

TESIS DE MAESTRÍA

Maestría en Procesos Biotecnológicos

Título:

“Influencia del mezclado en la producción de biomasa y composición bioquímica de *Spirulina platensis* LMPA-55”

Autor: Ing. Maximiliano Cristian Javier Argumedo Moix
Director de Tesis: Dr. Víctor Daniel Busto

Buenos Aires - 2018

Agradecimientos

A la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires, por brindar la posibilidad de formarme.

Al Departamento de Ingeniería Química de la Facultad Regional Buenos Aires, por el acompañamiento desde el primer día.

A mis docentes, de quienes obtuve no solo conocimientos académicos.

A la Dra. Ana María Giuliatti y al Dr. Isaac Marcos Cohen.

Al Dr. Víctor Daniel Busto, por su orientación y dirección.

A la Ing. María del Carmen Gutierrez, mi "madre" académica.

Al Ing. Ricardo "el Tano" Mateucci y la Ing. Paola Álvarez, "Poly", compañeros y amigos.

A mis padres y mi hermano, gracias a ellos soy quién soy.

A Karina, Clemente, Tina y Tito, la razón de mi felicidad, esto es para ustedes.

Índice

1. Resumen abstract.....	1
1.1. Resumen.....	1
1.2. Abstract.....	3
2. Introducción.....	5
2.1. Generalidades de las microalgas.....	5
2.2. Spirulina / Arthrospira	6
2.3. Composición bioquímica de <i>S. platensis</i>	9
2.4. Aplicaciones de <i>S. platensis</i>	12
2.5. Importancia del mezclado en el cultivo de <i>S. platensis</i>	14
3. Hipótesis	19
4. Objetivos.....	20
4.1. Objetivos Específicos.....	20
5. Materiales y Métodos	21
5.1. Microalga	21
5.2. Mantenimiento de la cepa.....	21
5.3. Medio de cultivo de <i>S. platensis</i>	22
5.4. Ensayo en Erlenmeyer agitado.....	23
5.5. Ensayo en columnas de burbujeo.....	24
5.6. Ensayo en Biorreactor de Tanque Agitado	25
5.7. Determinación de la biomasa microalgal.....	27
5.8. Estimación de parámetros cinéticos de crecimiento.....	27
5.8.1. Velocidad específica de crecimiento.....	27
5.8.2. Tiempo de duplicación.....	28
5.8.3. Índice de crecimiento.....	28
5.9. Técnicas Analíticas.....	28
5.9.1. Proteínas totales	29
5.9.2. Hidratos de carbono totales	30
5.9.3. Lípidos totales	32
5.9.4. Clorofila y Carotenoides.....	34
5.9.5. Ficobiliproteínas	37
5.10. Determinación de pH	38
5.11. Determinación del coeficiente de transferencia de masa (kLa)	38
5.11.1. Método dinámico.....	39
5.11.2. Método sulfito	40
5.11.3. Determinación del coeficiente de transferencia de masa referido a CO ₂ (kLa _{CO2}).....	42

5.12. Cálculo de la velocidad de disipación de energía P/V (potencia volumétrica).....	43
5.13. Cálculo de la longitud crítica del remolino λ (eddy)	44
5.14. Volumen total de la fase gaseosa retenida ε (hold-up)	45
5.15. Programas utilizados	45
5.16. Tratamiento de datos y análisis estadístico	45
6. Resultados	47
6.1. Ensayo en Erlenmeyer agitado.....	47
6.1.1. Ensayo en Erlenmeyer agitado de 500 mL sin deflectores	47
6.1.2. Ensayo en Erlenmeyer agitados de 500 mL con deflectores.....	52
6.2. Ensayo en columna de burbujeo	58
6.3. Cultivo en biorreactor de tanque agitado.....	64
7. Discusión.....	71
7.1. Cultivos en Erlenmeyer agitados	71
7.2. Cultivos en columnas de burbujeo.....	74
7.3. Cultivos en biorreactor tanque agitado.....	75
7.4. Evolución del pH en los tres sistemas de cultivo	76
7.5. Composición bioquímica de <i>Spirulina platensis</i> en los tres sistemas de cultivo	77
7.6. Evaluación de los tres sistemas de cultivo	78
8. Conclusión.....	81
9. Bibliografía	83

Índice de figuras

Figura 1 – <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i>	7
Figura 2 – Reproducción de <i>Spirulina</i> sp. (Sánchez, 2003/b).....	8
Figura 3 – Estructura de un ficobilisoma. Adaptada de Sonani et al. (2016)	10
Figura 4 – Trayectoria de la luz y de los ciclos de luz oscuridad en cultivos microalgales	15
Figura 5 – cultivo estacionario (izquierda y derecha) cultivo agitado (centro).	24
Figura 6 – Cultivo en columna de burbujeo con difusores y sin difusores.	25
Figura 7–Ensayo en biorreactor tanque agitado: a. primer día del cultivo, b. décimo día de cultivo, c. quinceavo día de cultivo.	26
Figura 8 – Complejo Biuret Cu^{2+} con nitrógenos peptídicos	29
Figura 9 – Curva de calibración para el método de Lowry.	30
Figura 10 – Reacción de hidrólisis en medio ácido de hexosas y pentosas.	31
Figura 11 – Curva de calibración para hidratos de carbono.....	32
Figura 12 – Mecanismo de reacción, generación del electrófilo.	32
Figura 13 – Mecanismo de reacción, activación del oxígeno del grupo carbonilo mediante el ácido fosfórico.	33
Figura 14 – Mecanismo de reacción, ataque del electrófilo.....	33
Figura 15 – Curva de calibración para lípidos.	34
Figura 16 – Carotenos presentes en <i>Spirulina platensis</i>	36
Figura 17 – Clorofila A.	36
Figura 18 – Extracto de clorofila y carotenoides.....	37
Figura 19 – coloración de ficocianina.	38
Figura 20 – Curva de crecimiento expresada en biomasa (g PS/L) de <i>S. platensis</i> versus tiempo para el ensayo en Erlenmeyers agitados de 500 mL.....	47
Figura 21 – Evolución del pH de los cultivos de <i>S. platensis</i> utilizando Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a 100 y 150 r.p.m.	49
Figura 22 – Contenido de proteínas de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación.	49
Figura 23 – Contenido de hidratos de carbono de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación.	50
Figura 24 – Contenido de lípidos de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación.....	50
Figura 25 – Contenido de clorofila A de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación.	51
Figura 26 – Contenido de carotenoides de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación.	51
Figura 27 – Contenido de ficocianina de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación.	51
Figura 28 – Contenido de aloficocianina de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación.	52
Figura 29 – Curvas de crecimiento de <i>S. platensis</i> obtenidas utilizando Erlenmeyers con deflectores de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación.....	53
Figura 30 – Evolución del pH de los cultivos de <i>S. platensis</i> utilizando Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyer bafleados de 500 mL agitados a 100 y 150 r.p.m.....	54
Figura 31 – Contenido de proteínas de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers bafleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación.	55
Figura 32 – Contenido de hidratos de carbono de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y y Erlenmeyers bafleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación.....	55

Figura 33 – Contenido de lípidos de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers bafleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación.....	56
Figura 34 – Contenido de clorofila A de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers bafleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación.	56
Figura 35 – Contenido de carotenoides de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers bafleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación.	57
Figura 36 – Contenido de ficocianina de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers bafleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación.....	57
Figura 37 – Contenido de aloficocianina de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers bafleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación.	58
Figura 38 – Curvas de crecimiento de <i>S. platensis</i> obtenidas utilizando columnas de burbujeo de 200 mL con difusor (D1 y D2) y sin difusor (SD1 y SD2) con distintos caudales de aireación.	58
Figura 39 - Curvas de crecimiento de <i>S. platensis</i> obtenidas utilizando columnas de burbujeo de 200 mL con difusor (D1 y D2) y distintos caudales de aireación.	59
Figura 40 - Curvas de crecimiento de <i>S. platensis</i> obtenidas utilizando columnas de burbujeo de 200 mL sin difusor (SD1 y SD2) y distintos caudales de aireación.	59
Figura 41 – Evolución del pH de los cultivos de <i>S. platensis</i> utilizando Columnas de burbujeo de 200 mL con difusor (D1, D2) y sin difusor (SD1, SD2), a distintos caudales de aireación.	61
Figura 42 – Contenido de proteínas de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2)	61
Figura 43 – Contenido de hidratos de carbono de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2).....	62
Figura 44 – Contenido de lípidos de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2).....	62
Figura 45 – Contenido de clorofila A de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2)	63
Figura 46 – Contenido de carotenoides de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2)	63
Figura 47 – Contenido de ficocianina de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2)	64
Figura 48 – Contenido de aloficocianina de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2)	64
Figura 49 – Curva de crecimiento de <i>S. platensis</i> creciendo en un biorreactor de tanque agitado de 3 L a una velocidad de agitación de 250 r.p.m.....	65
Figura 50 – Curva de pH de <i>S. platensis</i> versus tiempo para el ensayo en biorreactor tanque agitado.	66
Figura 51 - Curvas de crecimiento de <i>S. platensis</i> creciendo en un biorreactor de tanque agitado y en Erlenmeyers de 500 mL agitados a 100 r.p.m.....	66
Figura 52 - Contenido de proteínas de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m.	68
Figura 53 – Contenido de hidratos de carbono de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m.....	68
Figura 54 – Contenido de lípidos de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m	69
Figura 55 – Contenido de clorofila A de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m.....	69
Figura 56 – Contenido de carotenoides de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m.....	69
Figura 57 – Contenido de ficocianina de cultivos de <i>S. platensis</i> creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m.....	70

<i>Figura 58 – Contenido de aloficocianina de cultivos de S. platensis creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 59 – Efecto del pH en la concentración de CO₂.</i>	<i>77</i>

Índice de tablas

Tabla 1 - Principales características que separan a los géneros <i>Arthrospira</i> de <i>Spirulina</i>	7
Tabla 2 – Composición de aminoácidos de <i>S. platensis</i>	9
Tabla 3 – Composición de vitaminas de <i>S. platensis</i>	10
Tabla 4 – Composición de ácidos grasos <i>S. platensis</i>	10
Tabla 5 – Composición de pigmentos de <i>S. platensis</i>	11
Tabla 6 – Composición de hidratos de carbono de <i>S. platensis</i>	11
Tabla 7 – Composición de minerales de <i>S. platensis</i>	11
Tabla 8 – Formulación del medio de cultivo Zarrouk.	22
Tabla 9 – Condiciones de cultivo en Erlenmeyers estáticos y agitados.	23
Tabla 10 – Condiciones de cultivo en Erlenmeyers bafleados estáticos y agitados.	24
Tabla 11 – Condiciones de cultivo en columna de burbujeo.	25
Tabla 12 – Condiciones de cultivo biorreactor tanque agitado.	26
Tabla 13 – Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>S. platensis</i> , coeficiente de transferencia de masa para el CO ₂ , velocidad de disipación de energía y longitud crítica del remolino para el ensayo en Erlenmeyers agitados de 500 mL.	48
Tabla 14 – Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>S. platensis</i> , coeficiente de transferencia de masa para el CO ₂ , velocidad de disipación de energía y longitud crítica del remolino para el ensayo en Erlenmeyers bafleados de 500 mL agitados.	54
Tabla 15 – Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>S. platensis</i> , coeficiente de transferencia de masa para el CO ₂ , y volumen total de la fase gaseosa retenida (hold-up) en columnas de burbujeo con y sin difusores a diferentes caudales de aireación. D= con difusor; SD= sin difusor.	60
Tabla 16 – Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>S. platensis</i> , coeficiente de transferencia de masa para el CO ₂ , velocidad de disipación de energía y longitud crítica del remolino para el ensayo biorreactor tanque agitado a 250 r.p.m.	65
Tabla 17 – Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>S. platensis</i> , coeficiente de transferencia de masa para el CO ₂ , velocidad de disipación de energía y longitud crítica del remolino para el ensayo biorreactor tanque agitado a 250 r.p.m. y los cultivos en Erlenmeyer de 500 mL agitados a 100 r.p.m.	67
Tabla 18 – Comparación de valores de <i>k_{la}</i> obtenidos por Értola et al. (1965) con valores de <i>k_{la}</i> de este estudio. Valores de transferencia expresados para O ₂	71
Tabla 19 – Números de fase obtenidos para cultivos de <i>S. platensis</i> en Erlenmeyers sin deflectores agitados a distintas velocidades.	73
Tabla 20 – Composición bioquímica de <i>S. platensis</i> resultante de los tres sistemas de cultivo ensayados.	78
Tabla 20 – Comparación de los parámetros más relevantes de cada sistema evaluado para el cultivo de <i>S. platensis</i> . Los datos mostrados de biomasa fueron determinados a los 14 días de cultivo.	78

Índice de ecuaciones

Ecuación 1 – Correlación de biomasa g PS/L a partir de $DO_{560\text{ nm}}$ para el cultivo de <i>S. platensis</i>	27
Ecuación 2 – Tiempo de duplicación.....	28
Ecuación 3 – Índice de crecimiento	28
Ecuación 4 – Correlación de concentración de clorofila A	35
Ecuación 5 – Correlación de concentración de carotenoides	35
Ecuación 6 – Correlación de concentración de ficocianina.....	37
Ecuación 7 – Correlación de concentración de aloficocianina.....	37
Ecuación 8 – Ecuación de kla en función de la concentración a un dado tiempo.....	40
Ecuación 9 – Ecuación del kla para el método sulfito	42
Ecuación 10 – Corrección del kla expresado para CO_2	42
Ecuación 11 – Número de Reynolds.	43
Ecuación 12 – Número de potencia para dinoflagelados.....	43
Ecuación 13 – Número de potencia.....	44
Ecuación 14 – Velocidad de disipación de energía (potencia volumétrica).....	44
Ecuación 15 – Longitud crítica de remolino (eddy).	44
Ecuación 16 – Ecuación para el cálculo del volumen retenido ε (Hold up).....	45
Ecuación 17 – Número de fase definido por Büchs et al. (2001).....	73
Ecuación 18 – Número de Reynolds para la película líquida.	73

1. Resumen | *abstract*

1.1. Resumen

Las cianobacterias son microorganismos eficientes en la conversión de energía solar y en la fijación de CO₂. Además, producen una gran variedad de metabolitos de interés. Pueden ser utilizadas como suplementos en alimentación humana y de animales, como productos nutraceuticos, para el tratamiento de aguas residuales, en la industria de cosméticos y en la agricultura como biofertilizantes entre otros. Incluso en la actualidad son el centro de atención para la producción de biocombustibles.

En este trabajo se estudió la influencia de distintos sistemas de mezclado sobre la producción de biomasa y la composición bioquímica de la cianobacteria *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Se clasificó a cada sistema de mezclado como: agitación mecánica (Erlenmeyers agitados), agitación neumática (columnas de burbujeo), y una combinación de ambos sistemas de mezclado (biorreactor de tanque agitado). Se analizaron los parámetros cinéticos de crecimiento, como la velocidad específica de crecimiento (μ), el tiempo de duplicación (td) y el índice de crecimiento (IC). Se analizaron parámetros característicos y asociados a cada tipo de mezclado, como el coeficiente de transferencia de masa referido al CO₂ (kla_{CO_2}), la velocidad de disipación de energía (P/V) y la longitud crítica del remolino de Kolmogorov (λ). Finalmente, se analizó la composición bioquímica de los cultivos (contenido de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, y pigmentos).

La producción de biomasa microalgal se encontró favorecida por el mezclado, ya que éste mejora el acceso a los nutrientes, el intercambio gaseoso y la disponibilidad de la luz. Se observó que la velocidad específica de crecimiento y la producción de biomasa de *S. platensis* fue en incremento a medida que se aumentaron la velocidad de agitación de los Erlenmeyers agitados y el caudal de aireación en las columnas de burbujeo, lo cual sería resultado del incremento del coeficiente de transferencia de CO₂ (kla_{CO_2}). La adición de deflectores a los Erlenmeyers afectó positivamente al kla_{CO_2} , y en consecuencia a la producción de biomasa. La concentración de biomasa en el biorreactor de tanque agitado resultó menor a la obtenida en Erlenmeyers agitados, posiblemente por la baja relación superficie iluminada/volumen de cultivo, los fenómenos de sombreado celular, el estrés hidrodinámico y un valor inferior del kla_{CO_2} . Los cultivos de *S. platensis* llevados a cabo en columnas de burbujeo arrojaron los mejores resultados respecto a la concentración de biomasa microalgal, en comparación con el biorreactor de tanque agitado y los Erlenmeyers agitados.

La composición bioquímica de *S. platensis* no se vió afectada por ninguno de los sistemas de mezclado para cada una de las biomoléculas evaluadas.

Existiría una estrecha relación entre la producción de biomasa y el kla_{CO_2} en todos los sistemas de cultivo evaluados, lo que posibilitaría la utilización del kla_{CO_2} constante como criterio de escalado para el cultivo de *S. platensis*.

Palabras clave: microalgas, spirulina, mezclado, biomasa.

1.2. Abstract

Cyanobacteria are efficient microorganisms in the conversion of solar energy, CO₂ fixation and also produce a variety of metabolites of interest. They are used as supplements in human and animal feed, as nutraceutical products, for the treatment of wastewater, in cosmetics industry and agriculture as biofertilizers, among others. Even today they are the center of attention for the production of biofuels.

In this work, the influence of different types of mixing on the production of biomass and the biochemical composition of the cyanobacterium *Spirulina (Arthrospira) platensis* was studied. Each type of mixing was classified as: mechanical mixing (shake flasks), pneumatic mixing (bubble columns), and a combination of both type of mixing (stirred tank bioreactor). Growth kinetic parameters were analyzed, such as specific growth rate (μ), doubling time (td) and growth index (ID). Characteristic and associated parameters of each type of mixing were also analyzed, such as the mass transfer coefficient for CO₂ (kl_{aCO_2}), energy dissipation rate (P/V) and critical length of Kolmogorov eddy (λ). Finally, biochemical composition was analyzed for each microalgae culture (proteins, carbohydrates, lipids and pigments content).

The production of microalgae biomass was promoted by mixing, since it improves nutrients access, gas exchange and availability of light. It was observed that specific growth rate and biomass production of *S. platensis* was increasing as the agitation speed of shake flasks and air flow rate in bubble columns were increased, which would result as a consequence of CO₂ transfer coefficient (kl_{aCO_2}) increase. The addition of deflectors to shake flasks affected positively the kl_{aCO_2} , and consequently the biomass production. The biomass concentration in the stirred tank bioreactor was lower than that obtained in shake flasks, possibly due to the low illuminated surface area / volume of culture, the phenomena of cellular shading, the hydrodynamic stress and a lower value of kl_{aCO_2} . The cultures of *S. platensis* carried out in bubble columns gave the best results related to microalgae biomass concentration, in comparison with the stirred tank bioreactor and the shake flasks.

The biochemical composition of *S. platensis* was not affected by any of the mixing systems for each of the biomolecules evaluated.

There would be a close relationship between biomass production and kl_{aCO_2} in all the culture systems evaluated, which would make constant kl_{aCO_2} a possible scale up criterion for *S. platensis* cultures.

Key words: microalgae, spirulina, mixed, biomass.

2. Introducción

2.1. Generalidades de las microalgas

Las microalgas constituyen un amplio y diverso grupo de microorganismos fotosintéticos que pueden crecer de manera autotrófica, heterotrófica o mixotrófica. Este grupo incluye varios cientos de especies, tanto eucariotas como procariotas, siendo algunas fijadoras del nitrógeno atmosférico.

Se encuentran entre los organismos más antiguos conocidos, existiendo depósitos fósiles de cerca de 3.000 millones de años. (Ramírez y Roxana, 2006).

En general son altamente eficientes en la fijación de dióxido de carbono y en la utilización de la energía solar para producir biomasa liberando oxígeno a la atmósfera. El proceso de fotosíntesis es indispensable para regular el contenido de oxígeno y dióxido de carbono en la atmósfera (Travieso y Benitez Echegoyen, 1998).

Entre los procariotas autótrofos existen tres tipos de bacterias fotosintéticas: las bacterias verdes, las bacterias fotosintéticas purpúreas y las cianobacterias.

Las cianobacterias en sus características generales son un grupo de microorganismos que está compuesto por más de 2000 especies. Comprende distintos tamaño que van desde 0,5 a 40 micrones, los cuales pueden presentar formas unicelulares, coloniales o filamentosas; con o sin formación de mucílago, conteniendo en muchos casos vesículas de gas, las cuales les permiten elegir la profundidad en el cuerpo de agua según las necesidades nutricionales del medio, adaptándose a las distintas condiciones de luz y disponibilidad de nutrientes. Este grupo de microorganismos son reconocidos por su habilidad para mantenerse en ambientes extremos, los cuales pueden incluir aguas termales de aproximadamente 80°C, ecosistemas polares e inclusive pueden estar a varios grados bajo cero. Las cianobacterias, a su vez, pueden estar presentes en muchos de estos ecosistemas adversos para otras formas de vida con altos índices de salinidad. Tienen la habilidad de sobrevivir a largos períodos con poca disponibilidad de agua y algunas de sus especies pueden producir una vaina pigmentaria externa que les proporciona la habilidad de sobrevivir en ambientes de alta radiación UV (Graham y Wilcox, 2000).

La morfología básica de las cianobacterias comprende formas unicelulares, coloniales multicelulares y las formas filamentosas. Las formas unicelulares como en el caso del orden Chroococcales, son células esféricas, ovoides o cilíndricas. Las formas más simples en las cianobacterias son la de organismos unicelulares, de vida libre incluida o no sobre una capa mucilaginoso. La subsecuente evolución resultó en la formación de una fila de células llamada tricomas.

Las células de cianobacterias no presentan núcleo delimitado ya que por su carácter de bacteria carece de membrana nuclear. Al ser un organismo procariota fotoautótrofo, realiza fotosíntesis con liberación de oxígeno al igual que organismos fotosintéticos superiores como las plantas. Su color característico verde azulado lo obtienen gracias a la presencia de

pigmentos como la clorofila A, la cual que le aporta el color verde, y las ficocianinas o ficobilinas las cuales aportan el color azul. Estas ficobilinas pueden enmascarar en algunos casos a la clorofila (Chorus, 2001).

Las cianobacterias poseen diferentes esquemas metabólicos que tienen en común la ausencia del ciclo de Krebs completo. Muchas de ellas, sobre todo las filamentosas, son capaces de reducir (fijar) el nitrógeno atmosférico, gracias a unas estructuras llamadas heterocistos (Abbayes, 1989).

Las cianobacterias asimilan el carbono a través del ciclo de Calvin, y almacenan energía y carbono en forma de glucógeno (Rheinheimer, 1987).

2.2. *Spirulina* / *Arthrospira*

El término "*Spirulina*" ha sido ampliamente utilizado para referirse indistintamente a dos géneros: *Arthrospira* (Stizenberger 1852) y *Spirulina* (Turpin 1829); así como a dos especies de cianobacterias: *S. platensis* (Geitler 1932) y *S. maxima* (Geitler 1925). Estas últimas tienen importancia económica, por ser cultivadas y comercializadas para elaborar una gran cantidad de productos a los que se les atribuyen propiedades nutritivas y de prevención de la salud. Sin embargo, desde 1989 se ha reconocido que estos dos géneros son distintos, y que en realidad estas especies pertenecen al género *Arthrospira* (Tomaselli, 1997; Vonshak y Tomaselli, 2000; Sánchez et al., 2003).

La designación actual de *Spirulina* para especies del género *Arthrospira*, especialmente para *A. platensis*, tiene un significado más tradicional, tecnológico y práctico que uno taxonómico. Sin embargo, esta designación a menudo puede crear confusión. Es importante destacar que el género *Arthrospira* es diferente y filogenéticamente distante de la *Spirulina*, aunque comparten la misma forma espiral (Vonshak, 2002).

Spirulina platensis es una microalga perteneciente a las cianobacterias, una microalga verde azulada procarionta cuyo crecimiento es principalmente fotoautótrofo y son no diferenciadas (Rippka et al., 1979), multicelulares. Sus células cilíndricas tienen un ancho de 3 a 12 μm , y a veces hasta 16 μm , agrupándose en tricomas helicoidales de aspecto filamentosos (**figura 1**). Sus tricomas (filamentos) tienen un patrón de arreglo en forma de hélice abierta y llegan a medir 100-200 μm y hasta 500 μm (Sánchez et al., 2003); la inclinación de una vuelta de la hélice (helix pitch) generalmente varía de 10 a 70 μm , y el diámetro de la misma mide de 20 a 100 μm . Estas dos últimas características dependen en gran medida de las condiciones ambientales y de crecimiento. Tiene un alto contenido proteico y son aplicadas industrialmente para alimentación de animales y de humanos como así también para el tratamiento de aguas residuales. Algunas de las especies utilizadas en la industria son *S. platensis* y *S. máxima*. Entre éstas también existen diferencias morfológicas en cuanto a los filamentos, las vacuolas y la regularidad externa de la cubierta o la cápsula de cada filamento, que ayudan a la identificación taxonómica de las diferentes especies (Tomaselli, et al. 1996).

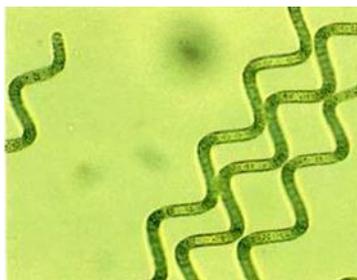


Figura 1 – *Spirulina (Arthrospira) platensis*.

Tabla 1 - Principales características que separan a los géneros *Arthrospira* de *Spirulina*.

Carácter	<i>Arthrospira</i>	<i>Spirulina</i>
Diámetro del tricoma	2,5 – 16 μm	0,5 – 5 μm
Tipo de hélice	Hélice abierta	Hélice cerrada
Septos	Visibles al microscopio de luz	Invisibles al microscopio de luz
Patrón de poros de la pared celular	Una fila alrededor del tricoma	Varias filas en la parte cóncava de la hélice
Tipo de fragmentación	Intracelular (necridio)	Intercelular
Cuerpos cilíndricos	Presentes	Ausentes
Fotosíntesis anoxigénica	Ausente	Presente en algunas cepas
C-ficoeritrina	No encontrada	Presente en algunas cepas
Ácido g-linolénico	presente	Ausente

Modificado por Vonshak y Tomaselli (2000).

La reproducción se lleva a cabo por fisión binaria transversal (**figura 2**). El alargamiento del tricoma se debe a numerosas divisiones transversales de las células del mismo. La multiplicación ocurre solo por fragmentación, y la fragmentación del tricoma es intracelular, involucrando la destrucción de la célula intercalar (Vonshak y Tomaselli, 2000).

El tricoma maduro se divide en varios filamentos, gracias a la formación previa de células especializadas, llamadas células de necridio, que se caracterizan por tomar un aspecto granuloso. Sus tabiques transversales se abomban fuertemente y la célula se vuelve bicóncava, la materia de la célula se reabsorbe para permitir la fragmentación. La ruptura celular ocurre por zonas conocidas como disyuntores. Para este proceso el tricoma crece longitudinalmente y toma su forma típica helicoidal (Abbeyes, 1989; Berry, et al., 2003).

