Evaluación del medio de cultivo sobre la producción de macromoléculas funcionales en la cepa *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 como posible suplemento alimenticio para gallinas ponedoras

Amalia Múnera Betancourt

Trabajo de grado para optar por el título de Bióloga

Asesora:
Alejandra Miranda Parra, Msc.
Investigadora
Innovación y Desarrollo Tecnológico
Universidad EAFIT

Universidad EAFIT
Escuela de Ciencias Aplicadas e Ingeniería
Pregrado de Biología
2024

Índice

1. Introducción **1**

2. Objetivos **3**
2.1. Objetivo General . . . 3
2.2. Objetivos Específicos . . . 3

3. Métodos **3**
3.1. Biomasa de Microalga . . . 3
3.1.1. Microorganismos . . . 3
3.1.2. Propagación Celular . . . 3
3.1.3. Cinética de Crecimiento Celular . . . 4
3.1.4. Diseño de Experimentos . . . 4
3.2. Análisis Bromatológico . . . 4
3.2.1. Concentración de Exopolisacáridos (EPS) . . . 5
3.3. Perfil de Ácidos Grasos . . . 5
3.4. Determinación de la solubilidad de la proteína . . . 5
3.5. Determinación de la digestibilidad *in vitro* . . . 5
3.5.1. Determinación de la digestibilidad de la biomasa usando pepsina diluida . . . 6
3.5.2. Determinación de la digestibilidad gástrica/pancreática de la biomasa . . . 6

4. Resultados y Discusión **6**
4.1. Crecimiento celular en medios de cultivo con diferentes concentraciones de polvo Clinker . . . 6
4.2. Producción de proteínas . . . 10
4.3. Composición Bromatológica de las biomasas . . . 12
4.4. Concentración de exopolisacáridos (EPS) en las biomasas . . . 16
4.5. Costo de producción de biomasa . . . 18
4.6. Composición de ácidos grasos de la biomasa seleccionada (Fertilizante Inorgánico Fertilizer, 300 mg/L Clinker) . . . 19
4.7. Solubilidad y Diegstibilidad *in vitro* de la proteína producida por la biomasa seleccionada (FIF, 300 mg/L Clinker) . . . 21

5. Conclusiones **22**

6. Referencias **24**

7. Anexos **I**
7.0.1. Análisis de proteína . . . I
7.0.2. Análisis de grasas . . . I
7.0.3. Análisis de Fibra . . . II
7.0.4. Análisis de Cenizas y Humedad . . . II
7.0.5. Análisis de carbohidratos . . . III
7.0.6. Revisión de Composición de Torta de Soya . . . III

1. Introducción

El aumento continuo de la población mundial, estimada a más de 10.000 millones de personas para el 2100, supone un enorme reto para la seguridad alimentaria mundial (Spínola et al., 2023). Así como lo indica Boland et al. (2013), junto a este aumento poblacional también se encuentra el rápido aumento de los ingresos, la población y la urbanización. Estas características han sido responsables, en gran medida, del cambio en la dieta y del rápido incremento del consumo humano de proteínas animales durante las últimas décadas. Adicionalmente, las tendencias alimenticias de los países emergentes, que se basaban en alimentos básicos y cereales, han dado paso a los hábitos alimenticios de los países desarrollados, que dependen en gran medida de los alimentos provenientes de animales (Cai et al., 2022). Entre las industrias alimenticias de animales que más produce a nivel mundial, está la industria avícola. Esta industria presentó un aumento del 3,9 % entre el 2020 y 2023, aproximadamente 3,89 millones de toneladas métricas, y se ha pronosticado una tendencia al alza para el 2024 (Mezoughem et al., 2024). Esto a su vez, representa un aumento en el costo y consumo de los alimentos necesarios para producir los alimentos provenientes de estos animales.

La principal fuente de proteína y aminoácidos en las dietas avícolas alrededor del mundo es la torta de soya o harina de soya (SBM, por sus siglas en inglés) (Aguirre et al., 2022; Ibáñez et al., 2020), y su aceptación global se debe a su alto contenido proteico y un perfil de aminoácidos adecuado (Dei, 2011). El uso de la torta de soya depende de la composición nutricional de la harina, y esta proporciona una proteína vegetal de alta calidad y aminoácidos esenciales y no esenciales en la alimentación animal. Es importante destacar que la composición nutricional de la harina de soja depende de factores que actúan de forma independiente e interactiva, como la geografía, el medio ambiente, las condiciones de procesamiento y la genética (Pope et al., 2023).

La producción de animales monogástricos, como las gallinas ponedoras, y su alimentación, requiere de la obtención de grandes cantidades de torta de soya, lo que a su vez exige grandes extensiones de tierra por parte de los alimentos convencionales. Así mismo, esta necesidad conlleva a la destrucción de hábitats, la deforestación, y el uso de grandes cantidades de agua, con graves consecuencias para el medio ambiente (Chaves et al., 2021).

En Colombia, se destina un 71 % de la inversión total en la industria de gallinas de postura al uso y producción de su alimento, contrastado con el 44 % de la inversión en el caso de las gallinas de levante. Este enfoque resalta la importancia del componente alimenticio en la cadena de valor de la producción de huevos. A su vez, el país ha evidenciado en las últimas décadas un crecimiento notable tanto en la producción como en el consumo de los huevos. En el año 2010, el consumo per cápita se situaba en 214 huevos, y esta cifra aumentó a 325 huevos para el año 2020. De igual forma, para el año 2020 se registró una producción de más de 16000 millones de huevos en todo el país (Cuéllar, 2022).

Lo anterior representa un gran reto para la industria avícola colombiana y los suministros alimenticios que esta utiliza, puesto que, para alimentar 1 millón de gallinas ponedoras, son necesarias alrededor de 120 toneladas de alimento al día. Esto representa altos costos, puesto que las importaciones anuales de alimentos de soya representan el 95 % del consumo, y la mayoría de estas son utilizadas en la fabricación de alimentos balanceados para animales (MinAgricultura, 2020; USDA-APHIS-VS, 2013). Esta situación, sumada a la drástica subida de los precios, ha llevado a buscar nuevas fuentes alternativas de proteínas para uso en la formulación de los alimentos (Pootthachaya et al., 2023).

Como alternativa, la biomasa de las microalgas surge como suplementos alimenticios en las dietas de las gallinas para mejorar la eficiencia alimenticia de los animales, disminuir el uso de la torta

de soya y reemplazar diferentes aditivos sintéticos utilizados. Según El-Hack et al. (2023), la incorporación de pequeñas dosis de microalgas ha mostrado mejoras en el crecimiento y la calidad de los huevos, el funcionamiento intestinal, respuestas inmunes y metabolismo de los lípidos en las gallinas.

Ahora bien, las microalgas se consideran un recurso alimentario prometedor debido a que en su biomasa se han encontrado muchos compuestos biológicamente activos (Hao et al., 2022), como lo son el contenido promedio de las proteínas, que se compara o es mayor a los ingredientes alimenticios convencionales alcanzando hasta el 71 % de la materia seca, presentan nutrientes invaluables como lípidos, ácidos grasos y polisacáridos complejos, fibra alimenticia, compuestos fenólicos con propiedades bioactivas, y alcanzan niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) de hasta un 44 % (El-Hack et al., 2023; Chaves et al., 2021; Pootthachaya et al., 2023).

Especialmente los polisacáridos presentes en las microalgas sirven como prebióticos y promueven la formación de un microbiota intestinal sana en el sistema gastrointestinal de las gallinas (El-Hack et al., 2023). Además, también pueden producir moléculas antioxidantes como los alcaloides, carotenoides, flavonoides y ácidos grasos. Estos compuestos juegan un rol sumamente importante en el control de procesos oxidativos celulares, y la industria alimenticia ha generado una urgencia por producir este tipo de compuestos de manera natural, puesto que los antioxidantes artificiales presentan riesgos para la salud (El-Hack et al., 2023; Luo et al., 2015).

Se han realizado múltiples estudios que destacan el papel de las microalgas como alimento o suplemento alimenticio en las gallinas ponedoras, y los beneficios que esto trae. Por ejemplo: Un estudio realizado por Ekmay et al. (2015) durante 14 semanas utilizando gallinas con diferentes dietas de microalgas y niveles de inclusión de estas en sus dietas, demostró que, aunque se redujera el promedio de consumo de alimento al día por parte de las gallinas, estos animales alimentados con dietas de microalgas mostraron peso final similar, producción total de huevos y calidad de los huevos en comparación a las gallinas que se alimentaron con otros aditivos.

La biomasa de microalgas adicionada a las dietas se convierte en fuentes importantes de carotenoides, que mejoran la pigmentación en la yema de los huevos (Poveda-Víquez et al., 2023). Específicamente, se observó que alimentar las gallinas con microalgas verdes como *Chlorella*, estas mejoraban el rendimiento en su puesta de huevos y su eclosionabilidad de los mismos (Englmaierová et al., 2013).

Evaluar el valor nutritivo y bioquímico de un nuevo ingrediente, como lo es la biomasa de *Chlorella sorokiniana*, se considera el primer paso para determinar su idoneidad para el uso en alimentos avícolas, que es uno de los factores más importantes a tener en cuenta en la formulación de los alimentos. Una vez determinada la composición química de un nuevo ingrediente, la digestibilidad suele ser el aspecto más crucial definir su calidad nutricional, ya que la digestión contribuye a la descomposición física y bioquímica del pienso y los nutrientes en el organismo como preparación para su absorción. Además, la digestión es altamente dependiente de su solubilidad y el grado de su hidrólisis química y enzimática en el intestino del animal (Tibbetts et al., 2016).

El valor nutricional de las microalgas para su uso en gallinas varía dependiendo de la especie de microalga utilizada, su descomposición química y la adaptación del animal a las microalgas como suplemento alimenticio. A su vez, la digestibilidad de estas biomasas microalgales depende de múltiples factores, como la composición química y características morfológicas (Pootthachaya et al., 2023).

Los ensayos *in vitro* que implican simulaciones digestivas de los ingredientes con enzimas digestivas

purificadas permiten el análisis de un gran número de muestras sin uso de animales (Tibbetts et al., 2015). Aunque no son completamente definitivos en cuanto a la respuesta completa del animal al alimento suministrado, estos métodos pueden complementar la información bioquímica y nutricional de las microalgas, puesto que son relativamente económicos, se obtienen resultados rápidamente haciendo uso de pocas cantidades de muestras, y en general, tienen la capacidad de generar información nutricional valiosa potencial para la investigación *in vivo* y el uso industrial (Fernández-García et al., 2009).

Por todo lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar diferentes medios de cultivo en la producción de macromoléculas funcionales en la cepa de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 como posible suplemento alimenticio para gallinas ponedoras.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar diferentes medios de cultivo en la producción de macromoléculas funcionales en la cepa de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 como posible suplemento alimenticio para gallinas ponedoras.

2.2. Objetivos Específicos

1. Establecer el efecto de la adición de polvo Clinker proveniente de la industria cementera en la productividad de la biomasa *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230.

2. Determinar la composición nutricional de la biomasa de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 bajo diferentes medios de cultivo y niveles de adición de polvo Clinker.

3. Establecer de manera *in vitro* la digestibilidad y la solubilidad de las proteínas presentes en la biomasa de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230.

3. Métodos

3.1. Biomasa de Microalga

3.1.1. Microorganismos

La cepa de microalga seleccionada para este estudio fue *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 (1230). Estas microalgas se encuentran dentro del cepario del laboratorio de biotecnología del centro de Argos para la innovación (CApI), ubicado dentro de la Universidad EAFIT sede Medellín.

3.1.2. Propagación Celular

La propagación celular de la cepa UTEX 1230 se realizó en volúmenes de 50 mL de medio de cultivo estéril BBM-liquido (cultivo de activación) y se adicionó toda la biomasa microalgal presente en las cajas de Petri. Posteriormente, el pre-inóculo se realizó en volumen de 1 L de trabajo con 850 mL de medio de cultivo estéril BBM Liquido y 50 mL de suspensión algal provenientes del cultivo de activación. La preparación del inóculo se desarrolló, en volumen de trabajo de 2 L con 1 L de cultivo estéril BBM-líquido y 1 L de suspensión algal provenientes del pre-inóculo.

Las condiciones empleadas para la propagación celular fueron: temperatura ambiente, fotoperiodo 12:12, intensidad de luz 52 μmol/m^{2}s y burbujeo de aire enriquecido con CO_2.

El desarrollo experimental se realizó a escala laboratorio piloto, para esto se empleando un sistema de fotobiorreactores (FBR) cilíndricos tipo columna de burbujeo, ubicados en la planta piloto del CApI. La preparación del inóculo se desarrolló en FBR cilíndricos de 20 L, elaborados en acrílico transparente, y la dispersión de gases en el medio de cultivo se realizó mediante una membrana difusora ubicada en la parte inferior del FBR. Las condiciones para el inóculo y el sistema experimental en planta piloto CApI fueron: luz y temperatura ambiente, fotoperiodos naturales, flujo de aire de 2,5 v.v.m (volumen de aire por volumen de medio por minuto), burbujeo de aire enriquecido con 3 % de CO_2 sintético y medio de cultivo BBM-líquido no esterilizado.

Los medios de cultivos empleados en la investigación fueron el Medio Basal de Bold (BBM, por sus siglas en inglés), el cual es ampliamente utilizando en el cultivo de múltiples especies de microalgas verdes (Chlorophyceae) sin la necesidad de suplementos adicionales como extractos de suelos o vitaminas (Brown et al., 1964; Nichols and Bold, 1965). El segundo medio de cultivo fue el fertilizante comercial de origen orgánico Abonisa®y como tercer medio de cultivo el fertilizante comercial inorgánico Florilizer®, el cual es empleado principalmente para la florescencia, rico en potasio, nitrógeno y fósforo.

