

TESIS DE MAESTRÍA

Procesos Biotecnológicos

Título:

“Influencia de la luz sobre la producción y la composición de la biomasa microalgal de *Spirulina platensis* LMPA55”

Autor: Paola Álvarez

Director de Tesis: Dr. Víctor Busto

Buenos Aires - 2018

Agradecimientos:

A la Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Buenos Aires y a la Maestría en Procesos Biotecnológicos por su excelencia en mi formación académica.

Al Departamento de Ingeniería Química-UTN -FRBA y a todas las personas que hacen parte del mismo por brindar el uso de sus instalaciones para la realización de esta tesis y por la motivación continúa para el perfeccionamiento de sus docentes.

Al Dr. Víctor Busto por dirigir este trabajo de tesis.

A la Dra. Ana María Giuliatti por su colaboración y sus acertadas frases.

Al Dr. Marcos Cohen por sus consejos y enseñanzas.

A María del Carmen Gutiérrez por su guía, por estar siempre presente, por su constante apoyo y fundamentalmente por su cariño y amistad.

A Maxi, Ricardo, Nahuel, Julieta y Federico por su amistad y por su ayuda en las mediciones experimentales.

A Ricardo Mateucci quien sin su ayuda y amistad esta tesis no podría haberse realizado.

A todas las personas que de una u otra manera hicieron parte de mi formación personal y profesional.

A María Luisa, María Celia, Sergio, Joaquín, Darío y Marina quienes han acompañado este proceso y siempre me han dado ánimos.

A mis amigas Cecilia y Paula, a Simona y Antonio por estar

Principalmente quiero agradecer a mis padres, a mis herman@s y a Solito que me brindan su apoyo y amor incondicional siempre, les dedico este trabajo.

Índice

1	Resumen/Abstract.....	1
1.1	Resumen	1
1.2	Abstract	2
2	Introducción	5
2.1	Generalidades de las microalgas	5
2.2	Fotosíntesis.....	7
2.3	<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	8
2.3.1	<i>Composición bioquímica y aplicaciones</i>	10
2.3.2	<i>Producción de Pigmentos</i>	13
2.4	Importancia de la luz en el cultivo de microalgas.....	17
2.4.1	<i>Ciclos de luz y oscuridad (Fotoperíodos)</i>	18
2.4.2	<i>Intensidad de la Luz</i>	19
2.4.3	<i>Longitud de Onda</i>	21
3	Objetivos	25
4	Metodología	27
4.1	Cepa y mantenimiento de la misma	27
4.2	Determinación de Biomasa – Curva de densidad óptica versus peso seco	28
4.3	Determinación de parámetros de crecimiento	30
4.4	Determinación de la composición bioquímica	31
4.4.1	<i>Determinación de proteínas</i>	31
4.4.2	<i>Determinación de carbohidratos</i>	33
4.4.3	<i>Determinación de lípidos</i>	34
4.5	Determinación de Pigmentos	36
4.5.1	<i>Determinación de Ficocianina</i>	36
4.5.2	<i>Determinación de Clorofila a y Carotenoides</i>	38
4.6	Análisis estadístico.....	39
4.7	Desarrollo experimental	39
4.7.1	<i>Ensayo: Efecto de los ciclos de luz y oscuridad (fotoperíodo)</i>	40
4.7.2	<i>Ensayo: Efecto de la intensidad de la luz</i>	40
4.7.3	<i>Ensayo: Efecto de las longitudes de onda</i>	41
4.7.4	<i>Ensayo: Cultivo en dos etapas</i>	42
5	Resultados y Discusión	45
5.1	Determinación de Biomasa: Curva densidad óptica versus peso seco.....	45
5.2	Efecto de los ciclos de luz y oscuridad (fotoperíodo) sobre cultivos de <i>S. platensis</i>	45
5.2.1	<i>Producción de biomasa y parámetros de crecimiento</i>	46
5.2.2	<i>Composición bioquímica de la biomasa</i>	48
5.2.3	<i>Producción de pigmentos:</i>	50

5.3	Efecto de la intensidad de la luz sobre cultivos de <i>S. platensis</i>	52
5.3.1	Producción de biomasa y parámetros de crecimiento	52
5.3.2	Composición bioquímica de la biomasa	55
5.3.3	Producción de Pigmentos	57
5.4	Efecto de las longitudes de onda sobre cultivos de <i>S. platensis</i>	60
5.4.1	Producción de biomasa y parámetros de crecimiento	60
5.4.2	Composición bioquímica de la biomasa	62
5.4.3	Producción de pigmentos	64
5.5	Cultivo de <i>S. platensis</i> en dos etapas.....	67
6	Conclusiones.....	71
7	Bibliografía	73

Índice de Figuras:

Figura 1: El proceso de fotosíntesis oxigénica	8
Figura 2: <i>Spirulina platensis</i> LMPA55	9
Figura 3: Estructura de la molécula de clorofila <i>a</i>	14
Figura 4: Productos comerciales a base de clorofila	14
Figura 5: Estructuras químicas de los carotenoides	15
Figura 6: Esquema de un ficobilisoma.....	16
Figura 7: Efecto de la irradiancia en la tasa fotosintética	20
Figura 8: Picos de absorción de los diferentes pigmentos presentes en las microalgas.....	22
Figura 9 : Barrido espectral de una suspensión de <i>S. platensis</i>	29
Figura 10: Curva de crecimiento característica de microorganismos, expresada en función del Ln Biomasa vs. Tiempo	30
Figura 11: Coloración típica de la curva de calibración de proteínas, según el método de Lowry	31
Figura 12: Coloración marrón obtenida en la cuantificación de carbohidratos por el método de Dubois.....	33
Figura 13: Coloración de la curva de calibración para la determinación de lípidos.....	35
Figura 14: Extracto clarificado para la cuantificación de ficocianina según el método de Tandeau De Marsac y Hourmad.....	37
Figura 15: Barrido espectral del extracto de ficocianina, con el pico característico a 620nm.....	37
Figura 16: Extracto clarificado para la cuantificación de clorofila <i>a</i> y carotenoides según el método de Wegman y Metzner.....	38
Figura 17: Barrido espectral de un extracto con pico característico de clorofila <i>a</i> y carotenoides	39
Figura 18: Cultivos de <i>S. platensis</i> expuestos a distintas longitudes de onda, utilizando tubos de colores	41
Figura 19: Curva de calibración de Absorbancia _{560 nm} versus Biomasa (g PS/l).....	45
Figura 20: Curvas de crecimiento de <i>S. platensis</i> bajo diferentes fotoperíodos.....	46
Figura 21: Relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la cantidad de horas de exposición a la luz en cultivos de <i>S. platensis</i>	48
Figura 22: Contenido de proteínas de <i>S. platensis</i> bajo distintos fotoperíodos	48
Figura 23: Contenido de lípidos de <i>S. platensis</i> bajo distintos fotoperíodos	49
Figura 24: Contenido de carbohidratos de <i>S. platensis</i> bajo distintos fotoperíodos	49
Figura 25: Contenido de ficocianina de <i>S. platensis</i> bajo distintos fotoperíodos	50
Figura 26: Contenido de clorofila de <i>S. platensis</i> bajo distintos fotoperíodos.....	51
Figura 27: Contenido de carotenoides de <i>S. platensis</i> bajo distintos fotoperíodos.....	52
Figura 28: Curvas de crecimiento de <i>S. platensis</i> a distintas intensidades de luz.....	53
Figura 29: Efecto de distintas intensidades de luz sobre la producción de biomasa de <i>S. platensis</i>	53
Figura 30: Relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la intensidad de la luz en cultivos de <i>S. platensis</i>	54
Figura 31: Contenido de proteínas de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas intensidades de luz	55
Figura 32: Contenido de lípidos de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas intensidades de luz	56
Figura 33: Contenido de carbohidratos de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas intensidades de luz	56

Figura 34: Contenido de ficocianina de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas intensidades de luz	57
Figura 35: Contenido de clorofila de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas intensidades de luz	58
Figura 36: Contenido de carotenoides de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas intensidades de luz	59
Figura 37 : Curvas de crecimiento de <i>S. platensis</i> a distintas longitudes de onda	60
Figura 38: Contenido de proteínas de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas longitudes de onda	63
Figura 39: Contenido de lípidos de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas longitudes de onda	63
Figura 40: Contenido de carbohidratos de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas longitudes de onda	64
Figura 41: Contenido de ficocianina de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas longitudes de onda	65
Figura 42: Contenido de clorofila de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas longitudes de onda	65
Figura 43: Contenido de carotenoides de <i>S. platensis</i> cultivada a distintas longitudes de onda	66
Figura 44 : Curvas de crecimiento de <i>S. platensis</i> cultivadas en dos etapas.....	68
Figura 45 : Contenido de ficocianina de <i>S. platensis</i> cultivada en dos etapas	69
Figura 46 : Contenido de clorofila de <i>S. platensis</i> cultivada en dos etapas	70
Figura 47 : Contenido de carotenoides de <i>S. platensis</i> cultivada en dos etapas	70

Índice de Tablas:

Tabla 1: Composición bioquímica general de <i>S. platensis</i>	9
Tabla 2: Aminoácidos presentes en <i>S. platensis</i>	10
Tabla 3: Vitaminas presentes en <i>S. platensis</i>	11
Tabla 4: Carbohidratos presentes en <i>S. platensis</i>	11
Tabla 5: Ácidos grasos presentes en <i>S. platensis</i>	12
Tabla 6: Pigmentos presentes en <i>S. platensis</i>	13
Tabla 7: Principales pigmentos presentes en <i>S. platensis</i> y sus correspondientes picos de absorción	22
Tabla 8: Composición del medio de cultivo Zarrouk	28
Tabla 9: Preparación de la curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de Lowry.	33
Tabla 10: Preparación de la curva de calibración para la determinación de carbohidratos por el método de Dubois.	34
Tabla 11: Preparación de la curva de calibración para la determinación de lípidos.	36
Tabla 12: Condiciones de cultivo para evaluar los efectos de los ciclos de luz / oscuridad (fotoperíodo) en cultivos de <i>S. platensis</i>	40
Tabla 13: Condiciones de cultivo para evaluar los efectos de la intensidad de la luz en cultivos de <i>S. platensis</i>	41
Tabla 14: Condiciones de cultivo para evaluar los efectos de distintas longitudes de onda en cultivos de <i>S. platensis</i>	42
Tabla 15: Condiciones empleadas en el ensayo de cultivo en dos etapas de <i>S. platensis</i>	43
Tabla 16: Parámetros de crecimiento obtenidos en cultivos de <i>S. platensis</i> bajo distintos ciclos de luz y oscuridad	47
Tabla 17: Parámetros de crecimiento obtenidos en cultivos de <i>S. platensis</i> bajo distintas intensidades de luz.....	53
Tabla 18: Parámetros de crecimiento de <i>S. platensis</i> a distintas longitudes de onda	61
Tabla 19: Parámetros de crecimiento obtenidos en cultivos de <i>S. platensis</i> realizados en dos etapas.	68

1 Resumen/Abstract

1.1 Resumen

La cianobacteria *Spirulina (Arthrospira) platensis* es una microalga con gran potencial biotecnológico, no solo porque permite su utilización como biomasa, dado su gran valor nutritivo, sino también porque puede ser utilizada para la obtención de varios productos de interés como vitaminas, clorofila, carotenoides, ficocianina, etc.

