



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación de las constantes cinéticas del crecimiento de *Arthrospira maxima* (Alga *Spirulina maxima*) en reactores tipo discontinuo utilizando un medio modificado.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

SELENE MENDOZA MORALES

CIUDAD DE MÉXICO, AÑO 2019





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO  
**VOCAL:** Dra. LUZ MARIA LAZCANO ARRIOLA  
**SECRETARIO:** Dr. SERGIO ADRIAN GARCIA GONZALEZ  
**1er. SUPLENTE:** Dra. ALEJANDRA MENDOZA CAMPOS  
**2° SUPLENTE:** Dr. ALFONSO DURAN MORENO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 301, EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Dr. SERGIO ADRIAN GARCIA GONZALEZ**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**Dr. ALFONSO DURAN MORENO**

**SUSTENTANTE:**

---

**SELENE MENDOZA MORALES**

Índice	
Índice de figuras.....	1
Índice de Tablas .....	1
Resumen .....	3
Capítulo 1. Introducción .....	5
Problemática .....	5
Justificación .....	5
Objetivo.....	12
Objetivos particulares .....	12
Capítulo 2. Antecedentes.....	13
Cianofita.....	13
Morfología de las cianofitas .....	15
<i>Arthrospira maxima</i> .....	16
Reacción enzimática de <i>Arthrospira maxima</i> .....	28
Usos .....	29
Crecimiento de los microorganismos .....	36
Cinética de las reacciones biológicas.....	40
Balance de materia para un biorreactor tipo CSTR .....	47
Rendimiento .....	49
Productividad volumétrica, $P_b$ .....	49
Productividad areal, $P_a$ .....	50
Velocidad de producción de biomasa, $F_b$ .....	51
Capítulo 3. Estado del arte .....	52
Crecimiento de <i>Arthrospira maxima</i> .....	52
Parámetros cinéticos de la literatura .....	52
Capítulo 4. Metodología.....	54
Condiciones generales.....	54
Inóculo .....	54
Método experimental .....	54
Capítulo 4. Resultados, análisis y discusión.....	59
Conclusiones.....	75
Bibliografía.....	77

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Comportamiento del modelo cinético de Michaelis-Menten. ....	29
<b>Figura 2.</b> <i>Arthrospira maxima</i> comercial. ....	31
<b>Figura 3.</b> Márgenes de pH para el crecimiento de hongos y bacterias. ....	38
<b>Figura 4.</b> Intervalo de temperaturas para el crecimiento de las bacterias. ....	40
<b>Figura 5.</b> Gráfica para el cálculo de $\mu_{max}$ . ....	43
<b>Figura 6.</b> Gráfica para obtener los parámetros del crecimiento microscópico. ....	43
<b>Figura 7.</b> Gráfica para el cálculo del rendimiento microbiano. ....	45
<b>Figura 8.</b> Gráfica de las fases del crecimiento microbiano. ....	45
<b>Figura 9.</b> Esquema de un biorreactor. ....	47
<b>Figura 10.</b> Reactor de <i>Arthrospira maxima</i> . ....	55
<b>Figura 11.</b> Muselina con biomasa húmeda. ....	55
<b>Figura 12.</b> Prueba de sólidos totales. ....	57
<b>Figura 13.</b> Incubadora con matraces. ....	58
<b>Figura 14.</b> Gráfica para el cálculo de $\mu_{max}$ . ....	59
<b>Figura 15.</b> Gráfica para obtener los parámetros de crecimiento microscópico. ....	60
<b>Figura 16.</b> Gráfica para el cálculo del rendimiento microbiano. ....	61
<b>Figura 17.</b> Gráfica de la comparación de $\mu_{max}$ de los reactores 5 y 6. ....	62
<b>Figura 18.</b> Gráfica de los parámetros de crecimiento microscópico de los reactores 5 y 6. ....	63
<b>Figura 19.</b> Gráfica para el cálculo del rendimiento microbiano de los reactores 5 y 6. ....	64
<b>Figura 20.</b> Observación al microscopio de <i>Arthrospira maxima</i> al inicio del experimento. ....	67
<b>Figura 21.</b> Observación al microscopio de <i>Arthrospira maxima</i> al final del experimento. ....	67
<b>Figura 22.</b> Gráfica de las fases de crecimiento. ....	69
<b>Figura 23.</b> Gráfica de la productividad volumétrica. ....	73
<b>Figura 24.</b> Gráfica de la velocidad de producción de biomasa. ....	74

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Proteínas de diversos alimentos. ....	8
<b>Tabla 2.</b> Tabla de comparación de alimentos. ....	9
<b>Tabla 3.</b> Análisis de <i>Arthrospira maxima</i> . ....	10
<b>Tabla 4.</b> Clasificación taxonómica. ....	17
<b>Tabla 5.</b> Parámetros cinéticos de la literatura. ....	53
<b>Tabla 6.</b> Inóculo de los reactores. ....	56
<b>Tabla 7.</b> Tabla de líneas de tendencia experimento 1. ....	60

<b>Tabla 8.</b> Líneas de tendencia del rendimiento microbiano.....	61
<b>Tabla 9.</b> Resultados de los parámetros cinéticos.....	65

## Resumen

En el presente trabajo se realizó el análisis y la evaluación de los parámetros cinéticos de *Arthrospira maxima* en matraces de 250 mL simulando biorreactores tipo discontinuo en cultivos monofásicos y medios no renovados (Madigan, *et al.*, 2012), asimismo se hizo un cálculo teórico de un biorreactor a partir de los parámetros cinéticos que se obtuvieron.

Los experimentos se llevaron a cabo en una modificación del medio de Zarrouk, manteniendo un pH de 9, temperatura de 30°C, luminosidad de 665lm (11.97 – 18.62 $\mu$ mol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) y agitación constante de 200RPM.

Se realizaron dos experimentos, uno fue la obtención de los parámetros cinéticos, el cual consistió en evaluar el crecimiento de *Arthrospira maxima*, durante un tiempo de 8 días en condiciones controladas de temperatura (30 °C) y agitación (200 RPM) utilizando un medio modificado, en un agitador orbital. El crecimiento de la cianofita se determinó mediante el crecimiento de la biomasa por sólidos suspendidos totales (SST), con los resultados obtenidos se calculaban los parámetros de crecimiento al término de los 8 días mediante el modelo cinético de Michaelis-Menten y la representación lineal Lineweaver-Burk.

El segundo experimento consistió en hacer crecer *Arthrospira maxima*, durante un tiempo de 8 días. Se determinaron SST para determinar el crecimiento microorganismo.

De los resultados obtenidos, la mejor constante de velocidad de crecimiento fue de 0.25 día<sup>-1</sup>, teniendo la mayor cantidad de biomasa (372.67mg/L) a los 7 días.

Posteriormente, con los parámetros obtenidos se realizó el diseño teórico de un biorreactor con el cual se pretende tener un flujo de 500 L/semana de *Arthrospira maxima*, para tener como volumen de 542 L, una productividad de 0.0023 kg/L d y una velocidad de reacción de 1.22 kg/d.

**Palabras clave:** *Arthrospira maxima*, biorreactor, cinética de Michaelis-Menten, representación lineal Lineweaver-Burk.

## Capítulo 1. Introducción

### Problemática

La nutrición es uno de los problemas más graves, que debe de preocupar a toda la población, debido a todos los problemas que se presentan por la deficiente nutrición, *Arthrospira maxima* es una excelente fuente de fibra, minerales y fitonutrientes, por lo que se emplea como complemento para poder tener una dieta variada.

La producción de la biomasa de *Arthrospira maxima* ha generado gran interés durante los últimos 50 años, debido a toda la escasez de alimentos a nivel mundial, sabiendo que la *Arthrospira maxima* posee un gran potencial debido a que no solo es una alga de consumo tradicional, sino también por todos los productos químicos que se pueden extraer de ella como el b-caroteno y la ficocianina (De Oliveira, et al., 1999).

El cultivo de *Arthrospira maxima* es una actividad económica importante, debido a que es una alternativa para producir energía, alimento para humanos y alimento para animales, porque se emplea en el uso del tratamiento de aguas residuales, con la captura de dióxido de carbono y la producción de metabolitos para el uso industrial, farmacéutico y alimenticio (Pulz & Gross, 2004).

### Justificación

*Arthrospira maxima* es un tipo de alga verde-azul (cianofita) que pertenece a la familia de las Oscillatoriaceae de 3.6 billones de años de antigüedad, crece a poca profundidad (de 10 cm a 20cm) y en agua altamente alcalina en áreas tropicales, es decir, en agua rica con carbonatos o bicarbonatos y un alto pH (8.5 a 9) (Affan, et al., 2014).

Es una alga verde-azul, tiene filamentos libres flotantes, compuesta de células vegetativas cilíndricas cortada en una hélice cercana, el movimiento que hace puede ser que se arrastre o que se deslice hacia un eje longitudinal haciendo un movimiento hacia atrás o hacia adelante, en algunas el movimiento puede ser un deslizamiento que avanza con la manifestación del tricoma el cual tiene lugar en la dirección de enrollamiento (Sahoo & Seckbach, 2015).

La principal característica morfológica del alga *Arthrospira maxima* se representa con su forma de tricoma, como un tornillo casi cerrado, uniforme y estrecho de diámetro (0.5-3 $\mu$ m) y células con paredes transversales invisibles para el microscopio de luz (Sili, *et al.*, 2012).

Siendo una especie de microalga de alto valor económico, considerada como una de las pocas algas para su producción a gran escala, debido a su alta eficiencia fotosintética, velocidad de crecimiento rápida y capacidad de adaptarse al ambiente (Shi, *et al.*, 2016).

Se tiene un gran interés en el uso de la *Arthrospira maxima* como un alimento, considerado actualmente como un alimento “saludable”. Los investigadores Dangeard, Brandily, Léonard y Compère describieron como diversas tribus africanas que viven a lo largo del lago Chad recolectan esta alga. La biomasa se cosecha en cuerpos de agua cerca del lago y se seca con el sol en las costas para producir una pasta oscura llamada “dihé”, la cual se divide para poder ser utilizada por las poblaciones como parte de su dieta diaria. Asimismo se tiene un registro de su uso en México, en el lago de Texcoco, donde se utilizó como alimento para nativos que vivían en el área. Los viajeros a México durante el siglo XVI describieron

como los aztecas utilizaban un suave material azul verdoso, que era cosechado en redes finas en el lago para hacer un llamado “tecuitlatl”. Descubriendo ambas poblaciones su valor nutricional (Sili, *et al.*, 2012).

Es el alimento más nutritivo y concentrado del cual se tiene conocimiento, ya que contiene antioxidantes, fitonutrientes, probióticos y nutraceuticos. Siendo una respuesta rápida a varios problemas que se tienen debido a su gran cantidad de nutrientes que posee los cuales se emplean para el uso terapéutico (Pulz & Gross, 2004). Actualmente se ha convertido en un alimento muy potente y nutritivo conocido por la ciencia, aunque se sabe de su existencia desde hace millones de años, su difusión como alimento es muy reciente (Moorhead & Capelli, 2011).

Tiene un alto contenido de micro y macronutrientes; su composición química incluye: 60-70% de proteínas, carbohidratos, vitaminas (como provitamina A, vitamina C, Vitamina E), minerales (como hierro, calcio, cromo, cobre, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc), ácidos grasos esenciales (ácido ginséico (GLA)), pigmentos (como clorofila, ficocianina y carotenos) (Sjors & Alessandro, 2010). Debido a esto *Arthrospira maxima* es un alimento ideal para personas de todas las edades y estilos de vida (Moorhead & Capelli, 2011).

La única comida con más proteína utilizable que la *Arthrospira maxima* son el huevo, en la tabla 1, se pueden apreciar diversos tipos de fuentes de proteínas, y ninguna de ellas tienen la cantidad de nutrientes que tiene la *Arthrospira maxima*, incluso llegan a tener propiedades negativas como la grasa animal y el colesterol:

**Tabla 1.** Proteínas de diversos alimentos.

Proteína utilizable de alimentos proteicos comunes			
Alimento	Proteína (%)	NPU (%)**	Proteína utilizable
Huevo	47	94	44
<i>Arthrospira maxima</i>	65	57	37
Leche desnatada en polvo	36	82	30
Harina de soya	37	61	23
Pescado	22	80	18
Pollo	24	67	16
Carne	22	67	16
Cacahuates	26	38	10

\*\*Net Protein Utilization (Switzer, 1982)

El mundo de las Naciones Unidas declaró en una conferencia que *Arthrospira maxima* es el alimento del futuro y está ganando popularidad el día de hoy. Mientras que la Organización Mundial de la Salud la describió como el mejor producto para la salud de la humanidad. Según la UNESCO es el alimento ideal del mañana, de acuerdo con la NASA y la Agencia Espacial Europea, este es uno de los alimentos principales que se pueden cultivar a largo plazo para misiones espaciales. La FDA aseguro que es “una de las mejores fuentes de proteínas” (Pulz & Gross, 2004).

Considerando los nutrientes que aporta, la simplicidad de su cultivo y cosecha de está alga (tomando en cuenta el tamaño que puede llegar a tener) en comparación con otras microalgas, se han realizado estudios en plantas piloto para la producción de *Arthrospira maxima* en países como Francia, Argelia y México. Fue cultivada en

medios sintéticos acuosos compuestos por minerales y soluciones salinas (Meyer, 1969).

*Arthrospira maxima* es rica en compuestos integrales, uno de los antioxidantes más importantes que es betacaroteno, el cual es muy difícil de encontrar de manera natural en los alimentos, como se puede apreciar en la tabla 2, comparándola con otros alimentos, *Arthrospira maxima* contiene carotenos importantes como lo son la zeaxantina y la beta-criptoxantina, también contiene mixoxantofila y xantófila (Moorhead & Capelli, 2011).

**Tabla 2.** Tabla de comparación de alimentos.

Alimento	Beta-caroteno
<i>Arthrospira maxima</i> *, 3 g	6.8 mg
Zanahoria, mitad	4.9 mg
Papaya, mitad	3.7 mg
Chlorella, 3 g	1.0 mg
Durazno, mitad	0.9 mg

\*\*De Cyanotech Corporation

También *Arthrospira maxima* es rica en fuente de enzimas, material genético (ARN y ADN), sulfolípidos y glucógeno.

En la tabla 3, se puede observar un análisis de la composición general de la *Arthrospira maxima* a una muestra de 3g (una cucharada):

**Tabla 3.** Análisis de *Arthrospira maxima*.

Composición general	Proteína 53-62%, Carbohidratos 17-25%, Lípidos 4-6%, Minerales 8-13%, Humedad 3-6%.
Minerales	Calcio 10mg, Magnesio 15 mg, Hierro 6.5mg, Fosforo 33mg, Potasio 60 mg, Sodio 30 mg, Manganeso 400mcg, Zinc 90mcg, Boro 22mcg, Cobre 20mcg, Selenio 0.9mcg, Yodo 15mcg.
Vitaminas	Vitamina A (100% como Beta-caroteno) 11,250 IU, Vitamina B1 Tiamina 3.5mcg, Vitamina B2 Riboflavina 140mcg, Vitamina B3 Niacina 400mcg, Vitamina B6 Piridoxina 30mcg, Vitamina B12 Cobalamina 9.0 mcg, Vitamina E d-a-tocoferol 285mcg, Inositol 1.7mcg, Biotina 0.5mcg, Ácido fólico 6.2 mcg, Ácido pantoténico 4.5mcg, Vitamina K1 60 mcg, Vitamina K2 15 mcg.
Fitonutrientes	Beta-caroteno 6.8mg, Zeaxantina 9mg, Clorofila 30mg, Carotenoides totales 15mg, C-Phycocyanin 240mg, Phycocyanins totales 519mg, Superóxido dismutasa 1080 unidades.
Ácidos grasos (Total 48mg por g)	Familia Omega 6 Gama Linofénico (GLA) 32mg, Esencial Linofénico 33mg, Dihomogamma Linofénico 1.59mg. Familia Omega 3 Alpha Linofénico 0.0435mg, Docosahexaenoico 0.0435m. Familia Monoenoico Palmitoleico 5.94mg, Oleico 0.51mg, Erúcico 0.072mg.
Otros ácidos grasos	Ácido Palmítico 61mg, Ácido Mirístico 0.4mg, Ácido Esteárico 2.5mg, Ácido Araquidónico 0.2mg, Ácido Behénico 0.144mg, Ácido Lignocérico 0.072mg.
Aminoácido (mg por g)	Aminoácidos esenciales Isoleucina 32.60mg (5.43%), Leucina 48.90mg (8.15%), Lisina 26.20mg (4.37%), Methionina 13.30mg (2.22%), Fenilalanina 26.10mg (4.35%), Treonina 28.10mg (4.68%), Triptófano 8.50mg (1.41%), Valina 37.40mg (6.23%). Aminoácidos no esenciales Alanina 46.60mg (7.74%), Arginina 47.60mg (7.94%), Ácido Aspártico 72.80mg (12.14%), Cistina 5.60mg (0.93%), Ácido Glutámico 84.40mg (14.07%), Glicina 31.90mg (5.32), Histidina 15.00mg (2.50%), Prolina 24.70mg (4.11%), Serina 26.50mg (4.42%), Tirosina 23.80mg (3.97%).