3.1.3. Cinética de Crecimiento Celular

El crecimiento celular fue cuantificado mediante el método de peso seco cada 48 horas, hasta alcanzar la fase estacionaria, utilizando filtros estériles de éster de celulosa (Advantec MFS, Inc) con poro de 0.45 μm, diámetro de 47 mm y balanzas de humedad Sartorius Mark-3.

3.1.4. Diseño de Experimentos

Con el fin de determinar el efecto generado por la adición un agente externo en la producción celular y porcentaje de proteína, al utilizar cada uno de los medios de cultivo anteriormente mencionados (BBM, Fertilizante Inorgánico y Orgánico) se evaluaron tres diseños experimentales unifactoriales, donde el factor fue la concentración de Clinker con 3 niveles (300, 450 y 600 mg/L).

El diseño experimental para la obtención de biomasa constó de triplicados para cada tratamiento, incluyendo los diferentes niveles de concentración de Clinker, así como un grupo de control sin la adición de Clinker. Para un total de 36 unidades experimentales, El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con el 95 % de confiabilidad, usando el Software estadístico STATGRAPHICS Centurión versión XVI, en el cual se comprobaron los supuestos del ANOVA mediante test cuantitativos de: Shapiro- Wilk, Kolmogorv, Levene y Durbin – Watson. Se utilizó el test de Tukey para establecer que tratamientos presentaron efecto sobre las variables de respuestas, las barras de error presentadas en las gráficas corresponden al error, para cada uno de los tratamientos.

3.2. Análisis Bromatológico

Los análisis bromatológicos de las biomasas obtenidas a escala piloto fueron ceniza (Método 923.03), humedad (Método 930.15), lípidos (Método 920.39), fibra cruda (Método 962.09), y proteínas (Método 984.13) bajo los estándares de la AOAC (Latimer, 2023) y las Normas ICONTEC. También se calculó el contenido de carbohidratos (Se encuentran descritos en la sección 7).

3.2.1. Concentración de Exopolisacáridos (EPS)

La evaluación a la concentración de exopolisacáridos se realizó llevando a cabo el método establecido en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Argos para la Innovación (CApI), realizado de la siguiente manera:

Inicialmente, se tomó una muestra de 20 mL de microalga en su medio de cultivo después de agitar bien. Después, se centrifugó la muestra a 3800 RPM durante 10 minutos. De este sobrenadante, se tomaron 5 mL y se llevaron a un tubo Falcon^{TM} de 50 mL (ThermoFisher Scientific), y a este se adicionaron 15 mL de etanol a -4 °C para que se lograra obtener una relación 3:1 entre el etanol y la muestra.

Esto se llevó una centrifuga (5804/5804 Eppendorf^{TM}, ThermoFisher Scientific), a 4200 RPM y 20 °C durante 20 minutos. Aquí, se generó un pellet en el fondo del tubo Falcon^{TM}. Se procedió a eliminar el sobrenadante para así dejar únicament el pellet en el tubo. Este se resuspendió con 2 mL de hidróxido de sodio (NaOH, 1M) y se agitó muy bien.

Posteriormente, este se llevó a baño maría durante 1 hora a 60 °C. Pasado este tiempo, se tomó 1 mL de la solución y se llevó a un tubo de ensayo de vidirio. Aquí, también se adicionaron 0,5 mL de fenol (5 %, %p/V) y 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4, 98 %) grado analítico (Sigma-Aldrich). Esto se dejó reposar durante 15 minutos y se volvió a llevar al baño maría durante otros 15 minutos a 30 °C.

Finalmente, se llevó la muestra a una celda calorimétrica y se midió su longitud de onda a 492 nm. Con una curva de calibración, se procedió a calcular la concentración de exopolisacáridos en la muestra.

3.3. Perfil de Ácidos Grasos

Para el análisis y la cuantificación de ácidos grasos presentes en la biomasa, se llevó a cabo el Método 996.06 establecido por la AOAC (Latimer, 2023) para las grasas totales (totales, saturadas e insaturadas) en los alimentos. Este procedimiento fue llevado a cabo junto con el laboratorio Aoxlab (Laboratorio Aoxlab, Medellín, Colombia).

3.4. Determinación de la solubilidad de la proteína

La solubilidad de la proteína presente en la biomasa de microalgas fue medida según el método de Araba and Dale (1990) con las modificaciones presentadas por Pootthachaya et al. (2023) y Tibbetts et al. (2016)). Inicialmente, se ubicaron 1,5 g de biomasa microalgal seca y 150 mL de solución de hidróxido de potasio a 0,2 % (KOH, pH 13). Esto se incubó en un baño maría en agitación a 22°C y 60 RPM por 30 minutos. Esto se centrifugó a 2700 RPM durante 15 minutos y se recolectó el sobrenadante. Finalmente, se utilizaron los mL del sobrenadante en el método Kjeldahl para determinación de proteína usando el valor de conversión de 6,25.

La solubilidad de la proteína se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Solubilidad = \frac{\%Proteína_{\ En\ El\ Sobrenadante}}{\%Proteína_{\ Muestra\ Original}}$$

3.5. Determinación de la digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad de la biomasa microalgal se evaluó usando soluciones y enzimas basadas en simulaciones *in vitro* de la digestión gastrointestinal de los animales monogástricos, en este caso,

las gallinas ponedoras. Aquí, se evaluó la digestibilidad con pepsina diluida (DPD) y digestibilidad gástrica y pancreática (DGP). Para ambos casos, los porcentajes de digestibilidad *in vitro* se calcularon de la siguiente manera:

$$\%D.I.V. = \frac{\%Proteína\ muestra_{\ inicial} - \%Proteína\ muestra_{\ tratamiento}}{\%Proteína\ muestra_{\ inicial}}$$

3.5.1. Determinación de la digestibilidad de la biomasa usando pepsina diluida

Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con el método 971.09 de la AOAC Latimer (2023) y Komaki et al. (1998), modificado por Pootthachaya et al. (2023) de la siguiente manera:

En erlenmeyers de 250 mL, se agregó 1 g de biomasa microalgal y esta se mezcló con 150 mL de una solución enzimática de pepsina porcina (P7000, Sigma-Aldrich) al 0,0002 %. Esta fue preparada en fresco con ácido clorhídrico (HCl, 0,075M, pH 1,5) siguiendo el método de (Miller et al., 2002). Los frascos se llevan a baño maría en agitación durante 16 horas a 40°C y 60 RPM. Después de la digestión, se pasaron los contenidos hidrolizados por medio de un papel filtro (110 mm, poro de 1,2 μ) en un embudo, y se realizaron lavados de agua destilada caliente hasta que el filtro quedara libre de ácido.

Finalizada la filtración, se puso a secar el papel filtro con los residuos in vitro durante la noche en un horno a 80°C. Estos residuos se sometieron al método Kjeldahl mencionado anteriormente para determinación de proteína con un factor de conversión de 6,25.

3.5.2. Determinación de la digestibilidad gástrica/pancreática de la biomasa

Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Yegani et al. (2013) y Tibbetts et al. (2016), modificado por Pootthachaya et al. (2023) de la siguiente manera:

Fase gástrica de la digestión: Se añadió 1 gramo de biomasa microalgal a un Erlenmeyer de 125 mL, junto con 25 mL de Buffer fosfato (0,1 M, pH neutro). Se redujo el pH a 2 añadiendo 10 mL de HCl 0,2 M y agitando la muestra para homogeneizar la solución. Después, se añadió 1 mL de solución enzimática de pepsina porcina (25 mg/mL, P7000, Sigma Aldrich) y se agitó de nuevo. La mezcla se incubó en un baño de agua a 40°C y 60 RPM durante 2 horas.

Fase pancreática de la digestión: Se añadieron 10 mL de Buffer fosfato (0,2 M, pH neutro) y 5 mL de NaOH a 0,6 M para llevar el pH a 6,8. Después, se añadió 1 mL de solución enzimática de pancreatina porcina que incluía proteasa, amilasa y lipasa (100 mg/mL, P1750, Sigma-Aldrich). Tras una agitación rápida, los Erlenmeyers se incubaron en un baño de agua a 40°C y 60 RPM durante 4 horas.

Procesamiento final: El contenido se filtró a través de papel de filtro de 110 mm con un tamaño de poro de 1,2 μm en un embudo. Los residuos se enjuagaron con agua destilada tibia y se colocaron en el filtro. Tras el filtrado, el papel de filtro que contenía los residuos *in vitro* se secó durante la noche a 80 °C. Se determinó el contenido de proteínas mediante la técnica de Kjeldahl con un factor de conversión de 6,25.

4. Resultados y Discusión

4.1. Crecimiento celular en medios de cultivo con diferentes concentraciones de polvo Clinker

El efecto del polvo Clinker en el crecimiento celular de las microalgas, se observa en la figura 1, 2 y 3. En estas se evidencia un crecimiento celular en los diferentes medios de cultivo al exponerse

a 0mg/L, 300 mg/L, 450 mg/L y 600 mg/L de polvo Clinker industrial.

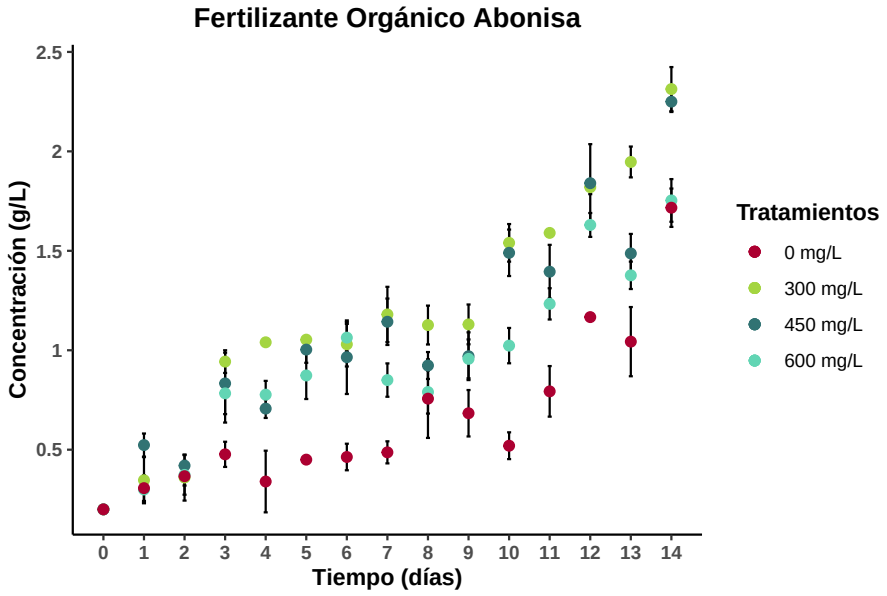

Figura 1: Cinética de crecimiento celular de *C. sorokiniana* en Fertilizante Orgánico Abonisa con diferentes niveles de adición de polvo Clinker.

En la figura 1 se muestra el efecto de los diferentes niveles de Clinker en el medio de cultivo de fertilizante orgánico Abonisa sobre el crecimiento celular de las microalgas. En todos los tratamientos se inició con una concentración celular de 0,2 g/L, presentando una fase de adaptación entre los días 1 y 3 de cultivo, seguido de una fase exponencial hasta el día 14. El tratamiento que mayor concentración alcanzó fue el de 300 mg/L de adición de Clinker alcanzando una concentración final de 2,31 g/L ± 0,11, seguido por el nivel de adición de 450 mg/L, en donde se alcanzó una concentración celular de 2,25 g/L ± 0,204, y el nivel de adición de 600 mg/L donde se alcanzó una concentración celular de 1,64 ± 0,37.

Por otro lado, la biomasa producida por el cultivo control del fertilizante orgánico abonisa presentó una menor crecimiento celular a través del tiempo, y una menor concentración en general. Que las biomasas producidas con adición de polvo clinker presentaran un mayor crecimiento celular en comparación con la biomasa producida sin adición de clinker sugiere que este puede actuar como un estimulante del crecimiento celular en las biomasas que se cultiven con fertilizante orgánico abonisa, hasta cierto punto de concentración del Clinker, ya que posiblemente a medida que se incrementa los niveles de Clinker existe una inhibición en el crecimiento celular, como sugiere Talec et al. (2013), que al anexar concentraciones de polvo Clinker puede generar un efecto tóxico en diferentes cepas de microalgas.

En la figura 2 se observa el crecimiento celular del cultivo con el medio Basal Bristol y los diferentes de adición de Clinker. En esta cinética de crecimiento celular, se puede observar fácilmente la fase de adaptación entre los días 1 y 3, seguido de una fase exponencial de crecimiento desde el día 3 hasta el día 10 de la evaluación. Después de esto, se reconoce una fase estacionaria para todos los cultivos realizados hasta el día 14, lo que indica que el cultivo llegó al equilibrio entre la muerte y crecimiento celular.