El cultivo de microalgas para la obtención de biomasa o como método de producción de metabolitos de interés, depende de muchos factores, entre los que se encuentran el medio de cultivo, la luz, el pH, la temperatura y la agitación. La luz es el factor más importante en el desarrollo de los organismos fotosintéticos, dado que representa la principal fuente de energía.

El crecimiento de las microalgas no solo puede verse modificado por la intensidad de la luz, sino que también depende de los ciclos de luz y oscuridad (fotoperíodos) a los que son sometidos los cultivos, y a la coloración de la luz incidente (longitud de onda). El efecto de estos factores sobre el crecimiento de las microalgas y la producción de compuestos de interés, dependen tanto de la especie microalgal como de la cepa en estudio.

El objetivo del presente trabajo de tesis fue analizar la influencia de la intensidad de la luz, de los fotoperíodos y de distintas longitudes de onda sobre la producción de biomasa y la composición bioquímica de la microalga *Spirulina platensis* LMPA55, con especial énfasis en la obtención de pigmentos, los cuales tienen particular interés biotecnológico.

Varios tiempos de exposición a la luz fueron evaluados. Un fotoperíodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad resultaría una opción válida para la producción de biomasa, lípidos y ficocianina en cultivos de *S. platensis*. Cuando el cultivo fue sometido a 6 horas de luz y 18 de oscuridad la producción de biomasa disminuyó notablemente. El uso de luz continua podría considerarse una alternativa para incrementar la producción de biomasa y carotenoides en cultivos de *S. platensis*. Sin embargo, implicaría un mayor costo energético en comparación con los procesos que poseen ciclos de luz y oscuridad. Tanto la intensidad de la luz como la cantidad de horas de exposición a la misma estarían en relación con la velocidad específica de crecimiento de esta cepa de *S. platensis*.

El efecto de la intensidad de la luz se estudió sometiendo los cultivos a un rango entre 150 y 4500 lux. A medida que se aumentó la intensidad de la luz se incrementó la producción de la biomasa. Las intensidades de luz para una óptima producción de biomasa microalgal difieren de las intensidades que optimizan la producción de algún metabolito en cultivos de *S. platensis*. Una intensidad de luz de 1500 lux, representaría una opción para obtener una considerable cantidad de biomasa e incrementar la producción de ficocianina, sin afectar la composición bioquímica de los cultivos de *S. platensis*. La aplicación de una baja intensidad

de luz (150 lux), o de luz azul, serían una alternativa para estimular la producción de lípidos, carbohidratos y pigmentos en cultivos de *S. platensis*. No obstante, bajo estas condiciones el crecimiento se encuentra limitado.

El efecto de la longitud de onda se estudió mediante la utilización de luces de color rojo, azul, amarillo y verde. La aplicación de luz roja sobre cultivos de *S. platensis* favorecería la producción de biomasa e incrementaría el contenido de lípidos y ficocianina, pero a un costo mayor de gasto energético.

Con el objetivo de aumentar la producción de pigmentos, se realizaron cultivos de *S. platensis* en dos etapas. En una primera etapa se estimuló la producción de biomasa a una intensidad de luz de 2500 lux, y en una segunda etapa se favoreció la producción de pigmentos sometiendo a los cultivos a una baja intensidad de luz (700 lux), ó a un cambio de longitud de onda (la presencia de luz azul). Los cultivos de *S. platensis* realizados en dos etapas, no respondieron con un aumento del contenido pigmentario. Esto podría deberse al inicio tardío de la segunda etapa, la cual podría haber afectado los mecanismos de adaptación de la cepa a las nuevas condiciones de cultivo. Si bien los resultados obtenidos no fueron los esperados, el cultivo de *S. platensis* llevado a cabo en dos etapas con cambios en las condiciones de luz, representaría una alternativa viable e interesante para modificar la producción de sus pigmentos. No obstante, esta estrategia necesita ser estudiada en profundidad.

Palabras Claves: *Spirulina platensis* –Composición Bioquímica – Fotoperíodo – Intensidad –Longitud de onda

1.2 Abstract

The cyanobacterium Spirulina (Arthrospira) platensis is a microalgae with great biotechnological potential, not only because it allows its use as biomass, due its great nutritional value, but also because it can be used to obtain several interest products such as vitamins, chlorophyll, carotenoids, phycocyanin, etc.

The microalgae cultivation to obtain biomass or as a production method of interest metabolites, depends on many factors, among which are the culture medium, light, pH, temperature and agitation. Light is the most important factor in growth of photosynthetic organisms, since it represents the main source of energy.

The microalgae growth can not only be modified by the light intensity, but also depends on the light and dark cycles (photoperiods) to which the cultures are subjected, and of the incident light coloration (wavelength). The effect of these factors on the microalgae growth and the production of interest compounds, depend both on the microalgal species and on the strain under study.

The aim of this thesis was to analyze the influence of light intensity, photoperiod and wavelengths on the biomass production and the biochemical composition of the microalgae Spirulina platensis LMPA55, with special emphasis on pigments obtaining, which has a particular biotechnological interest.

Several light exposure times were evaluated. A photoperiod of 18 hours of light and 6 hours of darkness would be a valid option for the production of biomass, lipids and phycocyanin in S. platensis cultures. When the culture was subjected to 6 hours of light and 18 of darkness the biomass production decreased markedly. The use of continuous light could be considered an alternative to increase the production of biomass and carotenoids in S. platensis cultures. However, it would imply a higher energy cost in comparison to processes that have light and dark cycles. Both the light intensity and the exposure time to light would be related to the specific growth rate of this strain of S. platensis.

The light intensity effect was studied by subjecting the cultures to a range between 150 and 4500 lux. As the light intensity increased, the biomass production increased. The light intensities for an optimal microalgal biomass production differ from the intensities that optimize the production of some metabolite in S. platensis cultures. A light intensity of 1500 lux, would represent an option to obtain a considerable amount of biomass and increase the production of phycocyanin, without affecting the biochemical composition of the S. platensis cultures. The application of a low light intensity (150 lux), or blue light, would be an alternative to stimulate the production of lipids, carbohydrates and pigments in S. platensis cultures. However, under these conditions growth is limited.

The wavelength effect was studied by using red, blue, yellow and green light. The application of red light on S. platensis cultures would stimulate the biomass production and increase the content of lipids and phycocyanin, but with a higher energy cost.

In order to increase the pigments production, S. platensis cultures were carried out in two stages. In a first stage, the biomass production was stimulated at a light intensity of 2500 lux, and in a second stage the pigments production was favored, subjecting the culture to a low light intensity (700 lux), or to a change of wavelength (the presence of blue light). The S. platensis cultures carried out in two stages, did not respond with an increase in the pigmentary content. This could be due to the late start of the second stage, which could have affected the strain adaptation mechanisms to the new culture conditions. Although the results obtained were not as expected, the S. platensis cultivation carried out in two stages with changes in the light conditions, would represent a viable and interesting alternative to modify the production of their pigments. However, this strategy needs to be studied in depth.

Keywords: Spirulina platensis – Biochemical composition – Photoperiod –Light intensity – Wavelength

2 Introducción

2.1 Generalidades de las microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares microscópicos capaces de convertir la energía solar en energía química mediante la fotosíntesis. Contienen numerosos compuestos bioactivos que pueden aprovecharse para uso comercial. El potencial de la fotosíntesis de microalgas para la producción de compuestos valiosos o para uso energético es ampliamente reconocido debido a su utilización más eficiente de la energía de la luz en comparación con las plantas superiores.

El término microalga, generalmente incluye a las algas microscópicas y las bacterias fotosintéticas es decir, cianobacterias, anteriormente conocidas como *Cyanophyceae* o “algas azules”. La estructura celular es eucariota en microalgas y procariota en cianobacterias, pero en términos de biomasa, ambas se consideran como una fuente potencial de energía, combustible, alimentos y otros muchos productos comerciales de interés biotecnológico. Las clases de microalgas más abundantes son *Cyanophyceae* (algas azul-verdosas), *Chlorophyceae* (algas verdes), *Bacillariophyceae* (incluidas las diatomeas) y *Chrysophyceae* (incluidas las algas doradas) (García et al. 2017).

Las microalgas se encuentran distribuidas en todo el mundo. Están presentes en todos los cuerpos de agua, como lagos, mares y ríos, pero no están supeditadas solo al agua ya que también se encuentran en la superficie de todo tipo de suelos.

El primer uso de las microalgas por humanos se remonta hace 2000 años a los chinos, que utilizaron *Nostoc* para sobrevivir durante la hambruna. Sin embargo, la biotecnología de las microalgas comenzó a desarrollarse a mediados del siglo pasado. Hoy en día, existen numerosas aplicaciones comerciales de microalgas, que pueden utilizarse para mejorar el valor nutritivo de los alimentos y la alimentación animal debido a su composición química; juegan un papel crucial en la acuicultura y pueden incorporarse en productos cosméticos. Además, se cultivan como una fuente de moléculas de gran valor (Priyadarshani y Rath, 2012).

Las microalgas para la nutrición humana se comercializan hoy en diferentes formas, como tabletas, cápsulas y líquidos. También se pueden incorporar en pastas, bocadillos, dulces, gomas y bebidas. Debido a sus diversas propiedades químicas, pueden actuar como un suplemento nutricional o representar una fuente de colorantes alimentarios naturales. Las aplicaciones comerciales están dominadas por las cepas: *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella salina* (Spolaore et al., 2006).

Son también una importante fuente de alimento y aditivo en la cría comercial de muchos animales acuáticos, especialmente larvas y moluscos bivalvos, y organismos vivos como rotíferos que, a su vez, se utilizan para criar las larvas de peces marinos y crustáceos. La importancia de las algas en la acuicultura no

es sorprendente ya que las algas son la fuente natural de alimento de estos animales. Aunque existen varias alternativas para las algas, como levaduras y alimentos microencapsulados, las algas vivas siguen siendo la mejor y la fuente de alimento preferida (Borowitzka, 1997).