(Moorhead & Capelli, 2011)

Considerando que en la actualidad se vive una revolución en el tema de la salud y cuidado del estado físico, lo que ha llevado a tener nuevas actitudes en las dietas y el estilo de vida, por lo que la demanda de alimentos naturales no procesados crece día con día, y por lo que se necesita que la comida rápida se vuelva saludable también. Ya que con muchas comidas rápidas y fuera de casa se obtienen muy poca cantidad de nutrientes que las comidas preparadas en casa (Moorhead & Capelli, 2011).

En la literatura científica existe poca información de los parámetros cinéticos de crecimiento del *Arthrospira maxima* y estos son fundamentales cuando se quiere diseñar reactores biológicos. Debido a las grandes propiedades que presenta el microorganismo, es de especial interés conocer la cinética de crecimiento en un medio modificado para determinar si hay un aumento en la velocidad de crecimiento.

Por lo que este trabajo plantea la obtención de parámetros cinéticos de crecimiento en un medio modificado con el cual se espera un crecimiento acelerado de *Arthrospira maxima* en condiciones controladas de temperatura, luz y agitación. Los parámetros obtenidos permitirá el diseño de reactores biológicos.

## **Objetivo**

Obtener los parámetros cinéticos del crecimiento de *Arthrospira maxima* utilizando un medio modificado en biorreactores tipo discontinuo en cultivos monofásicos y medios no renovados en condiciones controladas de laboratorio para obtener el diseño de un biorreactor.

## **Objetivos particulares**

1. Probar un medio modificado que ayude a tener un crecimiento acelerado de la *Arthrospira maxima*.
2. Determinar los patrones de crecimiento de la *Arthrospira maxima* en condiciones controladas de laboratorio.
3. Realizar el cálculo teórico de un biorreactor utilizando las constantes cinéticas de los datos experimentales del crecimiento de *Arthrospira maxima*.

## Capítulo 2. Antecedentes

### Cianofita

Las cianofitas son organismos procariotes fotosintéticos que son capaces de sintetizar clorofila  $\alpha$ , el agua sirve como donante de electrones durante la fotosíntesis, lo que lleva a la reacción química que hace que se forme oxígeno. Se caracterizan por su capacidad para formar el pigmento de ficobilina, ficocianina, su alta concentración hace que tengan el color verde-azul los organismos, debido a esta particular característica, se les conoce como algas verdeazuladas (Whitton & Potts, 2000).

Son organismos desprovistos de membrana celular y mitocondrias, presentan ácidos grasos no saturados con dos o más enlaces dobles, en lo que difieren a otros procariontes. Poseen solamente clorofila  $\alpha$  y un fotosistema II (PS-II) el cual se encuentra junto con los pigmentos fotosintéticos, los pigmentos accesorios y los componentes de transporte de electrones en los tilacoides, que son sistemas membranosos fotosintéticos. Ligados al sistema clorofílico se encuentran los agregados, ficobilinas, los cuales tienen un pigmento esencial para el transporte de energía hacia el PS-II, la ficocianina, es una proteína que posee un grupo prostético del tipo polipirrol, el cual le da el color azul así como una fluorescencia roja. Asimilan el carbono a través del ciclo de Calvin y almacenan su energía y carbono en forma de glucógeno (Rheinheimer, 1987).

Poseen diferentes esquemas metabólicos, con la particularidad, de que todos presentan la ausencia del ciclo de Krebs completo, la mayoría de ellas, sobre todo

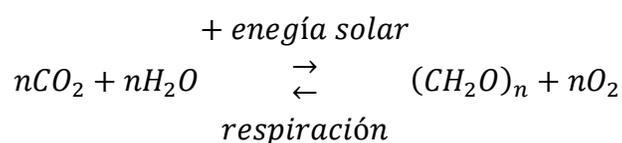
las filamentosas, son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico, con la ayuda de su estructura heterocista (Abbayes, 1989).

La mayoría de ellas son capaces de desplazarse en los líquidos, debido a vesículas gaseosas y en el caso de las filamentosas, por desplazamiento de hasta 25 micras por segundo mediante microfibras. Su reproducción, se lleva a cabo por escisión simple o múltiple, por gemación o por fragmentación (Whitton, 1992).

Se encuentran distribuidas en la naturaleza, en aguas continentales y en el mar, son capaces de tolerar ambientes extremos, se pueden encontrar de formas libres o fijas, las fijas crecen sobre las plantas y los animales acuáticos, también en algunos sustratos inertes como piedras, aunque algunas especies viven en simbiosis con plantas y animales inferiores (Rheinheimer, 1987).

Cuando se trata de su nutrición, son fotoautótrofas aunque pueden llegar a ser heterótrofas facultativas en la oscuridad, fijando nitrógeno. Se les puede encontrar en cualquier parte del mundo, y se pueden ver a simple vista como masas gelatinosas en aguas dulces y suelos húmedos, llegando a formar en ocasiones estromatolitos (formaciones de carbonato cálcico) (Kennedy, 2017).

Al igual que las plantas son capaces de realizar la fotosíntesis, proceso mediante el cual la energía solar se transforma en energía química a través de la transformación de moléculas de carbono en materia orgánica (Figueruelo & Davila, 2001).



## **Morfología de las cianofitas**

Es de gran importancia la comprensión de la biología molecular de las cianofitas, tanto para la taxonomía como para la interpretación de fenómenos ecológicos en general. Las condiciones de luz y los nutrientes influyen en la fisiología de la célula, siendo los cambios que se den en ella una respuesta de forma rápida o lenta, siendo la luz un importante factor ya que las vías de transducción de señales que permiten que se establezca una respuesta para que puedan adaptarse. Debido a esto, se debe de considerar que cualquier estímulo produce un cambio morfogénico en cualquier ambiente en donde se tenga el cultivo de cianofitas. Algunas cianofitas llegan a resistir la radiación UV y la desecación se ve favorecida por la capacidad que tienen para reparar su ADN (Whitton & Potts, 2000).

En 1995, el Instituto de Investigación de ADN Kazuza en Japón, comenzó con el análisis de la secuencia del genoma de *Synechocystis* PCC 6803 (un tipo de cianobacteria), el proyecto duró 16 meses y se depositaron los 3,573,470 pares de secuencia contiguas, junto con las anotaciones de 3,168 genes en la base de datos de CyanoBase, siendo esta la primer secuencia completa para cualquier fotoautótrofo (Whitton & Potts, 2000).

CyanoBase, se encarga de proporcionar de manera fácil los datos de secuencia y los datos de anotación por medio de imágenes de mapas, búsqueda de palabras clave y la lista de categoría de genes.

Se han desarrollado métodos cada vez mejores para poder secuenciar genomas y analizar datos de secuencias, ayudando al análisis y la manipulación genética de cianobacterias más complejas, tales como *Trichodesmium* la cual convierte el

nitrógeno atmosférico en amonio, el cual sirve como nutriente para algunos organismos (Whitton & Potts, 2000).

### ***Arthrospira maxima***

Las algas fueron los primeros organismos que aparecieron en el planeta, hace billones de años atrás, transformaron la atmósfera basada en dióxido de carbono a una atmósfera rica en oxígeno para que las otras formas de vida pudieran evolucionar (Moorhead & Capelli, 2011).

Existen una gran infinidad de especies y tipos de algas, las cuales son de diversos colores y tamaños, capaces de proporcionar toxinas hasta medicamentos.

De las más de 30,000 especies de algas, *Arthrospira maxima* es de las más primitivas, una de sus características fisiológicas más notables es que no contienen núcleo y sus paredes celulares son suaves y fácil de digerir (Moorhead & Capelli, 2011). En la tabla 4, se puede observar su clasificación taxonómica.

Debido a su pared celular suave, ofrece sus nutrientes de una manera fácil y de forma asimilable, lo que la vuelve un alimento de alta energía (Moorhead & Capelli, 2011).

**Tabla 4.** Clasificación taxonómica.

Nombre	<i>Spirulina maxima</i>
División	<i>Cyanophyta</i>
Clase	<i>Cyanophyceae</i>
Orden	<i>Nostocales</i>
Familia	<i>Oscillatoriaceae</i>
Género	<i>Spirulina</i>
Especie	<i>maxima</i>

(Guiry in Guiry, *et al.*, 2018)

Fue descubierta por el español Hernán Cortés y los conquistadores en 1519, observando que los aztecas la consumían durante su visita al lago de Texcoco en el Valle de México. Posteriormente Pierre Dangeard descubrió los beneficios que tenía para la salud, y trabajó con Jean Leonard para poder cosecharla y comercializarla, asimismo la primer planta de procesamiento de *Arthrospira maxima*, fue Sosa Texcoco, establecida por los franceses en 1969 (Ugwu, *et al.*, 2008).

El conquistador Bernal Díaz del Catillo, escribió sobre el mercado de la ciudad, desde joyas, medicinal y cerámica, y de algo no tan usual que era el “tecuitlatl” o pequeños pasteles de *Arthrospira maxima*, los cuales los aztecas intercambiaban, en cambio los españoles estaban desconcertados por el “barro azul verdoso” por el cual nunca adquirieron el gusto, pero para los aztecas era delicioso. Se tiene cierta

confusión de cómo comían el tecuitlatl, aparentemente lo hacían en un pan (con sabor a queso), mezclado con algunos granos y le ponían una salsa llamada chilmolli hecha a partir de tomates, chiles y diversas especias (Moorhead & Capelli, 2011).

Los aztecas recolectaban la *Arthrospira maxima* de la superficie de los lagos con redes de malla, llenaban sus canoas y ya en tierra la extendían en camas para que se secará con el sol. *Arthrospira maxima* húmeda, media de tres y cuatro centímetros de espesor, cuando se secaba cambiaba su espesor era de dos a tres milímetros (Moorhead & Capelli, 2011).

Se dice que al emperador Moctezuma le gustaba comer pescado, desafortunadamente, el pescado fresco se encontraba a unas 180 millas del palacio del emperador, hasta el Golfo de México, este era trabajo de los corredores de maratón lo cuales eran responsables de llevarle el pescado del día, se dice que los atletas corrían alrededor de 100 millas por día y *Arthrospira maxima* era parte de su dieta, tomándola en sus descansos, mezclándola con agua para que les diera energía y resistencia (Moorhead & Capelli, 2011).

Asimismo, *Arthrospira maxima* se ha comido durante siglos en el pueblo Kanembu, que se encuentra a las orillas del lago Chad en el norte de África Central, *Arthrospira maxima* sigue siendo una de sus principales fuentes de proteína, esta es empujada por el viento, donde se concentran un espesa masa, posteriormente las mujeres del pueblo adentran al agua con cestas de tejido fino para poder recolectarlas, la masa húmeda se pasa a unos agujeros que se cavan en los bordes de los lagos donde se encuentran los arenales, y a medida de que el agua se escurre en la arena la

*Arthrospira maxima* comienza a secarse y se le marcan cuadros, y el sol transforma la pasta húmeda en una galleta seca que se conoce como dihé. El mijo, que es la base de sus comidas se sirve con varias salsas picantes que contienen dihé, tomates, chiles y especias, frijoles, cebollas y pescado o algún tipo de carne, siendo el dihé un importante ingrediente en la salsa, es comido en siete de cada diez comidas y de diez a doce gramos por persona (Moorhead & Capelli, 2011).

Algunos de los factores importantes para la producción industrial de *Arthrospira maxima* es la seguridad y el control de calidad de la biomasa, ya que existen algunas especies tóxicas de otras cianobacterias que se pueden hacer presentes, por lo que algunas compañías han desarrollado métodos para determinar si existen toxinas en sus productos como las microcistinas, contaminación que se da por otras cianobacterias. Asimismo, otro problema en estanques abiertos es que el agua puede estar contaminada con microorganismos patógenos, por lo que puede dar como resultado una contaminación microbiana a la biomasa (Shimamatsu, 2004).

Por lo que el costo de producción de biomasa de *Arthrospira maxima* se estima de \$6-12 USD kg por materia seca, teniendo como los costos más bajos aquella que no se usa para consumo humano, se emplea más como una aditivo para pescar y alimentar a los pollos; el producto se seca con el sol, por consecuente puede contener un alto contenido en cenizas y un bajo contenido en clorofila (Shimamatsu, 2004).

Debido a esto, la reducción del costo de producción depende de varios factores, como lo son:

1. Aumento de la productividad del organismo.
2. Control de la contaminación.
3. Aumento en la eficiencia de la cosecha del alga.
4. Reducción en la eficiencia de operación del proceso.

Tomando en cuenta esto, se puede ver a la *Arthrospira maxima* no sólo en el mercado alimenticio, sino también en otros mercados como lo puede ser en el de aditivos (Shimamatsu, 2004).

El Comité sobre dieta y salud del consejo nacional de investigación, recomienda que debemos de comer de 5 a 9 porciones de frutas y verduras, siendo este un verdadero desafío hasta para las personas que comen saludable, tomando en cuenta esto y que mucha población no se da la prioridad de comer bien. Dando importancia a la *Arthrospira maxima* ya que con solo 3g al día se obtienen más antioxidantes y nutrientes antiinflamatorios que se pueden encontrar en 5 porciones de vegetales (Moorhead & Capelli, 2011).

Es recomendable para aquellos niños que no comen verduras, estudiantes que se encuentran afuera de sus casas, personas que no comen alimentos buenos y nutritivos, personas mayores, y también para aquellos que están recuperándose de alguna operación, asimismo para las personas que necesitan más energía que no tienen una dieta balanceada (Moorhead & Capelli, 2011).

Considerando que es un alimento ideal para las poblaciones desnutridas, se están estableciendo granjas en algunas aldeas del tercer mundo y en otras comunidades donde la tierra cultivable es escasa y las cosechas son impredecibles.

El Dr, Ripley Fox, un microbiólogo, se ha dedicado a estudiar y a implementar las maneras de terminar con la desnutrición, especialmente en aldeas del tercer mundo, sabiendo que la distribución de alimento no resuelve el problema ya que son cantidades insuficientes de alimento, corrupción, deterioro, falta de buenas carreteras y falta de transporte (Moorhead & Capelli, 2011).

El Dr. Fox, asegura que ninguna producción industrial de alimentos es capaz de ayudar a estas comunidades rurales, ya que sin dinero no les es posible participar en la economía local, por lo que ellos se deben de alimentar. El Dr. Fox ayudó a establecer Integrated Village Health and Energy Systems, que son sistemas de bajo costo que les permite a los habitantes del pueblo a cultivar su propia *Arthrospira maxima*, a base del reciclaje de desechos de la comunidad y tecnología solar. Demostrando que las críticas de que la gente no cambiaría sus hábitos alimenticios al incluir *Arthrospira maxima* son inválidas (Moorhead & Capelli, 2011).

Estableciendo sus proyectos en India, Togo, Senegal y Perú, el Dr, Fox junto con su equipo están listos para guiar a otros en el establecimiento de sus granjas de *Arthrospira maxima*. En su proyecto que llevó a cabo en Togo, alimentó a bebés que tenían desnutrición severa con atoles en los cuales disolvía de diez a quince gramos de *Arthrospira maxima*, después de tres meses los bebés alcanzaron su peso y actividad normales (Moorhead & Capelli, 2011).

### **Medio de obtención de la *Arthrospira maxima***

Los requisitos para el crecimiento de *Arthrospira maxima* son similares a los de las plantas terrestres, la diferencia es que *Arthrospira maxima* emplea los recursos de

forma muy eficiente para aumentar la productividad de la biomasa, teniendo un uso de agua un poco menor (Soni, *et al.*, 2017).

El conocimiento que se tiene actualmente solo la ecología, fisiología y la bioquímica de *Arthrospira maxima* ha ayudado para que se tenga una producción factible. Aunque actualmente se tenga una eficiencia fotosintética muy baja, dando como resultado la configuración de un 10% de la luz solar. Por lo que la saturación de la luz es uno de los factores importantes que limitan la explotación completa de la fotosíntesis.

El costo efectivo, la composición de los medios de cultivo y la tasa de crecimiento de biomasa deben de ser administrados correctamente para tener una buena producción (Raoof, *et al.*, 2006).

*Arthrospira maxima* en su hábitat natural es susceptible a diversos cambios tanto físicos como químicos provocados por las condiciones ambientales; como la luz, la salinidad, la temperatura y los nutrientes (Tomaselli, *et al.*, 1993).

- Factores climáticos

En el crecimiento de *Arthrospira maxima* varios factores externos e internos lo afectan. La luz es una fuente esencial para su crecimiento autotrófico y la actividad fotosintética, la temperatura influye en la composición química celular, la absorción de nutrientes, CO<sub>2</sub> y su tasa de crecimiento (Singh & Singh, 2015).

La luz, es un factor importante, pero la luz solar directa no se recomienda, con el 30% de luz solar total está bien, aunque en la mañana se requiere en su totalidad para poder mantener en su temperatura más rápidamente. Tampoco está

recomendado que tenga una exposición de 24h a la luz ya que, durante los períodos oscuros, dentro de *Arthrospira maxima* ocurren las reacciones químicas que corresponden a la síntesis de proteínas y la respiración (Soni, *et al.*, 2017).