Se evidencia que el tratamiento de 600 mg/L de polvo Clinker, fue el que presento menor con-

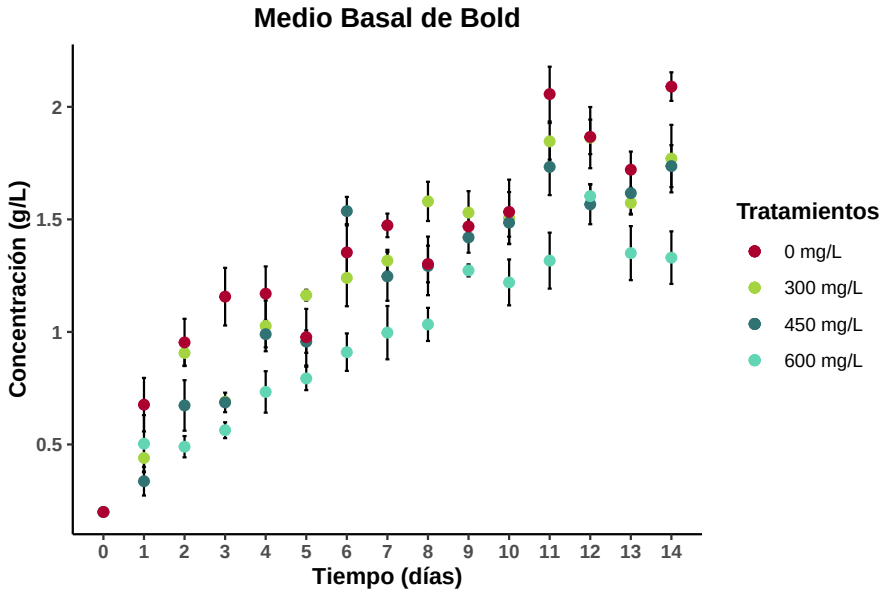

Figura 2: Cinética de crecimiento celular de *C. sorokiniana* en Fertilizante Inorgánico Florilizer con diferentes niveles de adición de polvo Clinker.

centración celular lo que confirma la sugerencia de Talec et al. (2013), que estos niveles pueden llegar a ser tóxicos lo que disminuye el crecimiento celular, pues este fue el cultivo con una menor concentración celular alcanzada y con una cinética que menor crecimiento presentó durante la evaluación, llegando únicamente a una concentración celular máxima de 1,603 g/L ± 0,201. La mayor concentración celular la presento el tratamiento sin adición de polvo clinker. Contrastando los tratamientos control del fertilizante orgánico Abonisa con el medio Basal Bold se evidencia un mayor crecimiento celular en el control del Basal Bold, posiblemente esto se deba a que el medio Basal Bold brinda una serie de micronutrientes específicos, como lo son el sulfato ferroso ($FeSO_4$), ácido bórico (H_3BO_3), sulfato de zinc ($ZnSO_4$), óxido de molibdeno (MoO_3), entre otros micronutrientes que el fertilizante orgánico no presenta, lo que puede conllevar a mayor crecimiento celular.

La cinética de crecimiento celular del cultivo de Fertilizante Inorgánico Florilizer con los diferentes niveles de adición en la figura 3. Aquí, a diferencia de los medios de cultivo mencionados anteriormente, no se alcanzaron picos de concentración celular mayores a 1 g/L para todos los tratamientos. Los niveles de adición de 300 mg/L y 600 mg/ fueron los tratamientos que lograron una concentración celular mayor a 1 g/L, obteniendo 1,01 g/L ± 0,21 y 1,12 g/L ± 0,07, respectivamente. Estos valores de concentración los siguieron el nivel de adición de 450 mg/L con una concentración celular de 0,92 g/L ± 0,27 y el cultivo control, con una concentración celular de 0,88 g/L ± 0,19.

En este último, a diferencia de los controles en los medios previamente descritos, el cultivo control llevado a cabo utilizando el fertilizante inorgánico florilizer junto con el tratamiento control no exhibió una relación diferenciada en su crecimiento celular en comparación con los tratamientos que si incluyeron adición de polvo Clinker. Esta observación se refleja en la figura 3, donde el crecimiento celular del cultivo control se mantiene en el mismo rango de crecimiento de los otros cultivos.

A través de todos los medios de cultivo, el tratamiento que evidenció proporcionar mejores con-

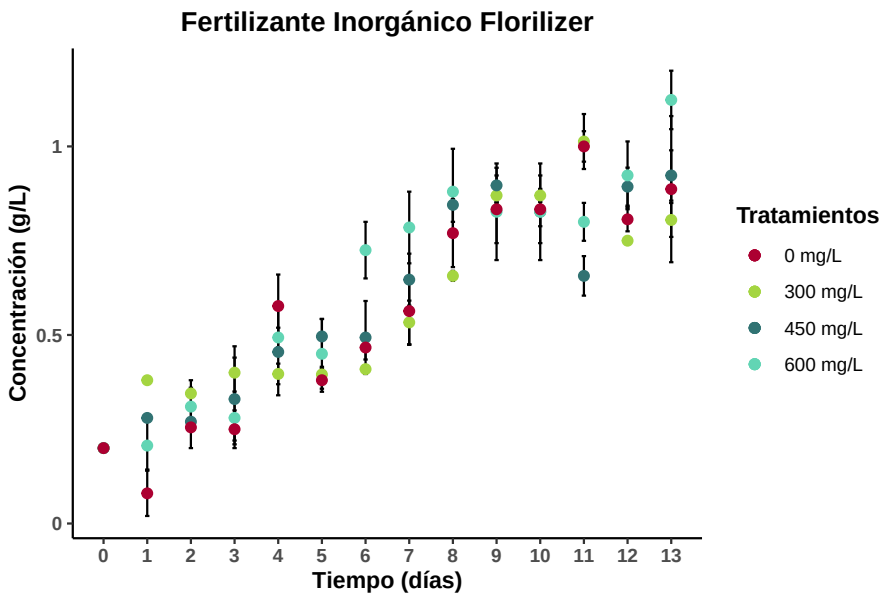

Figura 3: Cinética de crecimiento celular de *C. sorokiniana* en Fertilizante Inorgánico Florilizer con diferentes niveles de adición de polvo Clinker.

diciones de crecimiento para la cepa *C. sorokiniana* fue el nivel de adición de 300 mg/L de polvo Clinker, mientras que las concentraciones más bajas las presentaban los niveles de adición de 600 mg/L.

El tiempo de cultivo para las microalgas puede variar de manera significativa dependiendo de la especie de alga, condiciones de crecimiento, y el propósito en si del cultivo realizado (Lee et al., 2013). Generalmente, las microalgas son cosechadas durante su fase exponencial de crecimiento, ya sea para el uso de biomasa o para usarlas como inóculo. En este trabajo, se buscó que el inóculo inicial de *C. sorokiniana* utilizado para los cultivos se encontrara en su mayor valor de concentración celular (0,98 y 2,30 g/L) para cosecharla. Esta concentración se encontró entre los 15-19 días después de su cultivo.

Con respecto a la adición de polvo Clinker en todos los cultivos realizados, este no representó riesgos tóxicos ni acciones inhibitorias en el crecimiento celular, así como se demostró en los estudios realizados por Lara-Gil et al. (2016) y Talec et al. (2013). Sin embargo, los efectos observados en el aumento de la concentración en los cultivos realizados con bajos niveles de polvo Clinker sugieren que este tiene acciones estimulantes en el crecimiento y puede funcionar como aditivo en los medios de cultivo que demuestren poco crecimiento celular a través del tiempo.

Los resultados de productividad presentados en la figura 4, se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), donde se encontraron diferencias significativas ($p<0,05$) entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95 %. Para establecer las diferencias entre los tratamientos respecto a la productividad, se utilizó el test de rangos múltiples Tukey. Los tratamientos donde la concentración de Clinker fue de 300 mg/L presentaron mayor productividad, lo que sugiere que la productividad es mayor cuando existe la presencia del polvo hasta una determinada concentración, ya que después se genera una inhibición en el crecimiento por incremento de este agente externo. Este comportamiento posiblemente pueda explicarse por qué la adición del Clinker puede generar que la maquinaria celular dirige el nitrógeno hacia la síntesis de proteínas, incluidas probablemente proteínas reparadoras o

desintoxicantes, hasta un punto (300 mg/L de Clinker) y luego el exceso genera inhibición como lo reporta Talec et al. (2013).

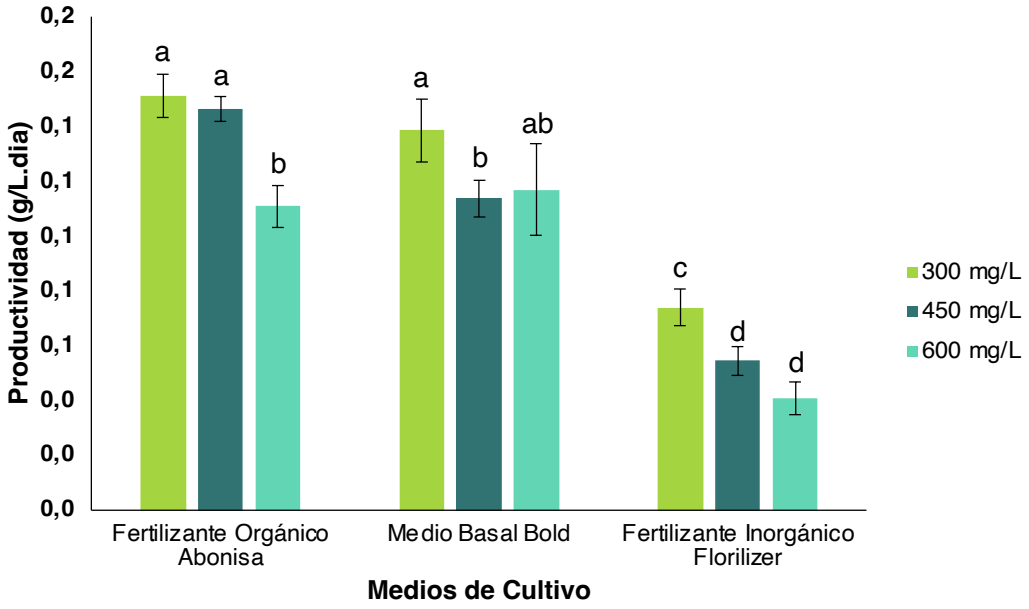

Figura 4: Productividad de biomasa obtenida de *C. sorokiniana* en diferentes concentraciones de Clinker. Las letras iguales corresponden a grupos estadísticamente homogéneos según el test de Tukey, con un nivel de confianza del 95 %.

4.2. Producción de proteínas

En la figura 5, se puede observar que los tratamientos con diferentes concentraciones de Clinker en los medios de cultivo de Fertilizante Orgánico Abonisa y el Medio Basal de Bold lograron producir una cantidad de proteína similar, manteniéndose en un rango de porcentaje de proteína que no supera el 20 % para todos los tratamientos aplicados, incluyendo el tratamiento control. Las células cultivadas en el medio inorgánico Florilizer tuvieron la mayor capacidad de producción de proteína, superando el 40 % de contenido de proteína en la biomasa producida para todos los tratamientos.

Así mismo, los demás niveles de adición de polvo Clinker presentaron una alta producción de proteína en sus biomasas, con porcentajes de proteína de 41,95 % y 47,73 % para los tratamientos con 450 mg/L y 600 mg/L de adición de polvo Clinker, respectivamente. Incluso la biomasa producida por el tratamiento control también presentó un porcentaje de proteína de 43,81 %, con una diferencia en la producción de 64,4 % comparado con el control del Fertilizante Orgánico Abonisa, y de 67,2 % comparado con el control del Medio Basal de Bold (figura 5). Lo anterior sugiere que los diferentes tratamientos de estimulación con polvo Clinker no presentan una incidencia significativa en la producción de proteínas a nivel celular, sino que algún otro factor en común a través de los tratamientos, como lo puede ser el medio de cultivo, la temperatura, agitación de los sistemas de cultivo, entre otras variables.

Esto es coherente con Amorim et al. (2021), donde se destaca que el nitrógeno es el parámetro más importante a la hora de producir proteínas en los cultivos de microalgas. Para la biomasa producida en el medio de cultivo con mayor concentración de nitrógeno, se presentó una mayor producción

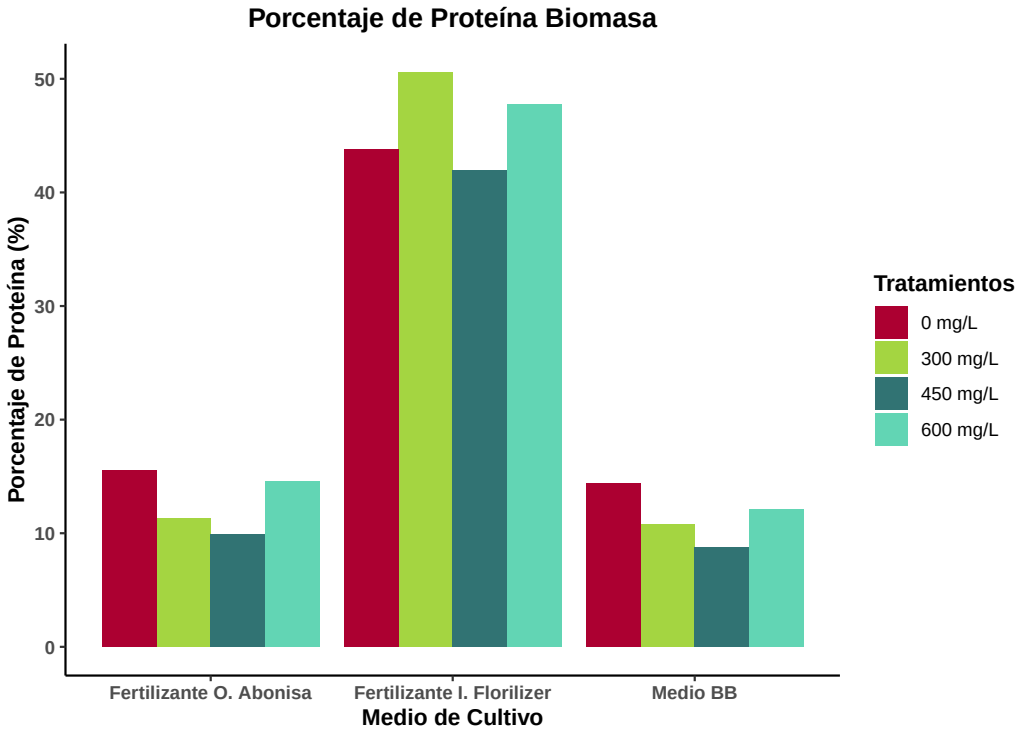

Figura 5: Producción de proteína dentro de las células de *Chlorella sorokiniana* para los niveles de adición de polvo Clinker y medios de cultivo.

de proteínas en todos los tratamientos aplicados, independientemente de la concentración del polvo Clinker. Lo anterior también demuestra que, para que haya una mayor producción de proteína por parte de las microalgas, se espera que estas tengan un alto consumo de nitrógeno a través de su cultivo. Tanto así, que la implementación de fuentes de nitrógeno de calidad comercial y bajo costo, como lo son los fertilizantes agrícolas, es crucial para la viabilidad de los cultivos de microalgas a gran escala Soares et al. (2018).