Muchas microalgas poseen un elevado valor debido al contenido de un amplio rango de nutrientes tales como provitaminas, minerales, proteínas y ácidos grasos poliinsaturados (Colla et al., 2007). Algunas pueden acumular pigmentos como el β -caroteno, la astaxantina y la luteína de aplicación en la alimentación humana y animal (Shi et al., 1999). También pueden contener vitaminas de particular valor comercial tales como la vitamina B12 y la vitamina E de amplio uso como antioxidante, y ficocoloides que se utilizan como espesantes, floculantes y lubricantes. Asimismo algunas microalgas, como las del género *Spirulina*, son capaces de sintetizar sustancias bioactivas susceptibles de ser utilizadas en medicina como terapéuticos (Colla et al., 2007).

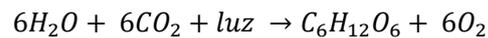
Además tienen la capacidad de atenuar la emisión de CO₂ y producir aceites con una alta productividad, teniendo de ese modo el potencial para aplicaciones en la producción de la tercera generación de biocombustibles. Las tecnologías clave para producir biocombustibles de microalgas incluyen la identificación de las condiciones de cultivo preferidas para la alta productividad del contenido de lípidos, el desarrollo de sistemas de cultivo de microalgas efectivos y económicos, así como la separación y cosecha de biomasa y aceites de microalgas. (Chen et al., 2011).

También se emplean en la agricultura como biofertilizantes y acondicionadores del suelo. La mayoría de las cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno atmosférico y se utilizan de manera efectiva como biofertilizantes. Las cianobacterias desempeñan un papel importante en el mantenimiento y la acumulación de nitrógeno en los suelos, aumentando su fertilidad, lo que ha sido probado en estudios realizados para el cultivo de arroz. (Priyadarshani y Rath, 2012; Song et al., 2005).

El cultivo de microalgas para la obtención de biomasa o como método de producción de metabolitos de interés, depende de muchos factores entre los que se encuentran el medio de cultivo, la luz, el pH, la temperatura y la agitación. Es sabido que la composición de la biomasa microalgal puede ser manipulada mediante las condiciones de cultivo (Markou, 2012). Estas condiciones optimizadas para la generación de biomasa son las habitualmente utilizadas en la producción comercial de microalgas.

2.2 Fotosíntesis

Las microalgas como todo organismo fotosintético pueden sintetizar su propio material mediante fotosíntesis. La comprensión de la fotosíntesis es fundamental para la biotecnología de las microalgas. El tipo de fotosíntesis que realizan las cianobacterias se conoce como fotosíntesis oxigénica dado que forman oxígeno como producto liberado a la atmósfera. La Ecuación 1 representa la principal reacción química que describe a la fotosíntesis.



Ecuación 1

En el proceso fotosintético, para que se inicie la fase fotoquímica (conversión de la energía de la luz en energía química), los organismos deben captar la luz. Las moléculas que intervienen en ello son los pigmentos fotosintéticos, los cuales se organizan en la membrana tilacoidal de las cianobacterias.

Parte de la energía luminosa absorbida por clorofilas y carotenoides se almacena al final del proceso fotosintético como energía química. La mayoría de los pigmentos actúan como una antena (en un complejo antena) captando la luz y transfiriendo la energía (proceso físico) al centro de reacción al que están asociados y donde se transfieren electrones desde la clorofila a una molécula aceptora de electrones (proceso químico). Se piensa que la energía de excitación se transfiere desde la clorofila, que absorbe la luz, hasta el centro de reacción por resonancia.

El proceso de fotosíntesis puede expresarse como una reacción redox impulsada por la luz en la que el dióxido de carbono se convierte en carbohidratos y el oxígeno se libera como un producto secundario.

Las microalgas, como las cianobacterias y al igual también que las plantas verdes, emplean la energía de la luz del Sol para generar un oxidante lo suficientemente potente como para extraer del agua oxígeno, protones y electrones. Los electrones extraídos del agua reducen, en la fase luminosa de la fotosíntesis, el NADP⁺ a NADPH, siendo NADP⁺ la forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, una coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas. NADPH es su forma reducida, que interviene en la fase oscura de la fotosíntesis (ciclo de Calvin) donde se reduce el CO₂. El NADPH actúa como transportador de energía, la cual se emplea finalmente en sintetizar macromoléculas orgánicas a partir de moléculas precursoras pequeñas. (Figura 1).

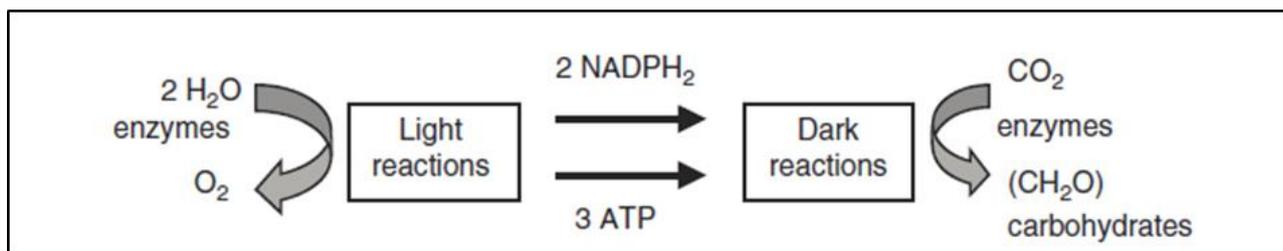


Figura 1: El proceso de fotosíntesis oxigénica se divide en dos etapas, la llamada fase clara o lumínica y la fase oscura. Fuente: Richmond (2008)

2.3 *Arthrospira (Spirulina) platensis*

Arthrospira, generalmente llamada *Spirulina* fue descubierta por primera vez por el científico español Hernán Cortez y los conquistadores en 1519. Cortez observó que la *Spirulina* se consumía en las mesas de los aztecas durante su visita al lago de Texcoco en el valle de México. Pierre Dangeard descubrió los beneficios para la salud de la *Spirulina* ya que observó que los flamencos sobrevivían consumiendo algas verdeazuladas (Soni et al., 2017).

Esta microalga fue redescubierta luego por el botánico Jean Léonard, miembro de una expedición franco-belga a África, quien describió un pastel verde azulado vendido en el mercado de alimentos de Fort Lamy, Chad. Un estudio adicional reveló que esta torta, llamada dihé en el dialecto local, contenía un alga azul-verde identificada como *Spirulina* que era consumida por las tribus que habitaban a las orillas del lago Chad, en el centro del África Occidental (Vonshak, 1997).

Spirulina es una cianobacteria filamentosa multicelular. Bajo el microscopio, la *Spirulina* aparece como filamentos verdeazulados compuestos de células cilíndricas dispuestas en tricomas helicoidales no ramificados (Figura 2). Los filamentos son móviles, deslizándose a lo largo de su eje (Ciferri, 1983). Sus tricomas (filamentos) tienen un patrón de arreglo en forma de hélice abierta y llegan a medir 100-200 μm y hasta 500 μm (Sánchez et al., 2003); la inclinación de una vuelta de la hélice generalmente varía de 10 a 70 μm , y el diámetro de la misma mide de 20 a 100 μm . Si bien la forma helicoidal del tricoma es característica del género, los parámetros helicoidales (es decir, la longitud del paso y las dimensiones de la hélice) varían con la especie, e incluso dentro de la misma especie se han observado diferencias en estos parámetros o pueden ser modificados cambiando las condiciones ambientales, como la temperatura de crecimiento y la luz. Como es el caso de un trabajo publicado por Huarachi-Olivera et al. (2015), quienes describieron que los filamentos de *S. platensis* cultivada en un fotobiorreactor tubular cambiaron de una forma espiral típica a una forma recta por efectos de la radiación ultravioleta.



Figura 2: *Spirulina platensis* LMPA55, aumento: 40x

La mayoría de las especies del género *Arthrospira* se han encontrado habitando cuerpos de agua alcalinos, donde crecen de forma masiva; sin embargo, algunas se encuentran presentes en cuerpos de agua dulce como ríos, manantiales y estanques.

Spirulina se encuentra entre las formas de vida más primitivas de la Tierra. Su estructura celular es un procarionta simple. Comparten características con plantas, ya que tienen la capacidad de realizar fotosíntesis. Comparten características con bacterias primitivas porque carecen de una pared celular vegetal. Curiosamente, también comparten características del reino animal, ya que contienen en sus membranas celulares azúcares complejos similares al glucógeno (Saranraj y Sivasakthi, 2014).

El valor de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.), radica precisamente en la gran variedad de macronutrientes y micronutrientes que contiene, algunos de los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo humano, así como en algunas de sus propiedades, tales como incrementar los niveles de energía, reducir el estrés premenstrual, incrementar el rendimiento de atletas, mejorar el apetito y ofrecer protección antioxidante. (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006). En la Tabla 1 se muestra la composición bioquímica general de *S. platensis*.

Tabla 1: Composición bioquímica general de *S. platensis*. Fuente: Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006; Sánchez et al., 2003; Cohen, 1997; Sasson, 1997.

Composición Bioquímica	% Peso seco
Humedad	3-7
Proteínas	55-70
Lípidos	6-8
Carbohidratos	15-25
Minerales	7-13
Fibra	8-10

2.3.1 Composición bioquímica y aplicaciones

Proteínas:

El alto contenido de proteínas de *S. platensis* hace de ésta un alimento altamente nutritivo. Las proteínas representan entre 40 y un 60% del peso seco, y en ciertas muestras, incluso el 70%. Representa una de las fuentes proteicas más ricas, mucho más que la carne y el pescado (15-25%), o la harina de soja (35%), además de que contiene aminoácidos esenciales (Tabla 2). En cuanto a vitaminas se refiere (Tabla 3), cabe destacar que *S. platensis* es una fuente rica en ellas, sobre todo en provitamina A y vitamina B12, la primera importante en la prevención de enfermedades oculares y la segunda de gran valor para el tratamiento de la anemia perniciosa (Sánchez et al., 2003).

Tabla 2: Aminoácidos presentes en *S. platensis*. Fuente: Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006; Sánchez et al., 2003; Cohen, 1997; Sasson, 1997.

Aminoácidos	[g/kg]	Aminoácidos	[g/kg]
Alanina	47	Lisina	29
Arginina	43	Metionina	14
Ácido aspártico	61	Fenilalanina	28
Cisteína	6	Prolina	27
Ácido glutámico	91	Serina	32
Glicina	32	Treonina	32
Histidina	10	Triptofano	9
Isoleucina	35	Tirosina	30
Leucina	54	Valina	40

S. platensis no presenta celulosa en sus paredes celulares, por lo tanto no requieren procesamiento físico o químico para lograr que la misma sea digerible. En ratas, Durand-Chastel (1980), informó una aparente digestibilidad del 85% de harina de *Spirulina* producida en México, y Vermorel et al. (1975), informaron una verdadera digestibilidad del 73-79%.