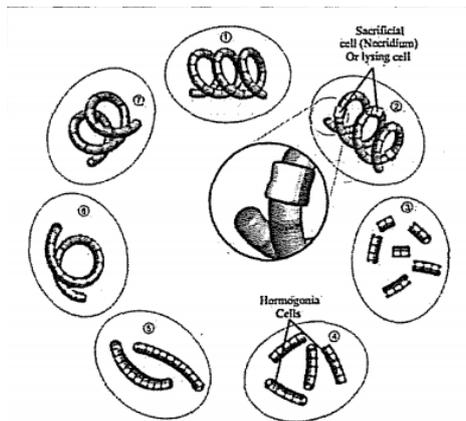


Figura 2 – Reproducción de *Spirulina* sp. (Sánchez, 2003/b)

Las células de *Arthrospira*, al igual que las de otras cianobacterias, poseen una membrana plasmática rodeada por una pared celular multiestratificada, Gram-negativa, caracterizada por tener una fila de poros alrededor del tricoma; además estas se encuentran separadas por septos que son visibles al microscopio de luz (Sánchez et al., 2003; Vonshak y Tomaselli, 2000). La pared está envuelta por una cápsula o vaina compuesta de polisacáridos (Fay, 1983).

La mayoría de las especies del género *Arthrospira* se han encontrado habitando cuerpos de agua alcalinos, donde crecen de forma masiva. Sin embargo, algunas se encuentran presentes en cuerpos de agua dulce como ríos, manantiales y estanques. Y aunque no hay reportes para el ambiente marino, con un adecuado suplemento de HCO_3^- , Na^+ y K^+ en conjunto con pH y salinidad adecuados, las especies de *Arthrospira* pueden ser altamente productivas en agua de mar (Vonshak y Tomaselli, 2000).

En presencia de fuentes de carbono orgánico puede comportarse como mixotrofo o incluso heterótrofo. Urea y amonio son las fuentes de nitrógeno recomendadas. Trazas de cobalto, cobre, manganeso, molibdeno, níquel, vanadio y cinc son indispensables.

El crecimiento de *Spirulina* sp. presenta las siguientes fases de desarrollo: (Becker, 1982)

- Fase de adaptación
- Fase de crecimiento exponencial
- Fase de crecimiento lineal
- Fase estacionaria
- Fase de muerte

Durante la primer fase el cultivo se adapta a las condiciones en las que se lleva a cabo, la velocidad de crecimiento específico es baja y se incrementa con el tiempo del cultivo. En la fase de crecimiento exponencial, el cultivo de *Spirulina* se ha adaptado a las condiciones del cultivo y la velocidad de crecimiento es la más alta. El crecimiento continúa hasta la tercer fase, la fase de crecimiento lineal, en la cual la multiplicación celular es tal que las células se ocultan unas sobre otras. Esto provoca una disminución de la luz que llega a cada célula,

reduciendo la velocidad de crecimiento. Esta fase continúa hasta llegar a una inhibición en el crecimiento debido al agotamiento de nutrientes, momento en el que comienza la fase estacionaria. En este punto de crecimiento, la curva de crecimiento presenta un valor máximo de concentración de biomasa. En la última fase, fase de muerte, las células mueren liberando materia orgánica al medio. Esa fase es causada por condiciones desfavorables del ambiente, nutrientes y acceso de luz limitados (Nascimento, 1990, Becker, 1982).

2.3. Composición bioquímica de *S. platensis*

Su composición proteica se encuentra entre 50 y 70% en peso seco, los lípidos entre 5 y 11% en peso seco. Además posee aminoácidos esenciales, ácidos grasos como el ácido linoléico y el γ -linoléico. También posee galactosildiglicéridos y fosfatidilgliceroles, carotenoides y ficobiliproteínas. (Borowitzka, Borowitzka, 1988).

La **tabla 2** contiene la composición de proteínas y aminoácidos, modificada por Cohen (1997), Sasson (1997) y Sanchez et al. (2003).

Tabla 2 – Composición de aminoácidos de *S. platensis*.

Aminoácido	%
Leucina	5,9 – 6,5
Valina	7,5
Isoleucina	6,8
Lisina	2,6 – 3,3
Fenilalanina	2,6 – 3,3
Metionina	1,3 – 2,0
Triptofano	1,0 – 1,6
Ácido glutámico	7,3 – 9,5
Ácido aspártico	5,2 – 6,0
Cisteína	0,5 – 0,7

Las ficobiliproteínas son macromoléculas componentes del aparato fotosintético de las cianobacterias, y consisten de proteínas unidas covalentemente a las ficobilinas. Las ficobiliproteínas se dividen en tres grupos: ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) y aloficocianina (AP). Estas moléculas están arregladas en partículas llamadas ficobilisomas (Apt y Behrens, 1999; Fay, 1983; Olvera-Ramírez et al., 2003). Según su origen microalgal, rodophyta, bangiophyceae y cyanophyta, se las denomina R, B y C, respectivamente (Bryant et al., 1978; Gantt, 1981).

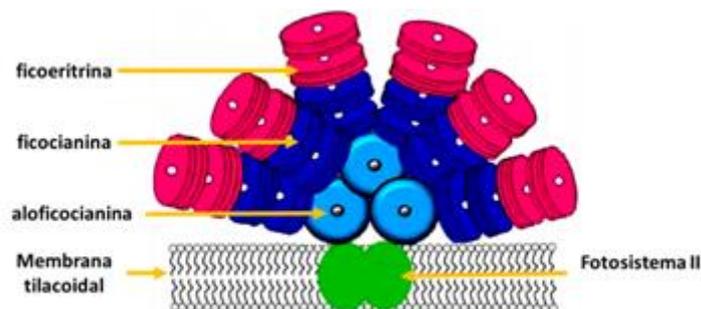


Figura 3 – Estructura de un ficobilisoma. Adaptada de Sonani et al. (2016)

Es una gran fuente de vitaminas, aporta vitaminas del complejo B, en particular vitamina B12. La **tabla 3** contiene la composición de las vitamina, modificada por Cohen (1997), Sasson (1997) y Sanchez et al. (2003).

Tabla 3 – Composición de vitaminas de *S. platensis*.

Vitamina	%
Provitamina A	0,11 – 0,2
Tiamina B1	3 – 4 mg
Riboflavina B2	2,5 – 3,5 mg
Niacina B3	0,014
Vitamina B6	0,5 – 0,7 mg
Cobalamina B12	0,15 – 0,25 mg
Vitamina E	5 – 7 mg
Vitamina K	2,2 mg
Ácido fólico	4 – 5 mg
Ácido pantoténico	0,5 – 0,8 mg
Biotina	5 µg

Contiene entre 3 – 6,5 % de ácidos grasos (% en base al peso seco). La **tabla 4** contiene la composición de los distintos ácidos grasos, modificada por Cohen (1997), Sasson (1997) y Sanchez et al. (2003).

Tabla 4 – Composición de ácidos grasos *S. platensis*.

Ácidos grasos	%
Ácido mirístico	0,23
Ácido palmítico	44,6 - 54,1
Ácido palmitoleico	1,26
Ácido γ -linolénico	8 – 32
Ácido oleico	1 – 15,5
Otros	20,88

La **tabla 5** contiene la composición de los distintos pigmentos, modificada por Cohen (1997), Sasson (1997) y Sanchez et al. (2003).

Tabla 5 – Composición de pigmentos de *S. platensis*.

Pigmento	%
Clorofina A	0,8 – 1,5
Carotenoides	0,648
β -caroteno	15
Equinenona	11 – 13
β -criptoxantina	6 – 8
3'-hidroxiequinenona	7 – 11
Zeaxantina	25
Diatoxantina	5
Cantaxantina	5
Mixoxantina	13 – 17
Oscillaxantina	3 – 5
No identificados	3 – 4
Ficocianina	16 – 20

Contiene entre 15 – 20 % de hidratos de carbono (% en base al peso seco). La **tabla 6** contiene la composición de los distintos hidratos de carbono, modificada por Cohen (1997), Sasson (1997) y Sanchez et al. (2003).

Tabla 6 – Composición de hidratos de carbono de *S. platensis*.

Hidrato de carbono	%
Glicerol	7,4
Glucosa	7,5
Ramnosa	17,1
Fucosa	3,3
Ribosa	8,1
Xilosa	4,5
Manosa	1,9
Galactosa	8,2
D-Glucosamina	2,12
No identificados	2,6

Contiene 7 % de minerales (% en base al peso seco). La **tabla 7** contiene la composición de los distintos minerales, modificada por Cohen (1997), Sasson (1997) y Sanchez et al. (2003).

Tabla 7 – Composición de minerales de *S. platensis*.

Mineral	%
Potasio	1 – 14
Sodio	0,45 – 0,5
Fósforo	0,3 – 0,7
Calcio	0,1 – 0,4
Magnesio	0,1 – 0,2
Hierro	0,03 – 0,05
Manganeso	0,005
Zinc	0,003
Cobre	0,0012
Cromo	0,28 mg

2.4. Aplicaciones de *S. platensis*

Las biomásas microalgales han sido producidas y aplicadas industrialmente en diferentes áreas, tales como la alimentación humana (como suplementos nutricionales) y de animales (alimentos para peces y crustáceos) (Knuckey et al., 2006), los productos nutracéuticos (Shi et al., 2002), la obtención de pigmentos (Del Campo et al., 2007), y el tratamiento de aguas residuales (Delanoue et al, 1992; Lan y Wang, 2010; Wang y Lan, 2011a). Además, se las han utilizado en industrias de cosméticos y en la agricultura como biofertilizantes (Markou y Georgakakis, 2011). La *Spirulina* es extremadamente adaptable y crece en una amplia variedad de entornos incluyendo agua fresca, arroyos tropicales, agua salada y estanques salinos.

Asimismo, una aplicación importante del cultivo de microalgas es la producción de biomasa con fines energéticos. Las microalgas producen biomasa que puede ser convertida en energía o utilizada como un portador de energía a través de un número de procesos de conversión energética. Estos procesos incluyen la conversión termoquímica (gasificación, combustión directa y pirólisis), la conversión bioquímica (fermentación anaerobia, digestión anaerobia y producción de hidrógeno fotobiológico) y la esterificación de los ácidos grasos para la producción de biodiesel (Markou y Georgakakis, 2011). En las últimas tres décadas la producción de biocombustibles basada en biomasa microalgal se ha establecido como una de las alternativas más prometedoras a los combustibles fósiles (Li et al, 2008a.), y para la biofijación de CO₂ (Huntley y Redalje, 2007; Wang et al, 2008).

Esta cianobacteria es fuente rica en proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales y otros nutrientes, por lo que uno de sus principales usos es como suplemento alimenticio, ya sea en polvo, encapsulado, en tabletas, como sustituto de harina (en diferentes sabores), en pastas para sopa, botanas, salsas, barras de granola, golosinas o bebidas instantáneas de frutas o vegetales (Sasson, 1997).

El alto contenido de proteínas de *Spirulina sp.* hace de ésta un alimento altamente nutritivo, además de que contiene aminoácidos esenciales y su aminograma es muy similar al de la yema de huevo, que es considerado el aminograma tipo por la FAO (Mondragón, 1984). A lo anterior se puede agregar que las proteínas presentes en esta cianobacteria son de fácil digestión y metabolización, ayudando con esto al tratamiento de la desnutrición (Roxana y Ramírez, 2006).

Los carotenoides comprenden a los pigmentos amarillo-anaranjados, y acompañan a la clorofila en muchos productos. Estos constituyen los principales pigmentos de productos alimenticios, tales como: zapallo, zanahoria, tomate; también en ciertas flores y en mucho microorganismos (algas rojas, verdes, hongos y bacterias fotosintéticas) (Madrñan, 1988). Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales solubles en lípidos. Son los responsables de una amplia variedad de colores vistosos en la naturaleza, los más conspicuos siendo el amarillo, el naranja y el rojo (Olvera-Ramírez et al., 2003). El β -caroteno es un constituyente común de la fracción carotenoide de la *Arthrospira* y de otras algas, estando en mayor concentración en las algas verdes. Este compuesto incrementa la respuesta inmune en animales y en los seres humanos. En los animales es convertido en retinol (vitamina A), por lo

que también se le conoce como provitamina A. La protección contra el cáncer ha sido atribuida a su actividad antioxidante, siendo uno de los principales carotenoides implicados en el sistema de defensa contra los radicales libres (Chamorro et al., 2002). El β -caroteno se utiliza ampliamente en la industria de alimentos como colorante natural. También es un aditivo muy popular, no tóxico, debido a que tiene mayor solubilidad y disponibilidad que los colorantes sintéticos. En los alimentos para aves el β -caroteno puede utilizarse con ventaja para lograr la coloración naranja o amarilla de los productos (huevos y carne), necesaria en algunos países para ser aceptados por el consumidor (Cañizares et al., 1998). Estudios epidemiológicos han demostrado una correlación entre el incremento en el consumo de carotenos, y la reducción de enfermedades coronarias y cierto tipo de cáncer; y un incremento en la resistencia a infecciones virales, bacterianas, fúngicas y parasíticas (Olvera-Ramírez et al., 2003). Chamorro et al. (2002) informan una posible acción hepatoprotectora.

Las ficobiliproteínas por su alta eficiencia fluorescente y su solubilidad en agua, son usadas en la industria de alimentos como colorante natural. Otra aplicación que se les atribuye por sus propiedades son las de marcadores fluorescentes y reactivos químicos. Chamorro et al. (2002) reportaron las siguientes propiedades farmacológicas para la ficocianina: actividad antioxidante, debida a la presencia de su grupo cromóforo la ficocianobilina (Hirata et al., 1999), inhibiendo la frecuencia de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia sp.*; actividad hepatoprotectora en ratas; disminución significativa de edemas en ratones y resultados positivos en el tratamiento de la colitis.

Otra aplicación que se le da a las ficobiliproteínas, por su coloración y solubilidad en agua, es como colorante natural. Fue comercializada en 1980 bajo el nombre de Lina Blue-A (Dainippon, 2005), producto utilizado en la industria de alimentos para dar color a helados, gomas de mascar, bebidas y productos lácteos. Y en la industria cosmética como pigmentos naturales (Sasson, 1997). También se emplean en inmunoensayos, ya que pueden formar conjugados estables con anticuerpos; y en microscopia de fluorescencia es útil para diagnósticos e investigación biomédica, debido a que presenta ventajas con respecto a los marcadores fluorescentes tradicionales (Kronick, 1986; Glazer, 1994; Apt y Behrens, 1999).

Muchas cianobacterias, incluyendo a *Spirulina*, poseen estructuras superficiales adicionales tales como vainas, cápsulas o mucílago disperso, compuestos principalmente de polisacáridos y que durante el crecimiento de las células en cultivos estacionarios son liberados al medio provocando que éste se vuelva más viscoso. Estos polisacáridos solubles en el medio son fácilmente recuperables, por lo que se han sugerido diferentes aplicaciones en biomedicina y en la industria cosmética y de alimentos, como agentes emulsificantes, estabilizantes o espesantes (De Philippis y Vincenzini, 1998).

Se ha aislado de *Spirulina sp.* (*Arthrospira sp.*) en particular, el polisacárido sulfatado llamado Ca-SP, que inhibe la replicación del VIH, Herpes simplex, citomegalovirus humano, virus de la influenza A, paperas y sarampión (Kozlenko y Henson, 1998; Chamorro et al., 2002). También, desde 1992 los japoneses han producido continuamente los exopolisacáridos de esta cianobacteria como substitutos del agar-agar (De Philippis y Vincenzini, 1998).

El contenido de lípidos presente en *Spirulina* oscila entre un 6 y 13%, del cual la mitad son ácidos grasos. De los ácidos grasos presentes los que se encuentran en mayor proporción

son los ácidos palmítico, γ -linoleico (GLA), linoleico y oleico; pero el que más importancia tiene es el GLA, un ácido graso insaturado, esencial, que rara vez está presente en la dieta diaria. Entre las fuentes que contienen GLA, *Spirulina* sp. es la que lo contiene en mayor concentración (Cohen, 1997). El GLA es precursor de algunas prostaglandinas y reduce en cierta medida la cantidad de colesterol en sangre (Sánchez et al., 2003), por lo que representa una alternativa en el manejo de enfermedades cardiovasculares y en el control de peso. Ha sido utilizado en el tratamiento del eczema atópico, y para aliviar los síntomas del síndrome premenstrual. Se piensa que tiene efectos positivos en el Parkinson y en la esclerosis múltiple (Cohen, 1997); así como en el crecimiento celular, en la síntesis de la membrana celular (Sasson, 1997).

En lo que refiere a vitaminas, cabe destacar que *Spirulina* es una fuente rica en ellas, sobre todo en provitamina A y vitamina B12; siendo la primera de ellas importante en la prevención de enfermedades oculares y la segunda de gran valor para el tratamiento de la anemia perniciosa (Sánchez et al., 2003).

Por último, uno de los minerales al cual se le ha prestado más atención y que se encuentra en la *Spirulina* es el hierro, el cual es necesario en el tratamiento de la anemia hipoférrica ya que este se absorbe 60 % más que el sulfato ferroso y otros complementos (Sánchez et al., 2003).

2.5. Importancia del mezclado en el cultivo de *S. platensis*

Es sabido que los factores físicos, tales como la intensidad lumínica o la temperatura, tienen influencia sobre el crecimiento de los microorganismos fotosintéticos. Se podría aseverar que la luz es el factor más importante que afecta el desarrollo de estos microorganismos y representa la principal fuente de energía. (Pedrosa Bezerra et al., 2012).

La agitación en los cultivos de microalgas es necesaria para homogeneizar el cultivo y minimizar así los gradientes de concentración de nutrientes, luz y temperatura; así como para mover las células entre las zonas más interiores del cultivo, con poca disponibilidad de luz y las zonas exteriores próximas a la superficie, con mayor disponibilidad de luz. Cuanto mayor es la agitación, la frecuencia de exposición de las células a la luz se incrementa, aumentando así la productividad hasta un valor de saturación. Sin embargo, este aumento de la agitación implica un mayor consumo de energía, y por tanto una menor eficiencia energética y mayor coste de la producción (Molina, Fernández, García, Chisti, 1999).

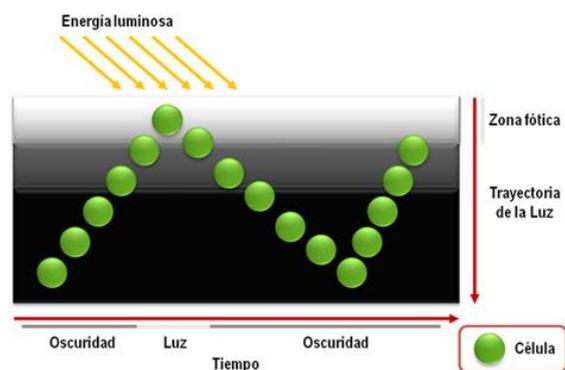


Figura 4 – Trayectoria de la luz y de los ciclos de luz oscuridad en cultivos microalgales (Contreras-Flores y col., 2003)

Un alto grado de turbulencia es preferible en los cultivos de microalgas con el fin de promover una rápida circulación de las células desde las zonas oscuras hacia las zonas iluminadas dentro del reactor. Contreras-Flores et al. (2003), informaron que el principal problema en el cultivo de algas es el daño celular causado por los esfuerzos de corte. Se conoce que el exceso de la agitación mecánica es causa de turbulencia, lo que puede originar daños permanentes en la estructura celular afectando el crecimiento y la producción de metabolitos. Por lo contrario, una agitación insuficiente provocará sedimentación y muerte celular.

La agitación se puede llevar a cabo mediante sistemas mecánicos y/o neumáticos. En reactores raceway se utilizan agitadores de paletas (padelwheels) de muy bajo consumo energético ($1-10 \text{ W/m}^3$), mientras que en fotobiorreactores se utilizan bombas centrífugas y burbujeo de aire de mayor consumo energético ($20-1.000 \text{ W/m}^3$).

La transferencia de oxígeno constituye un factor muy importante en el crecimiento de los microorganismos y es variable fundamental para el escalado y la economía de los sistemas de biosíntesis aerobia. La concentración de oxígeno disuelto en un cultivo con microorganismos aerobios depende de la tasa de transferencia de oxígeno de la fase gas al líquido, de la velocidad de transporte del oxígeno hacia las células y de la tasa de consumo de oxígeno (OUR, oxygen up take rate) por los microorganismos para el crecimiento, mantenimiento y producción de metabolitos y estructuras celulares (Galaction et al., 2004).

El mezclado se puede inducir de muy diversas formas, sin embargo, los sistemas neumáticos basados en la aireación del cultivo con aire comprimido (columnas de burbujeo o sistemas airlift), son los más usados. Estos reactores pueden diferir en sus diseños, poseen bucles internos, bucles externos o sistemas airlift de columnas divididas y columnas de burbujeo (Becker, 1995; Chisti, 1989; Jansen et al., 2003). Sin embargo, los sistemas airlift tienen inconvenientes en el escalado (Chisti, 1998; Vardar, 2008).

En cuanto a los sistemas de distribución del aire, se ha planteado el uso de microburbujeadores para los cultivos de microorganismos por varias razones. En primer lugar, estos sistemas suministran el oxígeno en burbujas de gas de menor diámetro, incrementando el área de contacto entre éste y el medio líquido, favoreciendo así la velocidad de transferencia de oxígeno (Deckwer y Schumpe, 1993). En segundo lugar, los

microburbujeadores, en comparación con otros sistemas de dispersión de gases, producen un menor estrés mecánico sobre las células generando condiciones adecuadas para su cultivo (Cockx et al., 1995; Flores-Cotera y García-Salas, 2005; Soler y Buitrago, 2010).

Esta estrategia de mezclado también puede usarse como método para incorporar una fuente de carbono inorgánico, enriqueciendo el aire inyectado con CO₂. También, los medios mecánicos (paletas rotatorias) pueden ser utilizados, aunque pueden generar fuerzas de corte que afectan la viabilidad de las células.

El aumento de la tasa de crecimiento de algunas especies de microalgas cuando se incrementa la turbulencia, es debido a la mejora del suministro de luz y CO₂. Sin embargo, a niveles mayores de turbulencia, el crecimiento se ve disminuido drásticamente, aumentando simultáneamente la velocidad superficial del gas causando un posible daño celular (Contreras-Flores y col., 2003). Los sistemas de mezclas de gases o los sistemas de columnas de burbujeo causan menor daño celular que los sistemas de agitación mecánica. Esto únicamente para el caso de unidades de bombeo de aire, en donde la mezcla se logra por el flujo de líquido que se obtiene por la aspersion del aire al centro del tubo interno, disminuyendo la densidad celular del líquido provocando que este suba. El líquido fluye hacia abajo a través del tubo exterior, creando así una circulación natural. Aunque estos sistemas parecen causar un menor daño celular, no están exentos de un esfuerzo cortante causando daño celular en menor medida (Gudin y Chaumont, 1991). Barbosa y col. (2004), reportaron la formación de burbujas en el difusor como el factor principal que conduce a la muerte celular. Por último, se ha reportado el efecto de sombreado mutuo, el cual implica el movimiento celular continuo desde y hacia las zonas de luz y oscuridad. Este efecto se considera esencial para garantizar la alta productividad de biomasa (Degen y col., 2001; Contreras-Flores y col., 2003; Martin, 2010).

Los Erlenmeyers agitados han sido utilizados como simples biorreactores para estudios básicos y aplicados llevados a cabo con bacterias (Ibarra et al., 2002; Wittmann & Heinzle, 2002), levaduras, hongos (Bushell et al., 1997; Veglio et al., 1998), células animales (Girard et al., 1991; Lui & Hong, 2001), células de insectos (Marteijn et al., 2003), y también células vegetales (Chattopadhyay et al., 2002a; Glicklis et al., 1998; Payne et al., 1990). Además, la variedad de estudios para los cuales los Erlenmeyers agitados han sido aplicados es muy amplia, incluyendo la elucidación de vías metabólicas (Büchs, 2001). Su éxito se le atribuye al diseño simple y funcional, que permite realizar un gran número de experimentos de manera simultánea a un costo accesible y eficiente (Klöckner, Büchs, 2012). Pero a pesar de esta extensa y variada aplicación, no ha habido mucha información hasta la actualidad respecto a la dinámica de los fluidos y al estrés hidrodinámico en cultivos en Erlenmeyers agitados. Han sido publicados varios trabajos durante la última década ampliando los conocimientos básicos sobre la relación entre la potencia entregada al sistema y la potencia de disipación en reactores, para el caso de frascos agitados (Büchs, 2001; Büchs et al., 2008a; Büchs et al., 2000b). Estos trabajos abren la posibilidad de cuantificar las fuerzas relacionadas al flujo que actúan sobre las células en suspensión en Erlenmeyers agitados, y por lo tanto, comparar los cultivos creciendo en estos frascos con los cultivos en biorreactores, desde el punto de vista de los efectos del estrés hidrodinámico.

Es por ello que resulta interesante efectuar estudios de mezclado utilizando Erlenmeyers como sistemas de cultivo, los cuales pueden ser agitados en agitadores orbitales a diferentes velocidades. Asimismo, estos recipientes pueden también usarse como sistemas de cultivo aireados (burbujeados), ya que permiten realizar cultivos a escala laboratorio utilizando menores volúmenes que los necesarios para biorreactores convencionales.

Por otra parte, deben tenerse en cuenta que la mayoría de los ceparios que contienen microalgas utilizan Erlenmeyers como sistemas de cultivo; sin embargo los utilizan de manera estática (sin agitación), ya que los volúmenes de los cultivos son pequeños y permiten la penetración de la luz de manera eficiente. Dada la versatilidad de los Erlenmeyers como sistemas de cultivo simples, económicos y de baja escala, resultan de preferencia para llevar a cabo estudios comparativos de métodos de agitación de cultivos de microalgas.

Finalmente es de considerarse que en los procesos a escala industrial, a medida que aumenta la concentración de biomasa algal, la distribución de nutrientes en el medio de cultivo, la difusión de gases (oxígeno y dióxido de carbono) y la intensidad lumínica se ven disminuidas, afectando la velocidad de crecimiento. Al disminuir esta velocidad se obtiene una baja productividad, aumentando los tiempos de producción y los gastos de energía, pudiendo incluso ocurrir la muerte celular. Es por ello que estudios de mezclado a mayor escala son necesarios para satisfacer todos los requerimientos, tanto nutricionales, como de luz, pH y temperatura.

3. Hipótesis

El cultivo de *Spirulina (Arthrospira) platensis* se vería favorecido mediante la agitación, aumentando el intercambio gaseoso, lo que además permitiría un acceso homogéneo por parte de las células a las condiciones del medio de cultivo (pH, nutrientes, temperatura). Como consecuencia disminuiría la muerte celular, y fundamentalmente permitiría que todas las células accedieran a las zonas iluminadas en el cultivo, aumentando de ese modo la velocidad de crecimiento. Asimismo, una mayor velocidad de crecimiento celular redundaría en una mayor cantidad de biomasa, lo que aumentaría la productividad. Por otra parte, un mezclado eficiente podría afectar positivamente la composición bioquímica de la biomasa microalgal obtenida en los cultivos, ya que permitiría incrementar la fijación de CO₂ atmosférico.

- Aumentaría el intercambio gaseoso.
- Permitiría un acceso homogéneo por parte de las células a las condiciones de medio de cultivo.
- Todas las células accederían a las zonas iluminadas, aumentando de ese modo la velocidad de crecimiento.

4. Objetivos

En base a lo expuesto previamente, el objetivo general del presente trabajo de tesis es estudiar la influencia del mezclado de los cultivos de *Spirulina platensis* LMPA55 sobre la producción de la biomasa y su composición bioquímica.