Adicionalmente, cuando las microalgas se encuentran en condiciones de privación de nutrientes, inducen la acumulación de lípidos y moléculas ricas en carbono para su almacenamiento de energía o protección contra demás tipos de estrés (Amorim et al., 2021). Este tipo de acumulación se puede reconocer en la composición nutricional de las biomasas cultivadas en los medios Basal Bold y Fertilizante Orgánico Abonisa, donde estos podrían estar aplicando un estrés de nutrientes esenciales para la producción de proteínas, como lo es el nitrógeno y fósforo. Tanto así, que este estrés y el mecanismo de protección aplicado por las microalgas también explica la reducción en la producción de proteína para estas biomasas.

Lo anterior también se evidencia en los resultados obtenidos de proteína presente en las biomasas cultivadas en medio Basal Bold y el fertilizante Organico Abonisa, donde los tratamientos que no presentaban algún tipo de estrés por parte del polvo Clinker fueron quienes evidenciaron tener un mayor porcentaje de proteína.

Finalmente, es importante resaltar que la composición de aminoácidos, ya sean aminoácidos hidrofóbicos o hidrofílicos, también tiene incidencia en qué tanto se puede digerir la biomasa de las microalgas. Según Pootthachaya et al. (2023), para que las proteínas de las biomasas sean solubles,

se necesitan un porcentaje considerable de aminoácidos hidrófobos. Por esta razón, es necesario desarrollar investigaciones futuras en la composición de aminoácidos que permitan entender la calidad de la proteína aplicada a las dietas de las gallinas.

4.3. Composición Bromatológica de las biomasas

Para que un producto biológico pueda ser aplicado como alimento, a este se le debe realizar un análisis bromatológico, también conocido como un análisis nutricional. Este tipo de estudios permite reconocer las características nutricionales del alimento, su composición química, posibles alteraciones, entre otras características. En las figuras 6,7 y 8. se muestra la composición nutricional total de la biomasa cultivada con los tres medios de cultivos empleados y diferentes niveles de adición de polvo Clinker.

En las tres producciones de biomasa de microalgas con los medios de cultivo Fertilizante Orgánico Abonisa, Medio Basal de Bold (BBM) y Fertilizante Inorgánico Florilizer, no se presentó carencia de los componentes nutricionales evaluados, es decir, se presentó una composición nutricional completa para el contenido bromatológico del suplemento. No obstante, se evidenció una diferencia en el promedio de composición nutricional total de la biomasa producida con los diferentes medios de cultivo.

En la figura 6, se muestra la composición de las biomasas producidas con el Fertilizante Orgánico Abonisa y los diferentes niveles de adición de polvo Clinker, donde se presentó una composición nutricional constante a través de los niveles de adición, y con presencia de variaciones en las características nutricionales totales de las características evaluadas. Para la biomasa producida con un nivel de adición de 600 mg/L de polvo Clinker, la cantidad de grasa obtenida fue mayor a comparación de las biomasas con los demás niveles de adición. Para este tratamiento, el porcentaje de grasa fue de 15,05 %, a diferencia del tratamiento de los tratamientos 300 mg/L, 450 mg/L y 0 mg/L de adición que presentaron un porcentaje de 4,12 %, 4,54 % y 3,64 % de grasa, respectivamente.

Se obtuvo una diferencia marcada en el contenido de cenizas, aquí, el tratamiento con 600 mg/L de adición de polvo Clinker presentó 22,35 % de cenizas, seguido del tratamiento con 450 mg/L de adición que presentó un 21,41 %, el tratamiento con 300 mg/L de adición que presentó un 14,79 % de cenizas, y finalmente el tratamiento con 0 mg/L de adición, que solamente presentó un 6,71 % de adición.

En este último tratamiento, el tratamiento control, se evidenció una diferencia en los perfiles nutricionales de grasa, humedad, cenizas y carbohidratos a comparación de las otras biomasas producidas con los diferentes niveles de adición de polvo Clinker establecidos. Aquí se observó un aumento en el porcentaje de humedad y carbohidratos, y una disminución en el porcentaje de cenizas y grasas.

En la figura 7 se muestra cómo se compone las biomasas obtenidas con diferentes niveles de adición de polvo Clinker y el Medio Basal de Bold. Las diferentes composiciones nutricionales obtenidas con los niveles de adición de Clinker empleados demuestran una similitud entre ellas. Sin embargo, como se describe en la sección anterior, se diferencian entre ellas no sólo por su porcentaje de proteína, sino también por su porcentaje de grasas.

Aquí, todas las biomasas obtenidas de los cultivos con diferentes niveles de adición de Clinker presentaron un rango porcentual de cantidad de grasa similar, que va desde los 2,24 % para el tratamiento sin adición de polvo Clinker, hasta el tratamiento con 450 mg/L de adición, que alcanzó un porcentaje de 3,68 % de grasa. No obstante, en la biomasa que se obtuvo del cultivo con 600 mg/L de adición de polvo Clinker, se presentaron resultados opuestos a los que presentó la biomasa

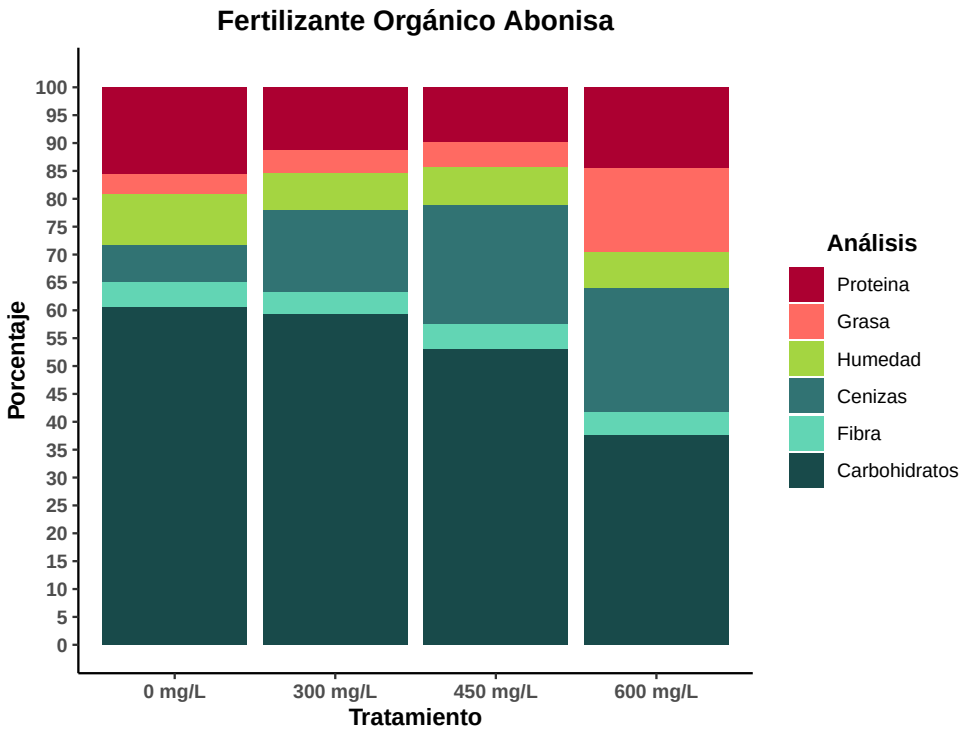

Figura 6: Composiciones bromatológicas de las biomasas obtenidas en los diferentes tratamientos con fertilizante orgánico Abonisa

cultivada con Fertilizante Orgánico Abonisa y este mismo tratamiento. En este caso, el porcentaje de grasa obtenido sólo alcanzó el 0,24 %.

Adicionalmente, se observó una regularidad entre los perfiles nutricionales de carbohidratos y fibra a través de las biomasas producidas con los diferentes niveles de adición de polvo Clinker. Para el caso del perfil nutricional de carbohidratos, la biomasa que mayor porcentaje obtuvo fue la biomasa con el tratamiento control, con 56,31 %; y la biomasa que menor porcentaje obtuvo fue la biomasa con el tratamiento de 300 mg/L de polvo Clinker, con 49,4 %. Para el perfil nutricional de fibra, esta se mantuvo a través de todas las biomasas en un rango de 2,53 % por parte de la biomasa con 300 mg/L de tratamiento y de 3,68 % por parte de la biomasa con 600 mg/L de tratamiento.

Es importante resaltar las diferencias que se presentan en la composición nutricional del tratamiento control en comparación con las demás biomasas que tenían adición de polvo Clinker. Adicionalmente a las diferencias que se evidenciaron en la composición de grasa y proteína, el tratamiento control destacó en su aumento en el porcentaje de humedad con un 8,63 %, mientras que los demás niveles de humedad presentaron valores menores, oscilando entre 7,15 % y 7,31 %. Por otro lado, se observó una disminución en el porcentaje de cenizas en el tratamiento control, con un 14,78 %, a diferencia de los demás niveles de ceniza que registraron valores más altos, entre el 23,18 % y el 27,13 %.

Al observar la composición nutricional de las biomasas producidas con los diferentes niveles de adición de polvo Clinker y el Fertilizante Inorgánico Florilizer en la figura 8, no sólo se evidencia una diferencia entre las biomasas con diferentes niveles de polvo Clinker, sino también entre las biomasas producidas con los medios de cultivo anteriormente descritos. Aquí, se produjo un porcentaje de

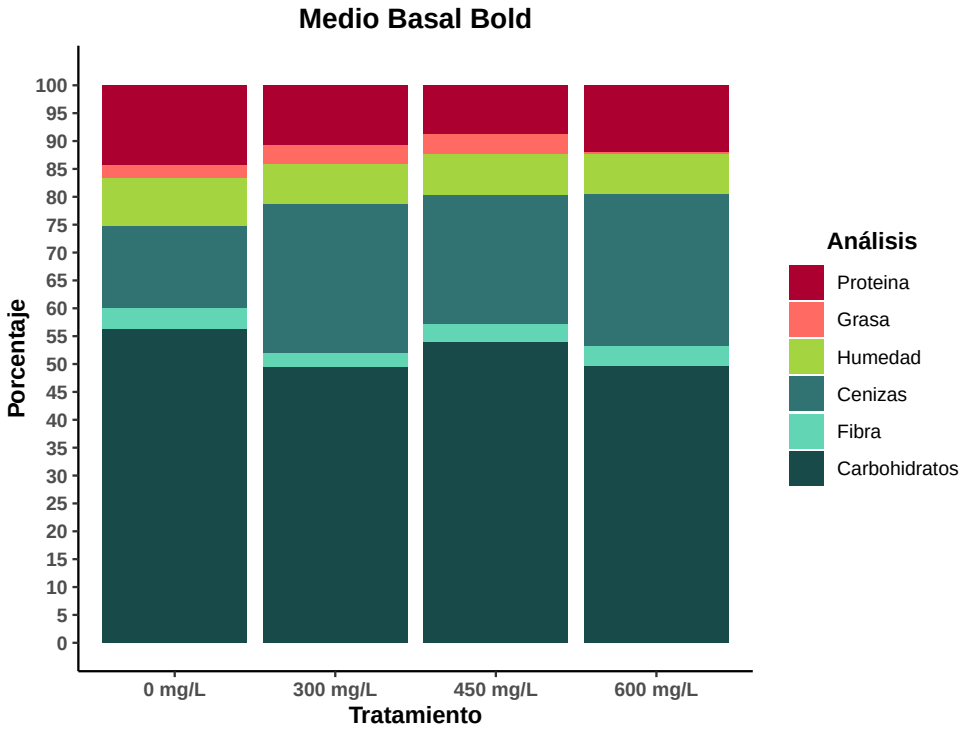

Figura 7: Composiciones bromatológicas de las biomasas obtenidas en los diferentes tratamientos con el medio Basal Bold

grasa diferente a través de las biomasas producidas bajo la adición de los diferentes niveles de polvo Clinker, donde el mayor porcentaje fue de 13,27 % y lo presentó la biomasa con 0 mg/L de adición de polvo Clinker, y el menor porcentaje fue de 2,6 % y lo presentó la biomasa con 450 mg/L de adición de polvo Clinker.