Tabla 3: Vitaminas presentes en *S. platensis*. Fuente: Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006; Sánchez et al., 2003; Cohen, 1997; Sasson, 1997

Vitaminas	[mg/kg]
Provitamina A	1400
Tiamina B1	35
Riboflavina B2	40
Niacina B3	140
Vitamina B6	8
Cobalamina B12	3,2
Vitamina E	100
Inositol	640
Vitamina K1	22
Ácido fólico	0,1
Ácido pantoténico	1,0
Biotina	0,05

La posibilidad de incorporación de toda la biomasa de *S. platensis* en los alimentos es particularmente interesante porque proporcionará color verde a los alimentos e incrementará su valor nutricional.

La Organización de las Naciones Unidas, a través del Instituto Intergubernamental para el Uso de las Microalgas contra la Malnutrición, recomienda el consumo de microalgas como la *Spirulina* contra la malnutrición aguda en situaciones de emergencia humanitaria, de malnutriciones de índole crónica, y para el desarrollo sostenible (Naciones Unidas, 2005).

Carbohidratos

Los carbohidratos en las microalgas pueden encontrarse en forma de almidón, glucosa, azúcares y otros polisacáridos. Su digestibilidad es alta, por lo que no existe ninguna limitación para el uso de microalgas secas y enteras en alimentación (Spolaore et al., 2006). La Tabla 4 muestra la composición de carbohidratos presentes en *S. platensis*.

Tabla 4: Carbohidratos presentes en *S. platensis*. Fuente: Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006; Sánchez et al., 2003; Cohen, 1997; Sasson, 1997.

Carbohidratos	[g/kg]
Glicerol	15
Glucosa	15
Ramnosa	34
Fucosa	6
Ribosa	16
Xilosa	9
Manosa	4
Galactosa	16
D-glucosamina	4

El uso de microalgas como fuente de materia prima para la producción de bioetanol requiere altos rendimientos de biomasa y carbohidratos. Con excepción de algunas especies de microalgas que tienen un alto contenido inicial de carbohidratos, la mayoría tienen un contenido relativamente bajo. En consecuencia, las microalgas no han sido fuente de atención para su utilización como sustrato en la producción de bioetanol (Markou et al., 2013). Sin embargo, la composición de la biomasa de las microalgas se puede manipular aplicando diversas condiciones de cultivo consideradas estresantes para ellas. La inanición de nutrientes o la alta intensidad de la luz, produce la acumulación de carbohidratos en su biomasa, los cuales pueden alcanzar un nivel significativamente alto (de hasta un 65%) (Markou et al., 2012a; Gonzales-Fernández y Ballesteros, 2012). En cultivos mixotróficos llevados a cabo en aguas residuales mezcladas con medio Zarrouk se obtuvieron altas productividades de hidratos de carbono (60 mg/l.d), lo que indicó que esas condiciones de cultivo resultaron apropiadas para la utilización de *S. platensis* como materia prima en la producción de bioetanol (Salla et al., 2016).

Lípidos

En condiciones de cultivo adecuadas, algunas especies de microalgas pueden acumular hasta 50-70% de aceites / lípidos por peso seco (Chisti, 2007), los cuales son adecuados para la síntesis de biodiesel. La principal atracción del uso de aceite de microalgas para biodiesel es la tremenda capacidad de producción de aceite de las microalgas, ya que podrían producir hasta 58.700 L de aceite por hectárea, que es una o dos magnitudes más altas que las de cualquier otro cultivo energético (Chen et al., 2011). No obstante, *S. platensis*, como es característico en las cianobacterias, presenta un bajo contenido de lípidos (Cohen, 1997), por lo que no resulta una especie de microalga atractiva para la producción de biodiesel.

S. platensis es una de las pocas fuentes dietéticas naturales de ácido gamma linolénico (GLA). Se trata de un ácido graso poliinsaturado esencial al que se le han atribuido propiedades medicinales, como tener la capacidad para reducir las lipoproteínas de baja densidad en pacientes con hipocolesterolemia, para aliviar los síntomas del síndrome premenstrual y para el tratamiento del eczema atópico (Tanticharoen et al., 1994). El contenido de ácidos grasos presentes en *S. platensis* se enuncia en la Tabla 5.

Tabla 5: Ácidos grasos presentes en *S. platensis*. Fuente: Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006; Sánchez et al., 2003; Cohen, 1997; Sasson, 1997.

Ácidos Grasos	[g/kg]
Ácido mirístico	0,1
Ácido palmítico	19
Ácido palmitoleico	0,5
Ácido γ -linolénico	10
Ácido linoleico	8
Ácido oleico	2

2.3.2 Producción de Pigmentos

El uso de los pigmentos de *Spirulina* sp. como colorante ya ha sido explorado por las industrias cosmética, farmacéutica y alimentaria. Se sabe que las microalgas producen pigmentos y compuestos bioactivos de los cuales tres son particularmente prometedores: clorofila, ficobilinas y carotenoides (Abalde et al., 1991). *S. platensis* presenta varios pigmentos de interés comercial, como se muestran en la Tabla 6, y dado que existe una tendencia mundial respecto de los colorantes que consiste en sustituir los productos artificiales por productos naturales, convierten a esta microalga en un medio para la obtención de productos de alto valor (Danesi et al., 2002).

Tabla 6: Pigmentos presentes en *S. platensis*. Fuente: Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006; Sánchez et al., 2003; Cohen, 1997; Sasson, 1997

Pigmentos	[mg/100 g]
Clorofila <i>a</i>	1000
Carotenoides	370
<i>β</i> -caroteno	56
Equinenona	44
<i>β</i> -criptoxantina	26
3'-hidroxiequinenona	33
Zeaxantina	93
Diatoxantina	19
Cantaxantina	19
Mixoxantofila	56
Oscillaxantina	15
Ficocianina	14000

Clorofila:

La clorofila, el pigmento presente en todas las células fotosintéticas, absorbe todas las longitudes de onda de la luz visible excepto el verde, el cual es reflejado y percibido por nuestros ojos. La clorofila es una molécula compleja, formada por cuatro anillos pirrólicos, un átomo de magnesio y una cadena de fitol larga, como se ve en la Figura 3.

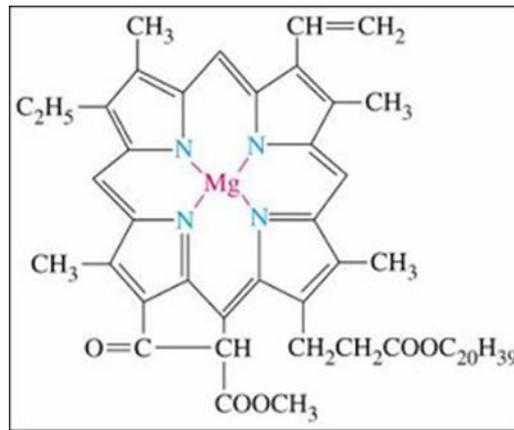


Figura 3: Estructura de la molécula de clorofila *a*.

En las plantas y otros organismos fotosintéticos existen diferentes tipos de clorofilas. La clorofila *a* se encuentra en todos los organismos fotosintéticos (plantas, ciertos protistas, proclorobacterias y cianobacterias).

S. platensis presenta solo clorofila *a* en su composición. Además, esta microalga presenta uno de los mayores contenidos de clorofila encontrados en la naturaleza, que corresponde al 1.15% de su biomasa. En base a estos hechos, la utilización de *S. platensis* para la producción de clorofila puede considerarse una alternativa interesante para su estudio (Danesi et al., 2004).

La clorofila *a* tiene numerosas aplicaciones en el campo biotecnológico, principalmente se la ha utilizado en productos de belleza, como complemento alimenticio y en bebidas funcionales, como se muestra en la Figura 4.



Figura 4: Productos comerciales a base de clorofila

Subramoniam et al. (2012), reportaron que la clorofila tiene efectos antiinflamatorios, mientras que Bishop y Zubeck (2012), afirman que también estimula la recuperación de la función hepática y aumenta la secreción de bilis. Las actividades antioxidantes de la clorofila y sus derivados, fueron demostradas por Lanfer-Marquez et al. (2005).

Carotenoides:

Los carotenoides son pigmentos que aportan los colores amarillo y rojo característicos de muchas frutas y hortalizas. Se encuentran en el interior de las células vegetales y actúan como antioxidantes naturales para nuestro organismo. Existen dos grupos: los carotenos y las xantofilas. Mientras que los primeros no albergan ningún átomo de oxígeno en su composición, las xantofilas sí lo hacen.

El betacaroteno desempeña un papel importantísimo en la nutrición humana, puesto que es el precursor de la vitamina A. Esta vitamina es esencial para el correcto funcionamiento de la visión, especialmente la visión nocturna, además para el fortalecimiento del sistema inmunológico y para la reparación de los tejidos del organismo (piel, mucosas, uñas, cabello, esmalte de dientes). Se han puesto de manifiesto las propiedades antioxidantes de estos pigmentos, así como su eficacia en la prevención de ciertas enfermedades del ser humano, como la aterosclerosis o incluso el cáncer. Todo ello ha hecho que, desde un punto de vista nutricional, el interés por estos pigmentos se haya incrementado notoriamente (Meléndez-Martínez et al., 2004). Los pigmentos carotenoides protegen la fotosíntesis bajo condiciones benignas y bajo una gran cantidad de estrés ambiental. Estos mismos pigmentos se han identificado como posibles agentes de protección en la función inmune de la visión humana, y en la prevención del cáncer y enfermedades cardíacas (Demmig-Adams y Adams, 2002).

Los carotenoides (Figura 5), son tetraterpenos constituidos por múltiples unidades isoprenoides, con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Son moléculas lipofílicas, con nula solubilidad en agua. La propiedad de absorber la luz se deriva de la presencia de siete o más enlaces dobles conjugados con posibilidad de absorber luz visible, con colores que van del amarillo al rojo.

