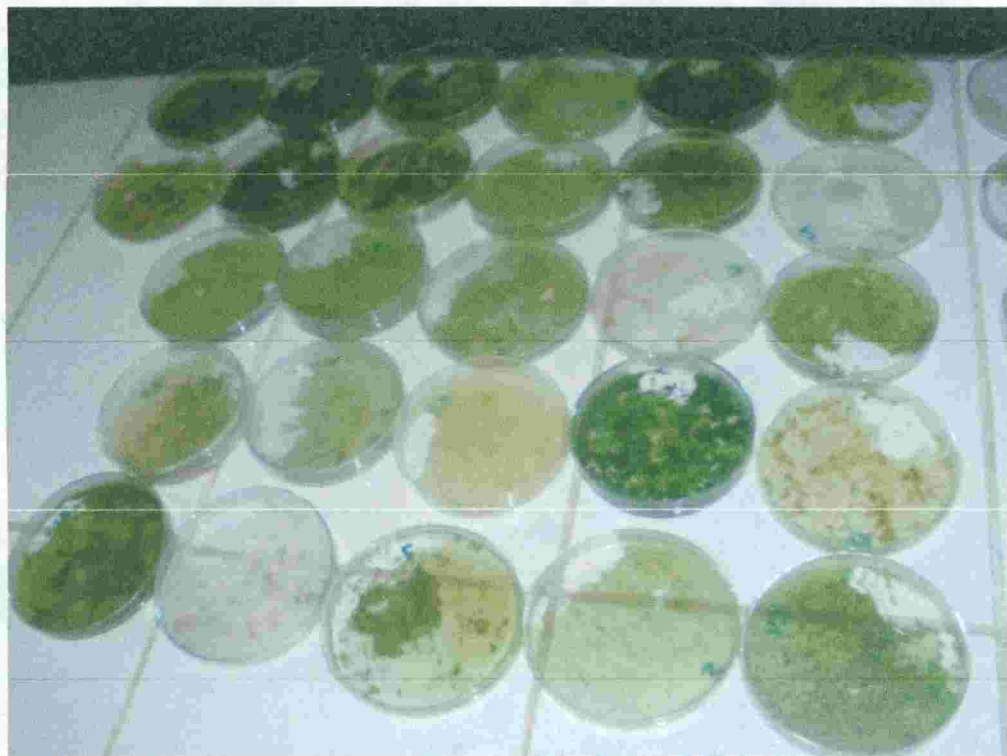
Fotografía N°03: Cultivos de las microalgas a temperatura de 25 °C, a diferentes pH y vitaminas.



Fotografía N°04: Equipo completamente instalado para la obtención de la biomasa con los distintos parámetros.



Fotografía N°05: Placas de Petri en la estufa a una temperatura de 60 °C por 24 horas.



Fotografía N°06: Placas con muestra seca, extraído de la estufa.

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Optimización de la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris*.