4.1. Objetivos Específicos

- 1) Evaluar la producción de biomasa microalgal y su composición bioquímica en sistemas estándar de cultivo (estáticos - sin agitación).
- 2) Estudiar a distintas revoluciones por minuto (agitación mecánica) la producción de biomasa microalgal y su composición bioquímica en agitador orbital.
- 3) Analizar a distintos caudales de inyección de aire (agitación neumática) la producción de biomasa microalgal y su composición bioquímica.
- 4) Analizar la producción de biomasa microalgal y su composición bioquímica en un biorreactor de tanque agitado (agitación mecánica y neumática).

5. Materiales y Métodos

5.1. Microalga

La cepa *Spirulina (Arthrospira) platensis* se obtuvo del cepario del Laboratorio de Microalgas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (sede Trelew – Chubut, Argentina). Esta cepa se encuentra identificada mediante el código LMPA-55.

5.2. Mantenimiento de la cepa

A fin de asegurar y preservar la viabilidad y las características fenotípicas y genotípicas, la microalga *Spirulina platensis* LMPA-55 fue mantenida en Erlenmeyers de 250 mL estáticos, mantenidos a 26 °C en una incubadora, iluminados durante un fotoperíodo de 12 horas, a través de tubos fluorescentes de 20 W, de tonalidad media que proporcionan una intensidad lumínica de 3000 lux, a una distancia de 30 cm respecto de los Erlenmeyers. Para el fotoperíodo se utilizó un temporizador analógico al cual se le conectaron los tubos fluorescentes. La formulación del medio de cultivo a utilizar fue la desarrollada por Zarrouk (Zarrouk, 1966).

La metodología de mantenimiento seleccionada es la de pasajes seriados quincenales, el cual fue realizada en campana de flujo laminar, previamente sanitizada utilizando luz ultravioleta durante 20 minutos, y luego alcohol 70 % en algodón sobre la superficie de la mesada de trabajo. Tanto los Erlenmeyers como todos los materiales utilizados (probeta, tips para micropipeta, medios de cultivo) son previamente esterilizados por calor húmedo a 121 °C durante 20 minutos en autoclave.

El procedimiento del mantenimiento consiste en colocar 1 mL de la suspensión de microalga utilizando micropipeta automática y 49 mL de medio fresco medidos con probeta de 100 mL, en Erlenmeyers de 250 mL provisto de un tapón de algodón. Estos subcultivos son realizados por cuadruplicado para evitar la pérdida del stock debido a una contaminación potencial.

5.3. Medio de cultivo de *S. platensis*

Se utilizó el medio de cultivo según la formulación de Zarrouk (Zarrouk, 1966), tanto para el mantenimiento de la cepa como para los cultivos de los distintos ensayos de mezclado. Está compuesto por dos soluciones de igual volumen (A y B), las cuales se preparan según la **Tabla 8**. Para su preparación se utilizó una balanza granataria y una balanza analítica. Se ajustó el pH utilizando NaOH 1 M y un pHmetro de mesada a un valor entre 8,5 y 9,0. Una vez preparadas las dos soluciones se esterilizaron por separado en frascos color caramelo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, y se conservaron en oscuridad. En el momento de utilizar el medio de cultivo Zarrouk, se mezclaron volúmenes iguales de ambas soluciones en campana de flujo laminar.

Tabla 8 – Formulación del medio de cultivo Zarrouk.

Solución A	
Sustancia	Concentración (g/l)
K ₂ HPO ₄	1,0
NaHCO ₃	33,6

Solución B	
Sustancia	Concentración (g/l)
H ₃ BO ₃	5,70 x 10 ⁻³
MnCl ₂ .4H ₂ O	3,26 x 10 ⁻³
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,44 x 10 ⁻⁴
ZnSO ₄	2,50 x 10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄	3,54 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,58 x 10 ⁻⁴
NaNO ₃	5,0
K ₂ SO ₄	2,0
NaCl	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4
MgSO ₄	0,20
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,08
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Na ₂ -EDTA	0,16

5.4. Ensayo en Erlenmeyer agitado

Se realizaron ensayos en dos grupos con el fin de estudiar los efectos de la agitación sobre el crecimiento microalgal y la composición bioquímica. Todos los ensayos se llevaron a cabo en una cámara de cultivo (**Figura 5**) cuya temperatura, establecida en $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fue controlada mediante un aire acondicionado, y un extractor de aire. El fotoperíodo se fijó en 12 horas controlado por un temporizador analógico. La iluminación provino de cuatro tubos fluorescentes de 20 W, de tonalidad media que proporcionaron una intensidad lumínica de 2600 lux a una distancia de 30 cm respecto de los Erlenmeyers estáticos y agitados. La cámara cuenta con un indicador de temperatura y humedad.

Los Erlenmeyers fueron esterilizados previamente con calor húmedo a 121°C durante 20 minutos en autoclave, junto con probetas de vidrio. A cada Erlenmeyer se le dosificó un cierto volumen de un cultivo de *S. platensis* LMPA-55 en función del ensayo a realizar. La preparación se realizó en el flujo laminar utilizando probetas de vidrio estériles. Una vez preparados los Erlenmeyers, se utilizaron tapones de algodón para evitar ingreso de contaminantes y permitir la difusión de los gases.

El cultivo del ensayo se preparó con 50 mL de inóculo de un cultivo que llevaba 15 días en la cámara de cultivo. Éste se diluyó en el medio de cultivo Zarrouk (Zarrouk, 1966) hasta llegar a un volumen de 4 L. Los cuales fueron dosificados en cada Erlenmeyer. Se utilizó para la dilución una probeta de 50 mL y un vaso de precipitados de 4 L previamente esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

El primer grupo consistió en Erlenmeyers de 500 mL, con un volumen de cultivo de 200 mL con tapones de algodón. Este grupo contaba con tres Erlenmeyers estáticos, dos Erlenmeyers agitados a 100 r.p.m. en agitador orbital con una órbita de $\frac{3}{4}$ in, y dos Erlenmeyers agitados a 150 r.p.m. en agitador orbital con una órbita de $\frac{3}{4}$ in. La **Tabla 9** reúne las condiciones del ensayo.

Tabla 9 – Condiciones de cultivo en Erlenmeyers estáticos y agitados

Volumen de Erlenmeyer	500 mL
Deflectores	No
Volumen de cultivo	200 mL
Temperatura	$28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
Intensidad lumínica	2600 lux
Fotoperíodo	12 hr
Tiempo de cultivo	27 días
Velocidad de agitación	0 – 100 - 150 r.p.m.
Biomasa inicial	0,032 mg PS /mL

El segundo grupo consistió en Erlenmeyers con deflectores de 500 mL, con un volumen de cultivo de 200 mL con tapones de algodón. Este grupo contaba con tres Erlenmeyers estacionarios, dos Erlenmeyers agitados a 100 r.p.m. y dos Erlenmeyers agitados a 150 r.p.m. en agitador orbital con una órbita de $\frac{3}{4}$ in. La **Tabla 10** reúne las condiciones del ensayo.

Tabla 10 – Condiciones de cultivo en Erlenmeyers bafleados estáticos y agitados

Volumen de Erlenmeyer	500 mL
Deflectores	Si
Volumen de cultivo	200 mL
Temperatura	28 °C ± 2 °C
Intensidad lumínica	2600 lux
Fotoperíodo	12 hr.
Tiempo de cultivo	27 días
Velocidad de agitación	0 - 100 – 150 r.p.m.
Biomasa inicial	0,032 mg PS /mL



Figura 5 – cultivo estacionario (izquierda y derecha) cultivo agitado (centro).

5.5. Ensayo en columnas de burbujeo

Se realizaron ensayos en columnas de burbujeo compuestas por probetas de vidrio de 250 mL con tapones de goma, los cual fueron perforados en el centro para que quede inserto un tubo de vidrio por el cual se insufló aire. Todo el sistema se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. El insuflado de aire se realizó con una bomba de pecera con un filtro de disco de teflón de 0,22 µm previo al ingreso de la columna. El caudal de aire se reguló mediante válvulas de pecera.

El cultivo del ensayo se preparó con 128 mL de inóculo de un cultivo que llevaba 20 días en la cámara de cultivo. Este se diluyó en el medio de cultivo Zarrouk (Zarrouk, 1966) hasta llegar a un volumen de 1,5 L. Los cuales fueron dosificados en cada Erlenmeyer. Se utilizó para la dilución probetas de 100 y 50 mL, y un vaso de precipitados de 2 L previamente esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Se dispusieron 4 columnas de las cuales las dos primeras tenían difusores de peceras para que el insuflado genere burbujas pequeñas, estas dos columnas tenían caudales distintos de insuflado. Las dos columnas restantes no poseían difusores y se insufló aire a distintos caudales.

Los ensayos se realizaron en una cámara de cultivo a una temperatura de 28°C±2 °C, regulada mediante un aire acondicionado, y un extractor de aire, con un fotoperíodo de 12

horas controlado por un temporizador, con dos tubos fluorescentes de 20 W, de tonalidad media que proporcionan una intensidad lumínica de 2600 lux, a una distancia de 15 cm respecto de las columnas. La cámara cuenta con un indicador de temperatura y humedad. La **Tabla 11** reúne las condiciones del ensayo.

Tabla 11 – Condiciones de cultivo en columna de burbujeo.

	D1	D2	SD1	SD2
Volumen de columna	250 mL	250 mL	250 mL	250 mL
Geometría	cilíndrica	cilíndrica	cilíndrica	cilíndrica
Volumen de cultivo	200 mL	200 mL	200 mL	200 mL
Temperatura	28 °C ± 2 °C			
Intensidad lumínica	2600 lux	2600 lux	2600 lux	2600 lux
Fotoperíodo	12 hr	12 hr	12 hr	12 hr
Tiempo de cultivo	21 días	21 días	21 días	21 días
Caudal de aire (vvm)	0,008	0,019	0,012	0,034
Biomasa inicial	0,042 mg/mL PS	0,042 mg/mL PS	0,042 mg/mL PS	0,042 mg/mL PS



Figura 6 – Cultivo en columna de burbujeo con difusores y sin difusores.

De cada uno de las columnas se tomaron muestras en forma estéril empleando micropipeta en campana de flujo laminar. El muestreo se realizó durante un período de 21 días. Se evaluó la evolución de la biomasa microalgal mediante el método descrito en 5.7, y sobre la máxima biomasa obtenida se determinó la composición bioquímica (proteínas, hidratos de carbono y lípidos) descritos en 5.9. Además, se determinó el contenido de clorofilas, ficocininas y carotenoides. Asimismo, sobre el medio de cultivo se determinó la evolución del pH, descrito en 5.10.

5.6. Ensayo en Biorreactor de Tanque Agitado

Se realizó un ensayo en un biorreactor de tanque agitado de 3 L (MY-CONTROL Applikon Biotechnology). El mismo cuenta con sistema de tomamuestra, electrodo de pH, electrodo de oxígeno disuelto, sistema de refrigeración, aireador y tres deflectores de 10 mm de largo, 6 mm de espesor y 220 mm de alto. El biorreactor se encuentra instalado en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos, a diferencia de los demás ensayos que se realizaron en la cámara de cultivo. Esto es debido a que el biorreactor tiene acoplado el controlador y una computadora. Toda la estructura no se pudo instalar en la cámara de cultivo. El

bioreactor se esterilizó junto con los electrodos de pH y oxígeno disuelto en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Las condiciones del ensayo son similares a los sistemas agitados y las columnas de burbujeo. El ensayo se realizó a $26 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, la temperatura se controló mediante el sistema de refrigeración que tiene el bioreactor por la circulación de agua como refrigerante. El fotoperíodo se controló con un temporizador analógico y tres tubos fluorescentes de 20 W, de tonalidad media que proporcionan una intensidad lumínica de 2600 lux. Se determinó la condición de operación comparando la potencia volumétrica de los cultivos agitados y llevando ese valor a la velocidad de agitación del bioreactor de tanque agitado. La aireación se realizó con una bomba de pecera la cual, previo al ingreso al bioreactor, pasó por un filtro de disco de teflón de 0,22 μm . La **Tabla 12** reúne las condiciones del ensayo.

Tabla 12 – Condiciones de cultivo bioreactor tanque agitado.

Volumen del bioreactor	3000 mL
Geometría	cilíndrica
Deflectores	Si
Volumen de cultivo	2000 mL
Temperatura	$26 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$
Intensidad lumínica	3000 lux
Fotoperíodo	12 hr
Tiempo de cultivo	15 días
Caudal de aire (vvm)	0,010
Velocidad de agitación	250 r.p.m.
Biomasa inicial	0,033 mg/mL PS



a.



b.



c.

Figura 7–Ensayo en bioreactor tanque agitado: a. primer día del cultivo, b. décimo día de cultivo, c. quinceavo día de cultivo.

Se tomaron muestras en forma estéril empleando el tomamuestras del bioreactor. El muestreo se realizó durante un período de 14 días. Se evaluó la evolución de la biomasa microalgal mediante el método descrito en 5.7, y sobre la máxima biomasa obtenida se

determinó la composición bioquímica (proteínas, hidratos de carbono y lípidos) descritos en 5.9. Además, se determinó el contenido de clorofilas, ficocianinas y carotenoides. Asimismo, sobre el medio de cultivo se determinó la evolución del pH, descrito en 5.10.

5.7. Determinación de la biomasa microalgal

El crecimiento de un cultivo de *S. platensis*. Puede ser expresado como máxima biomasa alcanzada durante un determinado período de incubación o como tasa de crecimiento. Para poder determinar la biomasa, se midió la densidad óptica (DO) de las muestras microalgales mediante espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm. Esta longitud de onda se eligió para evitar la influencia de pigmentos (Griffiths et al. 2011). A los datos registrados se le aplicó a una correlación, previamente realizada para cuantificar la biomasa obtenida en gramos de biomasa en peso seco por litro (g PS/L), en función de la absorbancia medida. Dicha correlación se obtuvo tomando un cultivo de 15 días de *S. platensis* en medio de cultivo Zarrouk y realizando diluciones con solución fisiológica de modo de obtener cultivos de absorbancia aproximadas de 0,2; 0,4; 0,8 y 1,2. Estos cultivos se prepararon en matraces de 500 mL y se filtró de cada cultivo 100 mL por triplicado, con una bomba de vacío. Cada filtrado fue lavado con 3 alícuotas de agua destilada de 75 mL cada una y luego secados en estufa a 90 °C hasta obtener un peso constante en balanza analítica.

$$Biomasa \left(\frac{g \text{ PS}}{L} \right) = 0,5355 \cdot DO_{560 \text{ nm}} + 0,0066$$

Ecuación 1 – Correlación de biomasa g PS/L a partir de $DO_{560 \text{ nm}}$ para el cultivo de *S. platensis*

5.8. Estimación de parámetros cinéticos de crecimiento

Es importante conocer la cinética de crecimiento de la microalga para poder hacer comparaciones entre distintos métodos de cultivo, tomar decisiones sobre qué tipo de método conviene más o incluso realizar predicciones sobre la producción que se puede obtener. Los parámetros más utilizados comúnmente para caracterizar el crecimiento son la velocidad específica de crecimiento (μ), el tiempo de duplicación y el índice de crecimiento (IC).

5.8.1. Velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento (μ) de *S. platensis* se calculó de la siguiente manera: los datos del crecimiento celular, biomasa en función del tiempo, se graficaron en la forma de logaritmo natural de la biomasa versus el tiempo. Esto permitió obtener una línea recta sobre la fase de crecimiento exponencial de las microalgas. El valor de la pendiente de

esta parte lineal de la curva corresponde al valor de μ , cuyas unidades están definidas como 1/unidad de tiempo. Este parámetro establece la biomasa que se genera por unidad de biomasa por unidad de tiempo. La velocidad específica de crecimiento es máxima en la zona de crecimiento exponencial, luego varía a lo largo del crecimiento de la microalga.

5.8.2. Tiempo de duplicación

Se lo define como el tiempo necesario para que se obtenga el doble de biomasa a partir de una biomasa inicial. El tiempo de duplicación (t_d) se lo calculó a partir de la siguiente relación:

$$t_d = \ln\left(\frac{2}{\mu}\right)$$

Ecuación 2 – Tiempo de duplicación

Dónde μ es la velocidad específica de crecimiento. La unidad del tiempo de duplicación dependerán de la unidad de μ , si esta está en días, el tiempo de duplicación estará expresado en días necesarios para duplicar la biomasa.

5.8.3. Índice de crecimiento

Se lo define como la cantidad de veces que genera biomasa por unidad de biomasa original. Este parámetro se puede calcular en cualquier instante del crecimiento del microorganismo, dando valores distintos a medida que avanza el crecimiento de la microalga. El índice de crecimiento (IC) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{\text{Máxima concentración de biomasa} - \text{Concentración de biomasa inicial}}{\text{Concentración de biomasa inicial}}$$

Ecuación 3 – Índice de crecimiento

5.9. Técnicas Analíticas

Se cuantificaron las proteínas totales, lípidos totales e hidratos de carbono (reductores y no reductores) mediante métodos químicos colorimétricos. Los mismos están basados en la

generación de especies químicas que absorben a una determinada longitud de onda en proporción con la cantidad de analito presente en la muestra.

5.9.1. Proteínas totales

En el caso de la cuantificación de proteínas se empleó el método de Lowry et. al. (1951). Dentro de los métodos de determinación de proteínas, el método de Lowry tiene la ventaja de ser extremadamente sensible, capaz de detectar cantidades del orden de 10 microgramos de proteína. El principal inconveniente del método es que al evaluar los fenoles presentes en la proteína (esencialmente residuos de tiroxina), la intensidad del color resultante varía entre las distintas proteínas. Para minimizar esto, cuando se tratan mezclas biológicas complejas, se calibra el método con alguna proteína comercial, como es la seroalbúmina bovina (BSA).

La reacción que tiene lugar en el método de Lowry es bastante compleja y se desarrolla en las siguientes fases:

1. Reacción previa de la proteína en medio alcalino con iones Cu^{2+} , en presencia de tartrato para evitar la precipitación. Es esencialmente idéntica a la reacción del Biuret, formándose un complejo de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico.

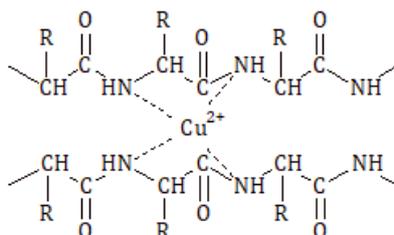


Figura 8 – Complejo Biuret Cu^{2+} con nitrógenos peptídicos

2. Reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles (ácido fosfomolibdotúngstico), que se reduce por medio de los grupos fenol (y en menor medida imidazol e indol) presentes en la proteína a un complejo de color azul oscuro, que se mide colorimétricamente a 750 nm. La elección de una u otra depende de la concentración proteica de la muestra estudiada.

La composición aminoacídica en tirosina y triptófano de la BSA es similar a la de *S. platensis*. BSA contiene 5,0 g/100g de tirona y 0,6 g/100 de triptófano (Stein & Moore, 1949), mientras que *S. platensis* presenta en promedio 5,4 g/100g de tirona y 0,4 g/100 de triptófano (Volkman et al., 2008). Se prepararon las muestras patrones y se realizó la curva de calibración para la determinación de proteínas presentes en los cultivos de *S. platensis*.

El procedimiento consistió en tomar una muestra del cultivo, 3 mL para cultivos en Erlenmeyer y columna, y 10 mL para el cultivo en biorreactor. La muestra se distribuyó en microtubos de 2 mL y se los centrifugó durante 15 minutos en microcentrífuga a 15.000 r.p.m. El concentrado celular (pellet) obtenido se lo hidrolizó en 1,5 mL de NaOH 1 M y se lo llevó a un baño de agua entre 95 – 100 °C durante 1 hora. Luego de transcurrido el tiempo, se centrifugó nuevamente durante 15 minutos en microcentrífuga a 15.000 r.p.m. Se tomaron 100 µl del sobrenadante, el cual se lo considera extracto, y se lo lleva a un tubo de ensayo. Se completó el volumen a 1 mL agregando 900 µl de agua destilada y se le agregó 5 mL de solución de Lowry. La solución de Lowry se preparó previamente con 50 mL de sc. Na₂CO₃ 2 % m/v en NaOH, 0,5 mL de sc. CuSO₄ 1 % m/v, y 0,5 mL de sc. Tartrato de sodio y potasio 2 % m/v. El tubo de ensayo se lo agitó enérgicamente en agitador vortex y se lo dejó reposar por 15 minutos. Luego se le agregó 0,5 mL de solución de Foulin– Cicalteau, la cual previamente se diluyó a la mitad antes de su uso. Se agitó enérgicamente en agitador vortex y se lo dejó reposar durante 30 minutos. Luego se midió en espectrofotómetro UV-Visible a 750 nm. en cubeta de vidrio con un paso óptico de 1 cm.

El resultado de la medición en espectrofotómetro fue contrastado con una curva de calibración para el método realizada con seroalbúmina bovina como referencia a distintas concentraciones. La seroalbúmina bovina se preparó en solución acuosa de 1 mg/mL de concentración. La curva de calibración se realizó utilizando cinco puntos de distintas concentraciones de seroalbúmina bovina y un blanco.

De la comparación con la curva de calibración se obtuvo la concentración de proteínas expresada en mg/mL. Se midió la biomasa del cultivo al momento de realizar el ensayo para expresar la concentración de proteínas como porcentaje masa en masa de peso seco (% PS).

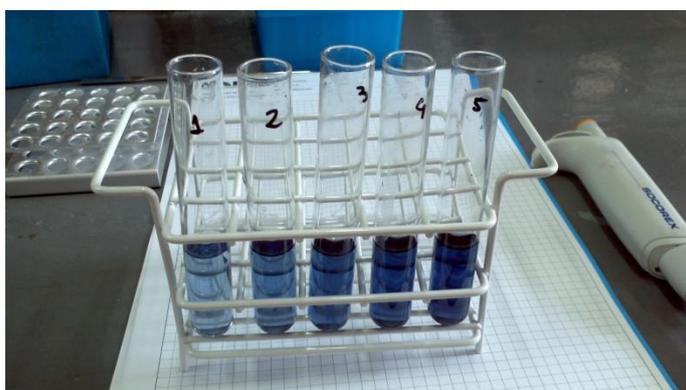


Figura 9 – Curva de calibración para el método de Lowry.

5.9.2. Hidratos de carbono totales

Los hidratos de carbono se cuantifican mediante el método del fenol sulfúrico (Dubois et. al., 1956). Dentro de los métodos de determinación de hidratos de carbono, el método del

fenol sulfúrico tiene la ventaja de poder cuantificar hidratos reductores y no reductores a la vez. Se utilizó glucosa como patrón de hidratos de carbono.

La reacción que tiene lugar en el método es bastante compleja y se desarrolla en las siguientes fases:

1. El ácido sulfúrico concentrado produce la hidrólisis de los hidratos de carbono en monosacáridos, con posterior deshidratación y formación de furfural a partir de las pentosas e hidroximetilfurfural a partir de las hexosas.

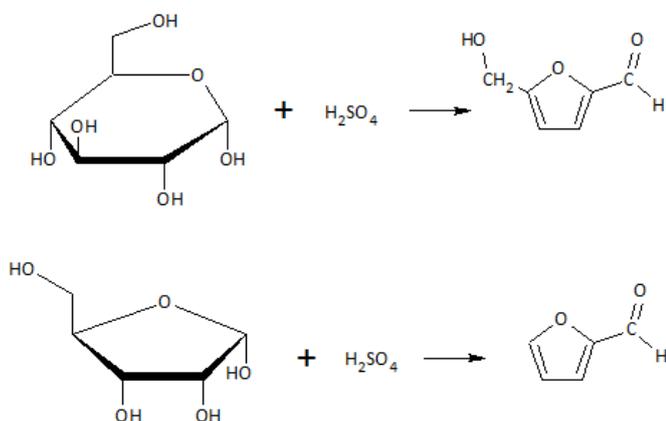


Figura 10 – Reacción de hidrólisis en medio ácido de hexosas y pentosas.

2. Los furanos obtenidos condensan con el fenol formando compuestos de coloración marrón. La intensidad del color es proporcional a la concentración de carbohidratos.

Dado que este método da resultados variables se requiere una curva de calibración que se hace a partir de glucosa. Se prepararon las muestras patrones y se realizó la curva de calibración para la determinación de hidratos de carbono presentes en los cultivos de *S. platensis*.

El procedimiento consistió en tomar una muestra del cultivo, 3 mL para cultivos en Erlenmeyers y columnas, y 10 mL para el cultivo en biorreactor. Se distribuyó la muestra en microtubos de 2 mL y se los centrifugó durante 15 minutos en microcentrífuga a 15.000 r.p.m. Al pellet obtenido se lo hidrolizó en 1,5 mL de NaOH 1 M y se lo agitó enérgicamente en agitador vortex durante 1 minuto. Luego se centrifugó durante 15 minutos a 15.000 r.p.m. en microcentrífuga. Se tomó 1 mL del sobrenadante al cuál se lo consideró extracto y se lo llevó a un tubo de ensayo. Se le agregó 1 mL de solución de fenol 80 % m/m, se lo agitó enérgicamente y se le agregó 5 mL de ácido sulfúrico concentrado de modo que impacte sobre la superficie del líquido. Se lo dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, y luego otros 10 minutos en estufa a 25 °C. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia en espectrofotómetro UV-Visible a 490 nm. en cubeta de vidrio con un paso óptico de 1 cm.

El resultado de la medición en espectrofotómetro fue contrastado con una curva de calibración para el método realizada con una solución de glucosa 1mg/mL en NaOH 1 M como referencia a distintas concentraciones. La curva de calibración se realizó con 4 puntos y un blanco.

De la comparación con la curva de calibración se obtuvo la concentración de hidratos de carbono expresada en mg/mL. Se midió la biomasa del cultivo al momento de realizar el ensayo para expresarla concentración de hidratos de carbono como porcentaje en masa en masa de peso seco (% PS).



Figura 11 – Curva de calibración para hidratos de carbono.

5.9.3. Lípidos totales

Los lípidos totales se cuantificaron utilizando el método de la sulfo-fosfo-vainillina (SPV) en forma directa sobre la suspensión microalgal, según lo desarrollado por Mishra et al. (2014). Dentro de los métodos de determinación de lípidos, el método de la sulfo-fosfo-vainillina tiene la ventaja de poder utilizar una muestra fresca sin necesidad de realizar extracciones de las biomoléculas.

Dado que este método da resultados variables se requiere una curva de calibración que se hizo a partir de aceite de canola como patrón. La reacción se lleva a cabo en dos etapas:

1. El ácido sulfúrico concentrado reacciona con los lípidos insaturados formando iones carbonio.

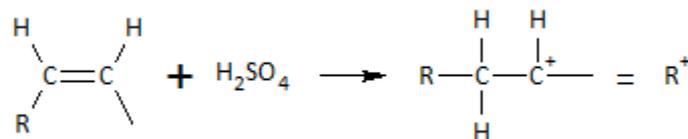


Figura 12 – Mecanismo de reacción, generación del electrófilo.

2. El ácido fosfórico reacciona con la vainillina formando un fosfoéster, el cual es más susceptible de ser atacado por los iones carbonio.