La temperatura, es uno de los grandes factores que afectan el crecimiento de la *Arthrospira maxima*, la temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un rango de 30°C a 35°C, en la naturaleza son temperaturas que se encuentran al Norte y Nordeste de Brasil. El clima tropical de la zona dado por la costa atlántica y la región ecuatorial, da como resultado un clima húmedo que hace que la temperatura se encuentre en condiciones favorables, asimismo, favorece el tiempo de exposición de la luz. Por lo que es muy favorable la producción de *Arthrospira maxima* al aire libre, cuando se tienen dichas condiciones climáticas. (Bombart, *et al.*, 1993)

En otras zonas donde el clima no es tropical, es un poco más complicado ya que los cambios que ocurren en la tarde las temperaturas, pueden llegar a bajar hasta los 20°C, y puede que crezcan otro tipo de algas, por lo que se requiere calefacción para poder mantener temperaturas superiores a los 30°C, en muchas ocasiones esto llega a aumentar el costo de producción (Bombart, *et al.*, 1993). Otro factor que afecta la temperatura son las estaciones del año, en especial el invierno, ya que en tanques abiertos no se desarrolla *Arthrospira maxima* más que en los trópicos. Los productores de *Arthrospira maxima* recurren a recubrir los estanques con polietileno transparente para que el medio se encuentre más cálido y libre de contaminación, lo que mejora las condiciones de cultivo (Vonshak, 1992).

- Medio de cultivo

Desde la antigüedad se han utilizado diversos medios de crecimiento del alga, como: el medio de Zarrouk, medios de RAO, medios CFTIR, medios OFERR, entre otros medios (Raouf, *et al.*, 2006).

El agua que se utiliza debe de estar limpia o filtrada para evitar el crecimiento de otras algas, comúnmente el agua contiene la cantidad adecuada de calcio, pero si se tiene un exceso de calcio hará que se endurezca y se forme sarro, por lo que el agua potable es conveniente, aunque se considera que el agua tratada es mejor para el cultivo de *Arthrospira maxima* (Soni, *et al.*, 2017).

Los medios de cultivo consisten principalmente en urea, ya que es más eficiente para suministrar nitrógeno, pero es tóxico en altas concentraciones, tomando en cuenta que *Arthrospira maxima* puede crecer en cualquier nitrato, se deben de tomar en cuenta los iones que se encuentran presentes en la urea como sulfato, cloruro, nitrato y sodio, el carbonato es reemplazado por bicarbonato (Soni, *et al.*, 2017).

Se debe de tener en cuenta: que el fosfato, magnesio y calcio no deben de aumentar mucho, la concentración de potasio se puede aumentar pero se debe de cuidar que no se convierta en más de cinco veces la concentración de sodio (Soni, *et al.*, 2017).

- Inóculo

Se requiere que el inóculo sea de cultivo concentrado de *Arthrospira maxima*, debe de tener una alta proporción de filamentos enrollados (<25% filamentos rectos o ninguno), y al menos 1% de ácido gamma-linolénico (GLA) basado en el peso seco.

El cultivo de *Arthrospira maxima* se puede obtener de una capa flotante de un cultivo compuesto o diluyendo la masa recién filtrada, el color del cultivo debe de ser claramente verde.

Con dichas condiciones se espera que la tasa de crecimiento sea de aproximadamente 30%, asimismo se debe de considerar el espacio de crecimiento, ya que el crecimiento es proporcional al área del cultivo que se encuentra expuesto a la luz, por lo que es recomendable maximizar dicha área (Soni, *et al.*, 2017).

- Agitación y aireación

La agitación es necesaria para poder homogeneizar y garantizar la buena iluminación entre todos los filamentos de la *Arthrospira maxima*, asimismo juega un papel importante en los cultivos de alta densidad. Mientras que la aireación es necesaria para obtener buena calidad y mejores rendimientos de *Arthrospira maxima*.

Se pueden emplear rotadores que mantienen las células en suspensión mediante agitación suave de células de crecimiento.

La aireación ayuda a que se tenga un alto rendimiento de biomasa de *Arthrospira maxima*, ya que da una distribución homogénea de los filamentos de *Arthrospira maxima* en todo el sistema de crecimiento para que tengan una exposición adecuada a la iluminación, también ayuda a distribuir la concentración de dióxido de carbono uniformemente y elimina sustancias como el oxígeno el cual emplea un papel de inhibidor.

Una agitación adecuada y turbulenta es esencial para una mayor productividad de biomasa, velocidades bajas dan como resultado zonas muertas alrededor de las esquinas del estanque y velocidades altas dan como resultado un alto costo de energía y puede resultar un esfuerzo cortante que dañe las algas.

Y una mezcla continua es necesario para evitar el hundimiento celular y la estratificación térmica, también se requiere para mantener una distribución uniforme de nutrientes, cuando no se cuenta con una aireación adecuada, la eficiencia del empleo de energía y la producción de biomasa serán bajos, y si el medio de crecimiento no está aireado, se encontraran las células en la superficie del medio flotante, sufriendo dichas células fotoinhibición, que da como resultado un bajo crecimiento y una baja producción de biomasa.

Las condiciones óptimas de crecimiento de *Arthrospira maxima*, la velocidad de agitación de 5 a 60 cm/s, con una intensidad de luz no menor a  $200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con un flujo de aire enriquecido con  $\text{CO}_2$  (0.5%), con una aireación superficial de velocidad de  $0.0056\text{m s}^{-1}$  y un medio de crecimiento libre de  $\text{NaHCO}_3$  (Soni, *et al.*, 2017).

- Temperatura y pH

*Arthrospira maxima* crece en un rango de temperatura de  $20^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$ , siendo la mejor temperatura de crecimiento entre los  $29^\circ\text{C}$  y  $37^\circ\text{C}$ , su crecimiento nocturno es de aproximadamente cero.

El pH tiene un efecto sobre el crecimiento de *Arthrospira maxima*, la producción de pigmentos y el contenido proteico, es decir, sobre su sistema antioxidante.

El crecimiento puede verse afectado de dos maneras:

- Alteración de carbono disponibles, lo cual interfiere con la fotosíntesis.
- Por la interrupción de los procesos de membrana celular.

Esto puede tener un gran impacto en la acumulación de antioxidantes, y factores como la disponibilidad de nutrientes, ionización y toxicidad de metales pesados, tienen impacto sobre el metabolismo de la *Arthrospira maxima*.

Un ambiente cálido y húmedo causa contaminación bacteriana, ya que puede causar el crecimiento de los principales contaminantes de *Arthrospira maxima* que son protozoarios como ameba y paramecio, los cuales llegan arruinar los cultivos.

Un medio saludable para el crecimiento de *Arthrospira maxima* tiene un pH entre 9 y 11, impidiendo que crezcan otro tipo de especies, ya que es un ambiente alcalino (Soni, *et al.*, 2017).

- Intensidad de luz

Todos los organismos fotoautótrofos, convierten la energía de la luz en energía química a través de la fotosíntesis. La calidad, intensidad y duración de la luz son factores importantes en la producción de *Arthrospira maxima*.

Considerando que en un sistema en condiciones naturales, la luz natural o radiación solar es la única fuente de luz, la disponibilidad de luz depende del área geográfica, condiciones climáticas, estacionalidad y de la atmósfera local.

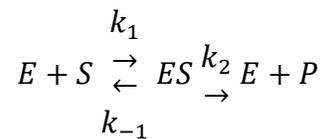
*Arthrospira maxima* requiere de una gama específica de intensidad de luz para su crecimiento, considerando que la densidad óptica del cultivo es directamente

proporcional a la intensidad de la luz, es decir, a una densidad óptica alta, mayor intensidad de luz, y a una densidad óptica baja, menor intensidad de luz.

Los valores altos de intensidad de luz hacen que aumenten los parámetros como la tasa de crecimiento máxima, pero a bajos valores dan una biomasa rica en pigmentos y proteínas (Soni, *et al.*, 2017).

### **Reacción enzimática de *Arthrospira maxima***

En 1913, Michaelis y Menten propusieron el siguiente mecanismo para explicar el comportamiento cinético de una reacción enzimática:



Donde:  $k_1$  = constante de velocidad de la formación de ES.

$k_{-1}$  = constante de velocidad de disociación de ES.

$k_2$  = constante de velocidad de formación y liberación del producto del sitio activo.

Cuando se une el sustrato S en el sitio activo de la enzima E, se forma un complejo intermediario (ES), durante el estado de transición el sustrato se convierte en producto, después de un lapso breve, el producto se disocia de la enzima. En la figura 1, se puede observar el comportamiento gráfico de la enzima con el sustrato cuando sucede la reacción.



**Figura 1.** Comportamiento del modelo cinético de Michaelis-Menten.

El modelo de Michaelis-Menten, asume que:

- 1) la  $k_{-1}$  tiene un valor despreciable en comparación con la  $k_1$ .
- 2) la velocidad de formación de ES es igual a la velocidad de degradación durante la mayor parte del curso de la reacción, lo que se denomina suposición del estado estacionario de equilibrio dinámico (Voet & Voet, 2004).

En el caso de la reacción de la *Arthrospira maxima*, el sustrato es el bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ), y la enzima es el inóculo de biomasa de *Arthrospira maxima*, que después de reaccionar hace que se produzca más biomasa.

## Usos

*Arthrospira maxima* es un “Superfood”, debido a que es el conjunto más nutritivo y concentrado de comida por la humanidad, llena de grandes maravillas nutricionales (Moorhead & Capelli, 2011).

En las últimas décadas, el alga *Arthrospira maxima* ha sido utilizada como un suplemento alimenticio, se llega a cultivar para su uso como un suplemento

alimenticio humano, alimento para animales y para uso farmacéutico ya que es capaz de producir compuestos como caroteno y ácidos grasos omega 3 y 6 poliinsaturados (Alonso & Maroto, 2000).

Las investigaciones han demostrado que la *Arthrospira maxima* tiene propiedades anti-fátiga, anti-radicación y anti-viral, asimismo, se puede emplear para suprimir el crecimiento de tumores y mejorar la inmunidad, por lo que se le puede llegar a considerar como un alimento funcional (Shi, *et al.*, 2016).

Asimismo ha sido probada experimentalmente, *in vivo* e *in vitro*, y es efectiva para tratar Alzheimer, alergias, anemia, cáncer, hepatotoxicidad (toxicidad en el hígado), enfermedades virales y cardiovasculares, hiperglucemia (nivel de azúcar alto en la sangre), hiperlipidemia (colesterol alto y triglicéridos), inmunodeficiencia y procesos inflamatorios (Chamorro *et al.*, 2002), también ha sido utilizada en el tratamiento de daño renal agudo, debido a su actividad antioxidante, ya que es capaz de consumir los radicales libres evitando el aumento de marcadores de estrés oxidativo causado por las drogas del daño celular (Rodríguez-Sánchez, *et al.*, 2012).

*Arthrospira maxima* es considerada un nutraceutico (alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, es decir, prevención o tratamiento de enfermedades) (Rodríguez-Sánchez, *et al.*, 2012).

*Arthrospira maxima*, como se puede observar en la figura 2, se puede tomar en forma de tableta o en polvo, existen muchas recetas las cuales ayudan a incorporar a la *Arthrospira maxima* a la dieta, aunque muchos consumidores la mezclan sólo con agua. Debido a su color intenso cuesta un poco de trabajo acostumbrarse a él,

por ejemplo, si se mezcla con chile, se torna de un color un poco extraño, así como el día de St. Patricio, que se le pone al ponche de frutas, cerveza, pastel y helado para que tengan un color verde. Ya que si se necesita de un colorante natural, la *Arthrospira maxima* es una buena elección, aunque teniendo sus debidas precauciones ya que es extremadamente concentrado, por lo que se debe de poner muy poco. Igual se puede agregar a galletas, aunque se debe de considerar que el calor prolongado destruye gran parte del contenido de los nutrientes, y al agregarlo a sopas o guisos se recomienda justo antes de servir. También se puede encontrar en alimentos como la pasta, sopa instantánea, barras, cereales, papas, palomitas de maíz, bocadillos, postres congelados, aderezos, jugos y licuados, e incluso cerveza (Moorhead & Capelli, 2011).



**Figura 2.** *Arthrospira maxima* comercial.

También se utiliza en cosméticos, medicamentos y tratamientos de aguas residuales, todos estos usos son gracias a que su pared celular se compone por polisacáridos que tienen una digestibilidad del 86% y puede ser absorbido por el cuerpo humano, así como a algunos de sus componentes, que pueden ser, ácidos

grasos, omega 3, omega 6, beta-caroteno, alfa-caroteno, ficocianina y compuestos de calcio (Sjors & Alessandro, 2010).

Asimismo, suministra nutrientes que faltan en la mayoría de las dietas, a los atletas les proporciona energía duradera y reduce su tiempo de recuperación, nutre a personas con problemas de digestión, asimilación y eliminación, satisface el apetito proporcionando los nutrientes esenciales, por lo que se puede decir que ayuda a proporcionar bienestar y salud en general (Moorhead & Capelli, 2011).

También por toda la cantidad de proteínas que posee, al tomar *Arthrospira maxima* antes de comer ayuda a satisfacer el apetito para que las personas coman menos y no se sientan tan hambrientos entre comidas, debido a esto *Arthrospira maxima* ayuda a perder peso de una forma más fácil que de manera convencional, nutriendo el cuerpo. Este beneficio se obtiene ya que la *Arthrospira maxima* es un alimento puro y natural que no contiene ingredientes sintéticos ni conservadores y se cultiva sin pesticidas ni herbicidas, lo que la hace que su consumo no tenga efectos secundarios ni se tenga adicción a ella, a diferencia de muchas pastillas para adelgazar las cuales son controladas y causan adicción.

Su explicación radica cuando se siente hambre es debido a que las reservas de glucosa y aminoácidos son bajas y lo que hace la *Arthrospira maxima* es elevar los niveles de glucosa en la sangre con sus polisacáridos y asimismo proporciona aminoácidos esenciales con la proteína que es altamente digerible de la *Arthrospira maxima*, y la felalanina (un aminoácido que se encuentra en la *Arthrospira maxima*) suprime el apetito al actuar en el cerebro en el centro del apetito. En comparación

con otras proteínas, *Arthrospira maxima* es baja en grasa, en calorías y en colesterol (Moorhead & Capelli, 2011).

Considerada como un alimento de alta energía, se puede emplear como un limpiador ya que ayuda a mejorar la digestión y la eliminación de desechos en el organismo. La cantidad de *Arthrospira maxima* se ajusta a cada uno de sus consumidores; sus necesidades, su edad, estado de salud y los resultados que desea lograr al consumirla (Moorhead & Capelli, 2011).

Considerando todos los beneficios de la *Arthrospira maxima*, no sólo es buena para las personas, sino también para las plantas y los animales, los veterinarios recetan *Arthrospira maxima* para ayudar a que las mascotas se recuperen si tienen algún problema, aumentar la resistencia, también para hacerlos lucir mejor. La premiada carpa koi, recibe *Arthrospira maxima* para realzar su color y mejorar su salud. Los criadores de aves agregan *Arthrospira maxima* a su comida para mejorar su color y el brillo de su plumaje. También emplean la *Arthrospira maxima* las compañías acuícolas para mejorar las tasas de crecimiento, aumentar la supervivencia y así aumentar la resistencia a enfermedades, y mejorar la calidad y el color de varios mariscos y pecados.

Los jardineros también la usan para poder alimentar a las plantas, rociando un poco de *Arthrospira maxima* en la tierra alrededor de su planta, los agricultores orgánicos la emplean como un fertilizante natural y saludable, aumentando el rendimiento y la salud de sus productos (Moorhead & Capelli, 2011).

Actualmente la biomasa que se produce se emplea en el mercado de aditivos alimentarios en forma de polvo o píldoras, ha sido seleccionada por la NASA y por la Agencia Espacial Europea como un alimento primario de las misiones espaciales a largo plazo.

La empresa Proteous (empresa asociada con Earthrise Farms en Estados Unidos) ha tratado de incorporar la biomasa de la *Arthrospira maxima* en mucha variedad de productos alimenticios, como; barras de granola y varios tipos de pasta. Asimismo en México y en China, financiado por el gobierno, el polvo de *Arthrospira maxima* se agrega a los alimentos de los niños, como; galletas o chocolate (Fox, 1985).

Otro producto disponible es la proteína extraída de la biomasa de *Arthrospira maxima*, el cual es un pigmento azul ficocianina que se comercializa con el nombre de "Lima Blue", dicho producto se emplea como colorante para la comida, siendo un tipo de pintura comestibles, por lo que se puede encontrar en los helados o también en algunos cosméticos. Una pequeña desventaja de dicho pigmento es su sensibilidad a la luz, ya que se debe de tener cuidados especiales para que este no se blanquee (Dainippon & Chemicals, 1980).

A parte de su producción comercial, *Arthrospira maxima* emplea un papel importante como alimento en la economía de algunos países africanos, en el año 2000 la delegación financiada por el Banco de Desarrollo Africano visitó varios países africanos con el fin de estudiar la manera en como usan la biomasa de *Arthrospira maxima* siendo parte de su dieta y con lo que complementan sus requerimientos de proteína. Los resultados que se emitieron en el informe indicaron que la recolección

de *Arthrospira maxima* que ocurre en los lagos alrededor del Rift Valley es una tradición muy común (Sodelac, 2000).