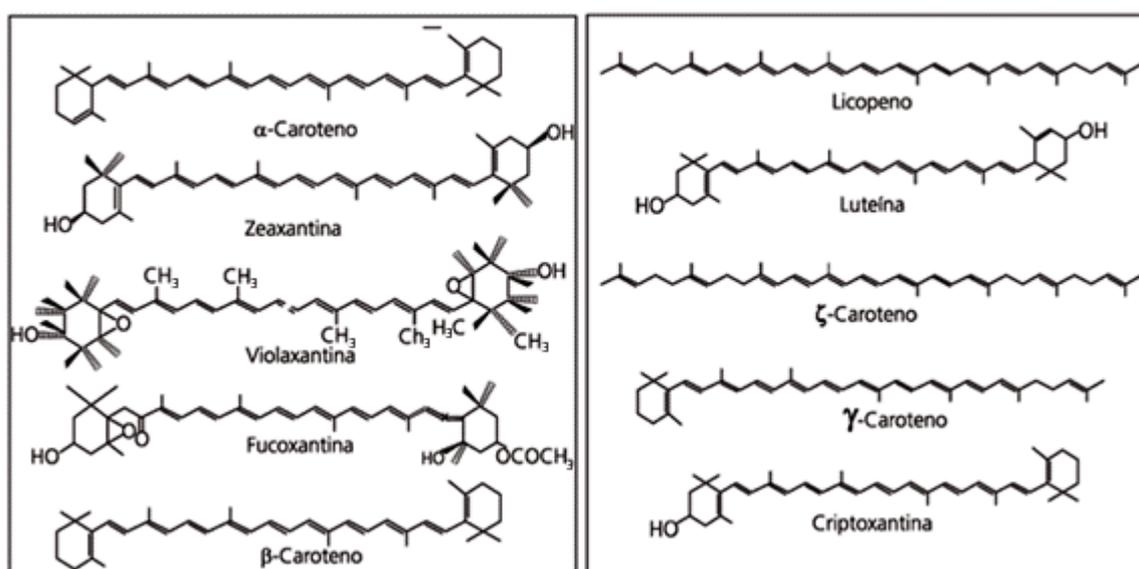


Figura 5: Estructuras químicas de los carotenoides

Para la fotosíntesis, tanto los carotenoides como las clorofilas se unen necesariamente a los péptidos para formar complejos de pigmento-proteína en la membrana del tilacoide. Frente a altas intensidades de luz funcionan como protectores y disipadores de energía para protegerse del daño celular.

Ficobiliproteínas:

Las ficobiliproteínas constituyen los pigmentos fotosintéticos más importantes en las cianobacterias; además de su función primaria en la fotosíntesis, pueden servir como reserva de nitrógeno celular (Allen y Smith, 1969; Boussiba y Richmond, 1980).

Según sus características espectrales, las ficobiliproteínas se dividen en tres grandes grupos: las ficoeritrinas (FE), que son de color rojo o naranja fluorescente, las ficocianinas (FC) que son azules, y las aloficocianinas (AFC) que son púrpuras; éstas dos últimas tienen fluorescencia roja. Las FE predominan en las algas rojas, y las FC en las cianobacterias o algas verde-azuladas (Betancourt, 1997).

Las ficobiliproteínas participan en el proceso de fotosíntesis en forma de agregados multiméricos captadores de luz, llamados ficobilisomas. El modelo consiste en un núcleo de aloficocianina presente como trímero. Este núcleo está rodeado por varias estructuras compuestas por hexámeros de subunidades de ficocianina y ficoeritrina. Finalmente, los ficobilisomas están conectados al fotosistema II a través de partículas situadas en el exterior de la membrana tilacoide dispersa en la célula (Figura 6) (Tomaselli, 1997).

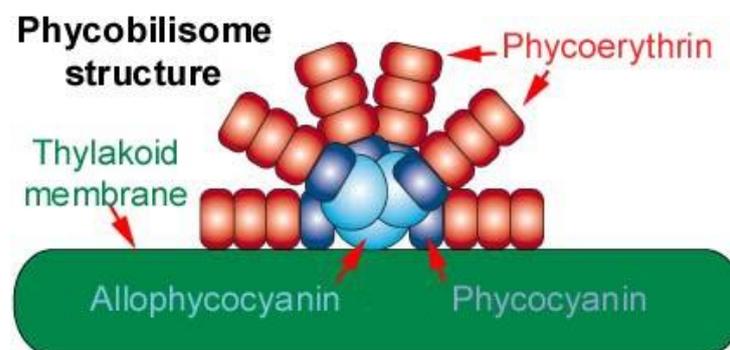


Figura 6: Esquema de un ficobilisoma.

Las ficobiliproteínas, por su alta eficiencia fluorescente y su solubilidad en agua, son usadas en la industria de alimentos como colorantes naturales. Otra aplicación que se les son atribuidas por sus propiedades son las de marcadores fluorescentes y reactivos químicos.

Las ficobiliproteínas de *Spirulina maxima* pueden utilizarse para proteger contra el daño hepático y el estrés oxidativo ocasionado por el Hg^{2+} . Debido a su propia estructura química de tetrapirroles lineales, pueden actuar como potentes nucleófilos neutralizando a las especies reactivas derivadas del oxígeno y nitrógeno evitando daño oxidativo. Además, las ficobiliproteínas tienen propiedades quelantes (Gallardo et al., 2010).

La C-ficocianina ha sido empleada en diferentes investigaciones biomédicas como biomarcador, por sus propiedades fluorescentes, y como posible agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, por sus propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Díaz-Domínguez et al., 2016).

2.4 Importancia de la luz en el cultivo de microalgas

El cultivo de microalgas para la obtención de biomasa o como método de producción de metabolitos de interés, depende de muchos factores, entre los que se encuentran el medio de cultivo, la luz, el pH, la temperatura, la agitación y el sistema de cultivo.

Para el cultivo de *S. platensis* y de microalgas en general, los sistemas de cultivo empleados se pueden dividir en dos tipos: abiertos y cerrados (Grobbelaar, 2000). Los primeros son los más abundantes y más antiguos, los segundos, más recientes, presentan la ventaja de reducir la contaminación por otros organismos no deseados (algas competidoras, parásitos, epífitos), o sustancias químicas que puedan resultar tóxicas para el alga en cuestión. El uso de reactores abiertos ha sido muy extenso y motivo de estudio en numerosas investigaciones.

Los fotobiorreactores cerrados permiten un mejor control de las condiciones de cultivo que los sistemas abiertos (Ugwu et al., 2008). Además, en estos reactores se obtienen mayores productividades y la contaminación se puede prevenir fácilmente. Los fotobiorreactores cerrados se usan para la producción de compuestos de alto valor, tales como ácidos grasos insaturados, pigmentos, vitaminas y polisacáridos (Vernerey et al., 2001).

Se podría aseverar que la luz es el factor más importante en el desarrollo de los organismos fotosintéticos, dado que representa la principal fuente de energía, cuando el crecimiento no se ve limitado por la fuente de nutrientes.

La energía de la luz puede ser proporcionada por el sol o mediante el empleo de lámparas. Esta elección es a menudo tema de debate. La explotación de la luz del sol como fuente de energía es ventajosa ya que es gratuita y abundante. Sin embargo, también presenta ciertas desventajas: ciclos diurnos / nocturnos, cambios en las condiciones climáticas y cambios estacionales. Además, todos estos factores son específicos de la ubicación geográfica del cultivo (Blanken et al., 2013).

En los cultivos a escala laboratorio, y en muchas ocasiones en los cultivos cerrados, suelen utilizarse sistemas de luz artificial como luces fluorescentes, lámparas incandescentes, halógenas y diodos emisores de luz (light emitting diodes, LED), en los cuales se pueden controlar y manipular las condiciones lumínicas a las que son sometidos los cultivos microalgales. Además, el sistema de iluminación puede formar parte del diseño del biorreactor con el fin de aumentar su eficiencia.

El crecimiento de las microalgas no solo puede verse modificado por la intensidad de la luz, sino que también depende de los ciclos de luz y oscuridad (fotoperíodos) a los que son sometidos los cultivos, y a la coloración de la luz incidente (longitud de onda). El efecto de estos factores sobre el crecimiento de las microalgas y la producción de compuestos de interés, dependen tanto de la especie microalgal como de la cepa en estudio.

2.4.1 Ciclos de luz y oscuridad (Fotoperíodos)

El fotoperíodo (tiempo de exposición a la luz y oscuridad), tiene efecto sobre los ciclos de vida y actividades metabólicas de las microalgas, tanto en cultivo artificiales como en la naturaleza (Humprey, 1979). En microalgas, se observaron ritmos circadianos en muchos procesos, como la fijación de nitrógeno, fotosíntesis y el ciclo de división celular (Mittag, 2001).

En condiciones naturales, la mayoría de las algas sufren períodos alternos entre luz y oscuridad, sin embargo, en la mayoría de los laboratorios de microalgas se mantiene constante la iluminación en los cultivos al interior, debido a que se favorece la división celular en ciertas microalgas como las diatomeas (Villa et al., 2014). Según Bouterfas et al. (2006), la relación entre el crecimiento de las microalgas y la duración del día ha sido un área de estudio descuidada. En general, se considera que las algas exhiben una tasa de crecimiento que es proporcional a la duración del período de luz efectivo. Además del contenido de los pigmentos, otros componentes celulares como ácidos grasos insaturados, carbohidratos y proteínas también pueden alterarse por el régimen de luz (Renaud et al., 1991).

Nhu (2017), quien realizó un estudio de los regímenes de luz sobre algunas cepas de microalgas, elaboró una clasificación de las mismas en dos grupos. Están aquellas que crecieron más eficientemente con luz continua (*B. braunii* y *S. obliquus*), y las que crecieron más eficientemente bajo un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (3 especies de *Neochloris*). Es necesario destacar, que estos dos grupos de microalgas difieren en el modo de reproducción.

Cultivos de microalgas bajo luz continua han sido estudiados, demostrándose que alcanzan la máxima tasa de crecimiento registrada (Bouterfas et al., 2006; Al-Qasmi et al., 2012). Sin embargo, los ciclos de luz y oscuridad son necesarios, ya que la fotosíntesis que se rige por dos reacciones: una fase fotoquímica que es dependiente de la luz, y otra, una fase oscura bioquímica que es independiente de la luz. Los compuestos que se producen en la fase dependiente de la luz se usan en la fase oscura para sintetizar moléculas metabólicas esenciales para el crecimiento.

Según Anderson (2005), los regímenes óptimos de luz / oscuridad deben variar entre 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad a 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad para la mayoría de las cepas de microalgas, ya

que por encima de esta cantidad de horas de exposición se produce saturación, lo que causa inhibición del crecimiento.

George et al. (2014), reportaron en un estudio realizado con *Ankistrodesmus falcatus*, que el ciclo de luz y oscuridad es un importante regulador del contenido celular de clorofila en las microalgas. El contenido de clorofila se incrementó en cultivos bajo condiciones de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad o 18 horas de luz / 6 horas de oscuridad, en comparación con los cultivos bajo luz continua y con ciclos de 6 horas de luz / 18 horas de oscuridad.