Consecuentemente, la cantidad de carbohidratos que se obtuvieron de todos los tratamientos de adición de polvo Clinker usando este medio fueron mucho menores siendo comparados con las biomasas obtenidas de los cultivos con los medios anteriores. Con el Fertilizante Inorgánico Florilizer, los cultivos alcanzaron un máximo de 28,63 % de carbohidratos con el tratamiento sin adición de polvo Clinker, y un mínimo de 8,74 % de carbohidratos con el tratamiento de 300 mg/L de adición.

Es importante resaltar las diferencias entre las composiciones nutricionales de las biomasas con tratamientos de adición de polvo Clinker y la biomasa en donde este no se adicionó. En consecuencia, se presentaron diferencias en el porcentaje de fibra y de cenizas entre la biomasa del tratamiento control y las demás biomasas producidas. Para el perfil nutricional de fibra, la biomasa del tratamiento control presentó un porcentaje de 3,57 %, mayor a comparación de las demás biomasas, que su porcentaje de fibra se mantuvo en un rango de 1,03 % a 1,65 %.

Adicionalmente, para el perfil nutricional de cenizas, la biomasa del tratamiento control produjo un 4,73 %, menor a comparación de las demás biomasas, las cuales presentaron valores de cenizas en un rango de 24,19 % a 26,11 %.

A pesar de todas estas diferencias entre los perfiles nutricionales de las biomasas obtenidas con los diferentes tratamientos, el perfil nutricional de humedad se mantuvo entre 6,27 % y 7,78 %, un

rango similar para las biomasas con los diferentes tratamientos de adición de polvo Clinker.

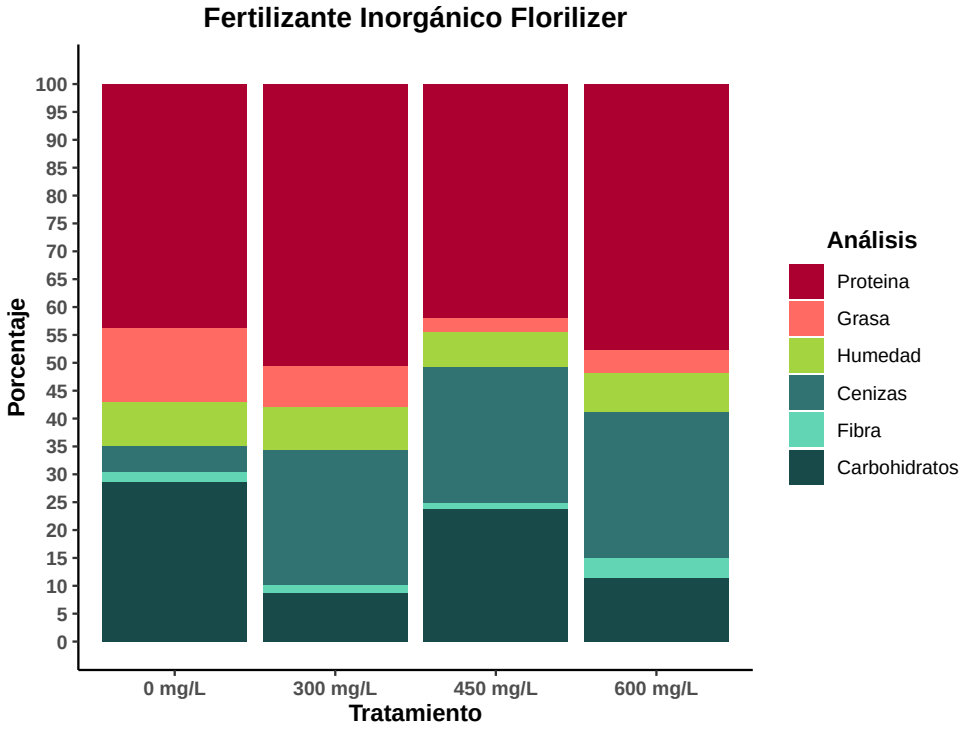

Figura 8: Composiciones bromatológicas de las biomasas obtenidas en los diferentes tratamientos con el fertilizante inorgánico Florilizer

A pesar de que las biomasas cultivadas con el fertilizante orgánico Abonisa y el medio de Basal Bold presentaran un bajo porcentaje de proteína en comparación con las biomasas obtenidas del cultivo con el fertilizante inorgánico Fertilizer, estas también pueden ser consideradas suplementos alimenticios para gallinas, dependiendo de las necesidades alimenticias y productivas del animal, debido a su alto contenido en carbohidratos y fibra, ya que los carbohidratos componen la mayor proporción de las dietas para gallinas utilizadas comúnmente, y este compuesto es considerado la mayor fuente de energía para las gallinas y su microflora intestinal (El-Hack et al., 2023).

Por otro lado, han reportado cepas de *Chlorella sorokiniana* que, a diferencia de los resultados obtenidos, logran producir hasta 37 % de lípidos en su biomasa (Kakarla et al., 2018). Sin embargo, los niveles de lípidos obtenidos representan una ventaja en la formulación de suplementos alimenticios animales, donde el promedio de la literatura es de alrededor del 6 %.

En particular, se observa que las biomasas cultivadas en el medio basal de Bold exhiben menores niveles de lípidos en comparación con las biomasas obtenidas utilizando otros medios de cultivo. Esta disparidad puede atribuirse a un posible estrés celular inducido por la escasez de nutrientes en el cultivo. Aunque limitar la disponibilidad de nutrientes es una práctica común para inducir la acumulación de lípidos en las microalgas (Song et al., 2022), las condiciones de estrés resultantes de la deficiencia de nutrientes esenciales como lo son el nitrógeno y el fósforo pueden disminuir la producción de biomasa y, consiguientemente, afectar de forma negativa el rendimiento final de los lípidos (Maltsev et al., 2023).

A su vez, se destacan notables concentraciones de lípidos en la biomasa cultivada utilizando

el Fertilizante Orgánico Abonisa y con la mayor adición de polvo Clinker. Esta alta concentración puede ser atribuida a diversos factores que inducen el estrés celular, la sobresaturación de nutrientes como el fósforo, y la presencia de aditivos que afectan la integridad morfológica de la microalga, entre otros (Song et al., 2022).

La importancia de la fibra como componente alimenticio, especialmente en las aves de corral como las gallinas, es altamente debatido. Este componente se ha reportado como un componente funcional para los órganos digestivos de las aves, o un antinutriente (Tejeda and Kim, 2021). Sin embargo, de manera general, se ha desaconsejado alimentar a las aves de corral con fibra debido a sus afectos adversos sobre el rendimiento y el uso de los nutrientes por parte del animal. Específicamente, al incluir cantidades adecuadas de fibra dietética a en las dietas avícolas, favorece el desarrollo gastrointestinal, el rendimiento del crecimiento, y evita el consumo excesivo de alimento sin impedir el crecimiento de las aves. Sin embargo, es necesario definir cómo se incluye esta fibra en las dietas avícolas (Jha and Mishra, 2021).

Por ejemplo, en el estudio realizado por Poveda-Víquez et al. (2023), se determinó una baja concentración de fibra para la biomasa de Anthrospira máxima que utilizaron, y esta a su vez al ser añadida en pequeñas concentraciones en las dietas de las gallinas, genera una alta disponibilidad nutricional de la biomasa seca, por lo que los valores obtenidos en los diferentes tratamientos tienen a ser atractivos a esta industria debido a su equilibrado valor de fibra.

Adicionalmente, todas las biomasas con tratamiento de adición presentaron altos niveles de ceniza en comparación a los controles, que se puede deber a los niveles de adición de Clinker. Esta ceniza, quien aporta el contenido de minerales para las gallinas y es un elemento crucial para la formación de la cáscara del huevo en las gallinas ponedoras, resulta ser beneficiosa para la salud animal (Gkarane et al., 2020).

Dados los resultados obtenidos, todas las biomasas cultivadas con *C. sorokiniana* se pueden considerar como suplementos alimenticios para gallinas ponedoras gracias a su composición rica en carbohidratos, fibra, cenizas, grasas, entre otros. Sin embargo, entre las biomasas con mayor porcentaje de proteína, la biomasa cultivada en el Fertilizante Inorgánico Florilizer con 300 mg/L de adición de polvo Clinker se considera un suplemento alimenticio que logra añadir características nutricionales pertinentes a los alimentos comúnmente utilizados para gallinas. Esto se debe a un aumento en el porcentaje de proteína, cenizas, lípidos, y una disminución en la fibra digestiva y los carbohidratos.

4.4. Concentración de exopolisacáridos (EPS) en las biomasas

Los resultados de producción de exopolisacáridos en diferentes tratamientos de concentraciones de Clinker en los medios de cultivo fertilizante orgánico Abonisa, medio basal de Bold y fertilizante inorgánico Florilizer se evidencian en la figura 9. En el caso de las microalgas cultivadas en el medio fertilizante orgánico Abonisa, reportaron la mayor cantidad de exopolisacáridos a través de todos los tratamientos utilizados. Sin embargo, se observó una menor producción para las microalgas cultivadas con el tratamiento de 600 mg/L de adición de polvo Clinker. Así mismo, las microalgas sin adición del Clinker reportaron niveles bajos en su producción de exopolisacáridos, similares a los anteriormente mencionados.

Para los cultivos de microalgas con adición de 300 mg/L y 450 mg/L de polvo Clinker, estos reportaron altos niveles de concentración de exopolisacáridos, superando los 100 mg/L de glucosa presente en los cultivos para las microalgas con ambos niveles de adición.

Para las microalgas cultivadas con Basal Bold y con fertilizante inorgánico, la producción de exopolisacáridos fue mucho menor en comparación con el cultivo anteriormente descrito. No obs-

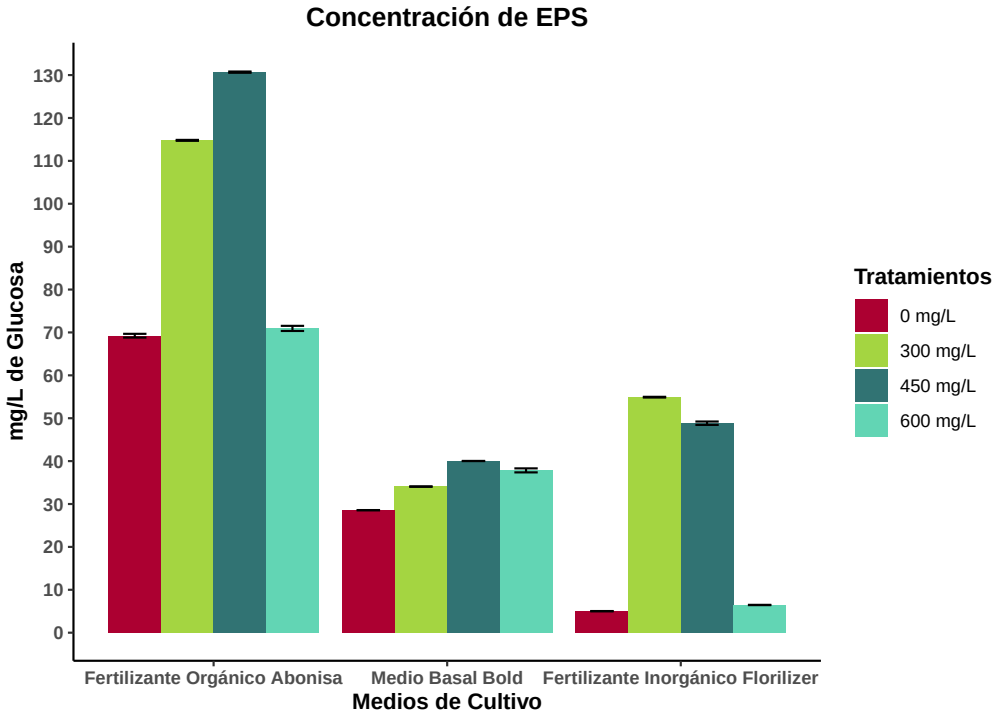

Figura 9: Producción de EPS de los diferentes tratamientos

tante, las microalgas de estos cultivos reportaron niveles relevantes de exopolisacáridos, con un máximo de 40,02 mg/L ± 0,02 para las microalgas cultivadas en el tratamiento de 450 mg/L de adición de Clinker en el medio BBM, y para el fertilizante inorgánico Fertilizer, un máximo de 54,90 mg/L ± 0,08 en el tratamiento de 300 mg/L de adición de Clinker. A su vez, para las microalgas cultivadas en el medio Basal Bold para los tratamientos control y con 600 mg/L de adición de polvo Clinker, se observaron niveles de exopolisacáridos menores a los mencionados anteriormente. Consiguientemente, para el tratamiento con el fertilizante inorgánico Fertilizer, las microalgas cultivadas con los tratamientos de 300 mg/L y 450 mg/L de adición fueron quienes produjeron una mayor cantidad de exopolisacáridos, con 54,90 mg/L ± 0,08 y 48,83 mg/L ± 0,39. Mientras tanto, los tratamientos con 600 mg/L y 0 mg/L de adición reportaron niveles de exopolisacáridos que no superaron los 7 mg/L de glucosa (figura 9).