Siendo así el cultivo de *Arthrospira maxima*, va dirigido a dos diferentes mercados, uno es la gran sociedad industrializada, donde las personas buscan alimentos saludables para su dieta, y el otro mercado son las sociedades tercermundistas que buscan una fuente de proteína que pueda ser producida bajo las condiciones locales, las cuales muchas veces no favorecen a la agricultura, asimismo, la pueden emplear para alimento de animales (Fox, 1985).

Actualmente existen varias compañías que se han dedicado a la producción y comercialización de *Arthrospira maxima*; los productores más grandes del mundo están ubicados en Estados Unidos y Asia. En Estados Unidos, su producción a gran escala comenzó hace aproximadamente 40 años por Earthrise (Irvine, CA) y Cyanotech Corporation (Kailua-Kona, Hawaii) (Vieria, *et al.*, 2017).

Posteriormente, otros países continuaron con su producción; como India, incluye Parry Nutraceuticals (Tamil Nadu), a principios de la década de 2000's, China se convirtió en el principal productor mundial de microalgas, que llega a representar más del 60% de la producción total. Mundialmente la *Arthrospira maxima* ha ido creciendo en el mercado, con una tasa de crecimiento anual del 15%, y una producción de 15,000 toneladas (Vieria, *et al.*, 2017). Actualmente los productos en forma de pastilla y polvo secado de *Arthrospira maxima*, se producen en México, Taiwan, USA, Tailandia, Japón e Israel (Richmond, 1988).

El mercado de la *Arthrospira maxima* se está expandiendo, y es capaz de atraer a miles de consumidores en los próximos años, ya que compuestos bioactivos que se emplean en formulaciones nutricosméticas pueden modular demasiadas funciones biológicas en el organismo (Vieria, *et al.*, 2017).

### **Crecimiento de los microorganismos**

El crecimiento de los microorganismos tiene una gran relación con el agua, mientras que las sustancias disueltas en el agua (nutrientes), los cuales les ayudan a los microorganismos a formar su material celular y obtener energía. Tomando en cuenta que cada microorganismo, el medio de cultivo y las condiciones ambientales varían (Schlegel, 1997).

Considerando que la composición química de las células contenidas en los microorganismos es:

- Macroelementos: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro (C, O, H, N, S, P, K, Na, Ca, Mg, Fe).
- Microelemento (oligoelementos): manganeso, molibdeno, zinc, cobre, níquel, vanadio, boro, cloro, selenio, silicio, wolframio (Mn, Mo, Zn, Cu, Ni, V, B, Cl, Se, Si, W). (Schlegel, 1997)

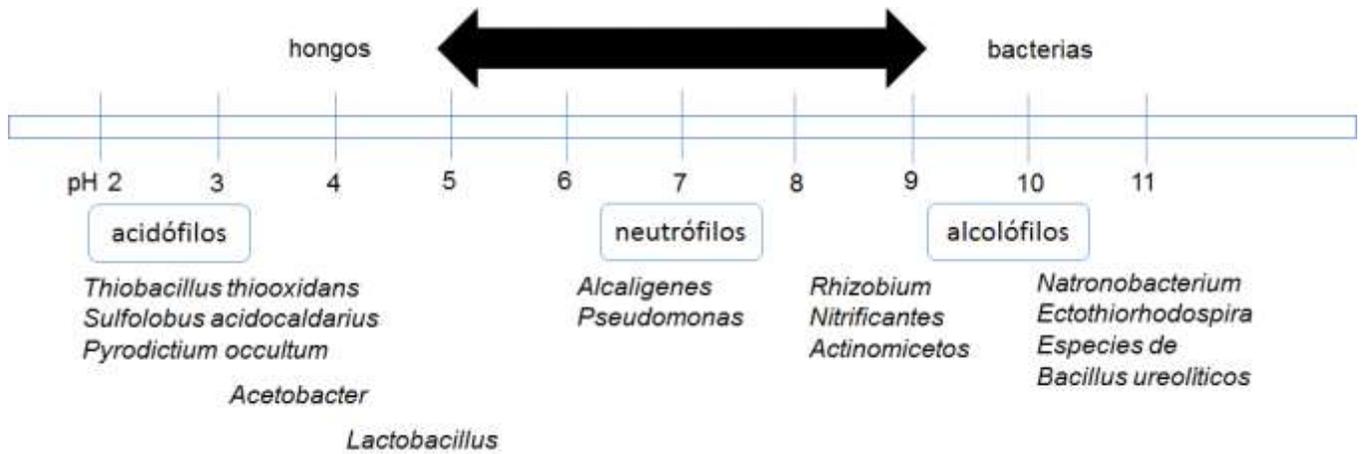
Los metales pesados son principalmente componentes de las enzimas ya que pueden transformar elementos o compuestos inorgánicos, dichos elementos sólo se encuentran en trazas en los medios de cultivo ya que se pueden llegar a ser tóxicos en concentraciones milimolares, aunque muchos se llegan a encontrar como

contaminantes en las sales de los macroelementos llegando a través de los frascos de vidrio o partículas de polvo (Schlegel, 1997).

Los organismos que obtienen su energía a través de la fotosíntesis o de la oxidación de compuestos inorgánicos utilizan el anhídrido carbónico como fuente principal de carbono, siendo capaces de reducir el  $\text{CO}_2$  para obtener el carbono que necesiten.

Un elemento muy importante y que forma parte esencial en el crecimiento de los microorganismos es el oxígeno, se encuentra en forma de agua, contenido en el anhídrido carbónico y en muchos compuestos orgánicos. Se considera un elemento esencial ya que es el receptor final de electrones en la respiración aeróbica dando como resultado que el  $\text{O}_2$  se reduzca a agua. Cuando la fuente de carbono llega a ser el metano, hidrocarburos de cadena larga o compuestos aromáticos, las moléculas de oxígeno se incorporan al material celular (Schlegel, 1997).

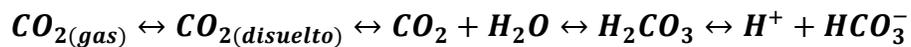
Un factor que llega a tener grandes consecuencias es la concentración de los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^-$ , debido a esto se debe de tener un pH inicial óptimo y controlarlo a lo largo del crecimiento de los microorganismos en este caso del alga *Arthrospira maxima*. En la figura 3, se puede ver el margen de pH para el crecimiento de hongos y bacterias, la mayoría de los organismos se desarrolla en un pH de 7, sin embargo muchas bacterias prefieren un pH de valores superiores (medios alcalinos) (Schlegel, 1997).



**Figura 3.** Márgenes de pH para el crecimiento de hongos y bacterias.

Es indispensable mantener el pH en un determinado valor para el crecimiento de los microorganismos, sobre todo para aquellos que son capaces de producir ácidos, pero no son capaces de tolerarlos, se deben de emplear sustratos no fermentables o taponear el medio para poder lograr la autodestrucción de los ácidos formados (Schlegel, 1997).

Tomando en cuenta que los fosfatos inorgánicos tienen un efecto tampón, y en dado caso que la excreción de ácidos de los microorganismos sea más fuerte se puede adicionar carbonato cálcico o carbonato sódico, considerando que los iones bicarbonato están en equilibrio con el CO<sub>2</sub> disuelto y con el contenido en anhídrido carbónico de la atmósfera gaseosa:



Algunos medios que se emplean para el crecimiento de microorganismos fijadores de CO<sub>2</sub> contienen bicarbonato sódico, y se incuban en una atmósfera que contenga anhídrido carbónico (considerando que la eliminación de anhídrido carbónico, llega a impedir el crecimiento de casi todas las bacterias) en un recipiente cerrado

pudiendo hacerse pasar aire o aire enriquecido en CO<sub>2</sub>. Siempre se debe de tomar en cuenta la relación que existe entre el pH, la concentración de bicarbonato y la presión parcial de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, la cual está dada por la ecuación de Henderson-Hasselbach:

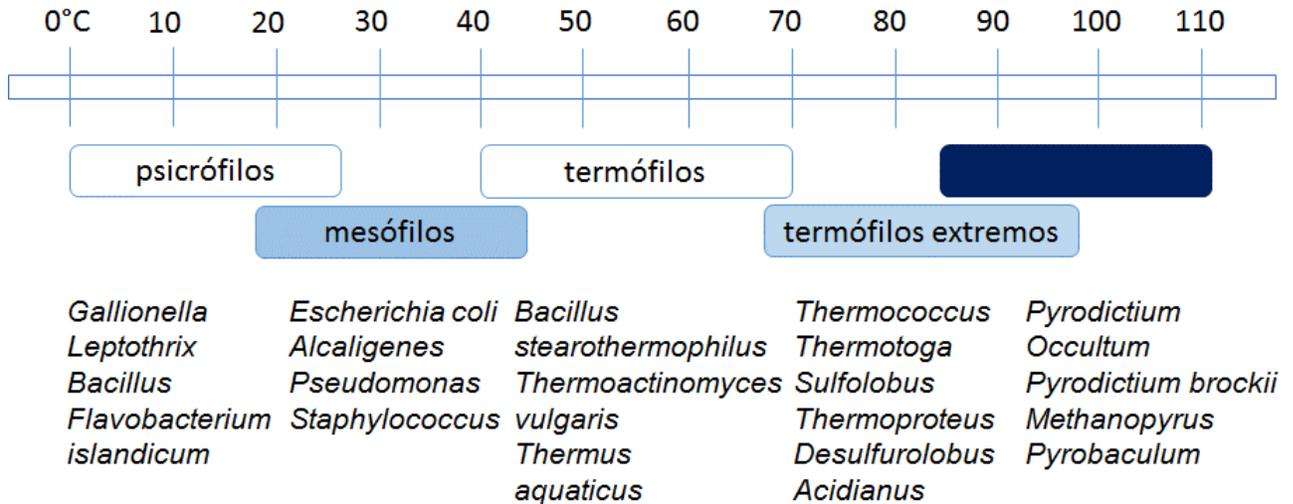
$$pH = pK' + \log \frac{c(HCO_3^-)}{p(CO_2) \cdot \alpha} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Considerando que la eliminación completa del anhídrido carbónico, impide el crecimiento de casi todas las bacterias (Schlegel, 1997).

La temperatura es otro factor muy importante para el crecimiento de los microorganismos, sobretodo porque todos presentan distinto comportamiento a las temperaturas de incubación que se requieren. Existen diferentes clasificaciones para los intervalos de temperaturas, como se puede ver en la figura 4:

- Psicrófilos o criófilos: el crecimiento óptimo es a temperaturas menores de los 20°C (bacterias luminiscentes y bacterias del hierro).
- Mesófilas: su crecimiento se da entre los 20°C y 42°C .
- Termotolerantes: llegan a crecer a 50°C (*Methylococcus capsulatus*).
- Termófilas: crecen a temperaturas superiores a los 40°C, pero su límite son los 70°C (*Bacillus stearothermophilus*, *Thermoactinomyces vulgaris*).
- Termofilos extremos: tienen rangos de temperatura muy variantes ya que existen microorganismos que su crecimiento es encima de los 65°C (*Thermus aquaticus*, *Sulfolobus*), por arriba de los 70°C (especies del genero *Bacillus* y *Clostridium*), y se encuentran una clasificación dentro de ellas:

- Hipertermófilos: crecen encima de los 80°C y lo 100°C (*Salfolebus acidocaldarius*, *Pyrodictium occultum*).



**Figura 4.** Intervalo de temperaturas para el crecimiento de las bacterias.

El oxígeno juega un papel muy importante en el crecimiento de los microorganismos aeróbicos ya que es el aceptor de electrones. Para las bacterias que crecen sobre placas de agar o en medios líquidos es suficiente con el oxígeno que se encuentra en el aire, en los cultivos líquidos de gran profundidad las bacterias aeróbicas sólo crecen en la superficie, ya que debajo las condiciones se hacen anaeróbicas, pero se puede lograr el crecimiento de microorganismos en la profundidad del medio con ayuda de la aireación ya que los microorganismos sólo utilizan el oxígeno disuelto, aunque esté se utiliza en concentraciones muy bajas, influye mucho ya que se puede llegar a perjudicar la respiración celular (Schlegel, 1997).

### Cinética de las reacciones biológicas

Las bacterias pueden crecer en dos distintos tipos de medio; el medio líquido y el medio sólido.

- **Medio líquido**

Cuando las bacterias crecen en medio líquido, las células que se producen en cada división continúan con su vida independiente, formando una suspensión de células libres (Willey, *et al.*, 2011).

Se pueden diferenciar cuatro fases de los parámetros que caracterizan el crecimiento microbiano:

1. Fase lag o de adaptación, los microorganismos se adaptan para iniciar su crecimiento exponencial, acoplado su metabolismo a las nuevas condiciones como la abundancia de nutrientes y las condiciones de cultivo.
2. Fase exponencial o logarítmica, la velocidad de crecimiento es máxima, pero el tiempo en el que se generan es mínimo, debido a que las bacterias consumen los nutrientes a velocidad máxima (Willey, *et al.*, 2011).

Se describe con la siguiente ecuación:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$N = N_0 e^{\mu(t-t_0)} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\ln N - \ln N_0 = \mu(t - t_0) \quad (\text{Ecuación 4})$$

ó

$$\log N - \log N_0 = \frac{\mu}{2,303}(t - t_0) \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

N: Número de microorganismos al tiempo t

$N_0$ : Número de microorganismos al  $t_0$  (inóculo)

$\mu$ : Constante específica de velocidad de crecimiento ( $h^{-1}$ )

Asimismo, se puede calcular el valor de la velocidad máxima de crecimiento para un microorganismo ( $\mu_{max}$ ) y un sustrato, empleando curvas de crecimiento con diversas cantidades de sustrato, para poder determinar el valor de  $\mu$  para cada concentración de sustrato:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{(K_s + S)} \quad (\text{Ecuación 6})$$

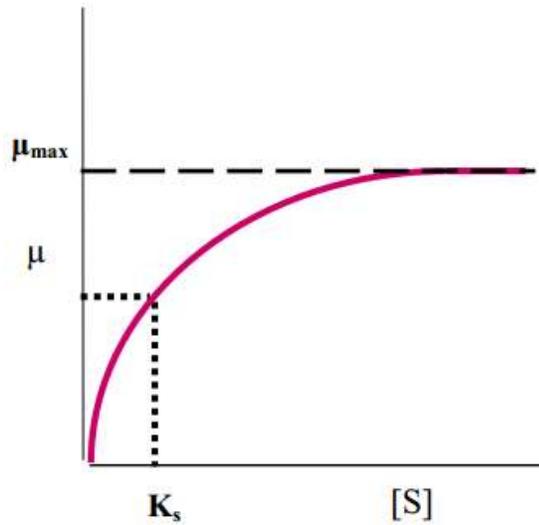
Donde:

$K_s$ : Constante de saturación para el sustrato e igual a la concentración de sustrato para la cual:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \left( \frac{K_s}{\mu_{max}} \right) \left( \frac{1}{S} \right) \quad (\text{Ecuación 7})$$

Se puede hacer el cálculo de  $\mu_{max}$  a partir de la representación gráfica como la figura 5, a partir de los resultados de  $\mu$  cuando el microorganismo crece con diferentes concentraciones de sustrato:

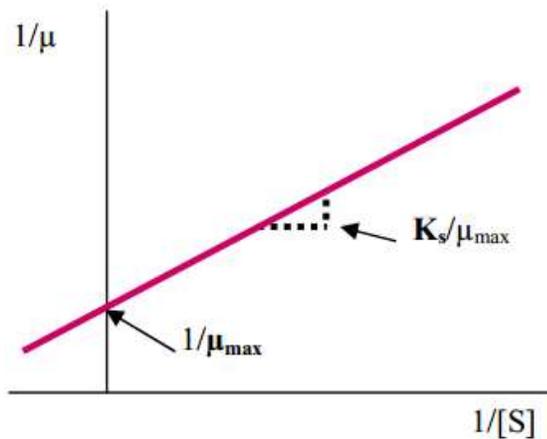
$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{(K_s + S)} \quad (\text{Ecuación 8})$$



**Figura 5.** Gráfica para el cálculo de  $\mu_{max}$ .

Linealizando la ecuación queda y gráficamente se puede ver en la figura 6:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \left(\frac{K_s}{\mu_{max}}\right) \left(\frac{1}{S}\right) \quad (\text{Ecuación 9})$$



**Figura 6.** Gráfica para obtener los parámetros del crecimiento microscópico.

(Arana, *et al.*, 2014)

3. Fase estacionaria, se da cuando se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que liberan en la fase exponencial hacen

que ya no sea un medio adecuado para el crecimiento microbiano, por lo que en esta fase no se incrementa el número de bacterias. Resulta ser una fase de gran importancia ya que representa el estado metabólico real de los microorganismos (Willey, *et al.*, 2011).

Se deben de resaltar dos parámetros importantes:

- Cosecha máxima, que es la biomasa máxima que se puede obtener:

$$M = M_t - M_0 \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde:

$M_t$ : Biomasa en el tiempo  $t$  (cuando en la fase estacionaria el número de células es más elevado) (g, mg, etc.)

$M_0$ : Biomasa del inóculo (biomasa al  $t_0$ ) (g, mg, etc.)