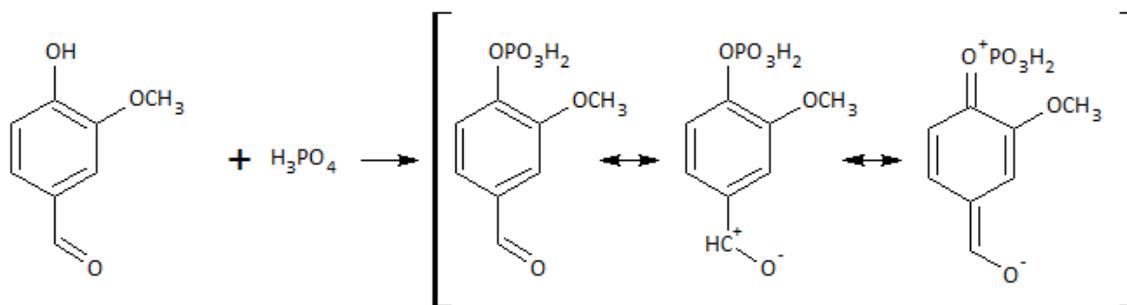


Figura 13 – Mecanismo de reacción, activación del oxígeno del grupo carbonilo mediante el ácido fosfórico.

3. El carbocatión formado ataca al oxígeno carbonílico formando el compuesto coloreado.

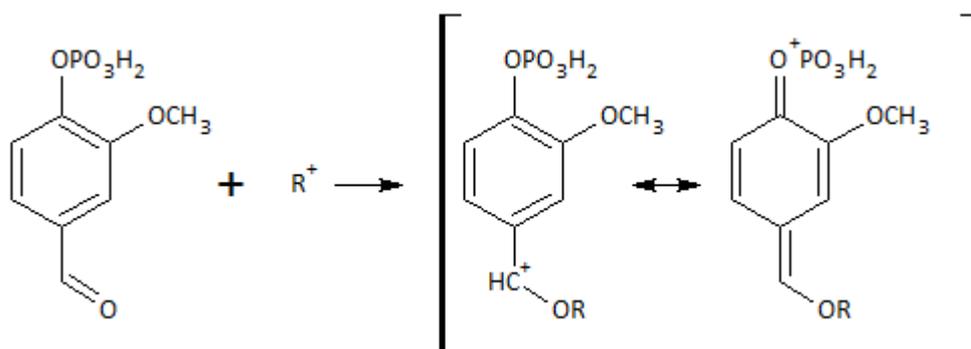


Figura 14 – Mecanismo de reacción, ataque del electrófilo.

La solución fosfo-vainillina está compuesta por 0,075 g de vainillina disuelta en 1,25 mL de etanol, 1,125 mL de agua destilada y 50 mL de ácido fosfórico concentrado (85 %). El aceite de canola presenta un índice de yodo cercano a 105 g/100g (Albuquerque et al., 2009) mientras que *S. platensis* posee un valor cercano a 80 g/100g (Sarpal et al., 2016). Esto permitiría suponer que el empleo del aceite de canola como patrón, subdimensionaría el contenido lipídico de *Spirulina platensis* al presentar una menor cantidad de insaturaciones por unidad de masa respecto al aceite. No obstante, se ha demostrado que esto no es así debido a que se forma un solo ion carbonio por molécula independientemente de la cantidad de insaturaciones, y debido a que existe impedimento estérico en la reacción de SPV con múltiples sitios en una misma molécula (Knight et al., 1972). Por lo mencionado, la intensidad de color se deberá principalmente a la concentración de lípidos, guardando una relación de proporcionalidad.

El procedimiento consistió en tomar una muestra de 100 μ l de la suspensión, se la llevó a un tubo de ensayo, y se le agregó 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (98 %) con pipeta de vidrio. Se calentó el tubo de ensayo durante 10 minutos a 100 °C en baño de agua, luego se lo enfrió durante 5 minutos en un baño de hielo. Una vez frío se le agregó 5 mL de solución de fosfo-vainillina y se incubó el tubo durante 15 minutos en estufa a 37 °C. Se midió

la absorbancia en espectrofotómetro UV-Visible a 530 nm. en cubeta de vidrio con un paso óptico de 1 cm. Con la absorbancia registrada se calculó la concentración de lípidos en $\mu\text{g}/\text{mL}$, se la refirió al volumen de suspensión utilizada y a la cantidad de biomasa en esa muestra para expresar el contenido de lípidos como gramos de lípidos por gramo de peso seco (masa seca), o como % m/m.

La curva de calibración para el método fue realizada utilizando aceite de canola disuelto en cloroformo (20 mg en 10 mL). Se tomaron 5 tubos para las distintas concentraciones y un blanco. A cada tubo se le evaporó el solvente mediante un baño de agua y se les realizó el mismo procedimiento que a las muestras.

De la comparación con la curva de calibración se obtuvo la concentración de lípidos expresada en mg/mL . Se midió la biomasa del cultivo al momento de realizar el ensayo para expresarla como porcentaje masa en masa de peso seco (% PS).



Figura 15 – Curva de calibración para lípidos.

5.9.4. Clorofila y Carotenoides

La determinación de clorofilas y carotenoides se realizó según el método de Wegman & Metzner (1971).

El mismo consistió en tomar una muestra del cultivo (3 mL para cultivos en Erlenmeyers y columnas, y 10 mL para el cultivo en biorreactor) la cual se distribuyó en microtubos de 2 mL y se los centrifugó durante 5 minutos en microcentrífuga a 15.000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante, se re juntó el pellet obtenido en cada microtubo y se completó el volumen con 1,5 mL de agua destilada con el fin de volver a centrifugar y lavar el pellet. Luego de la segunda centrifugación se descartó el sobrenadante. Al pellet obtenido se le agregan 3 mL de acetona al 90 % con micropipeta, y se sonicó durante 2 minutos con una intensidad del 30 % en sonicador. Luego del sonicado se dejó reposar los tubos durante 24 hr a 4 °C en

heladera, en oscuridad y cubiertos con papel de aluminio. Pasadas las 24 hr. los tubos se retiraron de la heladera y se los centrifugó durante 5 minutos a 15.000 r.p.m. El sobrenadante se lo consideró extracto. El mismo se midió en espectrofotómetro UV-Visible utilizando acetona al 90 % como blanco a las longitudes de onda de 750, 663, 644 y 453 nm. en cubeta de vidrio con un paso óptico de 1 cm. Para el cálculo de la utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila A } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = 10,3 \cdot \text{Abs}(663 \text{ nm}) - 0,978 \cdot \text{Abs}(644 \text{ nm})$$

Ecuación 4 – Correlación de concentración de clorofila A

$$\text{Carotenoides } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = 4,20 \cdot \text{Abs}(453 \text{ nm}) - 0,0264 \cdot \text{Clorofila A } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right)$$

Ecuación 5 – Correlación de concentración de carotenoides

Los resultados obtenidos están expresados en $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se midió la biomasa del cultivo al momento de realizar el ensayo para expresarla porcentaje masa en masa de peso seco (% PS).

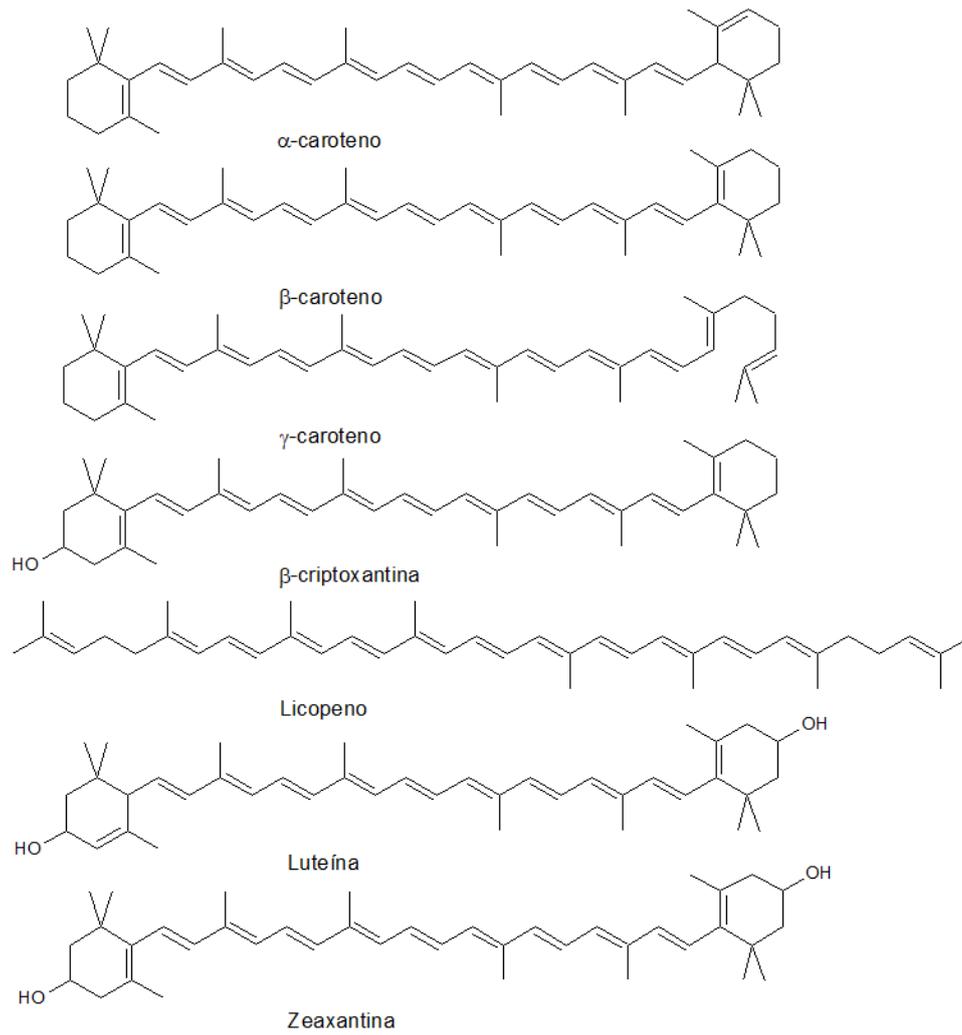


Figura 16 – Carotenos presentes en *Spirulina platensis*.

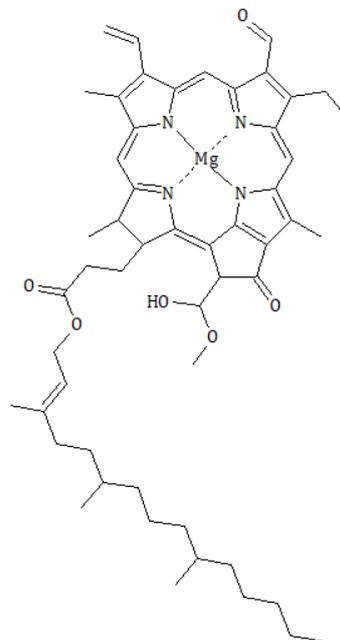


Figura 17 – Clorofila A.

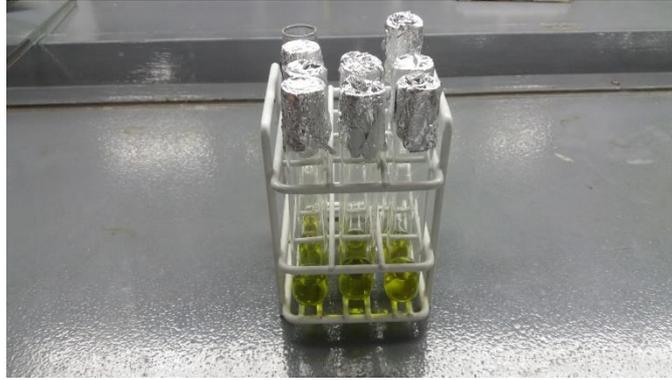


Figura 18 – Extracto de clorofila y carotenoides.

5.9.5. Ficobiliproteínas

EL contenido de c-ficocianina se determinó según el método de Tandeau De Marsac y Hourmad (1988). La cuantificación de ficobiliproteínas se realizó con las relaciones matemáticas propuestas por Bennett y Bogard (1973).

$$\text{Ficocianina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Abs}(620 \text{ nm}) - 0,7 \cdot \text{Abs}(650 \text{ nm})}{7,38}$$

Ecuación 6 – Correlación de concentración de ficocianina.

$$\text{Aloficocianina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Abs}(650 \text{ nm}) - 0,19 \cdot \text{Abs}(620 \text{ nm})}{5,65}$$

Ecuación 7 – Correlación de concentración de aloficocianina.

El procedimiento consistió en tomar una muestra del cultivo (3 mL para cultivos en Erlenmeyers y columnas, y 10 mL para el cultivo en biorreactor), la cual se distribuyó en microtubos de 2 mL y se los centrifugó durante 5 minutos en microcentrífuga a 15.000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y se re juntó el pellet obtenido, se completó el volumen con 1,5 mL de agua destilada con el fin de volver a centrifugar y lavar el pellet. Luego de la segunda centrifugación se descartó el sobrenadante. Al pellet obtenido se lo traspasó a un tubo de ensayo al cual se le agregó 3 mL de solución buffer acetato, pH: 5,5 –10 mM. La solución buffer se preparó con 0,3606 g de acetato de sodio anhidro, 0,6 mL de ácido acético 1 M (5,7 mL de ácido acético glacial llevados a 100 mL en matraz aforado). A la solución se la sonicó en baño de hielo con sonicador durante 1 minuto, dejando 3 minutos de reposo y repitiendo el procedimiento 5 veces. Se le agregó 1 mL de solución de sulfato de streptomina 4 % m/v y se lo dejó reposar en la heladera a 4 °C durante 30 minutos. Luego de ese tiempo se lo retiró y se centrifugó a 15.000 r.p.m. en microcentrífuga durante 5 minutos. El sobrenadante se lo

consideró extracto. El mismo se midió en espectrofotómetro UV-Visible utilizando la solución buffer acetato como blanco a las longitudes de onda de 650 y 620 nm en cubeta de vidrio con un paso óptico de 1 cm, y 280 nm en cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 cm.

Se midió la biomasa al momento de realizar el ensayo para expresar las concentraciones en % masa en masa de peso seco (% PS).

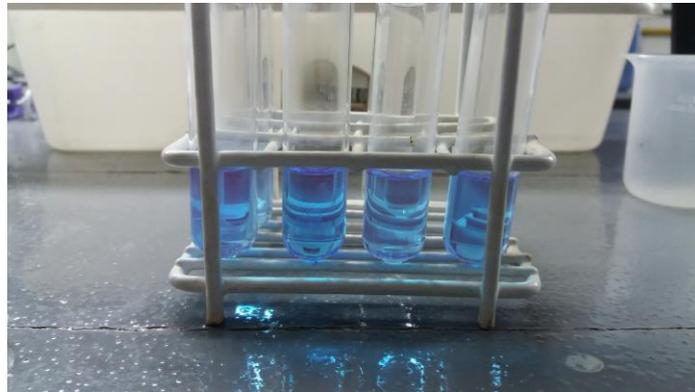


Figura 19 – coloración de ficocianina.

5.10. Determinación de pH

El pH se determinó para todos los cultivos midiendo con un pHmetro portátil directamente en el cultivo. Para evitar la contaminación se sanitizó el electrodo con una solución de alcohol 70° el cuerpo del electrodo y el bulbo de vidrio. El pHmetro se calibró antes de cada medición utilizando soluciones comerciales buffer de pH 7 y 10. Se representó la variación de pH con versus el tiempo de cultivo transcurrido.

5.11. Determinación del coeficiente de transferencia de masa (kLa)

La teoría más ampliamente usada para describir la transferencia de masa gas-líquido, es la teoría de la película (Whitman, 1923). Este modelo propone que existe un conjunto de resistencias al paso del oxígeno desde la fase gaseosa hasta el interior de la célula, las cuales comprenden:

- Transferencia difusiva a través de la capa límite de gas en la burbuja.
- Transferencia a través de la interfase gas-líquido.
- Transferencia a través de la película líquida que rodea la burbuja.
- Transferencia en la fase líquida.
- Transferencia a través de la película líquida que rodea la célula.
- Penetración a la célula.

- Reacción bioquímica.

Cuando las células se encuentran dispersas en el líquido, la mayor de estas resistencias, y por consiguiente la determinante de la transferencia, es la tercera, entre la interfase y el seno del líquido. Toda la resistencia a la transferencia queda expresada en la película a ambos lados de la interfase gas-líquido.

5.11.1. Método dinámico

El método de determinación del kla empleado fue el método físico-dinámico (Gaddis, 1999; Fadavi, 2005) tanto para el biorreactor (MY-CONTROL Applikon Biotechnology) como para las columnas de burbujeo. En éste se registra continuamente la concentración de oxígeno disuelto y por medio de una regresión lineal, se encuentra el valor de kla que corresponde a la pendiente de la recta (García-Ochoa y Gómez, 2009).

En el biorreactor, la transferencia de oxígeno está afectada por diferentes factores que intervienen sobre la hidrodinámica de éste, como: las propiedades físicas tanto del medio de cultivo como del gas utilizado para aportar el oxígeno, los parámetros geométricos del biorreactor, las condiciones de operación a las que se desarrolla el proceso y el tipo de microorganismo cultivado (Deckwer y Schumpe, 1993).

El mismo se lo realizó en el biorreactor (MY-CONTROL Applikon Biotechnology) con 2 L de medio de cultivo Zarrouk sin inóculo, utilizando el electrodo de oxígeno disuelto que posee el biorreactor.

El procedimiento consistió dos etapas:

- 1) Calibración de la sonda: Se le asignó un valor de 100 % de saturación de oxígeno en el medio de cultivo cuando la sonda midió un valor máximo constante. Luego se insufló nitrógeno gaseoso dentro del biorreactor y se asignó el valor 0 % de oxígeno cuando la sonda midió un valor mínimo constante.
- 2) Una vez calibrada la sonda, se midió el porcentaje de oxígeno disuelto dentro del biorreactor, estando despojado de oxígeno (0 % O.D.) debido al insuflado de nitrógeno, con respecto al tiempo. Se tomó el tiempo hasta que volvió a saturarse el medio nuevamente de oxígeno (100 % O.D.).

La ecuación diferencial que modela la transferencia de oxígeno es la siguiente:

$$\frac{dC}{dt} = kla \cdot (C^* - C(t))$$

Resolviendo la ecuación diferencial se obtiene:

$$\frac{dC}{(C^* - C(t))} = kla \cdot dt$$

$$\int_0^C \frac{dC}{(C^* - C(t))} = kla \cdot \int_0^t dt$$

$$\ln \left(1 - \frac{C(t)}{C^*} \right) = kla \cdot t$$

Ecuación 8 – Ecuación de kla en función de la concentración a un dado tiempo.

Donde $C(t)$ es el valor de porcentaje de oxígeno disuelto para un tiempo dado, C^* es máximo valor de porcentaje de oxígeno disuelto al que se llega en el biorreactor, t es el tiempo transcurrido. El valor del coeficiente de transferencia kla , se lo obtuvo de la pendiente del gráfico que surge de la ecuación anterior.

El mismo procedimiento fue aplicado en las columnas de burbujeo, primero la calibración y luego la medición de oxígeno disuelto versus el tiempo.

Una vez que se obtuvo el valor del coeficiente de transferencia se lo refirió a CO_2 , tanto para el biorreactor como las columnas de burbujeo.

5.11.2. Método sulfito

Es muy común determinar la eficiencia en fermentación mediante el empleo de soluciones de sulfito de sodio catalizadas con iones cobre. Aunque los valores obtenidos, expresados comúnmente en forma de coeficientes de transferencia kla , no indican de manera alguna que son los mismos que se obtienen durante la realización del proceso de fermentación. (Ertola et al., 1965).

Se utilizó el método de Cooper (Cooper et al. 1944) para el cálculo de coeficiente de transferencia de masa para los Erlenmeyer, y los Erlenmeyers con deflectores. Se basa en que el Na_2SO_3 en presencia de iones Cu^{2+} o Co^{2+} reacciona rápidamente con el O_2 según la reacción:



Cuando la concentración de Cu^{2+} está en el orden de $0,5 - 2 \times 10^{-3}$ M, y el pH se mantiene neutro o ligeramente alcalino, esta reacción es suficientemente rápida como para que en todo momento el valor de C_L sea prácticamente nulo, pero no tan rápida como para que afecte el espesor de la película. Además se debe cumplir que:

- La velocidad de la reacción no dependa de la concentración de SO_3^{2-} (reacción de orden cero). Para ello, ésta debe ser mayor que 0,015 M.
- El volumen ocupado por la película líquida debe ser muy pequeño en relación al volumen total de la fase líquida. Esto hace que el O_2 , luego de difundir a través de la película, pueda reaccionar con un gran volumen de solución de Na_2SO_3 , garantizando así que $C_L = 0$.

En estas condiciones la reacción de oxidación ocurrirá totalmente en el seno del líquido, y la velocidad de reacción estará controlada por la velocidad máxima de difusión de O_2 , es decir:

$$r = kla \cdot C^*$$

Dónde r es la velocidad de reacción del sulfito en el seno del líquido.

Si se conoce C^* podemos estimar el coeficiente de transferencia a partir de r . La velocidad de oxidación del sulfito puede estimarse mediante la determinación del sulfito residual mediante una yodometría.

Se prepararon las siguientes soluciones, Na_2SO_3 0,5 N utilizando balanza analítica y se ajustó el valor de pH a 8,0 aproximadamente medido con pHmetro previamente calibrado con soluciones buffer en pH 7 y 10. Una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,0 M utilizando balanza analítica, una solución de I_2 0,5 N utilizando balanza analítica. Una solución de almidón 1 % en balanza granataria. Por último se preparó una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,05 N utilizando balanza analítica la cuál fue valorada frente a un patrón de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Se prepararon tres Erlenmeyers de 500 mL a los que se les agregó 200 mL de la solución de Na_2SO_3 0,5 N, tres Erlenmeyers de 250 mL a los que se les agregó 100 mL de la solución de Na_2SO_3 0,5 N. Se prepararon tres Erlenmeyers de 500 mL con deflectores a los que se les agregó 200 mL de la solución de Na_2SO_3 0,5 N, tres Erlenmeyers de 250 mL con deflectores a los que se les agregó 100 mL de la solución de Na_2SO_3 0,5 N. Se realizaron las mediciones de los Erlenmeyers estáticos, a 100 r.p.m. y 150 r.p.m. en agitados orbital.

Se le agregó a cada Erlenmeyer un volumen de la solución de CuSO_4 1,0 M de modo tal que la concentración final sea 10^{-3} M, en ese momento se toma como tiempo cero de la experiencia. A intervalos de 30 minutos durante 3 horas se extrae una muestra con pipeta de vidrio de 5 mL utilizando propipeta automática, midiendo 2 mL y se adicionan sobre 3 mL de solución de yodo 0,5 N. El exceso de yodo se titula por retorno utilizando bureta graduada con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,05 N, y solución de almidón 1 % como indicador. Con los datos obtenidos se graficó

el volumen consumido de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en función del tiempo y de la pendiente de dicha gráfica se calculó el valor de kla empleando la siguiente expresión:

$$kla = \frac{1}{C^*} \cdot \frac{m \cdot N}{4 \cdot Vm}$$

Ecuación 9 – Ecuación del kla para el método sulfito

Dónde C^* es la solubilidad del O_2 , N es la concentración del tiosulfato de sodio, Vm es el volumen de la muestra de sulfito de sodio, y m es la pendiente.

Una vez que se obtuvo el valor del coeficiente de transferencia se lo refirió a CO_2 .

5.11.3. Determinación del coeficiente de transferencia de masa referido a CO_2 (kla_{CO_2})

Una vez que se obtuvo el valor del kla medido para el oxígeno, se lo refirió al dióxido de carbono utilizando una ecuación que relaciona el cociente del kla del O_2 con el kla del CO_2 con el cociente de las difusividades de ambos gases (Nielsen J., Villadsen J. (1994).

$$\frac{kla_{\text{O}_2}}{kla_{\text{CO}_2}} = \frac{D_{\text{O}_2}}{D_{\text{CO}_2}}$$

También se puede utilizar la siguiente relación (Talbot et al., 1990)

$$kla_{\text{CO}_2} = kla_{\text{O}_2} \cdot \sqrt{\frac{D_{\text{CO}_2}}{D_{\text{O}_2}}}$$

Ecuación 10 – Corrección del kla expresado para CO_2 .

A su vez, los coeficientes de difusividad se obtuvieron de ambos gases se obtuvieron mediante la ecuación:

$$D(T_2) = D(T_1) \cdot \left(\frac{T_2}{T_1}\right) \cdot \left(\frac{\mu_1}{\mu_2}\right)$$

Dónde T es la temperatura (K) y μ la viscosidad (Pa.s) siendo la temperatura de referencia 25 °C y la viscosidad del agua a dicha temperatura (1,07 cP) se obtuvo del nomograma correspondiente (Perry's, 1997).

5.12. Cálculo de la velocidad de disipación de energía P/V (potencia volumétrica)

Se calculó la velocidad de disipación de energía por unidad de volumen según el siguiente procedimiento:

Se partió del número de Reynolds para los Erlenmeyers agitados y para el biorreactor. El número de Reynolds es la relación entre la fuerza de inercia característica de mezclado y la fuerza viscosa, definido como:

$$Re = \frac{N \cdot ds^2 \cdot \rho}{\mu}$$

Ecuación 11 – Número de Reynolds.

Donde N es la velocidad de rotación, ds es el diámetro del impulsor para el biorreactor tanque agitado, y es el diámetro de la base del Erlenmeyer para los cultivos en Erlenmeyer, ρ es la densidad del cultivo y μ la viscosidad del cultivo. Estas últimas se tomaron los valores del agua a la temperatura de trabajo según bibliografía (Perry's 1997).

A partir del número de Reynolds se calculó el número de potencia con la siguiente relación para cultivos dinoflagelados:

$$n^{\circ}Pot = \frac{1,94 \cdot VL^{1/3}}{Re^{0,2} \cdot ds}$$

Ecuación 12 – Número de potencia para dinoflagelados.

El número de potencia para régimen turbulento con turbinas tipo Rushton tiende a un valor constante igual a 5 (Rushton, Costich, Everett, 1950).

$$n^{\circ}Pot \cong 5$$

Donde VL es el volumen del cultivo, Re el número de Reynolds y ds el diámetro del impulsor del biorreactor o el diámetro de la base del Erlenmeyer.

A partir del número de potencia se calculó la potencia consumida mediante el siguiente número adimensional:

$$P = n^{\circ}Pot \cdot \rho \cdot N^3 \cdot ds^5$$

Ecuación 13 – Número de potencia

A partir de la potencia se calculó la velocidad de disipación de energía por unidad de masa.

$$Pm = \frac{P}{VL \cdot \rho}$$

A partir de la potencia consumida se calculó la velocidad de disipación de energía por unidad de volumen.

$$Pv = \frac{P}{VL}$$

Ecuación 14 – Velocidad de disipación de energía (potencia volumétrica).

5.13. Cálculo de la longitud crítica del remolino λ (*eddy*)

Durante el mezclado se forman remolinos que se rompen para dar remolinos más pequeños. Los remolinos poseen energía cinética que se transfiere a los remolinos de menor tamaño. Cuando los remolinos son muy pequeños no pueden sostener el movimiento rotatorio y su energía cinética se disipa en forma de calor. El proceso de ruptura del flujo en remolinos cada vez más pequeños se denomina dispersión. La dispersión facilita una transferencia más rápida de materia a través del recipiente. El grado de homogeneidad que es posible alcanzar como resultado de la dispersión viene limitada por el tamaño de los remolinos más pequeños que pueden formarse en un determinado fluido. Este tamaño viene dado aproximadamente por la escala de mezcla de Kolmogoroff.