En cultivos de *Nannochloropsis salina* (Sforza et al., 2012), si los ciclos de luz y oscuridad no son óptimos las microalgas sufren daños por radiación y la productividad fotosintética se reduce en gran medida. Los resultados demostraron que es posible utilizar eficientemente incluso la luz muy intensa, siempre que ocurran ciclos oscuros que permitan la reoxidación de los transportadores de electrones del aparato fotosintético.

Rodríguez y Triana (2006), encontraron que *Spirulina* sp. no es capaz de soportar una exposición prolongada a la luz, ya que podría ser destruida por fotólisis, recomendando la necesidad de mantener la iluminación controlada por fotoperíodos de 12/12 horas (día/noche). Aunque Habib et al. (2008), han reportado que en *S. platensis* el fotoperíodo óptimo es de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad, basado en la evaluación de la densidad óptica y el contenido de clorofila.

Es importante determinar para cada cepa en particular los requerimientos respecto de los ciclos de luz y oscuridad, con el fin de, no solo maximizar la biomasa, sino también la producción de metabolitos de interés. Si estos períodos de luz y oscuridad no resultan adecuados no es posible permitir el equilibrio que se establece entre los fenómenos anabólicos y catabólicos. Por otro lado, y no menos importante, es considerar la relación entre el costo de energía asociado al uso de luz artificial respecto de la producción de biomasa y de productos de interés.

2.4.2 Intensidad de la Luz

Es sabido que los factores físicos tales como la intensidad de la luz, tienen influencia sobre el crecimiento de los microorganismos fotosintéticos. En ausencia de otros factores limitantes, la concentración celular se incrementa con la intensidad lumínica hasta alcanzar la máxima concentración de biomasa, la cual es denominada “nivel de saturación”. Intensidades de luz por encima del nivel de saturación provocan daño a nivel del sistema fotosintético debido a un fenómeno llamado “fotooxidación” o “fotoinhibición”. La fotoinhibición es la reducción de las actividades fotosintéticas causada por la exposición de las microalgas a altas densidades de flujo de fotones utilizados para la fotosíntesis (*photosynthetic photon flux density* o PPFd). Cuando el flujo de fotones absorbido es demasiado elevado, la concentración de electrones de alta energía en las células es excesiva, y estos no pueden ser incorporados al ciclo de Calvin. Estos electrones

son capaces de dañar la estructura de las células reaccionando y formando H_2O_2 (Soletto et al., 2008; Pedroza-Bezerra et al., 2012).

La descripción clásica de la actividad fotosintética se basa en mediciones de la evolución del oxígeno en proporción a la intensidad de la luz, lo que determina la curva de dependencia fotosintética en función de la irradiancia (Figura 7). A bajos niveles de intensidad luminosa la rapidez de la fotosíntesis aumenta con la intensidad de luz, pero niveles de energía incidente superiores a un cierto valor (I_k) inducen sólo pequeños cambios en la tasa de fotosíntesis. La constante específica I_k , característica para cada organismo, indica el nivel de energía luminosa al que comienza a saturarse el fotosistema de un organismo. La energía incidente puede llegar a niveles que causan inhibición de los fotosistemas celulares, lo cual puede deteriorar el cultivo y causar incluso un daño irreversible. Por otro lado, la eficiencia con la que la luz incidente es utilizada, es decir la fracción de energía luminosa incidente convertida a energía química, disminuye rápidamente al aumentar el flujo de fotones y tiende a valores mínimos cuando la energía incidente alcanza niveles superiores a I_k (por ejemplo, al mediodía en cultivos expuestos a la luz solar) (Flores et al., 2003; Richmond, 2008).

Existen reportes de tolerancias de flujo de fotones en cultivos de *S. platensis* hasta 5000 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (417 klux) (Gordon y Polle, 2007). Kebede y Ahlgren (1996), han utilizado intensidades de luz entre 1.67 a 41.7 klux, logrando condiciones óptimas a 27.5 klux en *S. platensis*. Se ha reportado que el crecimiento de *S. máxima* fue inhibido a intensidades de luz superiores a 300-360 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, mientras que para *S. platensis* fue de 150-200 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Un valor de irradiancia óptima se ha encontrado en el rango de 140-230 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en cultivos de *S. platensis* (Soletto et al., 2008).

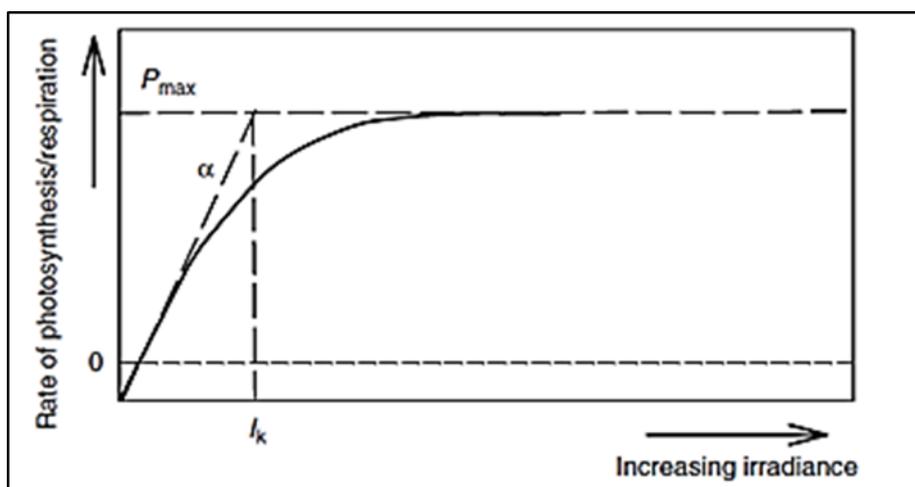


Figura 7: Efecto de la irradiancia en la tasa fotosintética. Fuente: Richmond, 2008

Olaizola y Duerr (1990), han informado de una posible capacidad de las células de *S. platensis* para regular su eficiencia fotosintética variando el contenido de pigmentos. Las algas que viven en hábitats bajo alta irradiación solar tienen pigmentos accesorios que las protegen del daño por radiación y también de la oxidación, debido a los dobles enlaces conjugados presentes en los cromóforos (Walter et al., 2011). Khoeyi et al. (2012), encontraron que el contenido de clorofila era menor a alta irradiación, mientras que el β -caroteno mostró una tendencia inversa.

A intensidades bajas el crecimiento está limitado por la falta de luz. En este punto la eficiencia en el aprovechamiento de la luz es muy alta, toda la luz incidente se aprovecha en la fotosíntesis. Las microalgas que se desarrollan a bajos niveles de intensidad lumínica presentan una cantidad mayor de pigmentos fotosintéticos por lo que son más eficientes en el aprovechamiento de la luz (Xue, et al., 2011).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que los requisitos de luz varían en función de la profundidad y la densidad del cultivo. Si las microalgas se cultivan a mayor profundidad y concentración celular, la intensidad de la luz debe aumentarse para penetrar a través del cultivo (Wahidin et al., 2013).

Dado que diferentes especies de microalgas requieren distintas intensidades de luz, dependiendo de los principales pigmentos presentes en ellas, resulta relevante estudiar las condiciones de intensidad de luz necesarias para su cultivo. Asimismo, la intensidad de la luz dependerá en gran medida de la finalidad del cultivo microalgal. Por ejemplo, cuando la finalidad del cultivo microalgal es la producción de pigmentos, puede ser necesario exponer a los cultivos a bajas intensidades de luz, sin comprometer la generación de biomasa.

2.4.3 Longitud de Onda

Se llama espectro visible a la región del espectro electromagnético que el ojo humano es capaz de percibir. A la radiación electromagnética en este rango de longitudes de onda se le llama luz visible o simplemente luz. No hay límites exactos en el espectro visible: el ojo humano típico responderá a longitudes de onda de 390 a 750 nm, aunque algunas personas pueden ser capaces de percibir longitudes de onda desde 380 hasta 780 nm. Los microorganismos fotosintéticos no utilizan todo el espectro solar, sino solo una fracción, en particular de 400 a 700 nm (radiación fotosintética activa, PAR). Además, el aparato fotosintético no puede utilizar todas las longitudes de onda del espectro PAR, sino solo aquellas que son absorbidas por los pigmentos fotosintéticos. Por lo tanto, la iluminación artificial, para ser energéticamente eficiente, tiene que emitir no solo dentro de la región PAR sino también en longitudes de onda específica que son absorbidas por los pigmentos (Markou, 2014).

Las microalgas, como se mencionó anteriormente, poseen distintos tipos de pigmentos, los cuales presentan picos de absorción como se muestra en la Figura 8 y en la Tabla 7. El conjunto de estos pigmentos permiten a las microalgas absorber la luz en un amplio rango de longitudes de onda.

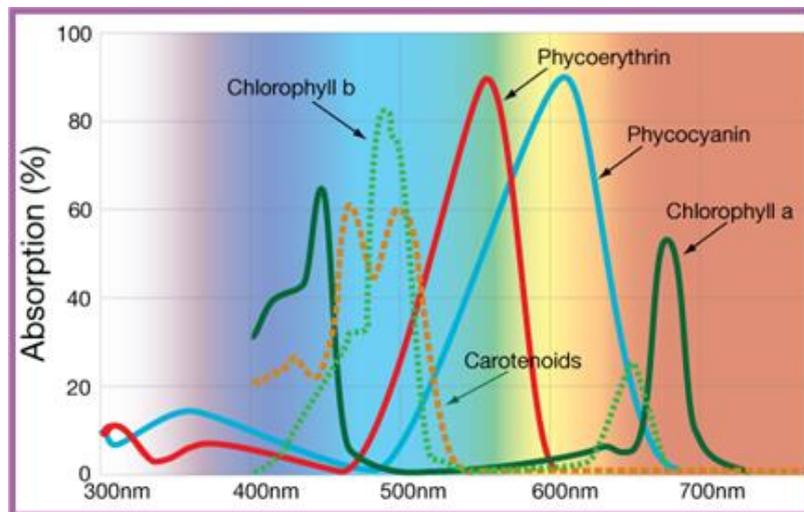


Figura 8: Picos de absorción de los diferentes pigmentos presentes en las microalgas

Tabla 7: Principales pigmentos presentes en *S. platensis* y sus correspondientes picos de absorción. Fuente: Markou (2014).

Pigmentos	Pico de Absorción (nm)
Ficocianina	620 nm
Clorofila <i>a</i>	435 y 676 nm
Carotenoides	500 nm

Cuando el cultivo es sometido a diferentes longitudes de onda ocurre un proceso de aclimatación cromática que permite que las células de las cianobacterias modifiquen sus características de absorción de la luz para regular la fotosíntesis de acuerdo con la disponibilidad de luz en diferentes ambientes. Como consecuencia de este fenómeno, el pigmento que absorbe las longitudes de onda de luz incidente se vuelve más predominante (Bennett y Bogorad, 1973; Wang, et al, 2007; Walter et al., 2011).