Rendimiento, es la biomasa que se produce por cantidad de sustrato consumida:

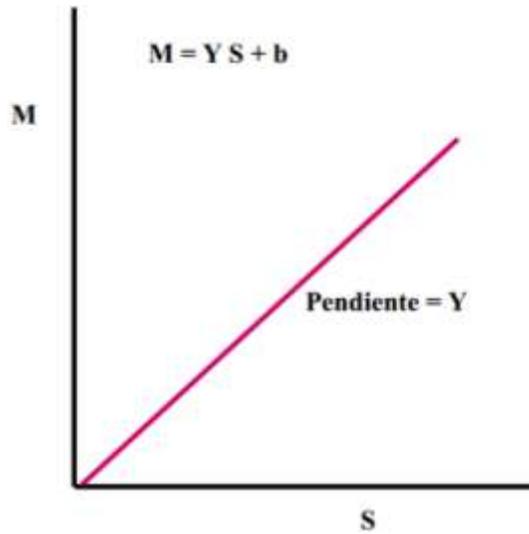
$$Y = \frac{(M_t - M_0)}{(S_0 - S_t)} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Donde:

$S_0$ : Cantidad de sustrato al inicio

$S_t$ : Cantidad de sustrato en el tiempo ( $t$ ) cuando se obtiene el número de células más elevado.

Para calcular el rendimiento ( $Y$ ), primero se deben de obtener los valores de la cosecha máxima ( $M$ ) para cada concentración de sustrato, posteriormente se debe de obtener la recta que relaciona  $M$  vs  $S$  (concentración del sustrato), en la figura 7, se puede observar el comportamiento gráfico del rendimiento microbiano:



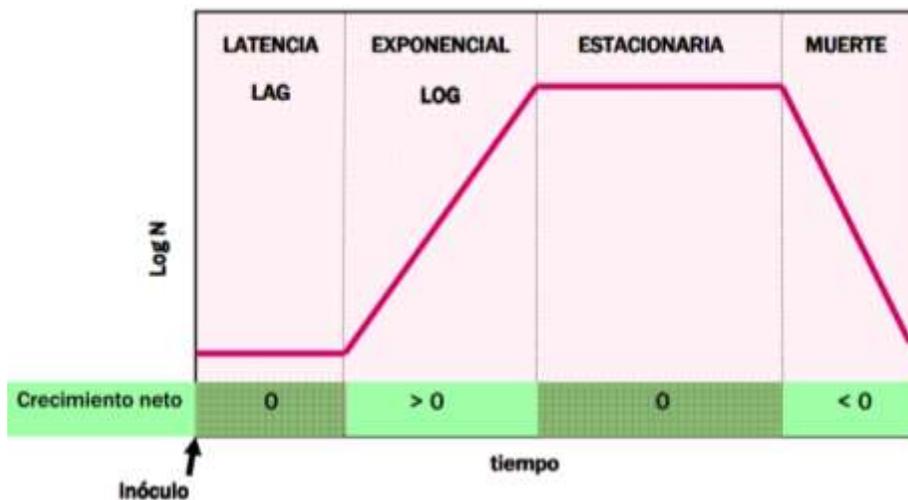
**Figura 7.** Gráfica para el cálculo del rendimiento microbiano.

(Arana, *et al.*, 2014)

4. Fase de muerte, se reducen el número de bacterias viables del cultivo.

Controlando las condiciones de crecimiento, se puede observar la evolución del número de células de un cultivo microbiano en un sistema cerrado en un laboratorio.

Una representación del comportamiento ideal de cada fase del crecimiento microbiano, se puede ver en la figura 8:



**Figura 8.** Gráfica de las fases del crecimiento microbiano.

(Arana, *et al.*, 2014)

- **Medio sólido**

Presenta las mismas fases de crecimiento que se presentan en el medio líquido (fase de adaptación, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte), aunque la cinética de crecimiento se puede observar con la evolución del número de células vivas por unidad de superficie o por unidad de masa (Willey, *et al.*, 2011).

Cuando se da el crecimiento en un medio sólido, el crecimiento después de un tiempo se le llama colonia. Por lo tanto se le denomina unidad formadora de colonia (UFC) a la célula bacteriana viva y aislada que si se encuentra en condiciones de sustrato y ambientales adecuadas puede producir una colonia en un lapso muy corto de tiempo (Willey, *et al.*, 2011).

El modelo más útil en el estudio de las velocidades enzimáticas fue propuesto por Leonor Michaelis y Maud Menten en 1913, teniendo el concepto del complejo enzima-sustrato, de Victor Henri en 1903, el cual es fundamental en la cinética de Michaelis-Menten, dicho modelo es el que se explicó anteriormente, siendo la  $K_s = K_m$  la constante de Michaelis-Menten (Voet & Voet, 2004).

Los valores de la  $K_m$  y de  $V_{max}$  se determinan midiendo los valores de las velocidades iniciales de reacción a diferentes concentraciones de sustrato, obteniendo los valores aproximados a través de la construcción de la figura 6, trazando los recíprocos de las velocidades iniciales frente a los recíprocos de las concentraciones del sustrato. A este tipo de Figuras se le conoce como *diagrama de los dobles recíprocos de Lineaweaver-Burk*, asimismo, sirve para poder

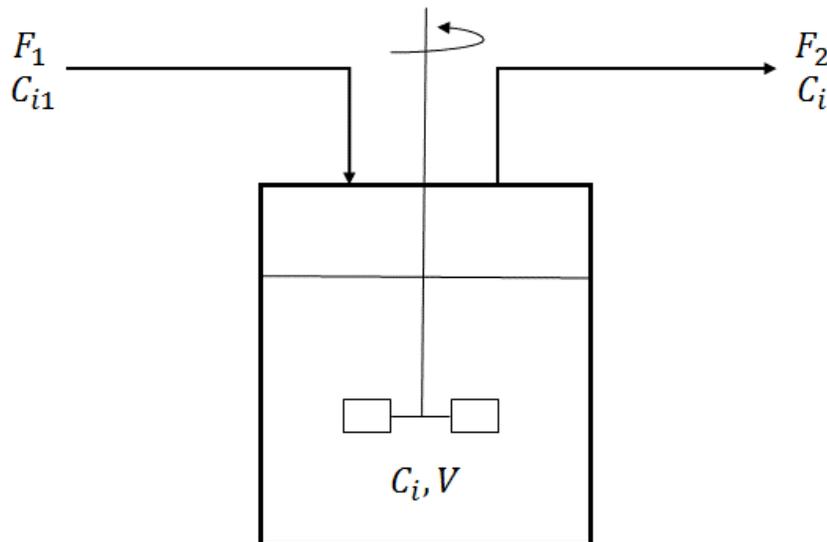
determinar el tipo de inhibición enzimática de la reacción, es decir, se reduce o se elimina la actividad enzimática o catalítica de las enzimas (Voet & Voet, 2004).

### **Balance de materia para un biorreactor tipo CSTR**

Considerando todos los diversos factores que afectan el crecimiento de *Arthrospira maxima*, el balance de masa para la producción de biomasa de *Arthrospira maxima*, puede formularse haciendo las siguientes suposiciones:

- a) No entra más biomasa al estanque que la inicial o es despreciable en comparación con la final.
- b) El sistema está bien mezclado y la velocidad de circulación del estanque es constante (Sadhukhan, *et al.*, 2014).

En la figura 9, se puede observar el biorreactor haciendo las suposiciones anteriores:



**Figura 9.** Esquema de un biorreactor.

Para el biorreactor, se puede plantear el siguiente balance de materia:

Velocidad de acumulación = Velocidad de entrada - Velocidad de salida + Velocidad de formación - Velocidad de consumo

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F_1 C_{i1} - F_2 C_i + V_{r_{fi}} - V_{r_{ci}} \quad (\text{Ecuación 12})$$

donde:

$V$  = Volumen del estanque.

$C_{i1}$  = Concentración del componente "i" en la alimentación.

$C_i$  = Concentración del componente "i" a la salida.

$F_1$  = Caudal de alimentación.

$F_2$  = Caudal de salida.

$r_{fi}$  = Velocidad de formación del componente "i".

$r_{ci}$  = Velocidad de consumo del componente "i".

$t$  = Tiempo, d. (Baños Rodríguez, 2015)

Con las suposiciones, para un volumen constante, y con ambos caudales iguales, el balance de materia en estado inestable, puede ser desarrollado por la siguiente ecuación:

$$V_{pond} \frac{dC_{alg}}{dt} = \mu C_{alg} V_{pond} - F_c C_{alg} \quad (\text{Ecuación 13})$$

donde:

$V_{pond}$  = Volumen del estanque,  $m^3$ .

$C_{alg}$  = Concentración de biomasa del alga,  $kg m^{-3}$ .

$F_c$  = Caudal del estanque,  $m^3 d^{-1}$ .

t = Tiempo, d.

(Sadhukhan, *et al.*, 2014)

### **Rendimiento**

En estado estacionario, la concentración de biomasa de algas es constante y la variación de la concentración con respecto al tiempo es igual a cero. La velocidad de dilución es igual a la velocidad de crecimiento de la biomasa. Si el efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> es descuidado, el rendimiento de biomasa de algas por área de tierra utilizada, se puede calcular a partir de la profundidad del estanque, empleando la siguiente ecuación:

$$Y_{alg} = \mu C_{alg} h z \quad (\text{Ecuación 14})$$

donde:

$Y_{alg}$  = Rendimiento de la biomasa de las algas.

h = Fracción del área ocupada.

z = Profundidad del estanque.

(Sadhukhan, *et al.*, 2014)

### **Productividad volumétrica, $P_b$**

Parámetro que mide la cantidad de biomasa que se genera por unidad de cultivo en el tiempo determinado. Sus unidades son unidad de masa por unidad de volumen y unidad de tiempo ( $g m^{-3} día^{-1}$ , etc.).

La productividad volumétrica, puede obtenerse como el cociente del incremento de la concentración de la biomasa,  $\Delta C_b$ , en un incremento de tiempo  $\Delta t$ , obteniendo así la productividad media en un periodo.

Si  $\Delta t$  es muy pequeño, se tiene la definición de productividad volumétrica instantánea:

$$P_b = \frac{dC_b}{dt} \quad (\text{Ecuación 15})$$

Considerando la definición de  $\mu$ , se deduce a:

$$P_b = \mu * C_b \quad (\text{Ecuación 16})$$

(Fernandez Sevilla, 2014)

### **Productividad areal, $P_a$**

Es importante considerar la productividad por unidad de área de un biorreactor, en término económico y de eficiencia de la luz del sol. Dada la siguiente relación:

$$P_a = P_b * a \quad (\text{Ecuación 17})$$

$$a = \frac{V_R}{S} \quad (\text{Ecuación 18})$$

donde:

$P_a$ = Productividad areal,  $g\ m^{-2}\ \text{año}^{-1}$  .

$V_R$ = Volumen de fotorreactor.

$S$ = Superficie ocupada, no solo la huella del biorreactor, también las sombras que proyecte (Fernandez Sevilla, 2014).

### **Velocidad de producción de biomasa, $F_b$**

El concepto se refiere a la producción total de un biorreactor como caudal de biomasa (biomass output rate). Es el resultado de la productividad neta volumétrica por el volumen del FBR:

$$F_b = P_b * V_R \quad (\text{Ecuación 19})$$

(Fernandez Sevilla, 2014)

### Capítulo 3. Estado del arte

#### **Crecimiento de *Arthrospira maxima***

La mayoría de los reactores comerciales para la producción de *Arthrospira maxima*, se basan en canales poco profundos en los que el cultivo de algas se mezcla en un flujo turbulento por una rueda de paletas. En Sosa Texcoco (México), se adaptaron una planta de bicarbonato de sodio y el lago natural para producir *Arthrospira maxima*. En lugares como Estados Unidos, Israel, India, Tailandia y Taiwán, se emplean dos tipos de estanques abiertos, uno que está revestido de hormigón (Tailandia y Estados Unidos), y el otro es un túnel de tierra poco profundo forrado con PVC u otro elemento duradero, por lo que, el costo y durabilidad del revestimiento, influyen en los costos de capital (Vonshak & Richmond, 1988).

El futuro del cultivo de *Arthrospira maxima*, depende de los desarrollos que se hagan en la tecnología y que den como resultado un aumento de los rendimientos y que reduzca el costo de su producción, para poder lograr dicho objetivo se debe de tener en consideración los factores que afectan el crecimiento de *Arthrospira maxima* (Vonshak & Richmond, 1988).

#### **Parámetros cinéticos de la literatura**

En la tabla 5, se muestran los valores de los parámetros cinéticos que están reportados en la literatura y las condiciones a las se realizaron los experimentos para poder obtener los parámetros.

**Tabla 5.** Parámetros cinéticos de la literatura.

Autor	Parámetro cinético	Valor	Unidades	Condiciones	
Santos de Jesus, Cristiane; da Silva Uebel, Lívia; Serra Costa, Samantha; Lobo Miranda, Andréa; Greque de Moraes, Etiele; Greque de Moraes, Michele; Vieira Costa, Jorge Alberto; Larroza Nunes, Itaciara; de Souza Ferreira, Ederlan; Izabel Druzian, Janice. 1	$X_{max}$	$1.6 \pm 0.04$	g L-1	Medio de Zarrouk, condiciones del Noreste de Brasil (temperatura de 27.1 a 37.3°C e intensidad luminosa de 75.85 a 1840.75 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ ).	
	$P_{max}$	$0.054 \pm 0.003$	g L-1 dia-1		
	$\mu_{max}$	$0.05 \pm 0.002$	dia-1		
	Shi, Wen-qing; Li, Si-dong; Li, Gao-rong; Wang, Wen-hua; Chen, Qing-xiang; Li, Yong-qiang; Ling, Xu-wei. 2	$X_{max}$	1.518	g L-1	Temperatura de 30°C, pH entre 9.5 y 10, luz roja-azul.
		$X_{max}$	1.389	g L-1	Temperatura de 30°C, pH entre 9.5 y 10, luz roja-verde.
		$X_{max}$	1.233	g L-1	Temperatura de 30°C, pH entre 9.5 y 10, luz roja-verde.
Affan, Md. Abu; Lee, Dae-Won; Al-Harbi, Salim Marzoog; Kim, Han-Jun; Abdulwassi, Najah Ibrahim; Heo, Soo-Jin; Oh, Chulhong; Park, Heung-Sik; Ma, Chae Woo; Lee, Hyeon-Yong; Kang, Do-Hyung. 3	$X_{max}$	1.80 - 2.05	g L-1	Intensidad luminosa 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura de 30.62°C, pH de 7.50 a 8.49, medio SOT.	
	$\mu_{max}$	0.34 - 0.35	dia-1		
	$X_{max}$	0.55 - 1.55	g L-1	Intensidad luminosa 1300 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura de 30.62°C, pH de 8.98, medio SOT.	
	$\mu_{max}$	0.33 - 0.36	dia-1		
	Affan, Md. Abu; Lee, Dae-Won; Jeon, Seon-Mi; Noh, Jae-Hoon; Heo, Soo-Jin; Oh, Chulhong; Park, Heung-Sik; Khomayis, Hisham Sulaiman A.; Kang, Do-Hyung. 4	$X_{max}$	$1.55 \pm 0.002$	g L-1	Medio ASKM-2-1, pH de 8.50 a 10.39, intensidad luminosa 120 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura de 30°C.
		$P_{max}$	$2.00 \pm 0.04$	g L-1 dia-1	
$\mu_{max}$		$0.284 \pm 0.002$	dia-1	Medio SOT, pH de 8.39 a 10.13, intensidad luminosa 120 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura de 30°C.	
$X_{max}$		$1.57 \pm 0.002$	g L-1		
	$P_{max}$	$1.97 \pm 0.03$	g L-1 dia-1		
	$\mu_{max}$	$0.283 \pm 0.002$	dia-1		

1. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. (Santos de Jesus, *et al.*, 2017)
2. Investigation of main factors affecting the growth rate of *Spirulina*. (Shi, *et al.*, 2016)
3. Variation of *Spirulina maxima* biomass production in different depths of urea-used culture medium. (Affan, *et al.*, 2015)

Bituminous coal and sodium hydroxide-pretreated seawater stimulates *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* growth with decreased production costs. (Affan, *et al.*, 2014)

## Capítulo 4. Metodología

### Condiciones generales

Todos los experimentos se realizaron en una incubadora Luzeren (02468617), a una temperatura de 30 ° C, con una agitación constante de 200 RPM y una luminosidad de 665lm (11.97 – 18.62 $\mu$ mol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) la cual fue provocada por un foco de 50 W marca Philips, el medio de crecimiento fue una modificación de Zarrouk descrito en Spirulina- From growth to nutritional product: A review (Soni, *et al.*, 2017) e Investigation of main factors. (Shi, *et al.*, 2016)

### Inóculo

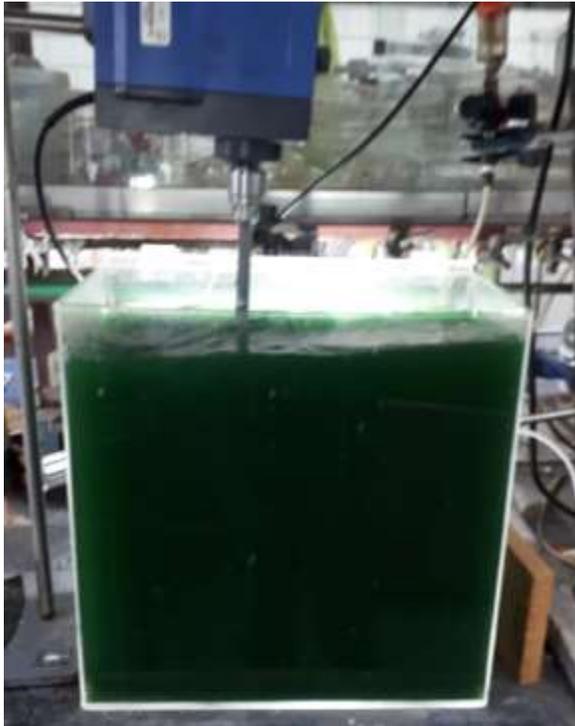
El inóculo se obtuvo de un reactor de 20L, de *Arthrospira maxima* cultivado en el medio de Zarrouk modificado, a una temperatura de 20°C, con una agitación constante de 60 RPM suministrado por un agitador EURO-ST 20 D S1 con 3 paletas planas y una luminosidad de 665lm (11.97 – 18.62 $\mu$ mol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Que ha estado en operación durante un periodo de 4 meses.