Dentro de los remolinos existe poca mezcla ya que el flujo rotatorio interior se produce siguiendo unas líneas de rotación. Por lo tanto, para alcanzar mezcla a una escala menor que la escala Kolmogoroff debe existir difusión.

Los daños potenciales que puede sufrir una partícula suspendida dependen de la relación entre su tamaño y la longitud crítica del remolino (λ), según la teoría de la turbulencia isotrópica de Kolmogoroff (Kolmogoroff 1958).

$$\lambda = \left[\frac{(\mu/\rho)^3}{Pm} \right]^{1/4}$$

Ecuación 15 – Longitud crítica de remolino (*eddy*).

Donde μ es la viscosidad dinámica (Pa.s), ρ la densidad (kg/m³) y Pm la velocidad de disipación de energía por unidad de masa (W/kg). En estado estacionario, la velocidad de disipación de energía por unidad de masa es igual a la potencia suministrada por la turbina.

5.14. Volumen total de la fase gaseosa retenida ε (hold-up)

Este parámetro se lo midió para las columnas de burbujeo, haciendo la diferencia entre el volumen del cultivo dentro de la columna con el aireador apagado, y el volumen del cultivo dentro de la columna con el aireador funcionando. Se evalúa de acuerdo al método de diferencia de volumen propuesto por Chisti (1989):

$$\varepsilon = \frac{V_G}{V_G + V_L}$$

Ecuación 16 – Ecuación para el cálculo del volumen retenido ε (Hold up).

Dónde V_G y V_L son los volúmenes de gas y de líquido en la columna de burbujeo. Indica la fracción retenida de gas dentro del volumen de cultivo.

5.15. Programas utilizados

Los gráficos, correlaciones y cálculos se realizaron con Excel 2010 (versión 14.0.4760.1000) y con Mathcad 14 versión 14.0.0.163 [revisión 702091438].

Los análisis de varianza y Test de Tukey se realizaron con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI (versión 16.1.03).

Las reacciones químicas y las moléculas representadas se realizaron con programa de modelado moléculas ACD/ChemSketch v.12.01

5.16. Tratamiento de datos y análisis estadístico

La existencia de diferencias significativas entre las distintas condiciones de cada experimento se determinó a partir de un análisis de la varianza (ANOVA). Posteriormente se realizó el test de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, y establecer así grupos homogéneos. Para ambos procedimientos el nivel de confianza aplicado fue del 95,0%.

6. Resultados

6.1. Ensayo en Erlenmeyer agitado

6.1.1. Ensayo en Erlenmeyer agitado de 500 mL sin deflectores

En este ensayo, los Erlenmeyers estáticos fueron realizados por triplicado, los ensayos agitados a 100 y 150 r.p.m. fueron realizados por duplicado debido a la disponibilidad del agitador orbital y el tamaño de los Erlenmeyers.

En la **figura 20** se muestra la evolución de la biomasa de *S. platensis* obtenida, expresada en gramo de peso seco por litro de cultivo (g PS/L) versus el tiempo (días). Cada punto corresponde al valor promedio obtenido de la biomasa y las barras de error corresponden a una vez el desvío estándar (D.S.) de cada una de los cultivos.

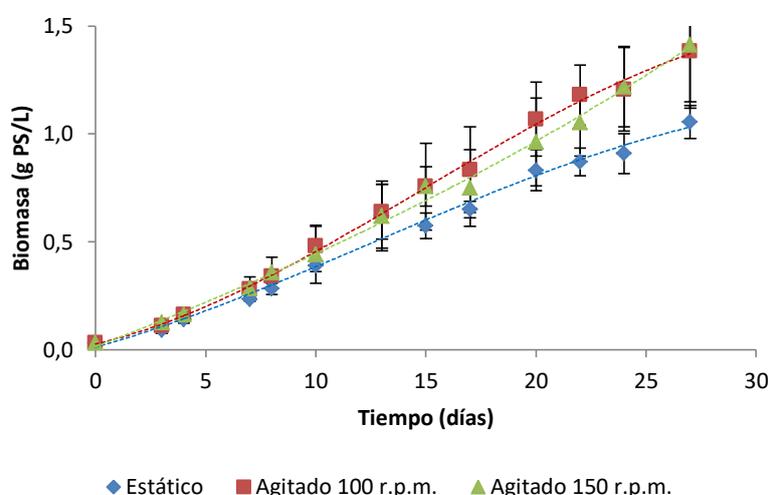


Figura 20 – Curva de crecimiento expresada en biomasa (g PS/L) de *S. platensis* versus tiempo para el ensayo en Erlenmeyers agitados de 500 mL.

El análisis estadístico de los resultados de la biomasa microalgal según el test ANOVA seguido de una prueba de HSD (honestidad estadística significativa) de Tukey, para un nivel de confianza del 95,0 %, indican la ausencia de diferencia estadística significativa entre los distintos cultivos. Sin embargo a partir de los 10 días de cultivo, se observó una tendencia de incremento de la biomasa producida en los cultivos agitados (100 y 150 r.p.m.) en relación a los cultivos estáticos. Al cumplirse los 27 días de cultivo se observó que la producción de biomasa fue de 1,41 g PS/L en los cultivos agitados a 150 r.p.m., 1,38 g PS/L en los cultivos a 100 r.p.m., y 1,06 g PS/L para los cultivos estáticos. Es decir, se registró un incremento de la biomasa del 31,0 % y del 34,0 % en los cultivos agitados a 100 y 150 r.p.m., respectivamente, en comparación con los cultivos estáticos.

Con respecto a los parámetros cinéticos de crecimiento se obtuvo una velocidad específica de crecimiento 28,7 % más alta en los cultivos agitados a 100 r.p.m., y 22,8 % más alta en los cultivos agitados a 150 r.p.m. comparadas con los cultivos estáticos.

En cuanto al coeficiente de transferencia de masa, se encontró que en los cultivos agitados a 100 r.p.m. llegó a ser un 93,3 % más alto que el coeficiente de los cultivos estáticos, y 80 % más alto en los cultivos agitados a 150 r.p.m. comparado con los cultivos estáticos.

Comparando la velocidad de disipación de energía, esta resultó mayor para los cultivos a 150 r.p.m. con respecto a los cultivos a 100 r.p.m.

La longitud crítica del remolino, como era esperable, fue menor en los Erlenmeyers a 150 r.p.m. comparada con el valor obtenido en los Erlenmeyers a 100 r.p.m.

En la **Tabla 13** se reúne los resultados de la cinética de crecimiento, coeficiente de transferencia de masa, velocidad de disipación de energía y longitud crítica de remolino en Erlenmeyers agitados y estáticos de 500 mL.

Tabla 13 – Parámetros cinéticos de crecimiento de *S. platensis*, coeficiente de transferencia de masa para el CO₂, velocidad de disipación de energía y longitud crítica del remolino para el ensayo en Erlenmeyers agitados de 500 mL.

Erlenmeyer	μ (días ⁻¹)	td (días)	IC	kla_{CO_2} (hr ⁻¹)	Biomasa final (g PS/L)	P/V (W/m ³)	λ (μm)
Estacionario	0,219 ± 0,013 ^a	3,17 ± 0,18 ^a	32,2 ± 2,4 ^a	21,4 ± 2,5	1,06 ± 0,08 ^a	-	-
Agitado 100 r.p.m.	0,286 ± 0,040 ^b	2,43 ± 0,09 ^b	42,5 ± 7,4 ^a	28,3 ± 5,0	1,38 ± 0,23 ^a	41,4	70,2
Agitado 150 r.p.m.	0,269 ± 0,001 ^b	2,58 ± 0,01 ^b	43,5 ± 9,2 ^a	35,1 ± 6,6	1,41 ± 0,29 ^a	129	52

Con respecto a la variación en el pH de los cultivos, no se hallaron diferencia estadística significativa entre los cultivos estáticos, y los agitados. Sin embargo, todos los cultivos de *S. platensis* exhibieron una alcalinización del medio de cultivo desde el valor inicial de pH = 9,46, hasta un valor máximo de 10,87 para el cultivo en Erlenmeyer agitado a 100 r.p.m. En la **figura 21** se muestra la evolución del pH de los cultivos en Erlenmeyer de 500 mL.

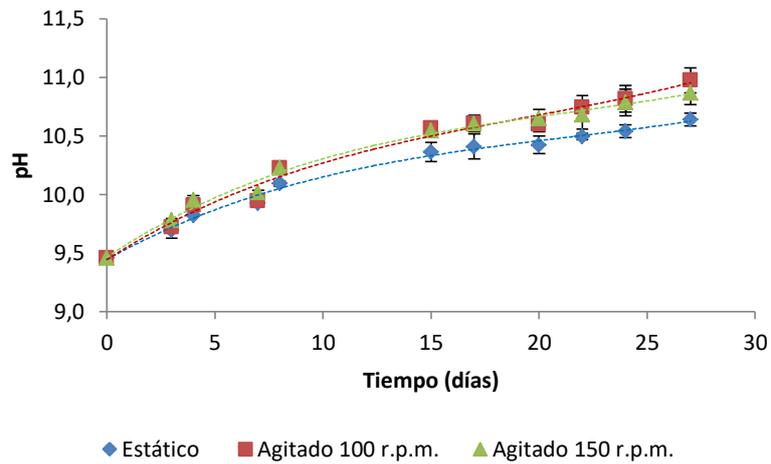


Figura 21 – Evolución del pH de los cultivos de *S. platensis* utilizando Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a 100 y 150 r.p.m.

Con respecto a la composición bioquímica de *S. platensis*, se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas en relación al contenido de proteínas, lípidos, carotenos, clorofila A, ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina. En cambio, si se encontraron diferencias estadísticas en el contenido de hidratos de carbono. Estos presentaron un incremento del 57,4 % en los cultivos agitados a 150 r.p.m. en comparación con los cultivos estáticos.

Por otro lado, se observó una tendencia de incremento en el contenido proteico cuando los Erlenmeyers fueron agitados.

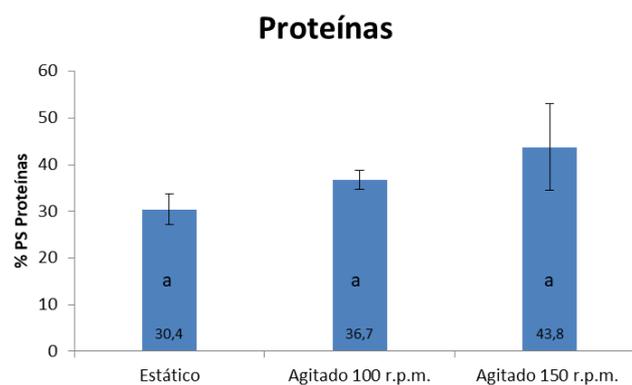


Figura 22 – Contenido de proteínas de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

Hidratos de carbono

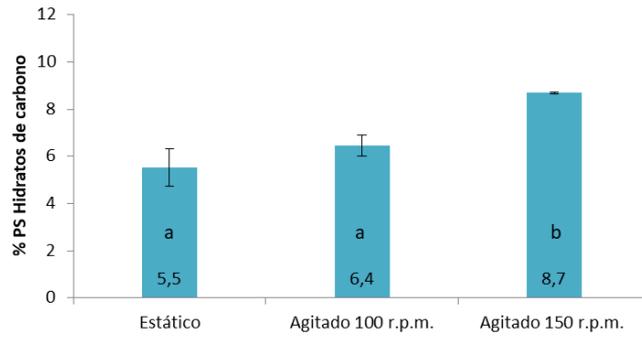


Figura 23 – Contenido de hidratos de carbono de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

Lípidos

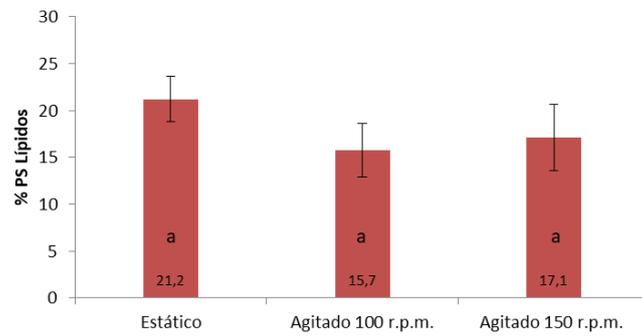


Figura 24 – Contenido de lípidos de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

Clorofila A

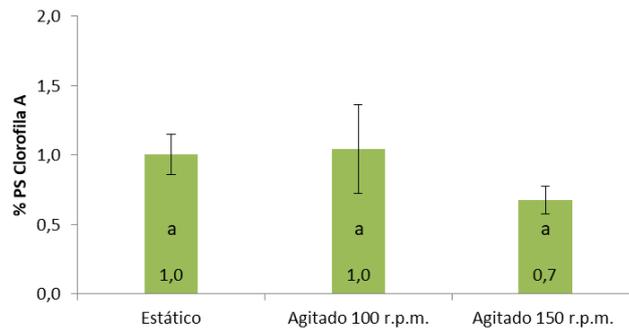


Figura 25 – Contenido de clorofila A de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

Carotenoides

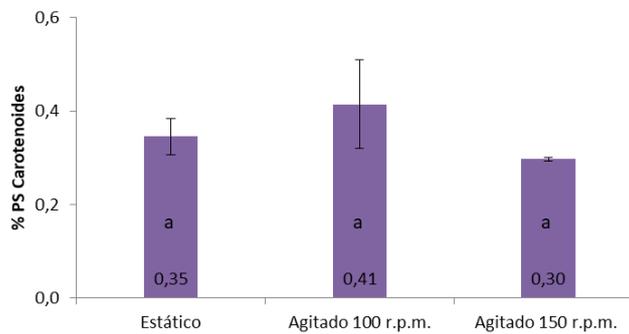


Figura 26 – Contenido de carotenoides de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

Ficocianina

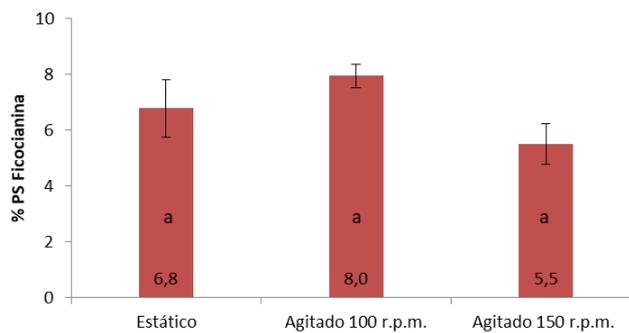


Figura 27 – Contenido de ficocianina de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

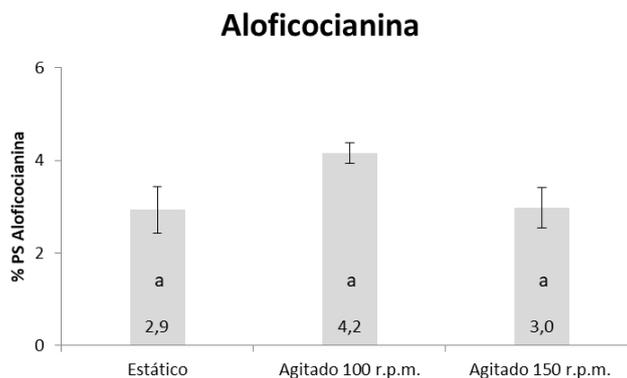


Figura 28 – Contenido de aloficocianina de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

6.1.2. Ensayo en Erlenmeyer agitados de 500 mL con deflectores

Los ensayos llevados a cabo en Erlenmeyers estáticos fueron realizados por triplicado, mientras que los ensayos realizados en Erlenmeyers agitados fueron realizados por duplicado debido a la disponibilidad del agitador orbital y al tamaño de los Erlenmeyers.

En la **Figura 29** se muestra la evolución de la biomasa de *S. platensis* obtenida, expresada en gramos de peso seco por litro de cultivo (g PS/L) versus el tiempo (días). Cada punto corresponde al valor promedio obtenido de la biomasa y las barras de error corresponden al desvío estándar (D.S.) de cada una de los cultivos.

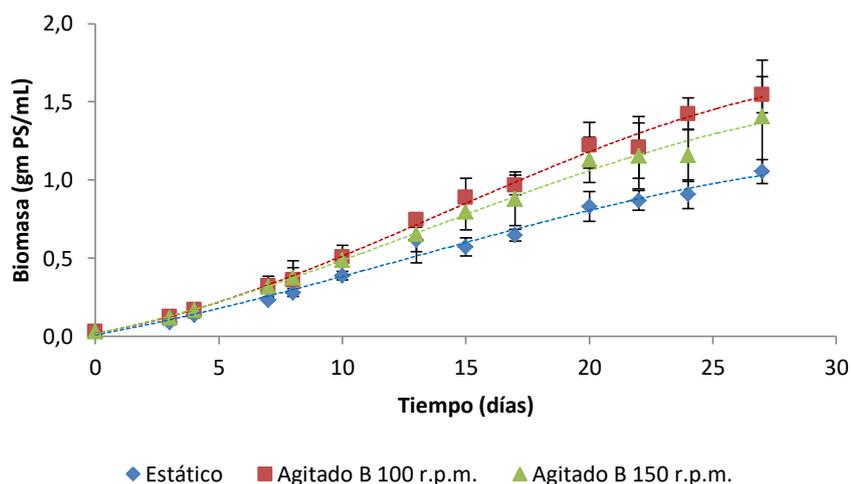


Figura 29 – Curvas de crecimiento de *S. platensis* obtenidas utilizando Erlenmeyers con deflectores de 500 mL estáticos y agitados a distintas velocidades de agitación. Biomasa expresada en g PS/L versus tiempo.

El análisis estadístico de los resultados de la biomasa muestra que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos cultivos. Sin embargo a partir de los 7 días de cultivo, y hasta el final del ensayo, se observó una tendencia de incremento de la biomasa microalgal en los Erlenmeyers agitados (100 y 150 r.p.m.) en comparación con los Erlenmeyers estáticos.

A los 27 días de cultivo la producción de biomasa fue de 1,41 g PS/L, 1,54 g PS/L y 1,06 g PS/L para los Erlenmeyers agitados a 150 r.p.m., agitados a 100 r.p.m. y estáticos, respectivamente. Estas diferencias indican un aumento de la biomasa de un 46,4 % en los cultivos agitados a 100 r.p.m., y del 33,3 % en los cultivos agitados a 150 r.p.m. en relación con los cultivos estáticos.

Se observó que, en referencia a los parámetros cinéticos de crecimiento, la velocidad específica de crecimiento fue 30,6 % mayor en los cultivos agitados a 100 r.p.m., y 26,9 % mayor en los cultivos a 150 r.p.m.; ambos casos en referencia a los cultivos estáticos.

El coeficiente de transferencia de masa aumentó un 130 % en los cultivos a 100 r.p.m., y 179 % en los cultivos agitados a 150 r.p.m.; en ambos casos referidos a los cultivos estáticos.

En la **Tabla 14** se muestran los resultados de los parámetros cinéticos de crecimiento de *S. platensis*, el coeficiente de transferencia de masa para el CO₂, la velocidad de disipación de energía y longitud crítica de remolino para el ensayo en Erlenmeyers agitados con deflectores de 500 mL.

Tabla 14 – Parámetros cinéticos de crecimiento de *S. platensis*, coeficiente de transferencia de masa para el CO₂, velocidad de disipación de energía y longitud crítica del remolino para el ensayo en Erlenmeyers bafleados de 500 mL agitados.

Erlenmeyer	μ (días ⁻¹)	td (días)	IC	kla_{CO_2} (hr ⁻¹)	Biomasa final (mg PS/mL)	P/V (W/m ³)	λ (μm)
Estático	0,219 ± 0,013 ^a	3,17 ± 0,18 ^a	32,2 ± 2,4 ^a	21,4 ± 2,5	1,06 ± 0,08 ^a	-	-
Agitado B 100 r.p.m.	0,286 ± 0,040 ^a	2,45 ± 0,34 ^b	47,6 ± 3,6 ^a	49,2 ± 10,2	1,54 ± 0,12 ^a	> 41,4	< 70,2
Agitado B 150 r.p.m.	0,278 ± 0,003 ^a	2,50 ± 0,03 ^{a,b}	43,3 ± 11,3 ^a	59,6 ± 7,1	1,41 ± 0,36 ^a	> 129	< 52

En cuanto a la variación en el pH del cultivo, el análisis estadístico indica que existen diferencias significativas entre los distintos cultivos. Se observan dos grupos homogéneos, uno para el cultivo estático, y el segundo grupo para los cultivos agitados a 100 y 150 r.p.m. Además todos los cultivos de *S. platensis* presentaron un aumento en su alcalinidad a medida que el cultivo avanzaba. Se partió de un pH inicial de 9,46 y al finalizar el ensayo el pH fue de 11,09 para el cultivo agitado a 100 r.p.m. siendo este el máximo valor de pH. En la **Figura 28** se representa la evolución del pH del ensayo en Erlenmeyers agitados con deflectores de 500 mL.

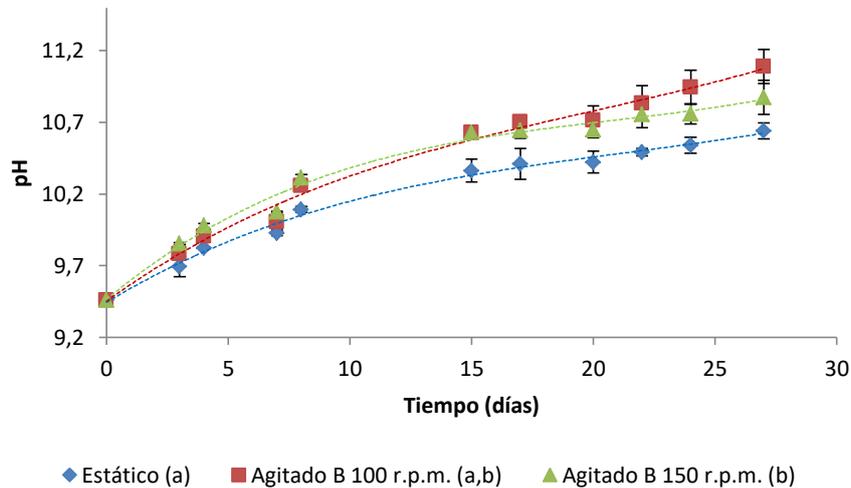


Figura 30 – Evolución del pH de los cultivos de *S. platensis* utilizando Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyer bafleados de 500 mL agitados a 100 y 150 r.p.m.

Con respecto a la composición bioquímica de *S. platensis*, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los contenidos de proteínas, lípidos, carotenos, clorofila A, ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina. No obstante, se registró una diferencia significativa con un incremento del 58,5 % en el contenido de hidratos de carbono de los cultivos en Erlenmeyers con deflectores de 500 mL a 150 r.p.m. en comparación con los cultivos estáticos.

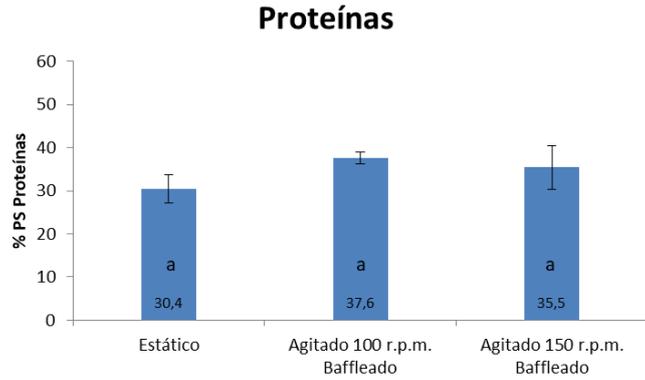


Figura 31 – Contenido de proteínas de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers baffleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

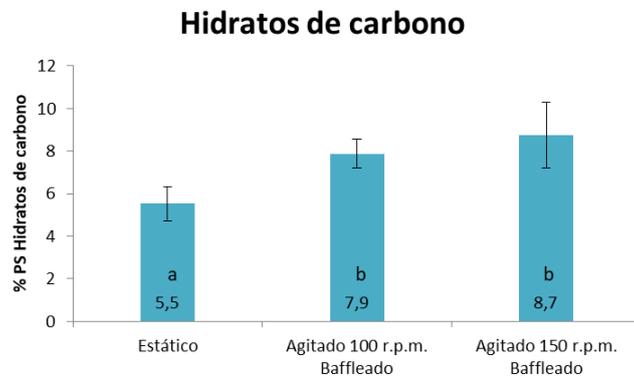


Figura 32 – Contenido de hidratos de carbono de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y y Erlenmeyers baffleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

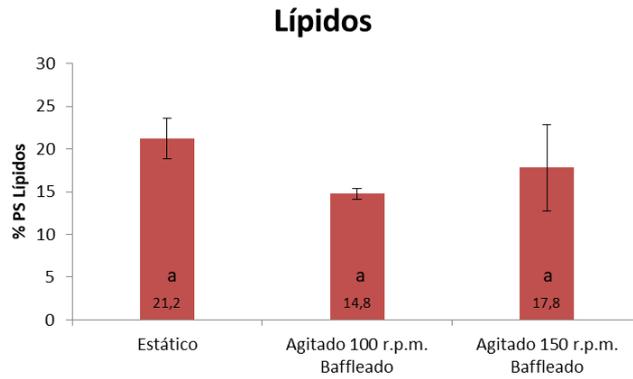


Figura 33 – Contenido de lípidos de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers baffleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

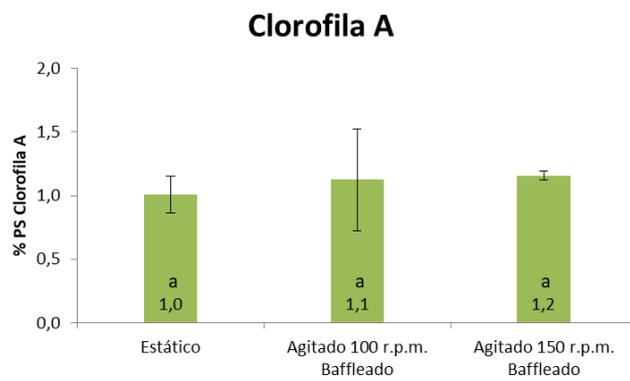


Figura 34 – Contenido de clorofila A de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers baffleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

Carotenoides

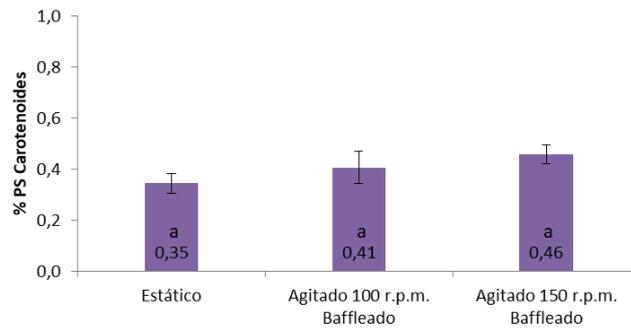


Figura 35 – Contenido de carotenoides de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers baffleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

Ficocianina

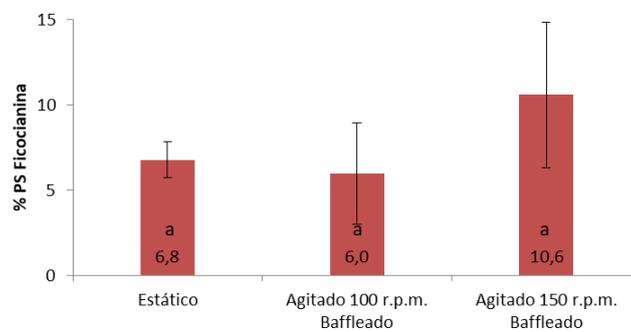


Figura 36 – Contenido de ficocianina de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers baffleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

Aloficocianina

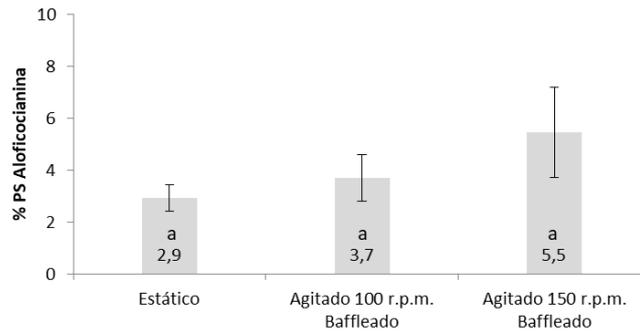


Figura 37 – Contenido de aloficocianina de cultivos de *S. platensis* creciendo en Erlenmeyers de 500 mL estáticos y Erlenmeyers baffleados de 500 mL agitados a distintas velocidades de agitación. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

6.2. Ensayo en columna de burbujeo

Los ensayos en columnas de burbujeo fueron realizados por duplicado, tomando muestras periódicas durante 21 días.