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>¿Cuáles son los parámetros óptimos del pH, temperatura y vitaminas para la producción de proteína unicelular <i>Chlorella spp.</i> aislado de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho?</p> <p>ESPECÍFICOS: Aislar las especies de <i>Chlorella spp.</i> de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho. Identificar las especies de <i>Chlorella spp.</i> utilizando la clave para algas importantes en abastecimientos de agua.</p>	<p>GENERALES: Determinar el pH, la temperatura y las vitaminas para la óptima producción de proteína unicelular a partir de <i>Chlorella spp.</i></p> <p>aislado de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho.</p> <p>ESPECÍFICOS: Aislar las especies de <i>Chlorella spp.</i> de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho. Identificar las especies de <i>Chlorella spp.</i> utilizando la clave para algas importantes en abastecimientos de agua.</p>	<p>Antecedentes</p> <p>Definición: -Microalgas -<i>Chlorella spp.</i></p> <p>Clasificación</p> <p>-Producción de proteínas unicelular</p> <p>Ventajas de la producción de <i>chlorella spp.</i></p> <p>Aplicaciones de la <i>chlorella spp.</i></p> <p>Rentabilidad de la producción.</p>	<p>La optimización del pH, la temperatura y las vitaminas permitirá la mayor producción de proteína unicelular, a partir de la microalga <i>chlorella spp.</i> aisladas de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho.</p>	<p>Variable Independiente</p> <p>Parámetros de producción de proteína unicelular <i>Chlorella spp.</i></p> <p>pH, Temperatura y Vitaminas.</p> <p>Indicadores</p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ pH. ➢ Temperatura. ➢ Vitaminas. <p>Variable Dependiente</p> <p>Producción de proteína unicelular.</p> <p>Indicadores</p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ Biomasa de proteínas: g. ➢ Concentración de proteínas: mg/mL. 	<p>Tipo de Investigación: Básica</p> <p>Nivel de Investigación: Experimental</p> <p>Diseño: Multifactorial</p> <p>Población: Microalgas del genero <i>Chlorella spp.</i> presentes en los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho.</p> <p>Muestra: La muestra estuvo constituida por cultivos unialgales de <i>Chlorella spp.</i> aislados de tres fuentes de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho.</p> <p>Diseño Metodológico:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ Recolección de muestra. ➢ Aislamiento de <i>chlorella spp.</i> ➢ Identificación y evaluación de la <i>chlorella spp.</i> ➢ Purificación y producción de biomasa microalgal. ➢ Optimización de la producción de la proteína unicelular. ➢ Evaluación del porcentaje de proteínas. ➢ Rendimiento del producto. <p>Análisis estadístico: Para el análisis estadístico se utilizara la estadística descriptiva, el análisis de varianzas, análisis de Duncan.</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R. D.N° 213–2011– FCB–D

Bach. Lizbeth Angélica MAGUIÑA AVALOS

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cinco de la tarde del día sábado treinta de julio del dos mil once en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga reunidos los miembros de sustentación de tesis presidida por el Maestro Elmer Avalos Pérez, en calidad de Decano de la Facultad de Ciencia Biológicas y con la asistencia de los docentes miembros: Magister Paula García Godos Alcázar (Asesora); Magister Fidel Rodolfo Mujica Lengua; Químico Farmacéutico Hugo Luna Molero y Magister Maricela López Sierralta como cuarto jurado calificador, quien además actuará como Secretaria Docente, para recepcionar la sustentación de tesis titulada: Optimización del pH, temperatura y vitaminas para la producción de proteína unicelular a partir de *Chlorella spp.* Aislado de los recursos hídricos de la ciudad de Ayacucho – 2010, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica, Lizbeth Angélica Maguiña Avalos con cuya sustentación pretende optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica.

Luego de la revisión de la documentación en mesa el Decano apertura el acto de sustentación recomendando a la sustentante sobre el tiempo de sustentación (Máximo cuarenta y Cinco minutos), recomienda además que proceda la exposición y explicación evitando limitarse a “solo” la lectura de las diapositivas: enseguida solicita a la Secretaria Docente Maricela López Sierralta para que dé la lectura a la Resolución Decanal N° 213 – 2011 – FCB– D.

Luego autoriza a la sustentante de inicio a la exposición del trabajo de investigación, quien lo realiza en el tiempo correspondiente. Culminada la exposición el Decano apertura la segunda etapa en la que los miembros del Jurado Calificador, realizarán las observaciones, preguntas y evaluación correspondiente, iniciando su participación el profesor Hugo Luna Molero, luego los profesores Maricela López Sierralta y Fidel Mujica Lengua y finalmente la profesora Paula García Godos en calidad de Asesora.

Luego el Decano solicita a la sustentante y publico en general abandonar el auditorio para que el Jurado Calificador pueda deliberar y emitir la calificación correspondiente como sigue:

JURADO CALIFICADOR	EXPOSICIÓN	RPTA. PREGUNTAS	PROMEDIO
Mg. Paula GARCÍA GODOS ALCÁZAR	17	15	16
Mg. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA	15	14	15
Q.F. Hugo LUNA MOLERO	17	15	16
Mg. Maricela LÓPEZ SIERRALTA	17	15	16