### Método experimental

Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante dos experimentos; con el primer experimento, se obtuvo cada uno de parámetros cinéticos, a partir del modelo cinético de Michaelis-Menten y de la representación de Lineweaver-Burk, el experimento consistió en poner 6 reactores con diferente cantidad de inóculo y diferente cantidad de sustrato, para analizarlos 8 días después. Con el segundo experimento, se observaron las fases del crecimiento de la *Arthrospira maxima*, el experimento consistió en poner 7 reactores con la misma cantidad de inóculo y sustrato, analizando uno por día durante un periodo de 7 días.

## Experimento 1.

Se tomó 1L de muestra de *Arthrospira maxima* del reactor de 20 L (figura 10) la cual fue filtrada sobre tela de muselina comercial los sólidos retenidos en la tela fueron separados (figura 11), apartando la cantidad necesaria de inóculo dependiendo la cinética a realizar para cada experimento.



**Figura 10.** Reactor de *Arthrospira maxima*.



**Figura 11.** Muselina con biomasa húmeda.

Se pusieron 7 matraces de 250 mL, los cuales tenían, la cantidad de biomasa húmeda que se muestran en la tabla 5 (dejando los dos últimos reactores con las misma cantidad de inóculo para poder observar el comportamiento de cada uno), 250 mL de medio de Zarrouk modificado y la cantidad de sustrato correspondiente en cada matraz (la cantidad de sustrato varió en cada experimento iba de 500 mg/L

a 8000 mg/L de  $NaHCO_3$ ). Las cantidades de inóculo seco por cada experimento se pueden ver en la tabla 6:

**Tabla 6.** Inóculo de los reactores

Reactor	Inóculo seco (mg)
1	72.8
2	76.0
3	181.6
4	216.0
5	228.8
6	228.8

Se dejó cada experimento en la incubadora durante un tiempo de ocho días.

Después del tiempo determinado (8 días), se sacó cada uno de los matraces y se realizaron las pruebas de; turbidez, pH, sólidos totales (figura 12) y alcalinidad, y así poder obtener los parámetros cinéticos de cada experimento.



**Figura 12.** Prueba de sólidos totales.

## **Experimento 2.**

Se tomó una muestra de 1L del reactor de 20L de *Arthrospira maxima* la cual fue filtrada sobre tela de muselina comercial, los sólidos retenidos en la tela se apartaron, para poder tomar la cantidad de 38 mg de inóculo para cada matraz.

Se pusieron 7 matraces de 250 mL, los cuales tenían, la biomasa húmeda, 250 mL de medio de Zarrouk modificado y la cantidad de sustrato correspondiente (la cantidad de sustrato fue la misma para todos los matraces de 250 mg/L de  $NaHCO_3$ ).

Se dejó el experimento en la incubadora durante un tiempo de ocho días (figura 13).



**Figura 13.** Incubadora con matraces.

Se sacó un matraz diario durante esos ocho días, y a cada matraz se le hicieron las pruebas de; turbidez, pH, sólidos totales y alcalinidad, para poder obtener los parámetros cinéticos y observar el comportamiento del experimento a lo largo del tiempo establecido.

## Capítulo 4. Resultados, análisis y discusión.

### Experimento 1.

Como se puede observar en la Figura 14, la velocidad de crecimiento de la *Arthrospira maxima* es directamente proporcional a la cantidad de sustrato inicial, también, existe una relación entre la cantidad de inóculo y la velocidad de crecimiento de la *Arthrospira maxima*, ya que a menor cantidad de inóculo mayor es su crecimiento. Cuando se tiene una concentración baja de sustrato la velocidad de reacción es mayor, en cambio cuando son concentraciones mayores de sustrato, la velocidad de reacción va disminuyendo y alcanza una velocidad máxima de 0.25 1/día (reactor 1). La Figura 14 sigue el comportamiento de la cinética de Michaelis-Menten.

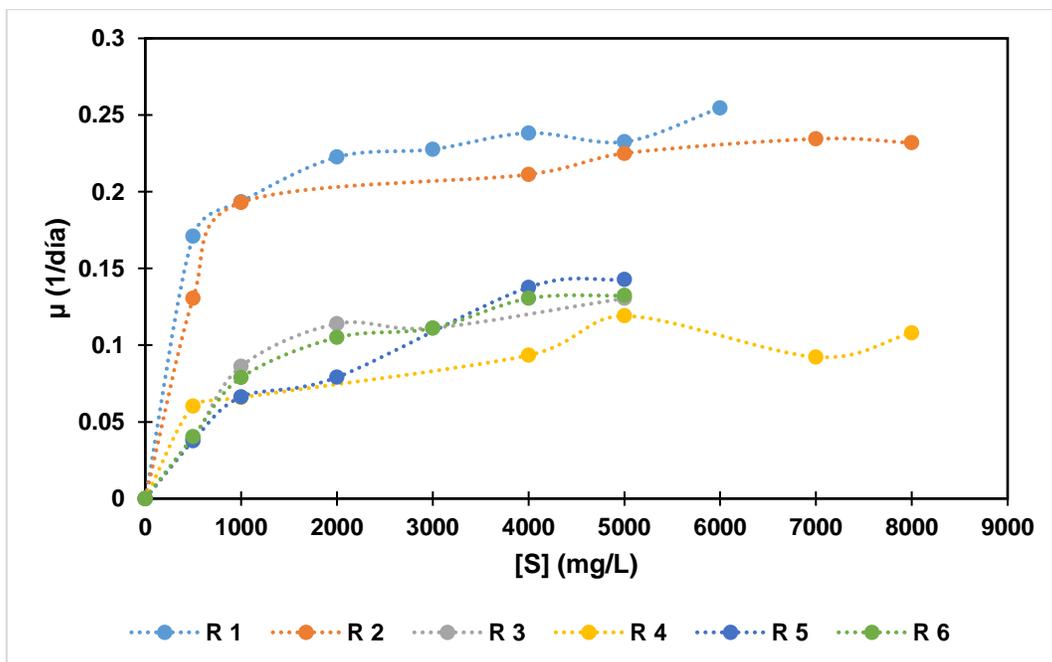
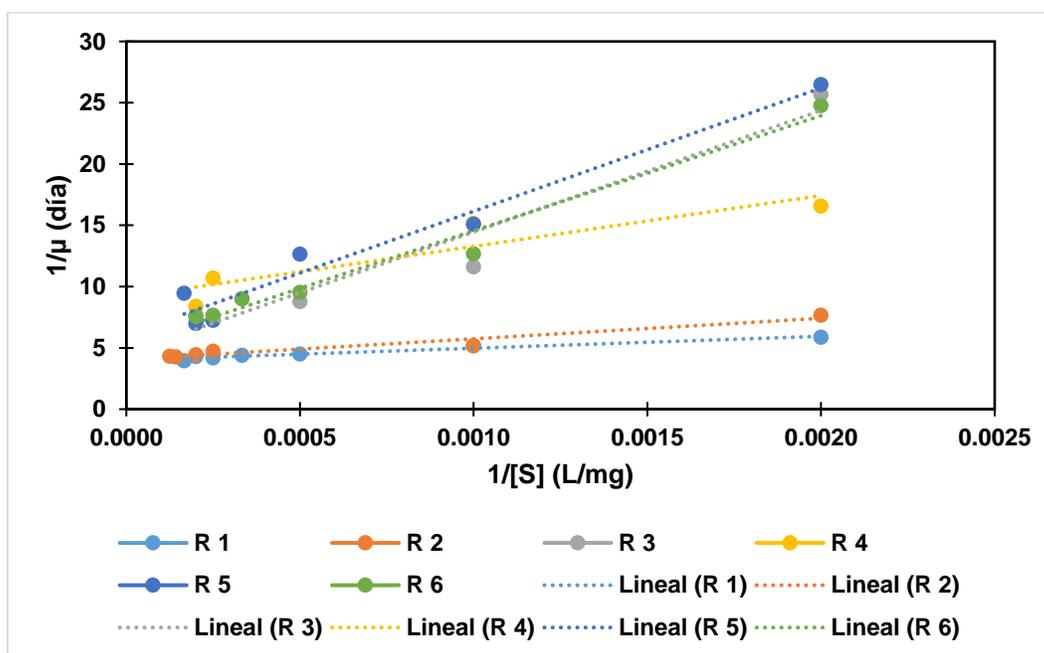


Figura 14. Gráfica para el cálculo de  $\mu_{max}$ .

Como se puede observar la Figura 15, es una representación doble recíproca, es decir, se graficó  $1/V_o$  vs  $1/[S]$ , cada experimento resultó ser una línea recta, la cual obedece a la representación que se le conoce como Lineweaver-Burk, observando la Tabla 7, y los valores de  $R^2$ , se puede determinar que la Figura 15 obedece el comportamiento lineal. Asimismo, se puede apreciar que la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración del sustrato, pero indirectamente proporcional a la constante de saturación del sustrato.

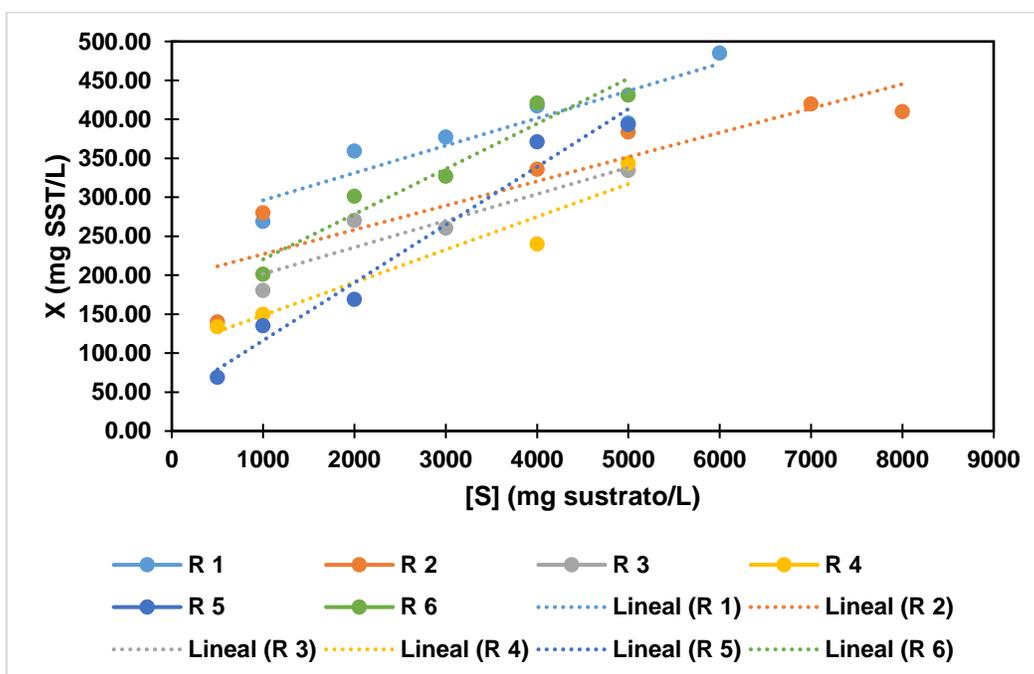


**Figura 15.** Gráfica para obtener los parámetros de crecimiento microscópico.

**Tabla 7.** Tabla de líneas de tendencia experimento 1.

Reactor	Ecuación línea de tendencia	$R^2$
1	$y = 972.25x + 3.9998$	0.9539
2	$y = 1680x + 4.0577$	0.9480
3	$y = 9910.1x + 4.5452$	0.9419
4	$y = 4146.4x + 9.136$	0.8387
5	$y = 10059x + 6.085$	0.9649
6	$y = 9390x + 5.1632$	0.9765

Como se puede observar en la Figura 16 y como se mencionó anteriormente, la cantidad de sustrato consumida es directamente proporcional a la cantidad de biomasa producida, dependiendo de la cantidad de biomasa inicial ya que a menor biomasa inicial mayor biomasa producida. Asimismo se obtiene una línea recta de la Figura 16, que corresponde a la; X (cosecha máxima) vs [S], y como se puede observar en la Tabla 8, los valores de  $R^2$ , lo que puede determinar que el comportamiento es lineal.



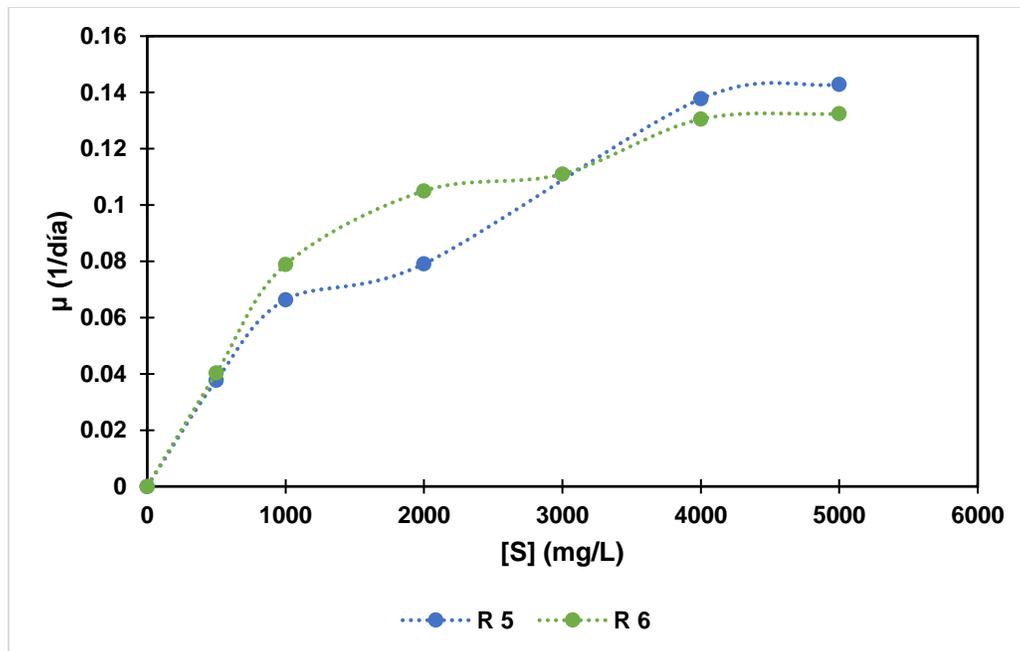
**Figura 16.** Gráfica para el cálculo del rendimiento microbiano.