En la **Figura 39** se muestra la evolución de la biomasa obtenida expresada en miligramo de peso seco por mililitro de cultivo (g PS/L) versus el tiempo (días). Cada punto corresponde al valor promedio obtenido de la biomasa y las barras de error corresponden al desvío estándar de cada una de las muestras.

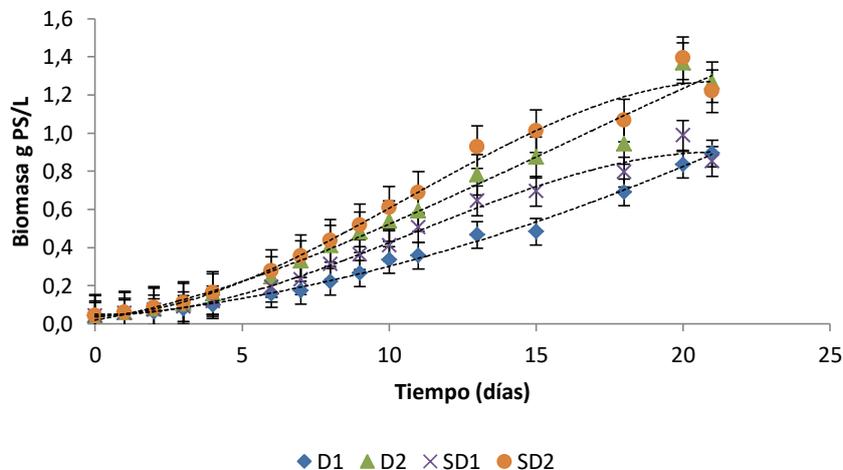


Figura 38 – Curvas de crecimiento de *S. platensis* obtenidas utilizando columnas de burbujeo de 200 mL con difusor (D1 y D2) y sin difusor (SD1 y SD2) con distintos caudales de aireación. Biomasa expresada en g PS/L versus tiempo. D= con difusor; SD= sin difusor. D1=0,008 vvm; D2=0,019 vvm; SD1=0,012 vvm; SD2=0,034 vvm.

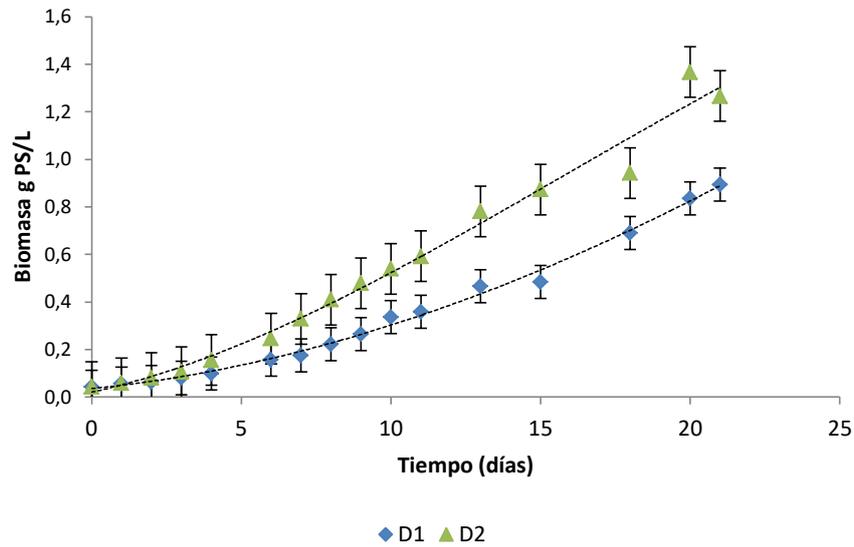


Figura 39 - Curvas de crecimiento de *S. platensis* obtenidas utilizando columnas de burbujeo de 200 mL con difusor (D1 y D2) y distintos caudales de aireación. Biomasa expresada en g PS/L versus tiempo. D= con difusor. D1=0,008 vvm; D2=0,019 vvm.

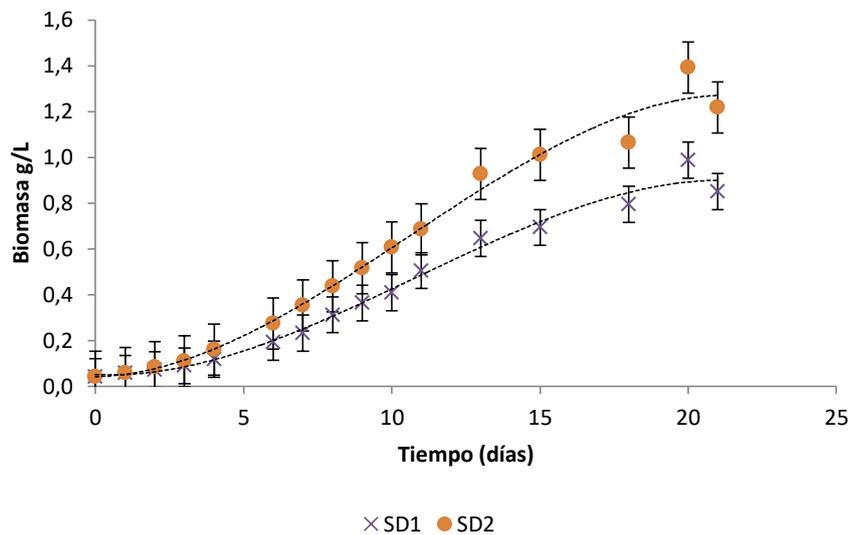


Figura 40 - Curvas de crecimiento de *S. platensis* obtenidas utilizando columnas de burbujeo de 200 mL sin difusor (SD1 y SD2) y distintos caudales de aireación. Biomasa expresada en g PS/L versus tiempo. SD= sin difusor. SD1=0,012 vvm; SD2=0,034 vvm.

Al analizar los gráficos de las **Figuras 38, 39 y 40**, se encontraron diferencias estadísticas significativas en los cultivos en columnas de burbujeo con difusores (D1 y D2), al igual que en los cultivos en columnas de burbujeo sin difusores (SD1 y SD2). Aunque no se

encontraron diferencias comparando los cultivos con difusores a bajos caudales de aireación (D1, SD1), al igual que al comparar los cultivos con altos caudales de aireación (D2, SD2).

Sin embargo, luego de los 10 días de cultivo, se observó una tendencia de incremento de la biomasa producida en los ensayos con mayor caudal de aireación con difusor y el menor caudal de aireación sin difusor, respecto a los demás ensayos. Al cumplirse 21 días de cultivo se observó que la mayor producción de biomasa fue de 1,27 g PS/L en los cultivos de las columnas con difusor (D1), comparada con 0,85 g PS/L correspondiente a las columnas sin difusor (SD1). Es decir, se obtuvo un 48,8 % más de biomasa en los cultivos sin difusor.

En la **Tabla 15** se reúnen los resultados de los parámetros cinéticos de crecimiento de *S. platensis*, el coeficiente de transferencia de masa y el volumen total de la fase gaseosa retenida (hold-up) para el ensayo realizado en columnas de burbujeo. Los superíndices indican los grupos homogéneos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95,0 %según el test ANOVA seguido de una prueba de HSD (honestidad estadística significativa) de Tukey.

Tabla 15 – Parámetros cinéticos de crecimiento de *S. platensis*, coeficiente de transferencia de masa para el CO₂, y volumen total de la fase gaseosa retenida (hold-up) en columnas de burbujeo con y sin difusores a diferentes caudales de aireación. D= con difusor; SD= sin difusor.

Ensayo	vvm	μ (días ⁻¹)	td (días)	IC	klac _{o2} (hr ⁻¹)	Biomasa final (mg PS/mL)	Hold-up ϵ
D1	0,008	0,203 ± 0,016	3,41 ± 0,27	20,3 ± 2,0	14,52 ± 0,12	0,89 ± 0,08	0,0099
D2	0,019	0,275 ± 0,022	2,52 ± 0,20	29,2 ± 2,3	17,68 ± 0,06	1,27 ± 0,11	0,0196
SD1	0,012	0,227 ± 0,018	3,06 ± 0,025	19,3 ± 1,6	15,40 ± 0,16	0,85 ± 0,07	0,0196
SD2	0,034	0,295 ± 0,024	2,35 ± 0,19	28,1 ± 2,3	37,50 ± 0,23	1,22 ± 0,10	0,0385

En todos los cultivos de *S. platensis* llevados a cabo en columnas de burbujeo, con y sin difusores se observó un aumento en el valor del pH, con su correspondiente alcalinización. Al comienzo del cultivo, el incremento fue importante variando de un valor de 9,17 original, a un valor alrededor de 10,3 en solo tres días. Dicho valor, luego de 10 días de ensayo, llegó a estabilizarse y su aumento fue mucho más suave, para finalmente obtener un valor alrededor de 10,6 para el resto del tiempo de cultivo. En la **Figura 41** se observa la evolución del pH de los cultivos en columna de burbujeo.

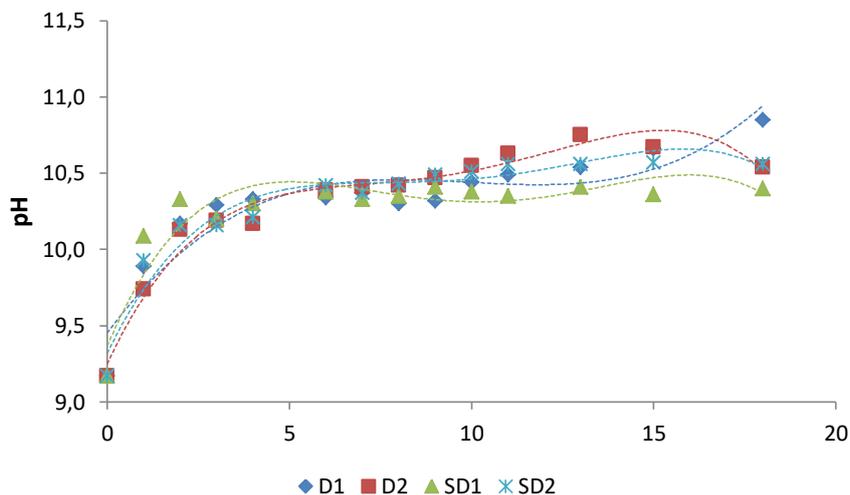


Figura 41 – Evolución del pH de los cultivos de *S. platensis* utilizando Columnas de burbujeo de 200 mL con difusor (D1, D2) y sin difusor (SD1, SD2), a distintos caudales de aireación. D= con difusor; SD= sin difusor. D1=0,008 vvm; D2=0,019 vvm; SD1=0,012 vvm; SD2=0,034 vvm.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en torno al perfil bioquímico de los cultivos de *S. platensis* en las columnas de burbujeo, con y sin difusores a distintos caudales de aireación. Aunque si se presentó una tendencia de incremento en el contenido de proteínas en los cultivos con difusor a bajos caudales de aireación (D1).

Proteínas

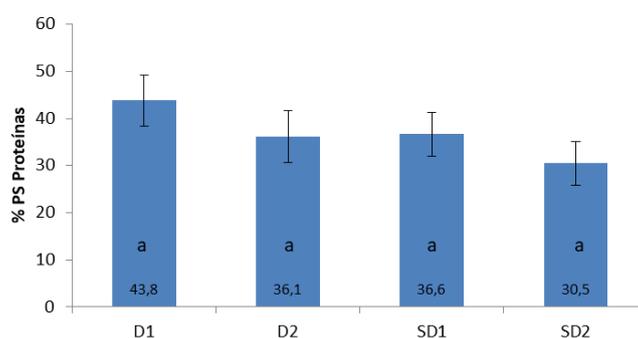


Figura 42 – Contenido de proteínas de cultivos de *S. platensis* creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2). Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. D= con difusor; SD= sin difusor. D1=0,008 vvm;

D2=0,019 vvm; SD1=0,012 vvm; SD2=0,034 vvm.

Hidratos de carbono

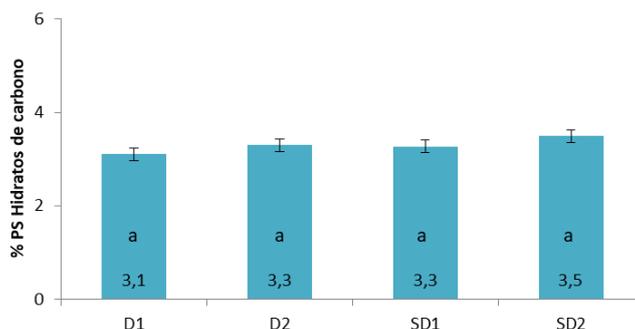


Figura 43 – Contenido de hidratos de carbono de cultivos de *S. platensis* creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2). Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. D= con difusor; SD= sin difusor. D1=0,008 vvm; D2=0,019 vvm; SD1=0,012 vvm; SD2=0,034 vvm.

Lípidos

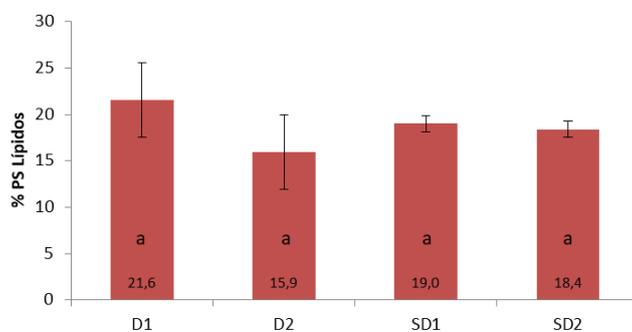


Figura 44 – Contenido de lípidos de cultivos de *S. platensis* creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2). Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. D= con difusor; SD= sin difusor. D1=0,008 vvm; D2=0,019 vvm; SD1=0,012 vvm; SD2=0,034 vvm.

Clorofila A

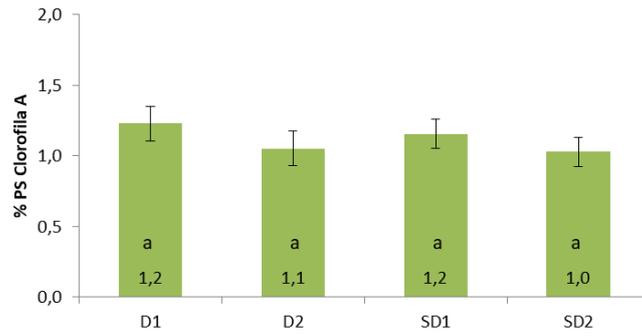


Figura 45 – Contenido de clorofila A de cultivos de *S. platensis* creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2). Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. D= con difusor; SD= sin difusor. D1=0,008 vvm; D2=0,019 vvm; SD1=0,012 vvm; SD2=0,034 vvm.

Carotenoides

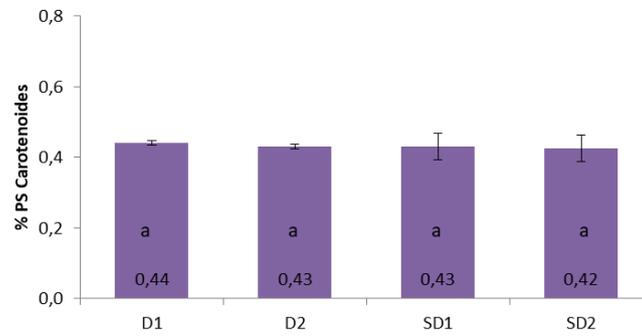


Figura 46 – Contenido de carotenoides de cultivos de *S. platensis* creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2). Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. D= con difusor; SD= sin difusor. D1=0,008 vvm; D2=0,019 vvm; SD1=0,012 vvm; SD2=0,034 vvm.

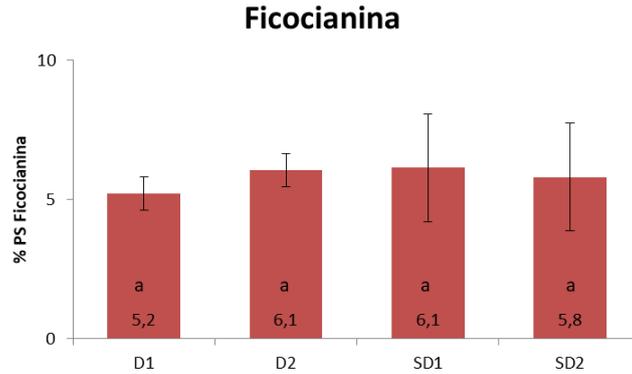


Figura 47 – Contenido de ficocianina de cultivos de *S. platensis* creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2). Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. D= con difusor; SD= sin difusor. D1=0,008 vvm; D2=0,019 vvm; SD1=0,012 vvm; SD2=0,034 vvm.

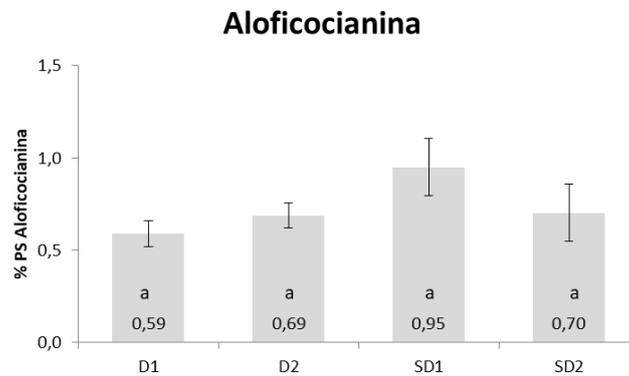


Figura 48 – Contenido de aloficocianina de cultivos de *S. platensis* creciendo en columnas de burbujeo de 200 mL con difusores (D1, D2) y sin difusores (SD1, SD2). Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. D= con difusor; SD= sin difusor. D1=0,008 vvm; D2=0,019 vvm; SD1=0,012 vvm; SD2=0,034 vvm.

6.3. Cultivo en biorreactor de tanque agitado

El ensayo en el biorreactor de tanque agitado (MY-CONTROL Applikon Biotechnology) fue realizado durante 14 días, tomando muestras periódicas de cultivo de *S. platensis* por triplicado. La velocidad de agitación del biorreactor se fijó en 250 r.p.m., la cual fue definida utilizando como criterio de escalado la velocidad de disipación de energía (potencia volumétrica) de uno de los cultivos del ensayo en Erlenmeyers agitados de 500 mL. Se eligieron los cultivos agitados a 100 r.p.m. en Erlenmeyer de 500 mL y se calculó cuál debería ser la velocidad de rotación en el biorreactor de tanque agitado, de modo que tengan la misma

velocidad de disipación de energía (potencia volumétrica) utilizando las ecuaciones 12, 13, 14 y 15 del apartado 5.12.

En la **Figura 49** se muestra la evolución de la biomasa obtenida expresada g PS/L versus el tiempo (días). Cada punto corresponde al valor promedio obtenido de la biomasa y las barras de error corresponden al desvío estándar (D.S.) de cada una de las muestras.

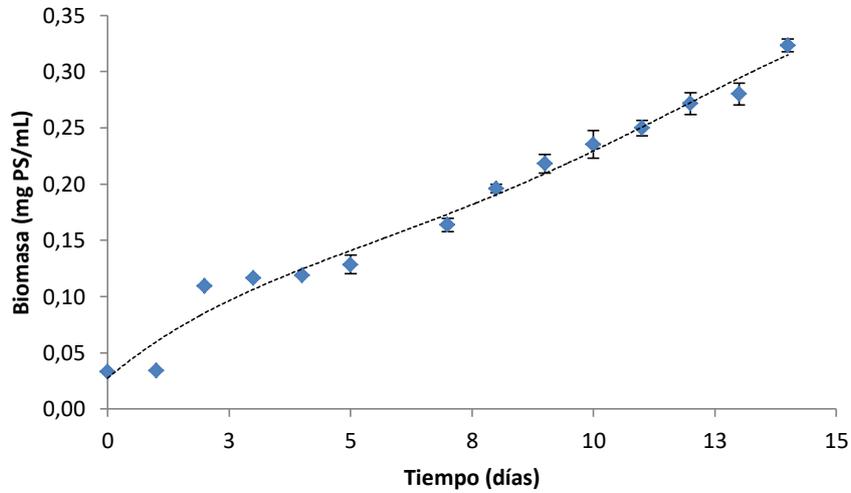


Figura 49 – Curva de crecimiento de *S. platensis* creciendo en un biorreactor de tanque agitado de 3 L a una velocidad de agitación de 250 r.p.m. Biomasa expresada en g PS/L versus tiempo.

En la **Tabla 16** se reúnen los resultados de los parámetros cinéticos de crecimiento, coeficiente de transferencia de masa para el CO₂, velocidad de disipación de energía (potencia volumétrica) y longitud crítica del remolino (*eddy*) para un cultivo de *S. platensis* creciendo en un biorreactor de tanque agitado.

Tabla 16 –Parámetros cinéticos de crecimiento de *S. platensis*, coeficiente de transferencia de masa para el CO₂, velocidad de disipación de energía y longitud crítica del remolino para el ensayo biorreactor tanque agitado a 250 r.p.m.

Ensayo	velocidad de crecimiento μ (días ⁻¹)	tiempo de duplicación (días)	Índice de crecimiento	kla_{CO_2} (hr ⁻¹)	Biomasa final (mg PS/mL)	P/V (W/m ³)	λ (μ m)
Biorreactor	0,123 ± 0,03	5,62 ± 1,31	8,69 ± 0,17	18,1 ± 0,9	0,323 ± 0,005	44,5	68,9

La variación en el pH del cultivo resultó más gradual que en los otros sistemas de cultivo, alcalinizando el medio a medida que transcurría el tiempo de cultivo, sin embargo, a una velocidad mucho menor. A partir de los 7 días de cultivo, el valor del pH se estabilizó aproximadamente en 10.

En la **Figura 50** se representa la variación del pH del cultivo de *S. platensis* en el biorreactor tanque agitado a 250 r.p.m.

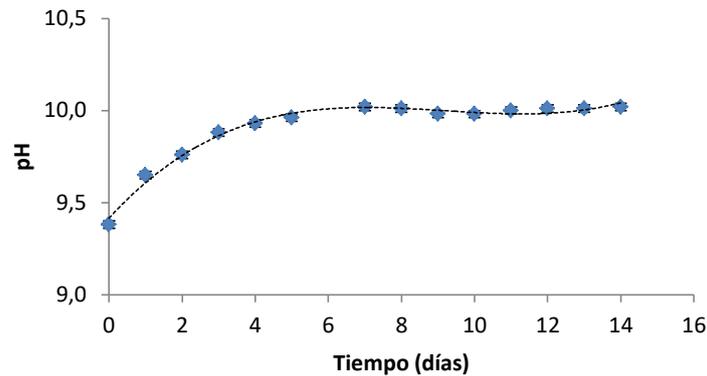


Figura 50 – Curva de pH de *S. platensis* versus tiempo para el ensayo en biorreactor tanque agitado.

Debido a que la potencia volumétrica de los cultivos en Erlenmeyers de 500 mL agitados a 100 r.p.m. fueron el punto de partida para definir la velocidad de agitación del biorreactor, se comparó la producción de biomasa de *S. platensis* en ambos cultivos, y se representó la curva de biomasa microalgal expresada en g PS/L (**Figura 51**).

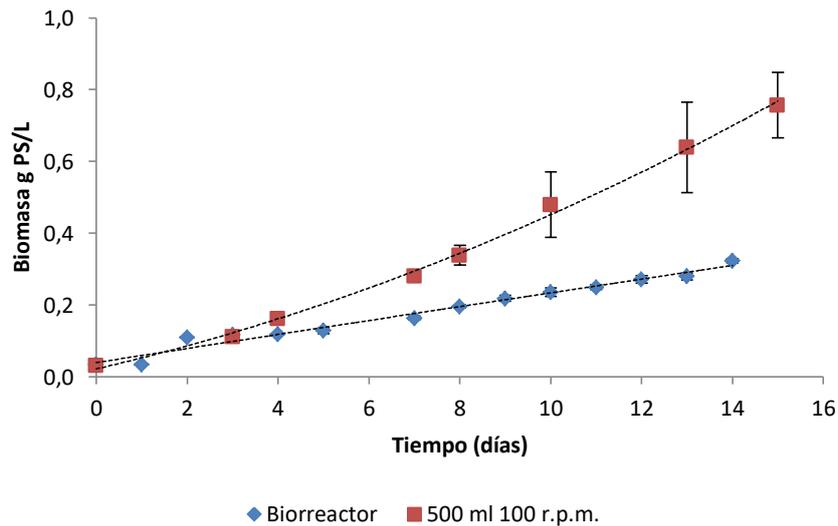


Figura 51 - Curvas de crecimiento de *S. platensis* creciendo en un biorreactor de tanque agitado y en Erlenmeyers de 500 mL agitados a 100 r.p.m. Biomasa expresada en g PS/L.

Realizando la comparación de ambos cultivos, se pudo observar una marcada diferencia de un 54% en la concentración de biomasa entre los cultivos en Erlenmeyer de 500 mL agitados a 100 r.p.m. y el cultivo en el biorreactor tanque agitado. Los cultivos en Erlenmeyers agitados resultaron los más productivos.

En la **Tabla 17** se expresan los resultados de la cinética de crecimiento de *S. platensis*, junto con el coeficiente de transferencia de masa para el CO₂, velocidad de disipación de energía (potencia volumétrica) y longitud crítica del remolino (*eddy*) para el ensayo en el biorreactor tanque agitado.

Tabla 17 – Parámetros cinéticos de crecimiento de *S. platensis*, coeficiente de transferencia de masa para el CO₂, velocidad de disipación de energía y longitud crítica del remolino para el ensayo biorreactor tanque agitado a 250 r.p.m. y los cultivos en Erlenmeyer de 500 mL agitados a 100 r.p.m.