Es importante destacar que en los cultivos de microalgas sin adición de Clinker se registró la menor cantidad de exopolisacáridos en todos los medios de cultivo empleados. Esto podría indicar que la adición de polvo Clinker actúa como un agente estimulante para la producción de exopolisacáridos por parte de los cultivos de microalgas. Sin embargo, después de los controles, los niveles más bajos observados fueron en los cultivos con el nivel más alto de adición de polvo Clinker, con la excepción de los resultados obtenidos utilizando el medio Basal Bold. Aquí, los niveles de exopolisacáridos en este tratamiento y en el tratamiento con 300 mg/L de adición de Clinker fueron comparables.

Como se mencionó anteriormente, los exopolisacáridos funcionan como una barrera física que protege a la microalga de agentes dañinos o condiciones ambientales adversas, y su rol principal es mantener la integridad y función de las membranas biológicas celulares (Rossi and Philippis, 2016; Tamaru et al., 2005). A la hora de exponer los cultivos celulares a estrés celular por la adición de un estimulante como lo es el polvo Clinker, se puede observar un aumento en su producción

de exopolisacáridos a comparación del cultivo control. Sin embargo, como se puede observar en la fig 9, cuando hay una mayor concentración de este polvo Clinker en el cultivo, la producción de exopolisacáridos también disminuye a un nivel cercano de los cultivos control. Todo esto sugiere que, si bien la adición de polvo Clinker puede estimular la producción de exopolisacáridos en los cultivos de microalgas, un exceso de este aditivo podría inhibir su producción.

Un factor importante para futuras investigaciones es la relación carbono-nitrógeno en los medios de cultivo y su incidencia tanto en la producción de exopolisacáridos como en la producción de proteína. Se ha observado que la reducción del contenido de nitrógeno en los medios de cultivo provoca la síntesis de exopolisacáridos, probablemente al incremento en la relación carbono-nitrógeno que esto genera (Kumar et al., 2007). A su vez, en el estudio realizado por Cai et al. (2022) se observó que la disminución en la relación carbono-nitrógeno promueve la síntesis de glutamato en las células de las microalgas, que después incrementa la síntesis de proteínas. Ahora bien, a través de la literatura se han definido múltiples beneficios de la suplementación con expolisacáridos de origen microbiano y microalgal para las gallinas ponedoras. Estas sustancias han sido exploradas como una excelente alternativa a los antibióticos aplicadas en la industria del alimento para el ganado y las gallinas, gracias a sus propiedades biológicas y funcionales (Yang et al., 2023).

En un estudio realizado por Ashfaq et al. (2020), donde evaluó el efecto de prebióticos como los exopolisacáridos, en el microbiota gastrointestinal de las gallinas de engorde. Aquí, se sugiere que los exopolisacáridos de origen microbiano no sólo inhiben el crecimiento de bacterias patógenas como *E. coli* o *Salmonella*, sino que también favorecen el crecimiento de microorganismos beneficiosos en el intestino delgado de estos animales. Esto se debe a que los exopolisacáridos presentes en las biomasas de microalgas no tienen la capacidad de fermentarse completamente por la microbiota gastrointestinal de los animales. Entonces, cuando estas sustancias pasan al intestino grueso, actúan como prebióticos mejorando el desarrollo y función de bacterias beneficiosas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (El-Hack et al., 2023).

4.5. Costo de producción de biomasa

Actualmente, el costo para producción de biomasa microalgal sigue siendo el mayor cuello de botella de esta tecnología ya sea para ser utilizada como alternativa para reducción de gases efecto invernadero, producción metabolitos, producción de suplemento alimenticio etc (Chaves et al., 2021; Song et al., 2022; Muys et al., 2019; Lara-Gil et al., 2016; Spínola et al., 2022). Por lo que diferentes investigaciones se centran en la disminución de costos del proceso de producción de biomasa microalgal entre la que resalta el reemplazo del medio de cultivo por medios que sean económicos, por lo que el presente trabajo evaluó 2 medios de cultivos (el fertilizante orgánico Abonisa y el fertilizante inorgánico Fertilizer), con el fin de evaluar el costo de producción de biomasa.

La figura 10, muestra el costo aproximado de producción de 1 kg biomasa al emplear la concentración celular máxima encontrada en cada uno de los medios evaluados. En esta figura se evidencia que el mayor costo de producción lo tiene el medio de cultivo Basal Bold, debido a la cantidad de sales que se utilizan para su preparación, mientras que los fertilizantes comerciales presentaron los valores mas bajos, lo que indican que podrían ser un medio de cultivo atractivo para reemplazar el Basal Bold y producir biomasa a gran escala.

Considerando los resultados obtenidos con relación a la concentración de proteínas y exopolisacáridos, así como el análisis del costo asociado a la producción de biomasa, se definió como objeto de estudio para la determinación del perfil lipídico y la evaluación *in vitro*, a la biomasa

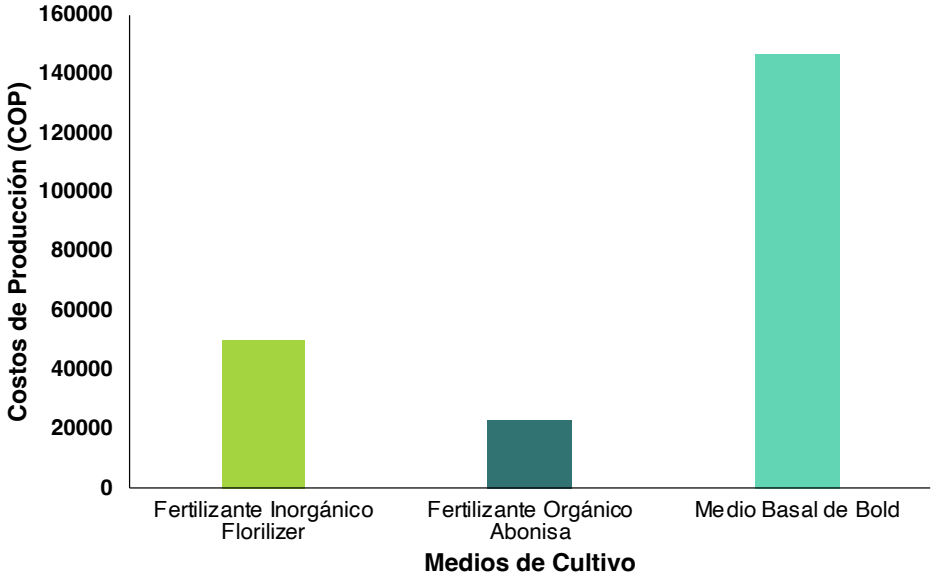

Figura 10: Costo de producción de 1 kg de biomasa de *C. sorokiniana* en diferentes medios de cultivo

obtenida mediante el cultivo con el fertilizante inorgánico florilizer y la adición de polvo clinker a una concentración de 300 mg/L.

4.6. Composición de ácidos grasos de la biomasa seleccionada (Fertilizante Inorgánico Fertilizer, 300 mg/L Clinker)

Al obtener los resultados de ácidos grasos para la biomasa seleccionada, se obtuvo una concentración total de 3,27 g/100g, y dentro de esta, se obtuvo la composición observada en la figura 12. Aquí, en coherencia con Kalwani et al. (2024), los ácidos grasos que representaban la mayoría de la composición en la biomasa de *C. sorokiniana* con adición de polvo clinker fueron el ácido γ-linoléico (C18:3), el ácido linoléico (C18:2) y el ácido palmítico (C16:0), con una concentración de 1,43 g/100g, 0,75 g/100g y 0,61, respectivamente.

Tanto los lípidos como los ácidos grasos obtenidos de las microalgas son componentes nutricionales altamente investigados. Muchas especies de microalgas son fuentes ricas en PUFAS n-3 de cadena larga, como lo son el DHA, EPA y DPA, los cuales son requeridos en las dietas de las gallinas (El-Hack et al., 2023).

Sin embargo, para entender los resultados de ácidos grasos obtenidos, es importante resaltar la síntesis de los ácidos grasos saturados. Esta ruta metabólica es similar tanto en las plantas como en las microalgas, y se divide en tres vías distintas apoyadas por tres sistemas enzimáticos:

En primer lugar, la biosíntesis del ácido palmítico (16:0) y otros ácidos grasos saturados se completa a partir del acetil-CoA, siguiendo la vía de la sintasa de ácidos grasos (FAS, por sus siglas en inglés); después, se producen nuevos alargamientos de cadena, y finalmente, desaturaciones como parte de las vías n-3 y n-6 para producir ácidos grasos poliinsaturados más complejos (Remize et al., 2021).

Tras ser sintetizados por la vía FAS, los 16:0 abarcan un último paso de condensación, reducción,

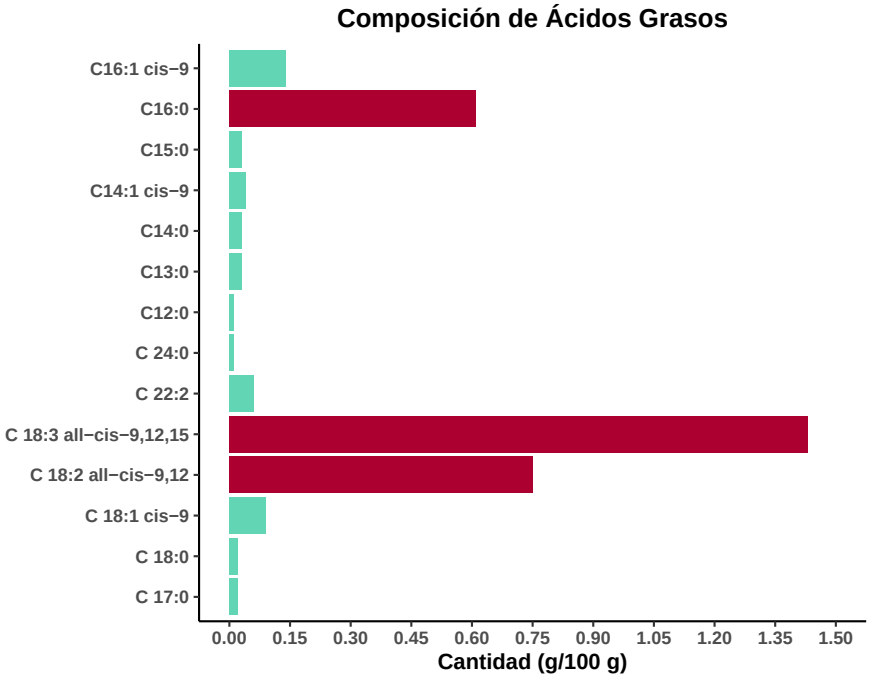

Figura 11: Perfil lipídico de la *C. sorokiniana* cultivada en el Fertilizante Inorgánico Fertilizer, 300 mg/L Clinker)

deshidratación y reducción, respectivamente, y dan lugar a un ácido graso saturado de dos carbonos más largo: el ácido esteárico (18:0). 16:0 y 18:0 son los principales productos de la vía FAS en las microalgas (Khozin-Goldberg, 2016). Lo anterior es coherente con los resultados obtenidos, pues uno de los ácidos grasos que presentó mayor concentración en la biomasa seleccionada fue el ácido palmítico (C16:0), el cual es el primer ácido grasos sintetizado en las microalgas, y precursor de ácidos grasos más complejos. Otro de estos precursores es el ácido graso C18:0, sin embargo, este presentó una concentración mucho más baja en la biomasa.

Después, en las vías convencionales para desaturar los ácidos grasos de la ruta FAS en ácidos grasos más complejos, el 18:1n-9 es desaturado por la enzima $\Delta 12$ desaturasa y posteriormente por una enzima $\Delta 15$ desaturasa para formar ácido linoléico y ácido α-linolénico, respectivamente, los precursores de las familias de ácidos grasos n-6 y n-3 (Remize et al., 2021).

En la biomasa seleccionada, se puede observar una alta concentración de ácido linoléico (C 18:2) y ácido γ-linoléico (C18:3), donde el primero es el precursor del segundo, y este es el primer ácido graso complejo en la biosíntesis de ácidos grasos n-6 (Mahendra et al., 2023).

En las gallinas, los ácidos grasos linoléicos y γ-linoléicos se transfieren al tejido adiposo y otros tejidos (Mahendra et al., 2023). Adicionalmente, se conoce que el ácido γ-linoléico mejor a la salud de las gallinas actuando como un agente anti-inflamatorio, antitrombótico, antiproliferativo, y agente reductor de lípidos (El-Demerdash, 2011; Watanabe et al., 2014). A su vez, como se menciona en Kishawy et al. (2019), el enriquecimiento muscular con omega-3 y omega-6 puede reducir el riesgo a enfermedades cardiovasculares, reduciendo los niveles de colesterol lipoproteínas de baja densidad en la sangre.

Aunque estos resultados demuestran un excelente potencial en la aplicación de microalgas como

suplemento de ácidos grasos, al comparar la composición de ácidos grasos de la biomasa seleccionada (FIF, 300 mg/L Clinker) con la composición reportada en la literatura (Lee et al., 2013), se observa que la biomasa seleccionada no alcanza los niveles de concentración mencionados. En la literatura consultada, se evidencian concentraciones de ácido palmítico (C 16:0), ácido linoleico (C 18:2) y ácido γ-linoléico (C 18:3) de 13.06 %, 55.02 % y 10.09 %, respectivamente.

4.7. Solubilidad y Diegstibilidad *in vitro* de la proteína producida por la biomasa seleccionada (FIF, 300 mg/L Clinker)

La tabla número 1 presenta tanto la solubilidad de la proteína como la digestibilidad *in vitro* de la biomasa cultivada en el fertilizante inorgánico florilizer con adición de 300 mg/L de polvo Clinker. Para la evaluación de solubilidad de la proteína, se observó un 75,70 % ± 5,71 de solubilidad. Por otro lado, estableciendo la digestibilidad *in vitro* de esta biomasa, en la digestibilidad bifásica (gástrica y pancreática) se obtuvo un alto porcentaje de digestión de la proteína, alcanzando 58,22 % ± 6,01. La digestibilidad con pepsina diluida, el porcentaje de digestibilidad fue menor a la digestibilidad bifásica, en donde se reportó un 41,49 % ± 4,20 de digestión.