**Tabla 8.** Líneas de tendencia del rendimiento microbiano.

Reactor	Ecuación línea de tendencia	$R^2$
1	$y = 0.0351x + 261.07$	0.8512
2	$y = 0.0312x + 195.82$	0.8132
3	$y = 0.0342x + 167.43$	0.8534
4	$y = 0.0421x + 106.46$	0.9290
5	$y = 0.0743x + 41.933$	0.9724
6	$y = 0.058x + 162.4$	0.9402

Comparando los resultados que se obtuvieron con los reactores 5 y 6 que tienen la misma cantidad de inóculo:

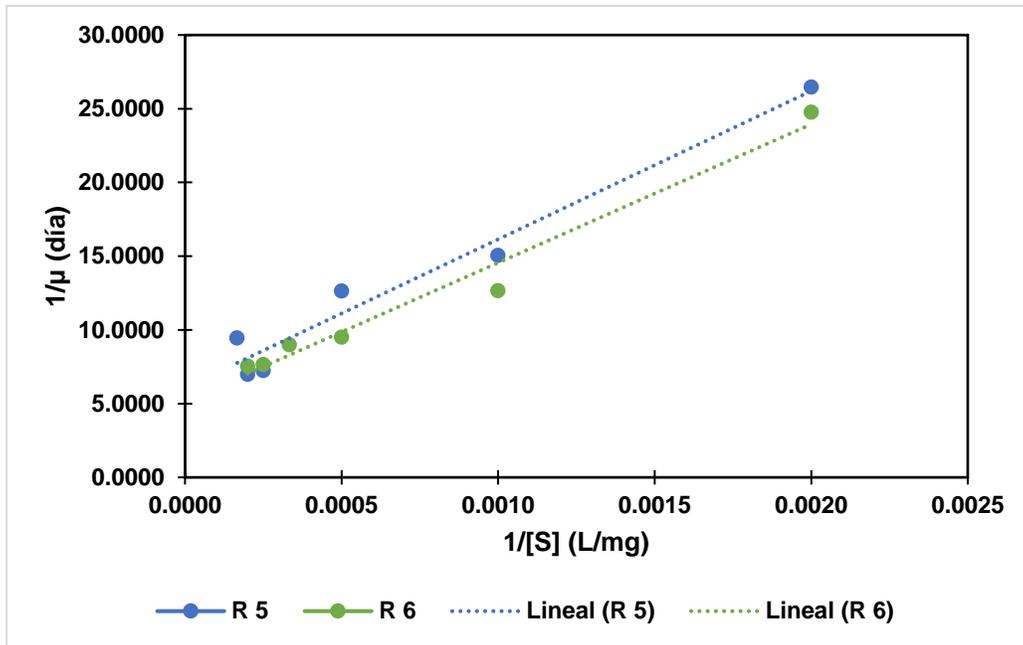
En la Figura 17 se puede apreciar que los reactores tienen casi los mismos resultados, pero ambos cumplen con la cinética de Michaelis-Menten,



**Figura 17.** Gráfica de la comparación de  $\mu_{\max}$  de los reactores 5 y 6.

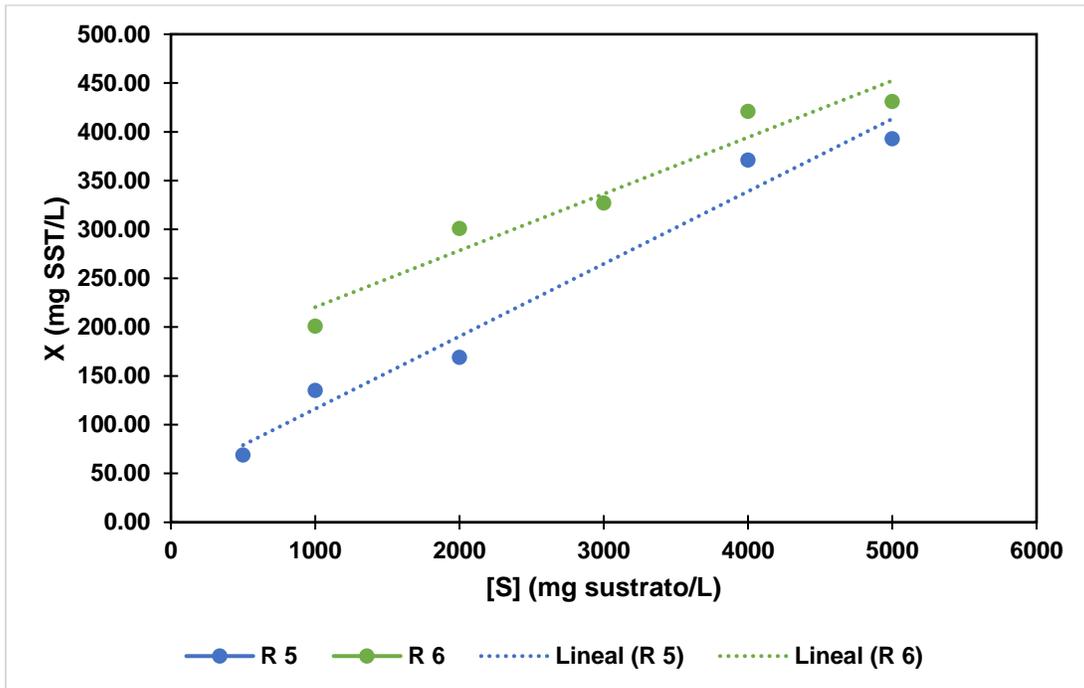
Como se puede apreciar en la figura 18 y como se mencionó en el caso anterior, ambos experimentos tienen una cantidad de biomasa producida aproximadamente de 400mg/L, y ambos experimentos cumplen con la representación de Lineweaver-Burk.

Comparando los valores que se tienen en la Tabla 7, a pesar de que varían un poco, dichos valores son aceptables, ya que su comportamiento es lineal y el valor de su  $R^2$  es aceptable.



**Figura 18.** Gráfica de los parámetros de crecimiento microscópico de los reactores 5 y 6.

En la Figura 19, como se esperaba se puede observar que ambos experimentos siguen un comportamiento lineal, asimismo, se puede apreciar en la Tabla 8, que los valores de sus ecuaciones son muy parecidos, dando una  $R^2$  con un valor muy aceptable para que sea lineal, ambos presentan valores muy parecidos.



**Figura 19.** Gráfica para el cálculo del rendimiento microbiano de los reactores 5 y 6.

Como se puede observar en la Tabla 9, los valores obtenidos de la  $\mu_{max}$  son aproximadamente iguales, considerando la Figura 14, se puede ver que el comportamiento de cada uno de los experimentos, corresponde al modelo cinético de Michaelis-Menten. Los valores obtenidos de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), son un poco variantes, pero considerando la Figura 15, donde se observa que

tiene un comportamiento lineal, y se puede ver que en la Tabla 7, cada uno de las  $R^2$ , se cumple con la representación de Lineweaver-Burk. En el caso del rendimiento los valores casi no varían mucho, pero observando la Figura 16, que deben de tener un comportamiento lineal y en la Tabla 8 se puede observar que dicho comportamiento se cumple por los valores de  $R^2$ . Asimismo se puede observar que todos los experimentos tuvieron un crecimiento notable, tomando en cuenta la biomasa máxima. Considerando que los mejores valores se presentan en el experimento 1 y 2, se puede decir, que a menor biomasa inicial, se tendrá una mejor producción.

Comparando los valores del experimento con los que hay en la literatura (tabla 5) y considerando el mejor valor que existen en la literatura de la velocidad de crecimiento ( $0.36 \text{ día}^{-1}$ ) y el obtenido en el experimento ( $0.25 \text{ día}^{-1}$ ), se puede observar los valores del experimento son un 30% bajos que los que están en la literatura respecto a la biomasa máxima obtenida, los valores del experimento son aceptables ya que se encuentran entre el rango en el que se encuentran los valores de la literatura ( $0.02 \pm 0.001 \text{ día}^{-1}$ ,  $0.05 \pm 0.002 \text{ día}^{-1}$ ,  $0.34 - 0.35 \text{ día}^{-1}$ ,  $0.33 - 0.36 \text{ día}^{-1}$ ,  $0.31 - 0.35 \text{ día}^{-1}$ ,  $0.284 \pm 0.002 \text{ día}^{-1}$ ,  $0.283 \pm 0.002 \text{ día}^{-1}$ ).

**Tabla 9.** Resultados de los parámetros cinéticos.

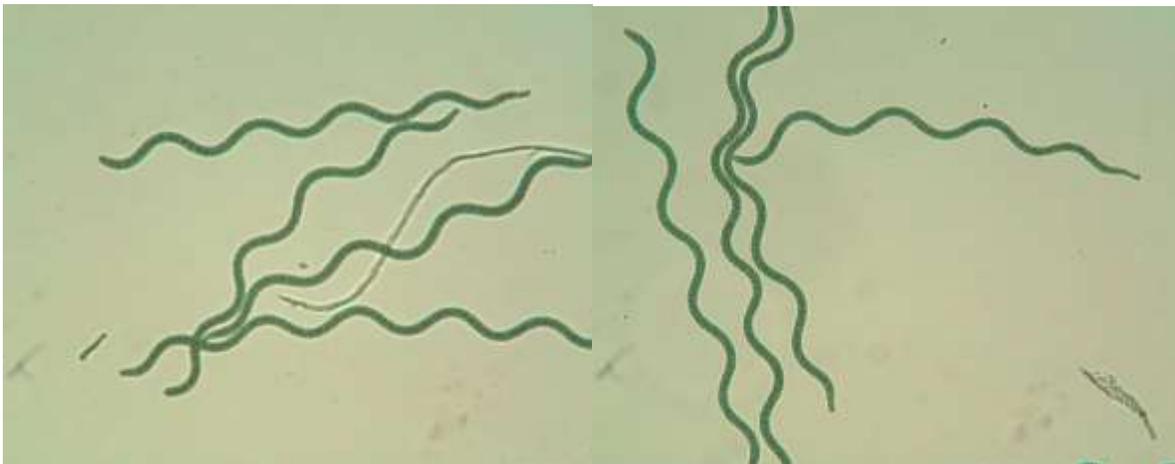
No. Reactor	Parámetro cinético	Valor	Unidades
1	$\mu_{\max}$	0.2500	1/día
	$K_s$	243.0747	mg/L
	Y	0.0351	mg SST/mg sustrato
	$X_{\max}$	485.20	mg/L
2	$\mu_{\max}$	0.2464	1/día
	$K_s$	414.0277	mg/L
	Y	0.0312	mg SST/mg sustrato
	$X_{\max}$	420.00	mg/L

3	$\mu_{max}$	0.2200	1/día
	$K_s$	2180.3441	mg/L
	Y	0.0342	mg SST/mg sustrato
	$X_{max}$	334.40	mg/L
4	$\mu_{max}$	0.1095	1/día
	$K_s$	453.8529	mg/L
	Y	0.0421	mg SST/mg sustrato
	$X_{max}$	344.00	mg/L
5	$\mu_{max}$	0.1643	1/día
	$K_s$	1653.0813	mg/L
	Y	0.0743	mg SST/mg sustrato
	$X_{max}$	393.20	mg/L
6	$\mu_{max}$	0.1937	1/día
	$K_s$	1818.7558	mg/L
	Y	0.0580	mg SST/mg sustrato
	$X_{max}$	431.20	mg/L

Asimismo, se puede observar el cambio de la figura 20 a la 21, como es el crecimiento de *Arthrospira maxima* a lo largo del tiempo.



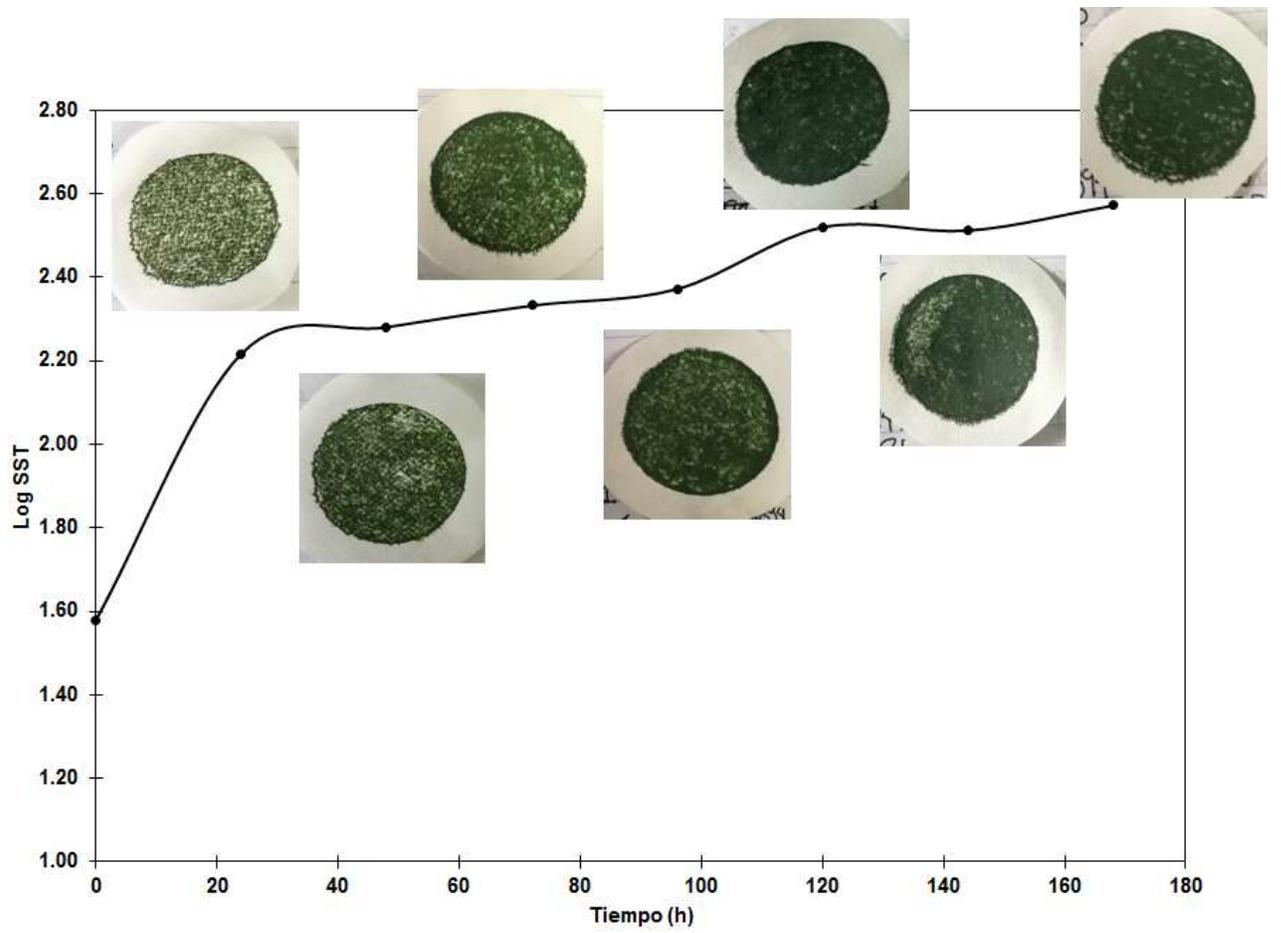
**Figura 20.** Observación al microscopio de *Arthrospira maxima* al inicio del experimento.



**Figura 21.** Observación al microscopio de *Arthrospira maxima* al final del experimento.

## Experimento 2.

Como se puede observar en la Figura 22, son las fases de crecimiento de la *Arthrospira maxima*, en estas se puede ver que el mayor crecimiento de biomasa producida se hace de las 0 a las 24h, posteriormente sigue creciendo pero ya de una manera un poco más lenta, teniendo un máximo a las 168h (7 días), después de este tiempo y como se puede apreciar en los experimentos previos se espera que sea la fase de muerte, ya que todo el sustrato habrá sido empleado para el crecimiento y se necesitará agregar más sustrato. Considerando que la luz puede ser un factor limitante para el crecimiento de *Arthrospira maxima*, se puede explicar como de las 0 a las 24H, tiene un crecimiento mayor, en comparación al resto del tiempo, ya que al principio se tiene la biomasa inicial y la luz le proporciona la energía necesaria para que se pueda generar más biomasa, pero conforme la biomasa va creciendo la luz se va haciendo insuficiente para el crecimiento de la biomasa.



**Figura 22.** Gráfica de las fases de crecimiento.

## Diseño de un biorreactor.

Considerando que se desea un flujo de 500 L/semana de *Arthrospira maxima*, se tiene una constante de crecimiento de 0.25 día<sup>-1</sup>, y la concentración máxima del alga es de 558 mg/L, resolviendo la ecuación 13 se obtendrá el volumen del biorreactor:

$$V_{pond} \frac{dC_{alg}}{dt} = \mu C_{alg} V_{pond} - F_c C_{alg} \quad (\text{Ecuación 13})$$

$$V_{pond} \frac{dC_{alg}}{dt} = (\mu V_{pond} - F_c) C_{alg}$$

$$\int \frac{1}{C_{alg}} dC_{alg} = \frac{(\mu V_{pond} - F_c)}{V_{pond}} \int dt$$

$$\ln|C_{alg}| = \frac{(\mu V_{pond} - F_c)}{V_{pond}} t$$

$$V_{pond} = -F_c / ((\ln|C_{alg}|/t) - \mu) \quad (\text{Ecuación 20})$$

$$\therefore V_{pond} = 378.74 \text{ L}$$

Se conoce que el volumen útil de un biorreactor es de 70% el volumen real (ecuación 20), se puede obtener el volumen del reactor:

$$V_{pond} = 70\% V_{real} \quad (\text{Ecuación 20})$$

$$V_{real} = 541.06 \text{ L} \approx 542 \text{ L}$$

Teniendo un volumen de 542 L, se puede obtener las medidas necesarias para el diseño del biorreactor:

$$V_{reactor} = V_{cilindro} + V_{cúpula} = 542 L = 0.542 m^3 \quad (\text{Ecuación 21})$$

$$V_{cilindro} = \frac{\pi}{4} * D^2 * h \quad (\text{Ecuación 22})$$

como:

$$D = \frac{2}{3}h \quad (\text{Ecuación 23})$$

$$V_{cúpula} = \frac{\pi}{3} * a^2 * (3r - a) \quad (\text{Ecuación 24})$$

donde:

a = Altura de la cúpula

r = Radio de la cúpula

De la ecuación 21 y sustituyendo la ecuación 22 y 23:

$$V_{reactor} = 0.542m^3 = \frac{\pi}{4} * \left(\frac{2}{3}h\right)^2 * h + \frac{\pi}{3} * a^2 * (h - a) \quad (\text{Ecuación 25})$$

Resolviendo la ecuación 25:

Datos reactor:

$$h = 1.05 \text{ m}$$

$$D = 0.70 \text{ m}$$

Datos cúpula:

$$a = 0.87 \text{ m}$$

$$r = 0.35 \text{ m}$$

Empleando las ecuaciones 16 (productividad volumétrica) y 19 (velocidad de producción de biomasa), con la constante de velocidad obtenida (0.25 día<sup>-1</sup>) y dando un flujo (71.43 L/día) y tiempo deseado (7 días), se obtuvo la productividad volumétrica diaria y la velocidad de producción de biomasa diaria, para el volumen del reactor que se requiere (542 L).