En las cianobacterias se produce la regulación de la síntesis de ficobiliproteínas por la calidad espectral de la luz, lo que se denomina adaptación cromática complementaria (Tandeau de Marsac y Houmard, 1988), en donde se produce un cambio en la producción de pigmentos en función de la longitud de onda a la que son sometidos los cultivos. Principalmente se ven modificados la cantidad relativa de los pigmentos rojos (ficoeritrina) y los azules (ficocianina), predominando la ficoeritrina en las células cultivadas con luz verde y la ficocianina en los cultivos expuestos a la luz roja. Al constituir estas ficobiliproteínas los principales pigmentos captadores de la luz en el proceso fotosintético, el control cromático permite a las células captar la energía luminosa disponible con máxima eficiencia (Tandeau de Marsac, 1983).

Wang et al. (2007), estudiaron la influencia de las longitudes de onda de la luz y la intensidad de varios diodos emisores de luz (LED) en *S. platensis*, y encontraron una alta tasa de crecimiento específico para la luz roja y que la menor eficiencia en la conversión de fotones fue bajo luz azul. Lan et al. (2013), estudiaron el efecto de la luz azul y roja bajo diferentes intensidades lumínicas, hallando un incremento de la clorofila en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* bajo la influencia de la luz roja.

Diferentes especies de microalgas requieren distintos espectros de luz, dependiendo de los principales pigmentos presentes en ella, lo que asociado a la intensidad lumínica constituyen parámetros importantes para el crecimiento y metabolismo (Vásquez-Villalobos et al., 2017).

Por lo tanto, las cianobacterias optimizarán la recolección de la luz al modular su composición de pigmentos (Bennet y Bogorad, 1973; Grossman et al., 2001, Tandeau De Marsac, 2003), lo que permitiría utilizar distintas longitudes de onda de luz como estrategia para favorecer la producción de pigmentos de interés comercial.

3 Objetivos

En base a todo lo expuesto anteriormente, es necesario tener en cuenta que en el cultivo autotrófico de microalgas la luz es la principal fuente de energía para el crecimiento celular. Las propiedades de la fuente de luz, como la longitud de onda y la intensidad, y el tiempo de exposición a la misma como los ciclos de luz y oscuridad (fotoperíodo), son críticas para el crecimiento y la producción de los metabolitos de interés.

El objetivo general del presente trabajo de tesis es analizar la influencia de la luz en la producción de biomasa y la composición bioquímica de la microalga *Spirulina platensis* LMPA55, con especial énfasis en la obtención de pigmentos los cuales tienen particular interés biotecnológico.

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la influencia de los ciclos de luz y oscuridad (fotoperíodo) sobre la obtención de la biomasa y la composición bioquímica de la microalga *S. platensis* LMPA55.
- Estudiar los efectos de la intensidad de la luz en la obtención de la biomasa y la composición bioquímica de *S. platensis* LMPA55.
- Evaluar la influencia de la coloración de la luz (longitud de onda) en la producción de la biomasa microalgal de *S. platensis* LMPA55 y su composición bioquímica.

4 Metodología

Para alcanzar los objetivos propuestos fue necesario la realización de varias actividades: por un lado fue fundamental preservar la viabilidad de la cepa microalgal durante todo el desarrollo de la tesis; además, para la determinación de los distintos parámetros se debió contar con las técnicas analíticas adecuadas. Una vez realizadas dichas actividades se realizaron los ensayos para determinar la influencia del fotoperíodo, intensidad de luz y longitud de onda sobre los cultivos de *S. platensis*. A continuación se describirán cada una de las actividades.

4.1 Cepa y mantenimiento de la misma

En esta investigación se utilizó la cepa *Spirulina (Arthrospira) platensis* LMPA55, la cual fue adquirida del cepario del Laboratorio de Microalgas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, sede Trelew (Chubut, Argentina). Dicho cepario se encuentra adherido (por Resolución MinCyT Nº 008/11) al Sistema Nacional de Datos Biológicos (creado por Resolución MinCyT Nº 245/09), que funciona bajo la órbita de la Subsecretaría de Coordinación Institucional dependiente de la Secretaría de Articulación Científica Tecnológica del Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (Listado de centros adheridos, 2012).

La cepa fue mantenida en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires, en incubadora frío-calor (Ingelab, modelo I-291P) a una temperatura de 26 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, a una intensidad lumínica de 2800 lux ($34 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), aportada por dos lámparas fluorescentes compactas de 4100 K de tonalidad (OSRAM, DULUX L 36w/21-840) en Erlenmeyers de 250 ml.

Para el mantenimiento de la cepa se utilizó como metodología la transferencia seriada. Con esta metodología se produce crecimiento progresivo de la microalga sin detención del metabolismo. El procedimiento consiste en el pasaje seriado quincenal de un volumen de 1 ml de suspensión de *S. platensis* en 50 ml de medio de cultivo fresco, en Erlenmeyer de 250 ml. La transferencia seriada se realiza en un flujo laminar (Microfilter, modelo FHP1e), previamente sanitizado (limpieza de la superficie con una solución de etanol 70° y exposición de la superficie a luz UV durante 20 minutos). Tanto los Erlenmeyers como los instrumentos utilizados fueron previamente esterilizados en autoclave (Autoclave tipo Chamberland, VZ, modelo 100) a 121°C, 20 min y 1 atm manométrica con el fin de evitar contaminaciones en el cultivo. Los pasajes seriados se realizaron por duplicado.

El medio de cultivo utilizado tanto para el mantenimiento como para la realización de los ensayos corresponde a la formulación de Zarrouk (Zarrouk, 1966). La composición del medio de cultivo se detalla en la Tabla 8. Se prepararon las soluciones A y B por separado, utilizando agua destilada. Las mismas fueron

esterilizadas en autoclave y mezcladas en partes iguales al momento de su utilización, el pH resultante es de 8.5. Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico.

Tabla 8: Composición del medio de cultivo Zarrouk

Solución A	
Compuesto	Concentración (g/l)
NaHCO ₃	16,80
K ₂ HPO ₄	0,5
Solución B	
Compuesto	Concentración (g/l)
K ₂ SO ₄	1
NaCl	1
NaNO ₃	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04
FeSO ₄ .7H ₂ O*	0,01
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O*	0,08
H ₃ BO ₃	2,85x10 ⁻³
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81x10 ⁻³
ZnSO ₄	1,25x10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,08x10 ⁻⁵
CuSO ₄ .5H ₂ O	7,90x10 ⁻⁵

*Se prepara una solución de FeSO₄.7H₂Oy Na₂-EDTA.2H₂O

4.2 Determinación de Biomasa – Curva de densidad óptica versus peso seco

Para poder calcular los diferentes parámetros del proceso que tienen relación con la biomasa, es necesario disponer de una metodología que permita cuantificar la misma.

A grandes rasgos, los métodos de estimación de biomasa pueden ser clasificados en métodos directos o indirectos. En los últimos, el crecimiento celular es referido y calculado en base al dosaje de algún componente celular (Ej.: NADH, ATP, proteínas, ADN, etc).

Dentro de los métodos directos la densidad óptica (D.O.) y la determinación gravimétrica o peso seco (PS) son métodos ampliamente usados para la determinación de la biomasa. La posibilidad de relacionar estas dos determinaciones en una curva de calibración resulta de utilidad al momento de obtener un valor de biomasa más exacto. Además, presenta la ventaja de la rapidez con la que se obtiene el resultado, el empleo de una pequeña cantidad de muestra y su uso extendido para *Spirulina* y microalgas en general.

A partir de un barrido espectral de una suspensión de *S. platensis* (Figura 9), y teniendo en cuenta lo recomendado por Griffiths et al. (2011), en cuanto a evitar la influencia de los pigmentos en la medición, se consideró que la mejor longitud de onda para realizar la medición de la DO era 560 nm.

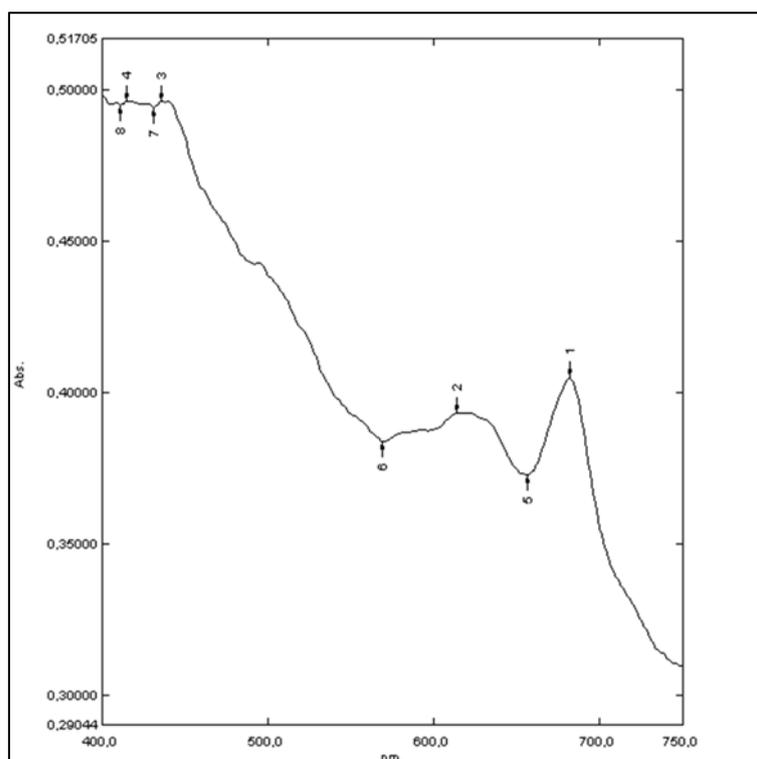


Figura 9 : Barrido espectral de una suspensión de *S. platensis*

Se determinó la correlación que existe entre la densidad óptica (DO) medida a 560 nm y el peso seco de la biomasa de *S. platensis*, y se desarrolló un procedimiento para que las mediciones sean fiables y reproducibles.