	Valor (%)
Solubilidad de proteína	75,7024 ± 5,71
Digestibilidad con Pepsina Diluida	41,4936 ± 4,20
Digestibilidad Bifásica (Gástrica/Pancreática)	58,2298 ± 6,01

Tabla 1: Valores de solubilidad de la proteína y digestibilidad *invitro*

En este trabajo, se aplicaron metodologías que permitieron la digestión tanto química como enzimática. Al juntar las digestiones del ácido clorhídrico a niveles bajos de pH (1-2,5) y la pepsina a concentraciones comunes del estómago monogástrico (0,0002 %), se pudo evidenciar una degradación en las paredes celulares y una hidrólisis en las proteínas liberadas como lo reporta (Tibbetts et al., 2016).

Sin embargo, los resultados presentados en la investigación previamente mencionada contrastan con los resultados obtenidos, puesto que en esta se registraron valores de solubilidad de proteínas, digestibilidad con pepsina diluida y digestibilidad bifásica de 83.4 %, 80 % y 69 %, respectivamente; y en esta evaluación no se reflejó una digestión eficiente de las proteínas en presencia de bajas concentraciones de pepsina, en donde se alcanzó el porcentaje más bajo a través de todos los ensayos, con un 41,49 ± 4,20 %.

Aun así, es importante resaltar que la determinación de la digestibilidad *in vitro* implementando diferentes cócteles de enzimas digestivas, condiciones de ensayo y métodos de preparación de muestras ha sido variable, oscilando entre el 27 % y 97 % de digestibilidad (Tibbetts et al., 2015).

Como se ha resaltado anteriormente, la composición química de las microalgas varía considerablemente entre las distintas especies e incluso dentro de cada una de ellas, dependiendo de la época de cosecha, factores medioambientales, entre otros.

Las microalgas verdes, tales como *C. sorokiniana*, contienen celulosa y otros carbohidratos insolubles reticulados como componente principal en su pared celular, que afecta en gran medida la digestibilidad y uso de los nutrientes, especialmente las proteínas, a la hora de ser digeridas por aves de corral (Pootthachaya et al., 2023; Spínola et al., 2023). Por esta razón, el alto contenido de

proteínas que las microalgas tienden a presentar no logra ser digerido correctamente, y presentan una digestibilidad relativamente baja.

En adición a la determinación de la digestibilidad usando enzimas digestivas, en este trabajo también se determinó la solubilidad de la proteína. Este método fue establecido por Araba and Dale (1990), permite un análisis rápido de la calidad de las proteínas presentes en los alimentos de soya, los cuales son los alimentos más utilizados para alimentar gallinas de corral, al exponerlos a niveles básicos de pH (12-13).

El concepto principal en el que se basa esta prueba es que, aunque las proteínas están compuestas por cadenas de aminoácidos unidos de forma covalente, su estructura tridimensional está unida muy débilmente por enlaces de hidrógeno, que pueden romperse con facilidad (Parsons et al., 1991). En este trabajo, se evidenció una buena solubilidad de las proteínas, llegando a un porcentaje de solubilidad de 75,70 % $\pm$ 5,71. Esto se debe a que las proteínas de las microalgas tienen la capacidad de perturbar sus estructuras secundarias y terciarias y desdoblarse al estar expuestas a un calentamiento ligero, tal como se realizó en esta prueba (Tibbetts et al., 2016), lo que les permite una mejor digestión y disolución.

A pesar de que los resultados de digestión fueron consistentes, y se reportó un porcentaje significativo de digestión para las tres evaluaciones, la biomasa obtenida de *C. sorokiniana* debe ser expuesta a más de un tipo de evaluación *in vitro* para determinar su digestibilidad. Aquí, se evidenció la necesidad de realizar diferentes ensayos y evaluar su digestión en diferentes circunstancias para determinarla correctamente.

5. Conclusiones

Se logró establecer el efecto del polvo de Clinker procedente de la industria cementera en la productividad celular de la cepa *C. sorokiniana* en diferentes medios de cultivos, evidenciándose que este agente externo puede generar un efecto positivo hasta ciertas concentraciones (300 mg/L) pero luego el incremento de este puede genera una posible inhibición en el crecimiento celular.

Las biomasas obtenidas de estos cultivos exhibieron un perfil nutricional equiparable con los alimentos aplicados en la producción de gallinas ponedoras. Específicamente, el cultivo realizado con *C. sorokiniana* y el Fertilizante Inorgánico Florilizer, junto con una adición de 300 mg/L de polvo Clinker, mostró una reducción en los niveles de fibra, carbohidratos, y un incremento significativo de proteína, ceniza y lípidos, así como la presencia considerable de exopolisacáridos. Estos factores nutricionales son de suma relevancia al formular un suplemento alimenticio destinado a gallinas ponedoras.

Así mismo, este formulado se evaluó el perfil de aminoacios y su digestibilidad de proteínas de manera *in vitro*. Aquí, se pudo obtener resultados relevantes en los ácidos grasos, especialmente en la producción de ácidos γ-linoléicos, los cuales representan beneficios en la salud de las gallinas al ser suministrados en sus dietas y en la evaluación de la digestibilidad *in vitro* de sus proteínas, se obtuvieron porcentajes de solubilidad y digestibilidad comparables con los ya reportados en la literatura.

Sin embargo, este método es sólo una aproximación de la verdadera digestibilidad de las proteínas y no es tan precisos como los métodos *in vivo*. En consecuencia, se requieren evaluaciones biológicas mediante estudios de alimentación animal, en donde se determine niveles óptimos de inclusión de la biomasa para los alimentos utilizados en gallinas en función de su nutrición, seguridad, y

rendimiento nutricional.

6. Referencias

Aguirre, L., Cámara, L., Smith, A., Arroyo, J. J., de Juan, A. F., Fondevila, G., and Mateos, G. G. (2022). Chemical composition, protein quality indicators and in vitro protein digestibility of commercial soybean meals from different origins for use in poultry feeding. *Animal Feed Science and Technology*, 293:115473.

Akpomie, T., Ogungbemiro, F. O., Anwani, S., and Ogungbemiro, F. (2020). Nutritional and elemental composition of awara (soya bean cake) snack eaten in northern nigeria. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 5:113–115.

Albarracin, V. G. (2006). La soya como fuente de proteína en la alimentación animal. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA*.

Amorim, M. L., Soares, J., dos Reis Coimbra, J. S., de Oliveira Leite, M., Albino, L. F. T., and Martins, M. A. (2021). Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61:1976–2002.

Araba, M. and Dale, N. (1990). Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing soybean meal. *Poultry Science*, 69:76–83.

Ashfaq, I., Amjad, H., Ahmad, W., Nasir, A., Ali, A., Ali, W. R., Khaliq, S., Hayat, A., Ali, H., Sattar, F., Ghauri, M. A., and Anwar, M. A. (2020). Growth inhibition of common enteric pathogens in the intestine of broilers by microbially produced dextran and levan exopolysaccharides. *Current Microbiology*, 77:2128–2136.

Boland, M. J., Rae, A. N., Vereijken, J. M., Meuwissen, M. P., Fischer, A. R., van Boekel, M. A., Rutherfurd, S. M., Gruppen, H., Moughan, P. J., and Hendriks, W. H. (2013). The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends in Food Science Technology*, 29:62–73.

Brown, R. M., Larson, D. A., and Bold, H. C. (1964). Airborne algae: Their abundance and heterogeneity. *Science*, 143:583–585.

Cai, Y., Zhai, L., Fang, X., Wu, K., Liu, Y., Cui, X., Wang, Y., Yu, Z., Ruan, R., Liu, T., and Zhang, Q. (2022). Effects of c/n ratio on the growth and protein accumulation of heterotrophic chlorella in broken rice hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15.

Chaves, A. A., Martins, C. F., Carvalho, D. F., Ribeiro, D. M., Lordelo, M., Freire, J. P., and de Almeida, A. M. (2021). A viewpoint on the use of microalgae as an alternative feedstuff in the context of pig and poultry feeding—a special emphasis on tropical regions. *Tropical Animal Health and Production*, 53.

Cuéllar, J. A. (2022). Panorama del sector avícola de colombia: cifras y retos. https://www.veterinariadigital.com/articulos/panorama-del-sector-avicola-de-colombia-cifras-y-retos/.

Dei, H. (2011). *Soybean as a Feed Ingredient for Livestock and Poultry*. InTech.

Ekmay, R. D., Chou, K., Magnuson, A., and Lei, X. G. (2015). Continual feeding of two types of microalgal biomass affected protein digestion and metabolism in laying hens. *Journal of Animal Science*, 93:287–297.

El-Demerdash, E. (2011). Anti-inflammatory and antifibrotic effects of methyl palmitate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254:238–244.

El-Hack, M. E. A., Abdel-Moneim, A. M. E., Shehata, A. M., Mesalam, N. M., Salem, H. M., El-Saadony, M. T., and El-Tarabily, K. A. (2023). *Microalgae applications in poultry feed*, pages 435–450. Elsevier.

Englmaierová, M., Skřivan, M., and Bubancová, I. (2013). A comparison of lutein, spray-dried chlorella, and synthetic carotenoids effects on yolk colour, oxidative stability, and reproductive performance of laying hens. *Czech Journal of Animal Science*, 58:412–419.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., and Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29:751–760.

Gkarane, V., Ciulu, M., Altmann, B. A., Schmitt, A. O., and Mörlein, D. (2020). The effect of algae or insect supplementation as alternative protein sources on the volatile profile of chicken meat. *Foods 2020, Vol. 9, Page 1235*, 9:1235.

Hao, N., Liu, Z., Hou, Y., Fan, Z., Li, Y., Chen, F., and Zhao, L. (2022). Small peptide glutathione-induced bioflocculation for enhancing the food application potential of chlorella pyrenoidosa. *Bioresource Technology*, 365.

Hayes, M. (2020). Measuring protein content in food: An overview of methods. *Foods*, 9.

Ibáñez, M. A., de Blas, C., Cámara, L., and Mateos, G. G. (2020). Chemical composition, protein quality and nutritive value of commercial soybean meals produced from beans from different countries: A meta-analytical study. *Animal Feed Science and Technology*, 267.

Jha, R. and Mishra, P. (2021). Dietary fiber in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, performance, gut health, and on the environment: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology 2021 12:1*, 12:1–16.

Kakarla, R., Choi, J. W., Yun, J. H., Kim, B. H., Heo, J., Lee, S., Cho, D. H., Ramanan, R., and Kim, H. S. (2018). Application of high-salinity stress for enhancing the lipid productivity of chlorella sorokiniana hs1 in a two-phase process. *Journal of Microbiology*, 56:56–64.

Kalwani, M., Kumari, A., Rudra, S. G., Chhabra, D., Pabbi, S., and Shukla, P. (2024). Application of ann-moga for nutrient sequestration for wastewater remediation and production of polyunsaturated fatty acid (pufa) by chlorella sorokiniana msp1. *Chemosphere*, 349:140835.

Khozin-Goldberg, I. (2016). *Lipid Metabolism in Microalgae*, pages 413–484. Springer, Cham.

Kishawy, A. T., Amer, S. A., El-Hack, M. E. A., Saadeldin, I. M., and Swelum, A. A. (2019). The impact of dietary linseed oil and pomegranate peel extract on broiler growth, carcass traits, serum lipid profile, and meat fatty acid, phenol, and flavonoid contents. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 32:1161–1171.

Komaki, H., Yamashita, M., Niwa, Y., Tanaka, Y., Kamiya, N., Ando, Y., and Furuse, M. (1998). The effect of processing of chlorella vulgaris: K-5 on in vitro and in vivo digestibility in rats. *Animal Feed Science and Technology*, 70:363–366.

Kumar, A. S., Mody, K., and Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides - a perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47:103–117.

Lara-Gil, J. A., Senés-Guerrero, C., and Pacheco, A. (2016). Cement flue gas as a potential source of nutrients during co2 mitigation by microalgae. *Algal Research*, 17:285–292.

Latimer, G. W., editor (2023). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. AOAC International Publications, 22 edition.

Lee, Y. K., Chen, W., Shen, H., Han, D., Li, Y., Jones, H. D., Timlin, J. A., and Hu, Q. (2013). Basic culturing and analytical measurement techniques. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*, pages 37–68.

Luo, X., Su, P., and Zhang, W. (2015). Advances in microalgae-derived phytosterols for functional food and pharmaceutical applications. *Marine Drugs 2015, Vol. 13, Pages 4231-4254*, 13:4231–4254.

Mahendra, M. Y. N., Kamaludeen, J., and Pertiwi, H. (2023). Omega-6: Its pharmacology, effect on the broiler production, and health. *Veterinary Medicine International*, 2023.

Maltsev, Y., Kulikovskiy, M., and Maltseva, S. (2023). Nitrogen and phosphorus stress as a tool to induce lipid production in microalgae. *Microbial Cell Factories 2023 22:1*, 22:1–22.

Mezoughem, C., Lindholm, C., and Grahame, M. (2024). Livestock and poultry: World markets and trade. *USDA Foreign Agricultural Service*, pages 14–16.