Ensayo	μ (días ⁻¹)	tiempo de duplicación (días)	Índice de crecimiento	kla (hr ⁻¹)	Biomasa final (mg PS/mL)	P/V (W/m ³)	λ (μ m)
Biorreactor	0,123 ± 0,03	5,62 ± 1,31	8,69 ± 0,17	19,5 ± 2,3	0,323 ± 0,005	44,5	68,9
Agitado 100 r.p.m.	0,286 ± 0,04	2,43 ± 0,09	22,5 ± 1,4	37,7 ± 4,1	0,700 ± 0,109	41,1	70,2

El cultivo en el biorreactor de tanque agitado obtuvo un 54 % menos de concentración de biomasa microalgal que en los Erlenmeyers de 500 mL agitados a 100 r.p.m. Esto es concordante con el hecho de que se obtuvo el doble de la velocidad específica de crecimiento, lo cual llevó a que el tiempo de duplicación fuese la mitad en el cultivo en Erlenmeyer. Además, el índice de crecimiento llegó a un valor 158 % más alto en los cultivos en Erlenmeyers de 500 mL.

Con respecto a la composición bioquímica de *S. platensis*, los siguientes gráficos muestran el valor promedio obtenido para cada biomolécula y las líneas de error indican la desviación estándar de la medición. Según el análisis estadístico, se encontraron diferencias significativas en los contenidos de clorofila A, carotenoides y aloficocianinas entre los dos sistemas de cultivo, siendo mayor el contenido de las mismas en el cultivo del biorreactor de tanque agitado, y se observó una tendencia a ser mayor, pero sin diferencias estadísticas, en el contenido de ficocianina en el biorreactor comparado con los cultivos en Erlenmeyer agitado a 100 r.p.m.

Proteínas

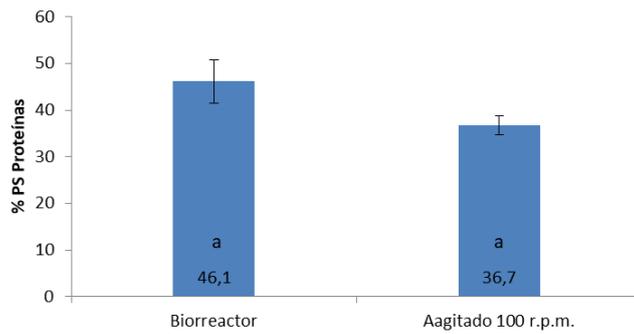


Figura 52 - Contenido de proteínas de cultivos de *S. platensis* creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

Hidratos de carbono

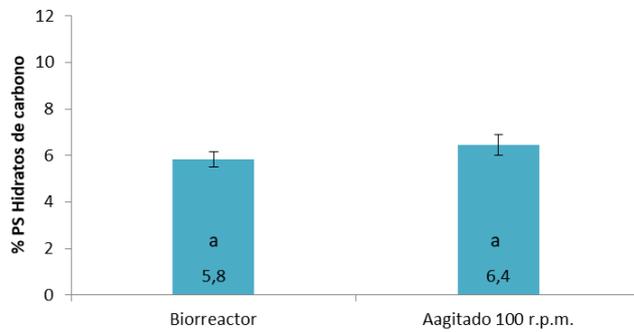


Figura 53 – Contenido de hidratos de carbono de cultivos de *S. platensis* creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

Lípidos

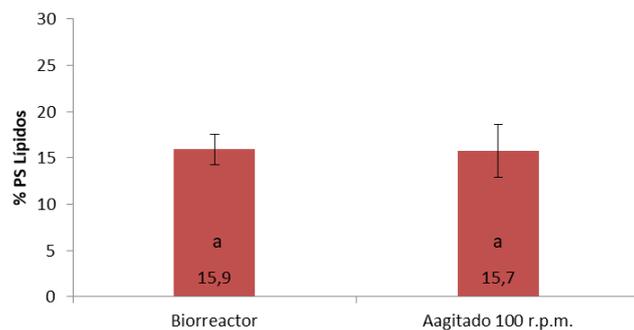


Figura 54 – Contenido de lípidos de cultivos de *S. platensis* creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

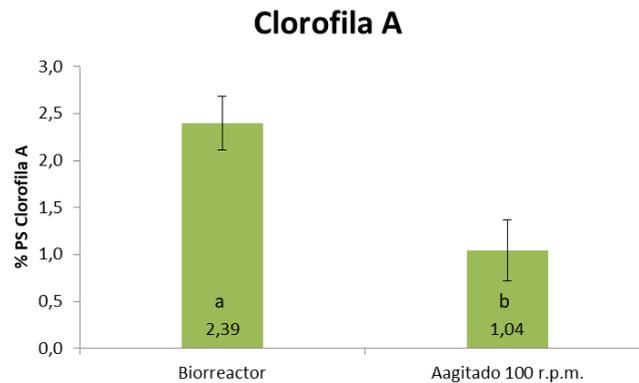


Figura 55 – Contenido de clorofila A de cultivos de *S. platensis* creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

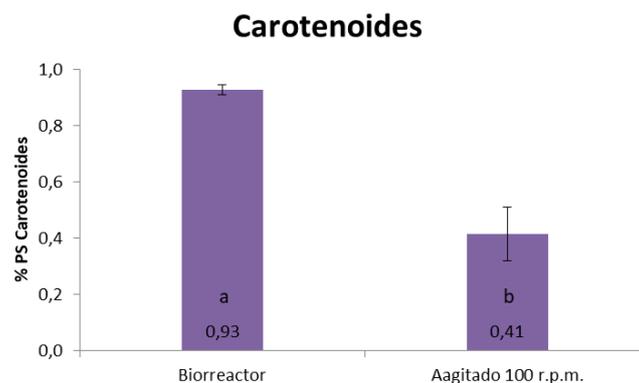


Figura 56 – Contenido de carotenoides de cultivos de *S. platensis* creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

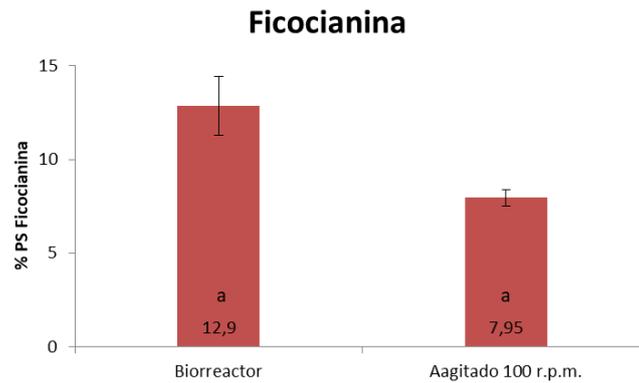


Figura 57 – Contenido de ficocianina de cultivos de *S. platensis* creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

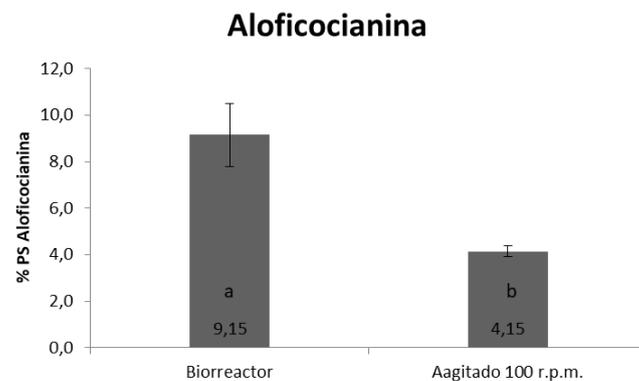


Figura 58 – Contenido de aloficocianina de cultivos de *S. platensis* creciendo en Biorreactor tanque agitado de 3000 mL y Erlenmeyers de 500 mL agitado a 100 r.p.m. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey.

7. Discusión

En todos los casos los cultivos de *S. platensis* presentaron una fase de crecimiento exponencial entre 8 y 10 días aproximadamente. Al inicio de los cultivos, los mismos se adaptaron a las condiciones impuestas por cada sistema de cultivo. Si bien la tasa de crecimiento fue baja al comienzo, ésta se incrementó con el tiempo de cultivo, similar a lo informado por Becker (1982).

7.1. Cultivos en Erlenmeyer agitados

Cuando se realizaron cultivos de *S. platensis* en Erlenmeyers agitados sin deflectores la producción de biomasa se incrementó hasta un 33 %, mientras que cuando se llevaron a cabo en Erlenmeyers agitados con deflectores, la producción de biomasa alcanzó un incremento de un 45 %, en relación a los Erlenmeyers estáticos. Esto podría deberse a un mejor intercambio gaseoso, acompañado con el aumento del coeficiente de transferencia de CO₂ (kla_{CO_2}) de los cultivos agitados con respecto a los cultivos estáticos. En todos los cultivos agitados el valor del kla_{CO_2} aumentó entre un 30 y un 60 % cuando se utilizaron Erlenmeyers sin deflectores, y entre un 130 y un 180 % cuando se emplearon Erlenmeyers sin deflectores, en comparación al uso de Erlenmeyers estáticos.

Értola et al. (1965) informaron valores de kla_{O_2} para Erlenmeyers de 500 ml sin deflectores agitados a 190 r.p.m. Estos valores son similares a los obtenidos para una velocidad de rotación de 150 r.p.m. en Erlenmeyers sin deflectores de 500 ml ensayados en nuestro estudio.

Tabla 18 – Comparación de valores de kla obtenidos por Értola et al. (1965) con valores de kla de este estudio. Valores de transferencia expresados para O₂.

Volumen del Erlenmeyer	VL	Deflectores	kla_{O_2} (Ertola et al.) 190 r.p.m.	kla_{O_2} 150 r.p.m.
500 mL	200 mL	No	33,1 hr ⁻¹	33,3 hr ⁻¹

Sin embargo en los ensayos del segundo grupo (Erlenmeyers con deflectores), la concentración de biomasa microalgal fue levemente mayor (9 % superior) para los cultivos a 100 r.p.m. con respecto a los agitados a 150 r.p.m., a pesar de que estos últimos poseían un valor de kla_{CO_2} superior en relación al obtenido a 100 r.p.m.

La presencia de deflectores en los Erlenmeyers agitados incrementa aún más los valores de kla_{CO_2} en comparación con los que no poseen deflectores, ya que generan mayor turbulencia y por lo tanto mejoran la transferencia de gases. Asimismo, un aumento de la velocidad de agitación en este tipo de Erlenmeyers conduciría a un incremento de los valores de kla_{CO_2} . Este hecho ha sido verificado en nuestro estudio y está de acuerdo a lo reportado por Értola et al. (1965) y McDaniels & Bailey (1969). Si bien los valores de transferencia de O₂ y CO₂ pueden ser determinados por algunos métodos, los valores de potencias volumétricas,

velocidad de disipación de energía y longitudes críticas de remolinos de Kolmogorov; solo pueden ser estimadas ya que no hay expresiones matemáticas que permitan su cálculo. A pesar de este hecho, un aumento de la turbulencia del cultivo por adición de deflectores incrementaría la velocidad de disipación de energía, y en consecuencia disminuiría la longitud crítica del remolino de Kolmogorov. Peter et al. (2006) han informado que la presencia de los deflectores en Erlenmeyers aumenta en un orden de magnitud la velocidad de disipación de energía en comparación con los Erlenmeyers que no lo poseen. Por lo tanto, la aparición de remolinos de Kolmogorov más pequeños por incremento de la turbulencia, podría generar un mayor estrés hidrodinámico sobre los cultivos de *S. platensis*, y como consecuencia, disminuir la producción de biomasa microalgal, como se ha observado en los cultivos en Erlenmeyers agitados a 150 r.p.m. con deflectores.

Además, a igual velocidad de agitación (100 r.p.m.), la adición de deflectores a los Erlenmeyers condujo a un incremento del 12 % en la producción de biomasa microalgal respecto a los Erlenmeyers sin deflectores. Este incremento de la biomasa es consistente con un mayor valor de kla_{CO_2} determinado en este tipo de Erlenmeyers, ya que la presencia de deflectores no solo mejora la transferencia de gases, sino también la distribución de los nutrientes. Asimismo, a una velocidad de agitación de 150 r.p.m., los cultivos en Erlenmeyers con deflectores produjeron concentraciones de biomasa similares a las obtenidas en Erlenmeyers sin deflectores, lo cual podría deberse al nivel de turbulencia generado por la adición de deflectores y al estrés hidrodinámico al que se encuentran sometidos los cultivos de *S. platensis* que impediría un incremento aún mayor en la producción de biomasa.

Por otro lado, en los cultivos llevados a cabo en Erlenmeyers estáticos se observó la formación de una capa compacta y densa de tricomas de *S. platensis* en la superficie del medio de cultivo. Esta formación podría deberse a un crecimiento competitivo por la luz, que limita el paso de la luz al fondo del Erlenmeyer. Este fenómeno explicaría en parte la limitación del crecimiento de microalgal en los cultivos estáticos en comparación con los cultivos en agitación. Mezclas inadecuadas promueven formación de aglomerados celulares que disminuyen la velocidad de transferencia de masa comprometiendo la viabilidad celular. Por esto, el continuo movimiento celular garantiza altas producciones de biomasa (Sato et al., 2010).

En los ensayos realizados con Erlenmeyers agitados sin deflectores a 100 y 150 r.p.m., se observó la formación de ondas en la superficie del cultivo de *S. platensis*, siendo más pronunciada en los cultivos de 150 r.p.m. Asimismo, en los Erlenmeyers agitados sin deflectores a 150 r.p.m., se observó que el cultivo se concentraba a un lado del Erlenmeyer, formando perturbaciones mayores en la superficie del cultivo.

Este comportamiento ha sido observado anteriormente en Erlenmeyers agitados y se explica en base al acoplamiento del frente de flujo con la velocidad de la pared del Erlenmeyer (Büchs et al., 2001b). Cuando el fluido sigue el movimiento del Erlenmeyer se dice que el flujo está en “fase” y en caso contrario se dice que el flujo se encuentra “fuera de fase”, lo que implica que el líquido no se encuentra sincronizado con el movimiento de agitación (Büchs et al., 2001). Büchs et al., desarrollaron un número adimensional que es conocido como Número de Fase, Ph , el cual se encuentra definido como:

$$Ph = \frac{d_o}{d} \cdot (1 + 3 \cdot \log(Re_f)) > 1,26$$

Ecuación 17 – Número de fase definido por Büchs et al. (2001).

El cual depende del número de Reynolds para la película líquida:

$$Re_f = \frac{\rho \cdot (2 \cdot \pi \cdot n) \cdot d^2}{\mu} \cdot \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \cdot \left(\frac{V_L^{1/3}}{d} \right)^2} \right)^2$$

Ecuación 18 – Número de Reynolds para la película líquida.

Dónde: d es el diámetro interior máximo del Erlenmeyer (m), d_o es el diámetro de agitación (m), n es la velocidad de agitación (s^{-1}), V_L es el volumen de líquido (m^3), ρ es la densidad (kg/m^3) y μ es la viscosidad dinámica (Pa.s).

Cuando el valor del número de fase (Ph) resulta mayor a 1,26 se dice que el líquido se encuentra “en fase”, y por lo tanto el mezclado es adecuado, de lo contrario el líquido está “fuera de fase” y no se mezcla correctamente. La operación fuera de fase está acompañada de una fuerte disminución de la energía de disipación, el rendimiento de la mezcla y la transferencia de masa, de acuerdo a lo sostenido por Büchs et al. (2001). En la **tabla 19** se pueden apreciar los valores de Ph de los cultivos realizados en Erlenmeyers sin deflectores, agitados a diferentes velocidades.

Tabla 19 – Números de fase obtenidos para cultivos de *S. platensis* en Erlenmeyers sin deflectores agitados a distintas velocidades.

Ensayo	Velocidad de rotación (r.p.m.)	Re_f	Ph
500 mL	100	1618	2,02
	150	2428	2,13

Particularmente, en todos los Erlenmeyers agitados sin deflectores y a diferentes velocidades, los cultivos de *S. platensis* se encontraron en fase, ya que los valores de Ph resultaron ser mayores a 1,26.

7.2. Cultivos en columnas de burbujeo

De acuerdo a los resultados obtenidos, el empleo de columnas de burbujeo favorece la producción de biomasa de *S. platensis*, debido a que estos sistemas de cultivo poseen un adecuado rendimiento de transferencia de gases y nutrientes mediante agitación neumática (inyección de aire). La inyección de gases desde el fondo de la columna favorece el mezclado, suministra suficiente CO₂ y, dependiendo de la altura de la misma, se logra una eficiente remoción de oxígeno disuelto en el medio. Además, el efecto de continuos movimientos celulares de las zonas más oscuras a las zonas más iluminadas de la columna por acción de las burbujas, es esencial para garantizar altas producciones de biomasa (Carvalho et al.2006).

Cuando los cultivos de *S. platensis* fueron agitados por elevados caudales de aire dentro de las columnas, la producción de biomasa se incrementó. Los incrementos de biomasa microalgal registrados en la condición D2 en relación a la condición D1 (43 % superior), son acompañados por un incremento en el caudal de aire (146 % mayor), y por un mayor valor del kla_{CO_2} (22 % mayor). Lo mismo sucedió para las condiciones SD2 y SD1, en donde el incremento de la biomasa microalgal de SD2 resultó 44 % superior a la obtenida en SD1, lo cual es traducido por un aumento en el caudal de aire (182 % mayor), y un incremento en el valor del kla_{CO_2} (144 % mayor). Ronda et al. (2012) reportaron resultados sobre la producción de *S. platensis* en columnas de burbujeo de 20 L, cuyos caudales de aire fueron desde 0,2 a 1,2 vvm. En coincidencia con nuestros resultados, las mayores producciones de biomasa se registraron en los mayores caudales de aire (1,2 vvm).

El aumento del caudal de aireación está ligado al aumento de la turbulencia en la columna, disminuyendo el espesor de la película líquida alrededor de la burbuja de aire, y por lo tanto incrementando el coeficiente de transferencia de CO₂ (kla_{CO_2}). Estos efectos redundan en un aumento de la velocidad específica de crecimiento (μ) y de la biomasa microalgal. El coeficiente de transferencia de masa (kla) es una de las características que determina la capacidad del reactor para sostener el crecimiento celular óptimo (Ramirez et al., 2013).

Se han informado resultados sobre cultivos de *S. platensis* en columnas de burbujeo de 200 L con velocidades de aireación de 0,02 vvm obteniéndose concentraciones de biomasa de 1,84 g/L (Torres et al., 2015). Similares velocidades de aireación (0,019 vvm) fueron aplicadas en la condición D2 alcanzándose similares concentraciones de biomasa (1,27 g/L), pero utilizando columnas de burbujeo de 100 mL. Estos hechos nos darían la pauta de un posible criterio de escalado aplicado a la producción de *S. platensis* en columnas de burbujeo, basado en la velocidad de aireación y en asociación con el coeficiente de transferencia de CO₂ (kla_{CO_2}).

Si se realiza una comparación entre la condición SD1 (sin difusor) y la condición D2 (con difusor), se pueden observar caudales de aireación del mismo orden (0,012 vvm para SD1 y 0,019 para D2). Sin embargo, la producción de biomasa de *S. platensis* obtenida en la condición D2 resultó un 49 % superior que la obtenida en SD1. Esto puede explicarse por el valor del kla_{CO_2} , el cual resultó un 15 % mayor en D2 en comparación con la condición SD1. Si bien los caudales de aire son similares, la presencia del difusor en D2 contribuiría con el incremento del valor del kla_{CO_2} al disminuir el tamaño de las burbujas y aumentar el área de transferencia del CO₂ al medio de cultivo.

El uso de difusores provoca una variedad de tamaños de burbujas que tienen relación con el coeficiente de transferencia (kla). Burbujas pequeñas son generalmente beneficiosas sobre la transferencia de oxígeno debido al mayor contenido de gas en el medio y a la mayor área interfacial. Aunque burbujas muy pequeñas (<2 mm diámetro) causan más daño celular que burbujas mayores (~10 mm diámetro) debido a la tensión de cizallamiento (Chisti y Jauregui-Haza, 2002).

Asimismo, los valores de ε (hold up) resultaron función del caudal de aire inyectado en las columnas, tanto en las columnas que tuvieron difusor como en las que no lo tenían, siendo estos valores superiores a caudales de aire más elevados. Este incremento en los valores de ε (hold up) fue acompañado por el aumento en los valores del kla_{CO_2} .

Según los datos publicados Chisti (1989), las mediciones de retención de gas en un fotobiorreactor de columna de burbujeo confirman que el hold-up aumenta con la potencia específica de entrada debida a la aireación. Chisti (1989) estableció correlaciones para el cálculo del kla , utilizando la potencia específica de entrada como parámetro en columnas de burbujeo, utilizando sistemas aire-agua. Encontró que el valor del kla es directamente proporcional a la potencia específica de entrada.

Por otro lado, un parámetro importante a tener en cuenta es la relación entre la superficie iluminada y el volumen del cultivo (S/V). A medida que se incrementa la relación S/V , mayor resulta la concentración celular en el cultivo. Una forma de incrementar la productividad volumétrica sin aumentar la intensidad de luz en la superficie, es acortar el camino de la luz mediante la disminución del diámetro de la columna (Tredici, 1999). Sin embargo, emplear rutas luminosas muy cortas implica obstáculos técnicos adicionales, ya que la fuerza motriz necesaria para mantener un flujo turbulento es inversamente proporcional al diámetro del tubo empelado (Contreras et al. 2003).

7.3. Cultivos en biorreactor tanque agitado

Si bien *S. platensis* fue capaz de crecer bajo las condiciones de agitación y aireación impuestas por un biorreactor de tanque agitado, la producción de biomasa no resultó la esperada, ya que se obtuvieron 0,323 g PS/L al cabo de 14 días de cultivo. Este valor indica un detrimento de un 54 % en relación a la biomasa obtenida en los Erlenmeyers sin deflectores agitados a 100 r.p.m., la cual fue de 0,700 g PS/L al cabo del mismo período de cultivo.

Las condiciones de operación del biorreactor de tanque agitado fueron definidas teniendo en cuenta la velocidad de energía de disipación como criterio de escalado entre un Erlenmeyer agitado y el biorreactor. Para ello se realizó el cálculo de la velocidad de energía de disipación de los Erlenmeyers agitados a 100 r.p.m. (condición en la cual se obtuvo la máxima producción de biomasa), y este valor se aplicó posteriormente al cultivo en un biorreactor de tanque agitado. El valor de la velocidad de energía de disipación fue de 44,5 W/m³. A partir de este valor se logró establecer la velocidad de agitación de la turbina Rushton del biorreactor, la cual resultó de 250 r.p.m.

Utilizando esa condición de operación en el biorreactor de tanque agitado se pudo observar que el perfil de biomasa de *S. platensis* no resultó como se esperaba, siendo muy diferente a la obtenida en los Erlenmeyers agitados a 100 r.p.m, sistema a partir del cual se partió para realizar el escalado.

Asimismo, cuando se determinó el valor del kla_{CO_2} bajo tales condiciones de operación del biorreactor, se obtuvo un valor de $19,5 \text{ h}^{-1}$, el cual resultó un 49 % menor al determinado en los Erlenmeyers agitados a 100 r.p.m. Este valor de kla_{CO_2} fue además muy cercano al valor determinado en los Erlenmeyers estáticos ($21,4 \text{ h}^{-1}$) en donde la transferencia de gases se lleva a cabo fundamentalmente por difusión en ausencia de agitación. Este hecho podría explicar la disminución en la concentración de biomasa de *S. platensis* que se detectó en el biorreactor de tanque agitado.

Además, el gran volumen de cultivo (2 L) y la geometría del biorreactor de tanque agitado, no solo tienen influencia en los fenómenos de transferencia de CO_2 , sino también en el acceso de la luz a todo el volumen de cultivo. El gran volumen del biorreactor comparado con los otros sistemas de cultivo provoca que el acceso a la luz no sea uniforme. La baja relación superficie iluminada/volumen del cultivo (S/V) provoca disminución de la eficiencia fotosintética (Carvalho et al., 2006). La presencia de la luz en el cultivo microalgal es de suma importancia, ya que constituye la fuente de energía para este tipo de microorganismos autótrofos. Igualmente, el acceso a la luz en este tipo de biorreactores se dificulta con el aumento de la concentración microalgal que se da con el crecimiento, ya que las microalgas debido a su coloración tienden a sombreadarse entre ellas. Este fenómeno de sombreado y la baja relación S/V podría traducirse en una disminución de la concentración microalgal de *S. platensis* en el biorreactor de tanque agitado.

Por otro lado, si bien la velocidad de energía de disipación aplicada en el biorreactor fue similar a la determinada en los Erlenmeyers agitados, los sistemas de mezclado son muy diferentes, ya que la agitación en el biorreactor es llevado a cabo por el movimiento de turbinas, mientras que la agitación de un Erlenmeyer es realizado mediante el movimiento orbital de una plataforma. Una excesiva agitación puede provocar daños en las células debido a las fuerzas de cizalla generadas por las turbinas, disminuyendo la productividad e incluso provocando la muerte de las mismas (Brindley et al., 2004).

Por todo lo expuesto, y a partir del análisis de los resultados obtenidos en el biorreactor de tanque agitado, podríamos deducir que el kla_{CO_2} constante posiblemente sea el criterio de escalado más adecuado para el cultivo de *S. platensis*.

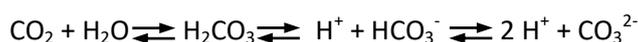
7.4. Evolución del pH en los tres sistemas de cultivo

En todos los casos el pH del medio de cultivo aumentó con el transcurso del tiempo, llegando aproximadamente a un máximo de 11,09 en los cultivos en Erlenmeyers agitados. Las microalgas de los géneros *Arthrospira* y *Spirulina* consumen los carbonatos y bicarbonatos de

su medio, y como consecuencia de ello tienen a incrementar aún más la alcalinidad del líquido, llegando incluso a un valor de pH de 11,5 (Whitton, 1992).

El medio de cultivo se alcaliniza por el consumo de la fuente de carbono, lo que genera bases como el NaOH. La medición de pH podría convertirse en una evaluación cuantitativa de la cantidad de biomasa en el cultivo: a mayor biomasa, mayor degradación de bicarbonato, y por consiguiente se eleva la concentración de grupos oxhidrilos en el medio, aumentándose así el pH (Pelizer, 2002).

La incorporación de CO₂ en el medio de cultivo de *S. platensis* genera la siguiente reacción:



Al incorporar CO₂ se logra acelerar la asimilación de carbono en el cultivo de *S. platensis*. A pH 9 se encuentra la mayor cantidad de bicarbonato, facilitando la disponibilidad para que la cianobacteria lo metabolice y se reproduzca (Contreras et al. 2003).

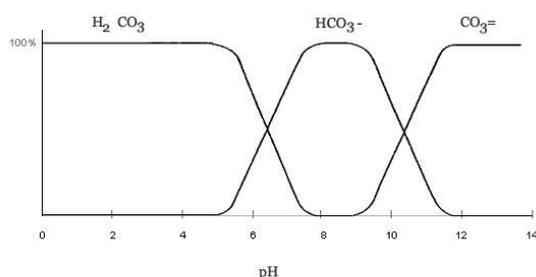


Figura 59 – Efecto del pH en la concentración de CO₂. Diagrama que muestra la relación entre el contenido porcentual de ácido carbónico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO₃⁻) y carbonato (CO₃⁼) y el pH

7.5. Composición bioquímica de *Spirulina platensis* en los tres sistemas de cultivo

Los perfiles bioquímicos de *S. platensis* en cada uno de los sistemas de cultivo evaluados no presentaron, en líneas generales, diferencias en relación a las biomoléculas determinadas (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, clorofila A, ficocianina, carotenoides, ficoeritrina y aloficocianina). Esto indicaría que los diferentes métodos de mezclado no tienen influencia en la composición bioquímica de *S. platensis*. La **Tabla 20** muestra la composición bioquímica de *S. platensis* determinada a partir de los resultados obtenidos en todos los ensayos realizados.