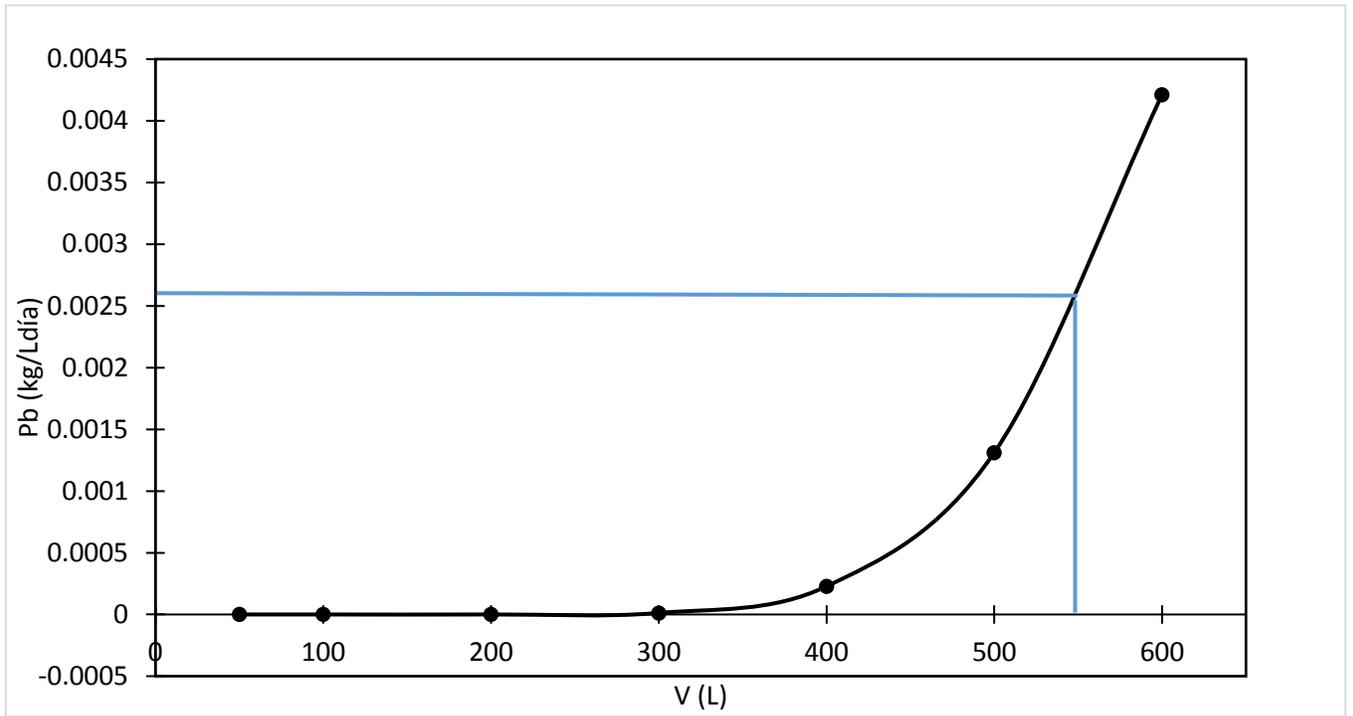
Datos:

$\mu$	0.25	1/día
t	7	día
F <sub>c</sub>	71.43	L/día

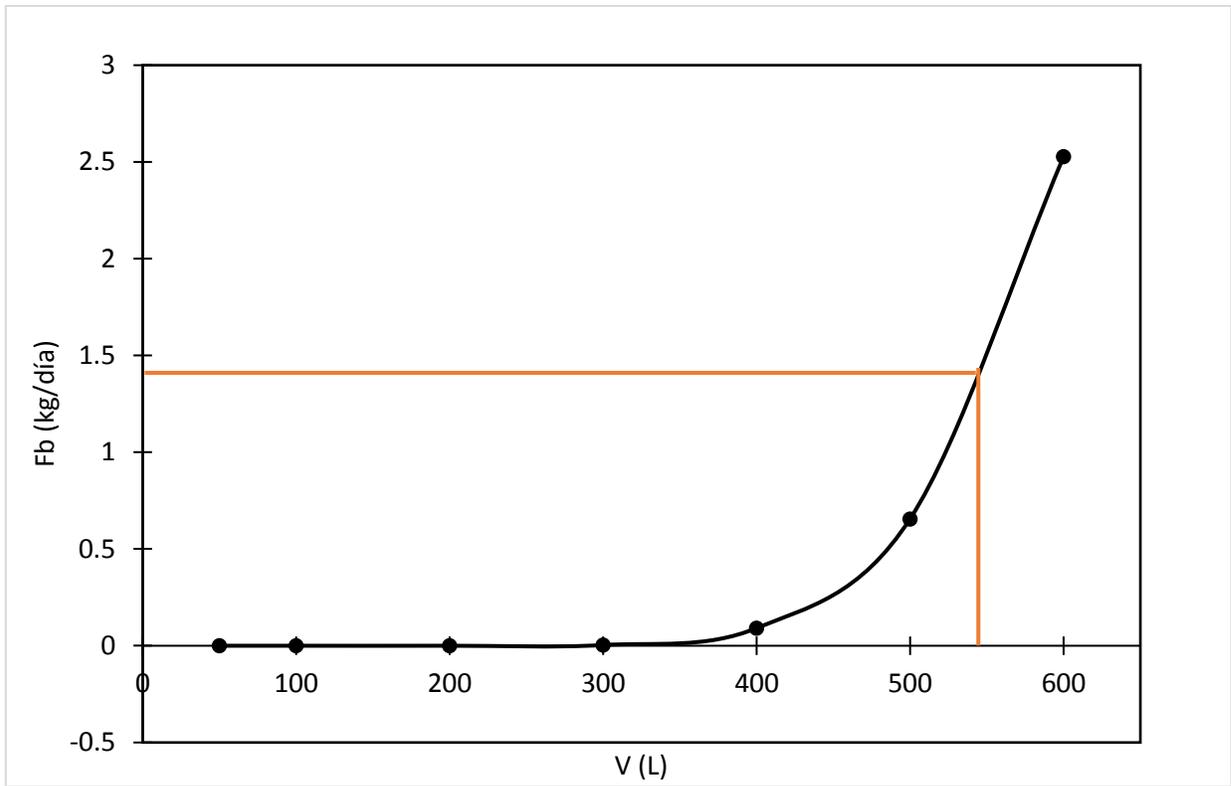
Considerando la velocidad de crecimiento de 0.25 día<sup>-1</sup>, un tiempo de 7 días y un flujo de 500 L/semanal, se tendrá un biorreactor de volumen de 542 L, con una altura de 1.05 m y un diámetro 0.70 m.

Como se puede observar en la Figura 23, para dicho volumen de reactor se tendrá una productividad de 0.0023 kg/Ldía y observando la Figura 24 se tendrá una velocidad de producción de 1.22 kg/día.

Por lo que, conociendo las condiciones de crecimiento y considerando que el tiempo, el flujo y el volumen (los factores independientes), se pueden hacer las modificaciones necesarias, para que se puedan obtener una productividad y una velocidad de producción deseada.



**Figura 23.** Gráfica de la productividad volumétrica.



**Figura 24.** Gráfica de la velocidad de producción de biomasa.

## Conclusiones

Considerando que el crecimiento de *Arthrospira maxima* se ve afectado por diversos factores, pero más el medio de crecimiento. En este trabajo se logró realizar un medio el cual es la modificación del medio de Zarrouk, llegando a este medio a través de que se probaron distintos medios que están reportados en la literatura (Zarrouk, RAO, Utex), dando un resultado aceptable, ya que la constante de crecimiento se encuentra entre los resultados reportados en la literatura.

Asimismo se obtuvieron las condiciones de crecimiento, que fueron: pH de 9, temperatura de 30°C, luminosidad de 665lm (11.97 – 18.62 $\mu$ mol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), agitación constante de 200RPM y cantidad de sustrato de 250 mg/L de NaHCO<sub>3</sub>. Y el tiempo óptimo que es de 7 días en el cual se tendrá la mayor tasa de crecimiento de biomasa de *Arthrospira maxima*.

Teniendo las condiciones de crecimiento y el medio que se consideró más adecuado, se obtuvieron los parámetros de la cinética de crecimiento de la *Arthrospira maxima*, considerando el modelo cinético de Michaelis-Menten, y la representación lineal de Lineweaver-Burk, los parámetros que utilizaron para el cálculo teórico de un biorreactor.

El diseño teórico de un biorreactor, se realizó considerando la constante de crecimiento de 0.25 día<sup>-1</sup>, la producción que se requería de 500 L/semana y la concentración máxima que se tiene durante ese tiempo de 558 mg/L, dando como resultado un biorreactor de volumen de 542 L, con una altura de 1.05 m y un diámetro de 0.70 m, también se calculó la productividad y la velocidad de

producción, siendo una productividad de 0.0023 kg/Ldía y una velocidad de producción de 1.22 kg/día.

Por lo que considerando los problema que se viven en la actualidad en el ámbito alimenticio y todos los beneficios que aporta *Arthrospira maxima* se considera importante invertir en la industrialización de ella, los parámetros y el diseño conceptual de un biorreactor, son el primer paso para poder producirla a gran escala. Este trabajo permite ser un punto de partida para la investigación de *Arthrospira maxima* dentro del grupo de investigación de la Facultad de Química de la UNAM, por lo cual pone las bases técnicas para futuras investigaciones.

## Bibliografía

1. Abbayes, H., 1989. Botánica: Vegetales inferiores. Guadalajara: Reverte S.A..
2. Affan, M. y otros, 2014. Bituminous coal and sodium hydroxide-pretreated seawater stimulates *Spirulina*(*Arthrospira*)maxim growth with decreased production costs. Elsevier, p. 121.
3. Affan, M.-A.y otros, 2015. Variation of *Spirulina maxima* biomass production in different depths of urea-used culture medium.. Brazilian Journal of Microbiology, pp. 991-1000.
4. Alonso, D. & Maroto, F., 2000. Plant as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids.. Biotechnol. Adv. 18, pp. 481-497.
5. Arana, I., Orruño, M. & Barcina, I., 2014. Cálculo de los parámetros que definen el crecimiento bacteriano. En: Como abordar y resolver aspectos practicos de Microbiología. País Vasco: Universidad del País Vasco.
6. Baños Rodríguez, U., 2015. México Document. [En línea] Available at: <https://vdocuments.mx/education/24-balance-de-masa-en-bioreactores.html>
7. Bombart, P., Brouers, M., Dujardin, E. & Sironval, C., 1993. *Spirulina* cultures in temperature climates. En: *Spirulina Algae of Life*. Mónaco: Bulletin de l'Institut océanographique, pp. 97-102.
8. Bourrelly, P., 1970. Les algues d'eau douce, algues bleus et rouges. Francia: N. Boubée et cie.
9. Chamorro, G. y otros, 2002. Update on the pharmacology of *Spirulina* (*Arthrospira*), an unconventional food. s.l.:Arch Latinoam Nutr.
10. Dainippon, I. & Chemicals, I., 1980. Production of highly purified alcoholophilic phycocyanin. Japanese Patent, p. 890.
11. De Oliveira, M. A. C. L., Monteiro, M. P. C., Robbs, P. G. & Leite, S. G. F., 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. Aquaculture International, pp. 261-275.
12. FAO, s.f. Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture, s.l.: s.n.
13. Fernandez Sevilla, J. M., 2014. Univeridad de Almería. [En línea] Available at: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/index.html>

14. Figueruelo, J. E. & Davila, M., 2001. Química física de medio ambiente. Puebla: Reverte S.A..
15. Fox, R., 1985. Spirulina, the alga that can end malnutrition.. Futurist, pp. 30-35.
16. Fox, R. D., 1985. Spirulina, the algal that can end malnutrition. The Futurist, p. 30.
17. Fritsch, F., 1935. The structure and reproduction of algae, Vol I. Cambridge: Cambridge University Presss.
18. Guiry in Guiry, M. D., M.D. & Guiry, G., 2018. AlgaeBase. [En línea] Available at: <http://www.algaebase.org> [Último acceso: 24 noviembre 2018].
19. Guiry, M., 2012. How many species of algae are there?, Ireland: Phycological Society of America.
20. Kennedy, J., 2017. ThoughtCo.. [En línea] Available at: <https://www.thoughtco.com/types-of-marine-algae-2291975>
21. Kumar, D. y otros, 2014. Extraction and purification of C-phycoocyanin from Spirulina platensis. Indian Journal of Plant Physiology, pp. 184-188.
22. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. & Clark, D. P., 2012. Brock Biology of Microorganisms. 13a. ed. s.l.: Benjamin Cummings.
23. Meyer, C., 1969. Etude d'une culture d'algues en vue d'une production & grande échelle.. Industr. Alim. Agr., p. 86.
24. Moorhead, K. & Capelli, B., 2011. Spirulina Nature's Superfood. Kailua-Kona: Cyanotech Corporation.
25. Ortegón Aznar, I., Freile Pelegrín, Y. & Daniel, R. R., 2000. Diversidad Vegetal Algas. En: Biodiversidad. Yucatán: s.n., p. 162.
26. Pulz, M. O. & Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology Biotechnology, pp. 635-648.
27. Raof, B., Kaushika, B. D. & Prasanna, R., 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of Spirulina. Biomass and Bioenergy, pp. 537-542.
28. Rheinheimer, G., 1987. Microbiología de las aguas. Zaragoza: Acribia.
29. Richmond, A., 1988. Spirulina. En: Microalgal biotechnology. s.l.: Cambridge University Press, p. 83.

30. Rodríguez-Sánchez, R. y otros, 2012. Phylobiliproteins or C-phycoerythrin of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* protect against HgCl<sub>2</sub>-caused oxidative stress and renal damage.. *Food Chemistry*, pp. 2359-2365.
31. Sadhukhan, J., Siew, N. K. & Martinez, H. E., 2014. *Biorefineries and Chemical Processes. Design, Integration and Sustainability Analysis*. United Kingdom: John Wiley & Sons.
32. Sahoo, D. & Seckbach, J., 2015. *The Algae World*. London: Springer.
33. Santos de Jesus, C. y otros, 2017. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating growth and chemical composition.. *Elsevier*, pp. 86-94.
34. Schlegel, H., 1997. El crecimiento de los microorganismos. En: *Microbiología General*. Barcelona: Omega, pp. 193-203.
35. Schlegel, H., s.f. *Microbiología General*. En: s.l.:s.n.
36. Sherry, A. M. & Fitzgerald, B., 2012. *BioMara*. [En línea] Available at: <http://www.biomara.org/schools/Lesson%201%20-%20what%20is%20algae.pdf>
37. Shimamatsu, H., 2004. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga.. *Hydrobiologia*, pp. 39-44.
38. Shi, W.-q. y otros, 2016. Investigation of main factors affecting the growth rate of *Spirulina*.. *Elsevier*, p. 6688.
39. Sili, C., Torzillo, G. & Vonshak, A., 2012. *Arthrospira* (*Spirulina*). En: *Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*.. London: Springer, p. 678.
40. Singh, S. P. & Singh, P., 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Elsevier*, pp. 432-442.
41. Sjors, V. I. & Alessandro, F., 2010. *Algae based biofuels. Applications and coproducts. Environment and natural resources management working paper*.. Bioenergy monitoring and assessment.
42. Sodelac, 2000. Etude de préféabilité du développement de la production de spirulines. En: République du Tchad. Tractebel Consult (Belgique): Financement: Fond Africain de Développement .
43. Soni, R. A., Sudhakar, K. & Rana, R. S., 2017. *Spirulina- From growth to nutritional product: A review*. *Elsevier*, pp. 157-171.
44. Switzer, L., 1982. *Spirulina, The Whole Food Revolution*. New York: Bantam Books.

45. Tomaselli, L., Giovannetti, L. & Torzillo, G., 1993. Physiology of stress response in *Spirulina* spp.. En: *Spirulina Algae of Life*. Mónaco: Bulletin de l'Institut océanographique, pp. 65-75.
46. Ugwu, C., Aoyagi, H. & Uchiyama, H., 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, pp. 4021-4028.
47. Vieria, J. A. y otros, 2017. The Potencial of *Spirulina* and Its Biactive Metabolites as Ingested Agents for Skin Care. *Industrial Biotechnology*, pp. 246-249.
48. Voet, D. & Voet, J., 2004. *Bioquímica*. Capítulo 14. Velocidad de las reacciones enzimáticas.. Argentina: Panamericana.
49. Vonshak, A., 1992. Microalgal biotechnology: is it an economical success?. En: *Biotechnology: Economic and Social Aspects*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 70-80.
50. Vonshak, A. & Richmond, A., 1988. Mass Production of the Blue-green Alga *Spirulina*: An overview.. *Biomass*, pp. 233-245.
51. Whitton, B., 1992. *Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria*. s.l.:Plenum Press.
52. Whitton, B. A. & Potts, M., 2000. Introduction to the Cyanobacteria. En: *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space*. Blacksburg: Springer, p. 1.
53. Willey, J., Sherwood, L., Woolverton, C. & Prescott, L., 2011. Microorganisms Culture. En: *Prescott's Microbiology*. New York: McGraw-Hill, pp. 4-5.