MinAgricultura (2020). Soya.

Muys, M., Sui, Y., Schwaiger, B., Lesueur, C., Vandenheuvel, D., Vermeir, P., and Vlaeminck, S. E. (2019). High variability in nutritional value and safety of commercially available chlorella and spirulina biomass indicates the need for smart production strategies. *Bioresource Technology*, 275:247–257.

Nichols, H. W. and Bold, H. C. (1965). Trichosarcina polymorpha gen. et sp. nov. *Journal of Phycology*, 1:34–38.

Parsons, C. M., Hashimoto, K., Wedekind, K. J., and Baker, D. H. (1991). Soybean protein solubility in potassium hydroxide: an in vitro test of in vivo protein quality. *Journal of Animal Science*, 69:2918–2924.

Pootthachaya, P., Puangsap, W., Bunchalee, P., Plangklang, P., Reungsang, A., Yuangsoi, B., Cherdthong, A., Tengjaroenkul, B., and Wongtangtintharn, S. (2023). Investigation of nutritional profile, protein solubility and in vitro digestibility of various algae species as an alternative protein source for poultry feed. *Algal Research*, 72.

Pope, M., Borg, B., Boyd, R., Holzgraefe, D., Rush, C., and Sifri, M. (2023). Quantifying the value of soybean meal in poultry and swine diets. *Journal of Applied Poultry Research*, 32:100337.

Poveda-Víquez, G., Villalta-Romero, F., Murillo-Vega, F., Guerrero-Barrantes, M., and Salas-Durán, C. (2023). Effect of inclusion of arthrospira maxima microalgae in laying hen diets on production parameters and egg characteristics. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 25.

Rakhee, Mishra, J., Sharma, R. K., and Misra, K. (2018). Characterization techniques for herbal products. *Management of High Altitude Pathophysiology*, pages 171–202.

Remize, M., Brunel, Y., Silva, J. L., Berthon, J. Y., and Filaire, E. (2021). Microalgae n-3 pufas production and use in food and feed industries. *Marine Drugs*, 19.

Rossi, F. and Philippis, R. D. (2016). *Exocellular Polysaccharides in Microalgae and Cyanobacteria: Chemical Features, Role and Enzymes and Genes Involved in Their Biosynthesis*, pages 565–590. Springer Cham, 1 edition.

Soares, J., Loterio, R. K., Rosa, R. M., Santos, M. O., Nascimento, A. G., Santos, N. T., Williams, T. C. R., Nunes-Nesi, A., and Martins, M. A. (2018). Scenedesmus sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. *Annals of Microbiology*, 68:35–45.

Song, X., Liu, B. F., Kong, F., Ren, N. Q., and Ren, H. Y. (2022). Overview on stress-induced strategies for enhanced microalgae lipid production: Application, mechanisms and challenges. *Resources, Conservation and Recycling*, 183:106355.

Spínola, M. P., Costa, M. M., and Prates, J. A. (2022). Digestive constraints of arthrospira platensis in poultry and swine feeding. *Foods*, 11.

Spínola, M. P., Costa, M. M., and Prates, J. A. (2023). Enhancing digestibility of chlorella vulgaris biomass in monogastric diets: Strategies and insights. *Animals*, 13.

Talec, A., Philistin, M., Ferey, F., Walenta, G., Irisson, J. O., Bernard, O., and Sciandra, A. (2013). Effect of gaseous cement industry effluents on four species of microalgae. *Bioresource Technology*, 143:353–359.

Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T., and Sakamoto, T. (2005). Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium nostoc commune. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:7327.

Tejeda, O. J. and Kim, W. K. (2021). Role of dietary fiber in poultry nutrition. *Animals*, 11:1–16.

Tibbetts, S. M., MacPherson, T., McGinn, P. J., and Fredeen, A. H. (2016). In vitro digestion of microalgal biomass from freshwater species isolated in alberta, canada for monogastric and ruminant animal feed applications. *Algal Research*, 19:324–332.

Tibbetts, S. M., Milley, J. E., and Lall, S. P. (2015). Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27:1109–1119.

USDA-APHIS-VS (2013). Poultry industry manual. foreign animal disease preparedness response plan. https://www.aphis.usda.gov/sites/default/files/poultry$_{i}nd_{m}anual.pdf$.

Watanabe, N., Masubuchi, D., Itoh, M., Teradu, S., Yazawa, H., and Uemura, H. (2014). Oral administration of whole dihomo--linolenic acid-producing saccharomyces cerevisiae suppresses cutaneous inflammatory responses induced by croton oil application in mice. *Applied microbiology and biotechnology*, 98:8697–8706.

Yang, S., Xu, X., Peng, Q., Ma, L., Qiao, Y., and Shi, B. (2023). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, as an alternative to antibiotics, on regulation of intestinal health and the immune system. *Animal Nutrition*, 13:78–89.

Yegani, M., Swift, M. L., Zijlstra, R. T., and Korver, D. R. (2013). Prediction of energetic value of wheat and triticale in broiler chicks: A chick bioassay and an in vitro digestibility technique. *Animal Feed Science and Technology*, 183:40–50.

Zygler, A., Słomińska, M., and Namieśnik, J. (2012). Soxhlet extraction and new developments such as soxtec. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*, pages 65–82.

7. Anexos

7.0.1. Análisis de proteína

La determinación de proteínas en las muestras de biomasa microalgal se cuantifica de manera indirecta basándose en el nitrógeno total, que se determina por medio del método Kjeldahl. El método Kjeldahl implica la digestión del alimento con un ácido fuerte para que el nitrógeno se pueda liberar (Hayes, 2020). Después, este es cuantificado por medio del método de titulación. Este está establecido como el método 984.13 por la AOAC (Latimer, 2023), y se modificó de la siguiente manera:

En un tubo de digestión Kjeldahl, se combinó 1 gramo de muestra de biomasa con 5 gramos de catalizador de sulfato de cobre/sulfato de potasio ($KSO_4/CuSO_4$). El tubo se colocó en un digestor Kjeldahl (Kjeldahl Kjeldahl Digestion System KJD10), y se añadieron 20 mL de ácido sulfúrico al 98 %. El ciclo de digestión se ajustó a una curva de calentamiento de 150°C durante 30 minutos, 210°C durante 20 minutos y 390°C durante 90 minutos. Simultáneamente, los gases producidos se manejaron en un depurador, donde los vapores de agua (H_2O) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) se neutralizaron con hidróxido de sodio (NaOH) y se secaron con carbón activado.

Posteriormente, el tubo Kjeldahl se trasladó al destilador (Hanon K9840 Auto Kjeldahl) para completar el ciclo de destilación. Los valores de lavado se ajustaron diluyendo con 20 mL de agua, añadiendo 150 mL de ácido bórico al 4 % (H_3BO_4), 50 mL de hidróxido sódico al 50 % (NaOH) y lavando con 20 mL de agua durante 20 minutos. La presencia de nitrógeno destilado se detectó por un cambio de color en el ácido bórico (H_3BO_4), dependiendo del indicador empleado.

Una vez finalizada la destilación, el recipiente que contenía el producto se tituló con ácido clorhídrico (HCl) a 0,025 N. Esta operación se realizó en un equipo multiparámetro con agitador magnético (SI Analytics TitroLine® 5000 Titrator) hasta que se detectó un cambio cualitativo de color, en este caso a marrón, y se alcanzó un pH de 4,44, que corresponde al punto de equivalencia teórico del ácido bórico. Esta técnica permitió calcular cuántos mililitros de ácido valorante se consumieron durante la valoración.

Finalmente, utilizando la siguiente fórmula, se obtienen los valores de porcentaje de nitrógeno y proteína total de la muestra:

$$\%Nitrogeno = \frac{(ml\ _{HCl} - ml\ _{Blanco}) \times [HCl] \times 1,407}{g\ _{muestra}}$$

$$\%Proteína = \%Nitrogeno \times 6,25$$

7.0.2. Análisis de grasas

El método de extracción Soxhlet, establecido como el método 920.39 por la AOAC (Latimer, 2023), se utiliza ampliamente para muchos tipos de muestras sólidas, especialmente muestras biológicas y medioambientales. Durante muchos años, este método se ha utilizado como práctica estándar de forma rutinaria para extraer compuestos bioactivos de diversas fuentes naturales (Rakhee et al., 2018; Zygler et al., 2012). El equipo experimental para la extracción utilizado en el método Soxhlet consta de un matraz de destilación, un dedal portamuestra de celulosa, un sifón, y un condensador.

Inicialmente, se tomaron 2 gr de la muestra de microalga seca y se ubicaron en el dedal de celulosa (Whatman 603 extraction thimbles 33x88) Adicionalmente, se purgó el recipiente donde

se realizará la destilación con hexano, se secó a 45°C en un horno previamente calentado, y se pesó con una balanza analítica (SHIMADZU AUW220D).

Una vez tomados estos valores, se ubicaron en el montaje del método Soxhlet con el condensador y el sifón, y este último se llenó con hexano hasta lograr una primera sifonada. Se cerró el montaje ubicando el condensador y el balón, y se mantuvo una temperatura entre 250°C y 300°C durante 4 horas, logrando múltiples sifonadas del hexano durante este procedimiento. Pasadas las 4 horas, se tomó el recipiente donde se realizó la destilación y se virtió lo que quede en el sifón Soxhlet. Se ubicó en el rota-vaporador a 68,7°C, que es el punto de ebullición del hexano, hasta que este este evaporó completamente y en el recipiente sólo quedaron las grasas extraídas.

Finalmente, se pesó el recipiente donde se realizó la destilación nuevamente en una balanza analítica (SHIMADZU AUW220D) y se utilizó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de grasas en la muestra:

$$\%Grasa = \frac{Peso_{f\ recipiente} - Peso_{i\ recipiente}}{g_{\ muestra}} \times 100$$

7.0.3. Análisis de Fibra

Digestión ácida: En un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se combinó 1 g de material de biomasa seco con 100 mL de ácido sulfúrico al 1,25 %. La solución resultante se calentó hasta ebullición durante 30 minutos en una placa calefactora (CORNING PC-420D) y se dejó enfriarla durante 1 minuto. Para eliminar cualquier resto de ácido sulfúrico, la solución se filtró utilizando un sistema de filtrado al vacío con lavados de agua caliente. El residuo filtrado se retiró con una espátula y se devolvió al matraz Erlenmeyer.

Digestión Básica: Al residuo en el matraz Erlenmeyer se añadieron 100 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 1,25 % y se calentó a ebullición en una placa caliente durante 30 minutos. Se dejó durante 1 minuto y la solución resultante se filtró nuevamente utilizando un sistema de filtración al vacío y lavados con agua caliente para conseguir un pH neutro. El residuo del filtrado se recogió y se guardó en un crisol limpio y seco.

Tratamiento final: El crisol con la muestra digerida se introdujo en un horno a 105°C durante 3 horas, seguido de un período de 1 hora en un desecador. Se registró el peso inicial del crisol utilizando una balanza analítica y luego se colocó en una mufla durante 3 horas a 505°C. Después de otro período de 1 hora en el desecador, se registró el peso final del crisol con la muestra en la balanza analítica para obtener el peso final.

Se utilizó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de grasas de la muestra:

$$\%Fibra = \frac{g_{secado} - g_{calcinado}}{g_{\ muestra}} \times 100$$

7.0.4. Análisis de Cenizas y Humedad

La ceniza es el residuo inorgánico que queda después de eliminar el agua y los materiales orgánicos por calentamiento en un horno de mufla. Mide la materia inorgánica o el contenido mineral total de una materia prima. Además, puede proporcionar una evaluación rápida de la contaminación o adulteración. Esta evaluación se llevó a cabo bajo el Método 923.03 establecido por la AOAC (Latimer, 2023) en el Laboratorio de Análisis Fisicoquímico del Centro Argos para La Innovación, en Medellín, Colombia.

7.0.5. Análisis de carbohidratos

Para la determinación de la cantidad de carbohidratos en los alimentos, se hizo por diferencia del valor 100 restado de los contenidos nutricionales ya establecidos por las evaluaciones mencionadas adicionalmente de proteína, grasa, humedad, cenizas y fibra.

7.0.6. Revisión de Composición de Torta de Soya

La harina de soya o torta de soya (SBM) es la principal fuente de proteína y aminoácidos en las dietas avícolas en todo el mundo (Aguirre et al., 2022). La composición nutricional de esta puede variar por sus métodos de producción y la forma que se emplea, como se comercializa, entre otros factores. Para conocer las necesidades alimenticias de las gallinas a la hora de desarrollar un suplemento alimenticio, se realizó la siguiente matriz de comparación:

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**Promedio**
Humedad	12 %	9,17 %	12 %	12 %	12 %	10 %	13 %	**11,45 %**
Proteína	46 %	30,58 %	44 %	46,30 %	46,30 %	45,50 %	46 %	**43,53 %**
Fibra	3,30 %	4,92 %	7 %	4,945 %	4,19 %	3,40 %	4 %	**4,54 %**
Grasas	1,6 %	24,6 %	0,5 %			1,50 %	4 %	**6,4 %**
Cenizas	6 %	3,23 %		6,713 %	6,595 %		7 %	**5,908 %**
Carbohidratos	31,1 %	27,5 %						**27,5 %**

Tabla 2: Comparison table of the macronutritional composition of soybean meal. 1) AgroColanta, 2) Akpomie et al. (2020), 3) SoyMeal Org, 4) Ibáñez et al. (2020), 5) Aguirre et al. (2020), 6) Garzón (2006), 7) Itacol.