Tabla 20 – Composición bioquímica de *S. platensis* resultante de los tres sistemas de cultivo ensayados.

Biomolécula	Porcentaje
Proteínas	35,8 ± 5,2
Hidratos de carbono	5,9 ± 2,2
Lípidos	15,4 ± 5,5
Clorofila A	1,1 ± 0,4
Carotenoides	0,4 ± 0,1
Ficocianina	6,8 ± 2,4
Aloficocianina	3,0 ± 2,2

7.6. Evaluación de los tres sistemas de cultivo

Los diferentes sistemas de mezclado generaron distintas respuestas en los cultivos de *S. platensis*, esencialmente sobre los parámetros cinéticos de crecimiento y en la producción final de biomasa. Estas respuestas estarían fundamentadas en la naturaleza de los métodos de agitación, resultando muy distinta una agitación neumática (basada en el movimiento de burbujas generadas por inyección de aire), de una agitación mecánica (causada por el movimiento de turbinas o de una plataforma orbital). Las distintas configuraciones, geometrías y tamaños de los diferentes sistemas de cultivo, además, contribuyeron en gran medida con las distintas respuestas biológicas obtenidas.

Es así que, para un mismo período de cultivo (14 días), se pudo observar que los cultivos de *S. platensis* llevados a cabo en Erlenmeyers bafleados en agitación mecánica a 100 r.p.m. arrojaron los mejores resultados en relación a los índices de crecimiento microalgal, en comparación con el biorreactor de tanque agitado y las columnas de burbujeo (agitación neumática).

En la **Tabla 21** se realiza una comparación de los diferentes sistemas de cultivo evaluados, con los parámetros más relevantes de cada uno de ellos. Los datos mostrados representan la condición de cultivo en la cual se obtuvo la producción de biomasa más elevada determinada a los 14 días de cultivo.

Tabla 21 – Comparación de los parámetros más relevantes de cada sistema evaluado para el cultivo de *S. platensis*. Los datos mostrados de biomasa fueron determinados a los 14 días de cultivo.

Tipo de Ensayo	μ (d ⁻¹)	Kla _{CO2} (hr ⁻¹)	Biomasa (g PS/L)	I.C.
Biorreactor tanque agitado	0,123 ± 0,030	19,5 ± 2,3	0,323 ± 0,005	8,78
Erlenmeyer agitado Bafleado 100 r.p.m.	0,286 ± 0,040	49,2 ± 10,2	0,817 ± 0,084	24,5
Columna de burbujeo SD2	0,295 ± 0,024	37,5 ± 0,2	0,969 ± 0,078	22,1

Si bien las concentraciones de biomasa microalgal registradas en las columnas de burbujeo resultaron superiores a las mismas obtenidas en Erlenmeyers agitados, esto podría deberse a una mayor concentración de biomasa inicial (inóculo) presente en estas columnas agitadas neumáticamente.

Por otra parte, el Kla_{CO_2} resultó consistente con los resultados obtenidos, ya que el valor del mismo fue mayor en los Erlenmeyers agitados con respecto a las columnas de burbujeo. La diferencia en este parámetro fundamental de transferencia de materia, se vio reflejada en los índices de crecimiento alcanzados en estos sistemas de cultivo. Asimismo, es importante destacar que la presencia de baffles en estos sistemas de Erlenmeyers agitados no solo condujo a un incremento en el coeficiente de transferencia de CO_2 , sino que incrementaría la potencia volumétrica, mejorando el mezclado y como consecuencia distribuyendo los nutrientes de forma más efectiva, de acuerdo a lo reportado por Peter et al. (2006).

Finalmente, un importante aspecto a tener en cuenta en el proceso de elección de un sistema de cultivo apto para el crecimiento de microalgas a nivel industrial, es la factibilidad de llevar a cabo un escalado adecuado (*scale-up*).

El sistema de cultivo en Erlenmeyers agitados representa una alternativa válida para el cultivo de *S. platensis* a nivel laboratorio, dada la versatilidad como sistemas simples, económicos y de baja escala. Además, permiten trabajar con un gran número de unidades experimentales, en forma paralela y bajo las mismas condiciones de cultivo.

No obstante, las columnas de burbujeo poseen la ventaja de ser un sistema de cultivo fácilmente escalable en comparación con los Erlenmeyers agitados. Pueden operar a grandes volúmenes con una mayor capacidad de control de las condiciones del cultivo. Además, es un sistema eficaz de desgasificación para remover el oxígeno generado, producto de la fotosíntesis, el cual puede inhibir el crecimiento en ciertos niveles de concentración. Por otro lado, las columnas de burbujeo tienen la ventaja de suministrar una relación superficie iluminada/volumen del cultivo (S/V) grande, ocupando menos espacio terrestre.

Por todo lo expuesto anteriormente, y considerando un nivel de producción de biomasa microalgal a gran escala, las columnas de burbujeo podrían representar una alternativa viable para el cultivo de *S. platensis* bajo condiciones controladas.

8. Conclusión

De acuerdo a todo lo expuesto se pudieron elaborar las siguientes conclusiones:

- La producción de biomasa microalgal se ve favorecida por el mezclado, ya que éste mejora el acceso a los nutrientes, el intercambio gaseoso y la disponibilidad de la luz.
- El aumento de la velocidad de agitación incrementa el coeficiente de transferencia de CO_2 (kla_{CO_2}) en Erlenmeyers agitados, lo cual redundaría en un incremento de la concentración de la biomasa.
- La adición de deflectores a los Erlenmeyers aumenta la turbulencia del mezclado y el kla_{CO_2} en relación con los mismos sin deflectores, lo cual se traduce en un incremento de la biomasa microalgal.
- La aparición de remolinos de Kolmogorov más pequeños por incremento de la velocidad de agitación en Erlenmeyers con deflectores, podría generar un mayor estrés hidrodinámico sobre los cultivos de *S. platensis*, y como consecuencia, disminuir la producción de biomasa microalgal.
- La formación de una capa compacta y densa de tricomas de *S. platensis* en la superficie del medio de cultivo en Erlenmeyers estáticos, limitaría el paso de la luz al fondo del Erlenmeyer, lo que explica en parte la limitación del crecimiento microalgal.
- Todos los cultivos de *S. platensis* realizados en Erlenmeyers agitados sin deflectores se encontraron “en fase”, lo cual demuestra la presencia de un mezclado adecuado.
- El aumento del caudal de aire incrementa el coeficiente de transferencia de CO_2 (kla_{CO_2}) en columnas de burbujeo, lo cual redundaría en un incremento de la concentración de la biomasa microalgal.
- La presencia de difusores en las columnas de burbujeo contribuiría con el incremento de valor del kla_{CO_2} al disminuir el tamaño de las burbujas y aumentar el área de transferencia del CO_2 al medio de cultivo, lo cual incrementa la producción de biomasa de *S. platensis*.
- La baja relación superficie iluminada/volumen de cultivo, los fenómenos de sombreado celular y un valor de kla_{CO_2} pequeño podrían explicar la baja concentración microalgal de *S. platensis* observada en el biorreactor de tanque agitado.
- Una excesiva agitación en el biorreactor de tanque agitado podría provocar daños en los tricomas de *S. platensis* debido a las fuerzas de cizalla generadas por las turbinas, lo que podría reflejar la disminución en la producción de la biomasa.
- La composición bioquímica de *S. platensis* no se vio afectada por ninguno de los métodos de mezclado y sistemas de cultivo evaluados, para cada una de las biomoléculas determinadas.
- Los cultivos de *S. platensis* llevados a cabo en los Erlenmeyers agitados (agitación mecánica) arrojaron los mejores resultados en relación a los índices de crecimiento respecto a las columnas de burbujeo (agitación neumática) y el biorreactor de tanque agitado.
- Existiría una estrecha relación entre la producción de biomasa y el coeficiente de transferencia de CO_2 (kla_{CO_2}) en todos los sistemas de cultivo evaluados, lo que

posibilitaría la utilización del kla_{CO_2} constante como criterio de escalado para el cultivo de *S. platensis*.

- Aunque el sistema de Erlenmeyers agitados resultó ser más eficiente en relación a la producción de biomasa microalgal a escala laboratorio, las columnas de burbujeo representarían una alternativa viable a mayor escala para el cultivo de *S. platensis* bajo condiciones controladas.

9. Bibliografía

- Abbayes, H. (1989). Botánica: Vegetales inferiores. Reverté S.A., 68 – 95.
- Ación Fernández, F. G. Fernández, J. S. Sánchez, A. P. Molina, E. G & Y. Chisti. (2001). “Airlift driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance”. *Chemical Engineering Science*, 56, 2721-2732.
- Andersen R. (Ed.) (2005). Algal Culturing Techniques. *Elsevier Academic Press, California*, pp. 13-14.
- Albuquerque, M. C. G., Machado, Y. L., Torres, A. E. B., Azevedo, D. C. S., Cavalcante, C. L., Firmiano, L. R., & Parente, E. J. S. (2009). Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends. *Renewable Energy*, 34(3), 857-859.
- Apt, K.E., Behrens, P.W. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. *J. Phycol*, 35, 215-226.
- Barbosa, M. (2003). “Hydrodynamic stress and lethal events in sparged microalgae cultures”. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(1), 112-120.
- Barbosa, M. (2003). “Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency”. *Biotechnology and Bioengineering*,
- Barbosa, M.J., Hadiyanto, H. and Wijffels, R.H. (2004). Overcoming shear stress of microalgae cultures in sparged photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 85 (1), 78-85.
- Becker, E.W., Venkataraman, L.V. (1982). Biotechnology and exploitation of algae – The Indian Approach -. Gesellschaft fiir Technische Zusammenarbeit (GTZ) – Agency for Technical cooperation (GTZ).
- Becker, E.W. (1995). *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, 293.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology*, 58(2), 419-435.
- Berry, S., Bolychevtseva, Y.V., Rogner, M., Karapetyan, N.V. (2003). Photosynthetic and respiratory electron transport in the alkaliphilic cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Photosynthesis Research*, 78, 67-76.

- Borowitzka M.A., Borowitzka L. (1998). Cambridge University Press. *Micro-Algal Biotechnology*, 57–84.
- Brindley Alías, C., García-Malea López, M.C., Acién Fernández, F.G., Fernández Sevilla, J.M., García Sánchez, J.L. and Molina Grima, E. (2004). Influence of power supply in the feasibility of *Phaeodactylum tricornutum* cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(6): 723-733.
- Brejc, K., Ficner, R., Huber, R., & Steinbacher, S. (1995). Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 249(2), 424-440.
- Bryant, D. A., Hixson, C. S., & Glazer, A. N. (1978). Structural studies on phycobiliproteins III. Comparison of bilin-containing peptides from the beta subunits of C-phycocyanin, R-phycocyanin, and phycoerythrocyanin. *Journal of Biological Chemistry*, 253(1), 220-225.
- Büchs, J. (2001) Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem. Eng. J.* 7, 91–98.
- Büchs, J., Lotter, S., Milbradt, C. (2001) Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 7, 135–141.
- Bushell, M.E., Dunstan, G.L., Wilson, G.C. (1997) Effect of small-scale culture vessel type on hyphal fragment size and erythromycin production in *Saccaropolyspora erythraea*. *Biotechnol. Lett.* 19, 849–852.
- Cañizares, R., Ríos, E., Olvera, R., Ponce, T., Márquez, F. (1998). Fuentes Microbianas de Pigmentos. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 40: 87-107.
- Carvalho, A. P., Meireles, L., Malcata, X. F. (2006). Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnol Progr.* 22, 1490-1506.
- Chrismadha, T., Borowitzka, M.A., 1994. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* grown in a tubular photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 6, 67–74.
- Contreras Flores, C., Peña Castro J.M. and Flores Cotera L.B. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 8, 450-456.
- Chamorro, G., Salazar-Jacobo, M. (1995). Toxicología de la *Spirulina*. *Tecnología de alimentos*, 30, 13-14.

- Chamorro, G., Salazar, M., Gomes de Lima-Araujo, K., Pereira dos Santos, C., Ceballos, G., Fabila-Castillo, L. (2002). Actualización en la farmacología de *Spirulina* (*Arthrospira*), un alimento no convencional. *Arch. Latinoamer. Nutr*, 52, 232-240.
- Chattopadhyay, S., Srivastava, A.K., Bisaria, V.S. (2002) Optimization of culture parameters for production of podophyllotoxin in suspension culture of *Podophyllum hexandrum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102, 381–393.
- Chen, C.Y.; Kao, P.C.; Tsai, C.J.; Lee, D.J.; Chang, J.S. (2013). Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycoyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.*, 145, 307-312.
- Chisti, Y. (1989). Airlift bioreactors, Elsevier applied biotechnology series. Elsevier Science Publishers Ltd., 345 p
- Chisti, Y., U. Jauregui-Haza. (2002). Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 10, 143-153.
- Chorus, I. (2001). Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences. In – S. & V. Bderlin, 75–82.
- Cockx A., Line R. M., Hebrard A. (1995). Modeling of mass transfer coefficient kL in bubble columns. *Chemical engineering research & design*, 73 (6), 627-631.
- Cohen, Z. (1997) The chemicals of *Spirulina*. En: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press, 175-204.
- Cooper, C.M; Fernsotn, G.; Milles, S.A. (1944). Gas Liquid Contactor. *Indust. Eng. Chem.*, 36, 504-509.
- Dainippon (2005.) DIC's *Spirulina*, a symbol of high quality. Dainippon Ink & Chemicals.
- Deckwer W. D., Schumpe A. (1993). Improved Tools for bubble column reactor design and scale-up. *Chemical Engineering Process*, 48 (5), 889-911.
- Degen, J., Uebele, A., Retze, A., Schmid-Staiger, U. and Trosch, W. 2001. A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *Journal of Biotechnology*, 92, 89–94.
- Delanoue, J., Laliberte, G., Proulx, D. (1992). Algae and waste-water. *Journal of Applied Physiology*, 4, 247-254.
- De Marsac, N. T., & Houmard, J. (1988). Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra. *Methods in enzymology*, 167, 318-328.

- De Philippis, R., Vincenzini, M. (1998) Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 151-175.
- Deckwer, W.D., Schumpe, A. 1993. Improved Tools for bubble column reactor design and scale-up. *Chemical Engineering Process*, 48 (5), 889-911.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimeter method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28 (3), 350-356.
- Erazo, R., Cárdenas, J. (2001). Determinación experimental del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{la}) en un biorreactor batch. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* 4(2), 22-27
- Ertola R, Mazza L, Daguerre R (1965) Transferencia de oxígeno en erlenmeyers agitados. *Industria y Química*, 4, 220 - 224
- Fadavi, A., Chisti, Y. (2005). Gas-liquid mass transfer in a novel forced circulation loop reactor. *Chemical Engineering Journal*, 112(1), 73-80.
- Fay, P. (1983) The blue-greens (Cyanophyta-Cyanobacteria). Arnold, 88.
- Flores-Cotera, L., García-Salas, S. (2005). Gas holdup, foaming and oxygen transfer in a jet loop bioreactor with artificial foaming media and yeast culture. *Journal of Biotechnology*, 116 (4): 387–396.
- García-Ochoa F., Gómez E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology advances*, 27(2), 153-176.
- García-Ochoa, F., Gómez, E., Santos, V., Merchuk, J. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49 (3), 289-307.
- Gaddis, E.S. (1999). Mass transfer in gas-liquid contactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 38(4), 503-510.
- Gantt, E. (1981). Phycobilisomes. *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1), 327-347.
- Galaction A., Cascaval D., Oniscu C., Turnea M. 2004. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*. 20 (1), 85-94.
- Girard, P., Jordan, M., Tsao, M., Wurm, F.M. (2001) Small-scale bioreactor system for process development and optimization. *Biochem. Eng. J.* 7, 117–119.

- Glazer, A.N. (1994). Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *J. Appl. Phycol.* 6: 105-112.
- Glicklis, R., Mills, D., Sitton, D., Stortelder, W., Merchuk, J.C. (1998) Polysaccharide production by plant cells in suspension: experiments and mathematical modelling. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 732–740.
- Gudín, C. and Chaumont, D. (1991). Cell fragility-key problem of microalgae mass production on closed photobioreactors. *Bioresource Technology*, 38, 145–151.
- Gressel, J. (1979). Blue light photoreception. *Photochemistry and Photobiology*, 30, 749-754.
- Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of microbiological methods*, 85(2), 119-123.
- Grobbelaar J. (2000). Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology*, 2, 201-206.
- Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., Sakaguchi, M. (2000). Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 12, 435
- Huntley, M. E., & Redalje, D. G. (2007). CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 12(4), 573-608.
- Ibarra, R.U., Edwards, J.S., Palson, B.O. (2002) *E. coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. *Nature*, 420, 186–189.
- Jacob-Lopes, E., C. Scoparo, L. Lacerda, T. Franco. (2009). Effect of light cycles (Night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering Process*, 48, 306-310.
- Janssen, M., M. de Winter, J. Tramper, L. Mur, J. Snel, R. Wijffels. 2000. Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium duration light/dark cycles. *Journal Biotechnology* 78, 123-137.
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L. R., Wijffels, R. (2003). “Enclosed outdoor photo bioreactors: light regime photosynthetic efficiency, scale-up and future prospects”. *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 193-210.
- Knight, J. A., Anderson, S., & Rawle, J. M. (1972). Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clinical chemistry*, 18(3), 199-202.

- Knuckey, R. M., Brown, M. R., Robert, R., Frampton, D. M. F. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35 (3), 300-313.
- Klöckner, W. and Büchs, J. (2011). Shake-flask bioreactors, En Murray, M. Y.: Comprehensive Biotechnology (2nd edn), 213–226.
- Klockner W., Büchs J. (2012). Advances in shaking technologies. *Trends in Biotechnology*, 30 (6).
- Kolgomoroff, A., (1958) Collected works on the statistical theory of turbulence, Academic Verlag, Berlin.
- Kozlenko, R., Henson, R.H. (1998). Latest Scientific Research on *Spirulina*: Effects on the AIDS Virus, Cancer and the Immune System. www.spirulina.com
- Kronick, M.N. (1986). The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. *J. Immunol. Meth*, 92, 1-13.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Jurnal of Biological Chemistry*. 193(1), 265-275.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4), 629-636.
- Liu, C.M., Hong, L.N. (2001) Development of a shaking bioreactor system for animal cell cultures. *Biochem. Eng. J.* 7, 121–125.
- Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. *Applied Energy*, 88(10), 3389-3401.
- Marteiijn, R.C.L., Jurrius, O., Dhont, J., Gooijer, C.D., Tramper J, Martens DE (2003) Optimization of a feed medium for fed-batch culture of insect cells using a genetic algorithm. *Biotechnol. Bioeng.* 81, 269–278.
- Martin FPH. (2010). Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. Tesis de Maestría en Ingeniería. National University of Singapore.
- Mc Daniel, L. E., Bailey, E. G. (1969) Effect of shaking speed and type of closure on shake flask cultures. *Appl. Microb.* 17, 286-290.

- Mishra, S.K., Suh, W.I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M.S. & Yan, J. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Biosource Technology*. 155, 330-333.
- Molina Grima, E., Ación Fernández, F.G., García Camacho, F., Chisti, Y. (1999), Photobioreactors: Light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, 70, 1-3, 231-247.
- Mondragón BMA (1984). Cultivo y uso del alga tecuitlatl (*Spirulina maxima*), estudio recapitulativo. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. 49 pp.
- Moraes, C.C., Sala, L., Cerveira, G.P. & Kalil S.I. (2011). C-phycoerythrin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 28 (01), 45-49.
- Nascimento, E., Ruiz, R. 1990. Producao de biomassa de *Spirulina máxima* para alimentacao humana e animal. *Rev. Microbiol*, 21 (1), 85-97.
- Nielsen J., Villadsen J. (1994). *Bioreaction Engineering Principles*, 295-323.
- Oncel, S., Vardar Sukan, F. (2008). Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*), *Bioresource Technology*, 99.
- Payne, G.F., Davison, S.W., Tate, J.T. (1990) Experimental constraints to studying the effects of dissolved oxygen and dissolved carbon dioxide on plant cell growth. *Develop. Ind. Microbiol*. 31, 293– 301.
- Pedrosa Bezerra, R., Chuei Matsudo, M., Sato, S., Perego, P., Converti, A., Monteiro de Carvalho, J. C. (2012). Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *Bioenergetic aspects. Biomass and bioenergy*, vol. 37, 309-317.
- Pelizer, L.H., Carvalho, J.C.M., Sato, S., De Oliveira, I. 2002. *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivation conditions. *Electr. J. Biotech*. 5(3), 251-257.
- Perry, D. (1997). *Chemical Engineers Handbook*. CRC Press.
- Peter, C.P., Suzuki, Y., Rachinskiy, K., Lotter, S., Büchs, J. (2006) Volumetric power consumption in baffled shake flasks. *Chemical Engineering Science*, 61, 3771-3779.
- Pirt, S. L. Lee, Y. K. Walach, M. R. Pirt, M. W. Balyuzi, H. H. & Bazin, M. J. (1983). "A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide:

- Design and performance". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 33, 35-58.
- Rau, W.; Shrott, E.L. (1979). Light mediated biosynthesis in plants. *Photochemistry and Photobiology*, 30, 755-765.
 - Ramírez-Moreno, L., Olvera-Ramírez, R. (2006). Uso tradicional y actual de spirulina sp. (*arthrospira* sp.). *Interciencia*, 31 (9).
 - Ramirez, L., Queiroz, L., Jacob, E. (2013). Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias. *Revista Ciencia y Tecnología*, 6(2), 9-19.
 - Rheinheimer, G. (1987). *Microbiología de las aguas*. Ed. Acribia. Zaragoza. España. Pp. 37 – 44.
 - Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
 - Ronda, S., Chandra, B., Chandrika, K., Chandrika, K., Binod, R. y Prasada, R. (2012). Aeration effect on *Spirulina platensis* growth γ -linolenic acid production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1), 12-20.
 - Rui X., Ran C., Hui-Yan Z., and Huan L. (2011). Microalgae *Scenedesmus quadricauda* Grown in digested wastewater for simultaneous CO₂ fixation and nutrient removal. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, vol. 5, 234–240.
 - Rushton, J.H., Costich E.W. y Everett H.J. (1950), Power characteristics of mixing impellers. Parts I and II *Chem. Eng. Prog.* 46, 395-404, 467-476.
 - Sato, T., D. Yamada, S. Hirabayashi. (2010). Development of virtual photobioreactor for microalgae culture considering turbulent flow and flashing light effect. *Energy Convers. Manage*, 51(6), 1196-1201.
 - Sánchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C., Rodríguez, I. (2003) *Spirulina (Arthrospira)*: an edible microorganism. *Universitas Scientiarum*, 8(1), 7-24.
 - Sánchez, M. R., Bernal J., Rozo C., Rodriguez I. (2003b). *Spirulina (Arthrospira)*: an edible microorganism: a review. *Universitas Scientiarum.*, 8 (1), 11-12.
 - Sánchez Mirón, A. Gómez, A. C. Camacho, F.G. Grima, E. M. Chisti, Y. (1999). Comparative evaluation of compact photobioreactors for large scale monoculture of microalgae. *Journal Biotechnology*, 70 (1-3), 249-270

- Sarpal, A. S., Costa, I. C. R., Teixeira, C. M. L. L., Filocomo, D., & Candido, R. (2016). Investigation of Biodiesel Potential of Biomasses of Microalgae *Chlorella*, *Spirulina* and *Tetraselmis* by NMR and GC-MS Techniques. *J Biotechnol Biomater*, 6(220), 2.
- Sasson, A. (1997). Cultivation of *Spirulina*. En *Microalgal biotechnologies: recent developments and prospects for developing countries*. 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnol. Conf. / 3rd Asia-Pacific Conf. Algal Biotechnol. Phuket, Tailandia. pp 11-31.
- Senger, H. 1982. The effect of blue light on plants and microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, 35, 911-920.
- Senger, H.; Briggs, W.R. 1981. The blue light receptor(s): Primary reactions and subsequent metabolic changes. *Photochemistry and Photobiology*, 6, 1-38.
- Shi, X. M., Jiang, Y., & Chen, F. (2002). High-Yield Production of Lutein by the Green Microalga *Chlorella protothecoides* in Heterotrophic Fed-Batch Culture. *Biotechnology progress*, 18(4), 723-727.
- Soler A., Buitrago, G. (2010). Evaluación de la transferencia de oxígeno en cultivos con *Lactococcus lactis* empleando un sistema de fermentación con aireación externa. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 124-138.
- Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Patel, R., Mandamwar, D. (2016). Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World J Biol Chem*, 7(1), 100-109.
- Stein, W. H., & Moore, S. (1949). Amino acid composition of β -lactoglobulin and bovine serum albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 178, 79-91.
- Taguchi H., Humphrey A.E. (1966). Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Technol.*, vol. 44, 881-889.
- Talbot, P., Lencki, R.W., Nouie, J. (1990). Carbon dioxide absorption characterization of a bioreactor for biomass production of *Phormidium boheneri*: comparative study of three types of diffuser. *J. Appl. Phycol.* 2, 341-350.
- Tomaselli, L., Palandri, M., Tredici, M. (1996). On the correct use of *Spirulina* designation. *Algol. Stud.* 83, 539-548.
- Tomaselli, L., (1997). Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. En: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press, 1-16.

- Torres, L., Lopez, Y., Torre, M., Urzua, A. y Corzo, L.J. (2017). Characterization of *Spirulina platensis* cultures growth in column bubbled biorreactor of 200 L. UPIBI-Instituto Politécnico Nacional. Depto. De Bioprocesos.
- Tredici, M. R. (1999). "Bioreactors, photo". En: Flickinger, M.C., Erew, S., Wiley, J. (Ed) Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation, 395-419.
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., (2012). Microalgal Culture Systems: An Insight into their Designs, Operation and Applications. *Biotechnology*, 11 (3), 127-132.
- Veglio, F., Beolchini, F., Ubaldini, S. (1998) Empirical models for oxygen mass transfer: a comparison between shake flask and lab scale fermenter and application to manganiferous or bioleaching. *Proc. Biochem.* 33, 367–376.
- Vonshak, A. y Tomaselli, L., (2000). *Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology*. En: The ecology of Cyanobacteria. (Ed). 505-522.
- Vonshak, A. (2002). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology*. Israel: Taylor & Francis e-Library.
- Madriñan de Guzmán, C. (1988). Química de Alimentos. Universidad del Valle. 360 422, 278-284, 192.
- Wang, B., & Lan, C. Q. (2011). Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresource Technology*, 102(10), 5639-5644.
- Wegmann, K., & Metzner, H. (1971). Synchronization of *Dunaliella* cultures. *Archives of Microbiology*, 78(4), 360-367.
- Whitman W.G. (1923). The Two-Film Theory of Gas Absorption. *Chemical Metals Engineering*, 29, 146-150.
- Whitton, B. (1992). Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. En: Mann, N., Carr, N., (Ed) Photosynthetic prokaryotes. Plenum Press, 1-37.
- Xie, Y.; Jin, Y.; Zeng, X.; Chen, J.; Lu, Y.; Jing, K. (2015). Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycoerythrin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation. *Bioresource Technology* 180, 281-287.
- Zarrouk, C. (1966). *Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de Spirulina maxima Geitler* (PhD Thesis). University of Paris, Paris.