El procedimiento para elaborar la curva de calibración se describe a continuación:

A un cultivo de microalgas se le midió la densidad óptica a 560 nm en espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, modelo UV-1700), y teniendo en cuenta el valor de D.O. obtenido se realizaron diluciones del cultivo con solución fisiológica con el objeto de obtener valores de absorbancia aproximados a 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.2. A dichas diluciones se le midió posteriormente la D.O. real obtenida y se filtraron 100 ml, por triplicado, para cada dilución. Las filtraciones se realizaron utilizando un embudo Buchner, una bomba de vacío (bomba de vacío Arcano, modelo XZ-1B) y papeles de filtro (Quanty, modelo JP41), con una medida de poro de 28 μm . Los papeles de filtros fueron previamente secados 96 horas en estufa (ORL) a 90 °C hasta peso constante y se determinó su peso inicial (P_i) mediante balanza analítica (Shimadzu, modelo AUX120). Luego de la filtración de la soluciones con suspensión de biomasa, las muestras fueron lavadas con 75 ml de agua destilada y los papeles de filtro con la biomasa fueron colocados en estufa a 90 °C hasta alcanzar peso constante (P_f). La cantidad de biomasa, expresada como peso seco, se determinó según la Ecuación 2.

$$\text{Biomasa (g PS/l)} = \frac{P_f - P_i}{\text{volumen de suspensión filtrada}}$$

Ecuación 2

Posteriormente, se correlacionaron los valores obtenidos de biomasa con las determinaciones de D.O. reales con el fin de hallar la regresión lineal correspondiente.

4.3 Determinación de parámetros de crecimiento

La evolución del cultivo en el tiempo, sigue una curva característica la cual recibe el nombre de “curva de crecimiento”. Los sucesos que tienen lugar durante la misma pueden separarse en cinco fases, como se muestra en la Figura 10 El estudio de las curvas de crecimiento permite evaluar cómo afectan las distintas condiciones de cultivo a la cinética de crecimiento.

Al analizar un cultivo es importante la estimación de parámetros de interés como la velocidad específica de crecimiento (μ), el tiempo de duplicación (T_d) y el índice de crecimiento (IC).

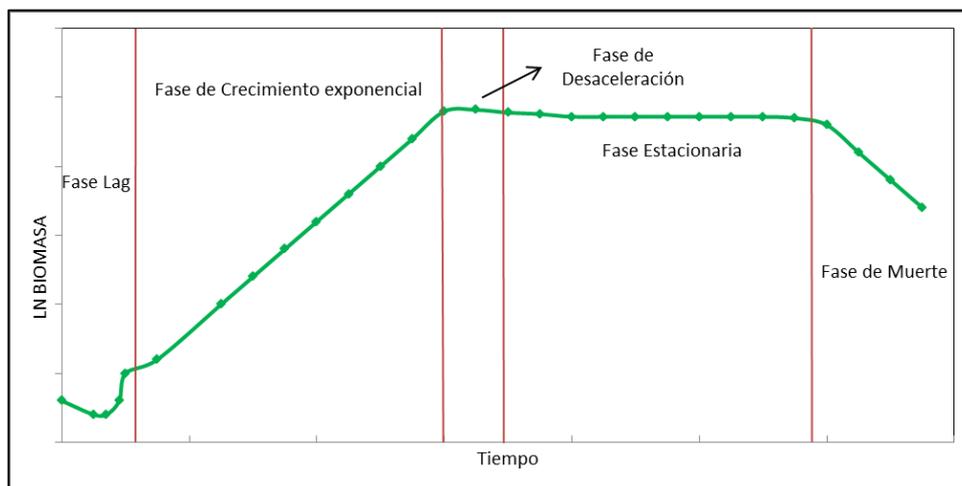


Figura 10: Curva de crecimiento característica de microorganismos, expresada en función del Ln Biomasa vs. Tiempo

Velocidad específica de crecimiento (μ): en cada ensayo se tomaron muestras periódicas cada 1 o 2 días, se determinó su densidad óptica, y se determinó la biomasa utilizando la curva de calibración. Los datos del crecimiento celular fueron graficados en la forma de logaritmo natural vs tiempo. Esto permitió la obtención de una línea recta sobre la fase de crecimiento exponencial de las microalgas (Figura 10). El valor de la pendiente de esta parte lineal de la curva corresponde al valor de μ , cuyas unidades están definidas como 1/unidad de tiempo. La linealidad fue confirmada mediante el cálculo de coeficiente de determinación R^2 para los puntos seleccionados.

Tiempo de duplicación (T_d): otro parámetro importante a conocer en un proceso en batch es el tiempo de duplicación de la biomasa, que se define como el tiempo que tarda una población celular en duplicar su número durante el crecimiento exponencial. El mismo fue calculado a partir de la Ecuación 3.

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Ecuación 3

Índice de crecimiento (IC): expresa la cantidad de veces que la biomasa inicial (inóculo) se ha duplicado a lo largo de un período de cultivo. El índice de crecimiento fue calculado utilizando la Ecuación 4:

$$IC = \frac{\text{Concentracion de biomasa final} - \text{Concentracion de biomasa inicial}}{\text{Concentracion de biomasa inicial}}$$

Ecuación 4

4.4 Determinación de la composición bioquímica

4.4.1 Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó según el método de Lowry (Lowry et al., 1951). El mismo está basado en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{++} y los nitrógenos de los enlaces peptídicos. Para resaltar el color formado en esta reacción y aumentar la sensibilidad, se hace reaccionar posteriormente con el reactivo de Folin, que al ser reducido por los residuos de aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano genera un color azulado (Figura 11). La intensidad del color dependerá de la cantidad presente en las proteínas de estos aminoácidos aromáticos y será proporcional a la concentración de proteínas en la disolución.



Figura 11: Coloración típica de la curva de calibración de proteínas, según el método de Lowry

El reactivo de Lowry está compuesto por tres soluciones que son mezcladas en el momento de su utilización:

- A: Carbonato sódico al 2 % en NaOH 0,1 M.
- B: Sulfato cúprico al 1 %
- C: Tartrato sódico-potásico al 2 %

En el momento de uso se mezclan 50 ml de la solución A con 0,5 ml de B y 0,5 ml de C.

Para poder realizar la determinación, es necesario en primera instancia preparar un pellet de biomasa de cada uno de los cultivos.

Preparación del Pellet: Se tomaron 3 ml de cada cultivo y se centrifugaron durante 5 min a 15000 rpm (microcentrífuga Dragon Lab, modelo D2012). Al “pellet” obtenido luego de retirar el sobrenadante se le agregó agua destilada a fin de lavar la biomasa y se lo volvió a centrifugar 5 min a 15000 rpm. Se descartó el sobrenadante, dando como resultado un pellet de microalgas.

Preparación de las muestras: Al pellet de microalgas se lo llevó a un volumen final de 2 ml con una solución de NaOH 1M, y se lo colocó durante 60 min a una temperatura de 95 a 100°C en baño termostático (Viking, modelo Masson), donde se produjo la lisis celular. Luego se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 15000 rpm. El sobrenadante obtenido se lo considera “extracto” para la determinación de proteínas.

De acuerdo al método antes mencionado, se transfirió, un volumen de 0.3 ml del extracto a un tubo de ensayo, al cual se le adicionó 0.7 ml de agua destilada. Se agitó enérgicamente mediante vortex (Velp Scientifica, modelo CLASSIC Vortex) y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se les agregaron 0.5 ml de una mezcla 50:50 v/v de reactivo de Folin Ciocalteau con agua destilada. Se dejó reposar durante 30 minutos y se midió la absorbancia en espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1700) a una longitud de onda de 750 nm, utilizando como blanco agua destilada.

La concentración de proteínas de una disolución problema puede calcularse interpolando el valor obtenido de absorbancia en una recta de calibrado trazada con valores conocidos de concentración de una proteína y sus respectivas absorbancias (curva de calibración).

Preparación de la curva de calibración: Para la cuantificación de las proteínas, se utilizó como estándar una solución de seroalbúmina bovina (BSA) de 1 mg/ml, a partir del cual se realizó la curva de calibración, como se indica en la Tabla 9. Los valores de absorbancia medidos se correlacionaron mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados, y los valores de proteínas en las muestras fueron calculados por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de proteínas totales se expresó en porcentaje con relación a la masa seca y en concentración por litro de cultivo (mg/l), y correspondió al promedio de todas las réplicas.

Tabla 9: Preparación de la curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de Lowry.

Curva de calibración- Determinación de Proteínas							
Tubo	Blanco	T1	T2	T3	T4	T5	T6
BSA (ml)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8
Agua (ml)	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.4	0.2
Reactivo de Lowry (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Agitar , dejar reposar 15 minutos							
Reactivo de Folin (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Agitar, dejar reposar 30 minutos, medir absorbancia a 750 nm.							

4.4.2 Determinación de carbohidratos

La determinación de carbohidratos se realizó según el método del fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956), donde azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, incluidos los éteres metílicos con grupos reductores libres o potencialmente libres, generan un color naranja-amarronado (Figura 12) cuando se tratan con fenol y ácido sulfúrico concentrado.

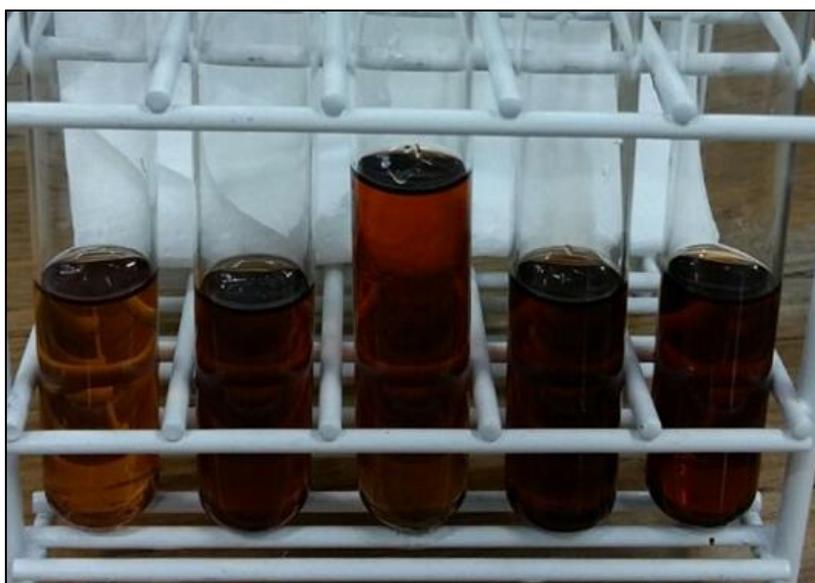


Figura 12: Coloración marrón obtenida en la cuantificación de carbohidratos por el método de Dubois.

Preparación del pellet: Se tomaron 3 ml de cada cultivo y se preparó el pellet de la misma manera que en el método de Lowry enunciado anteriormente.

Preparación de las muestras: El “pellet” de microalgas se llevó a un volumen de 2 ml utilizando NaOH 1 M y se agitó enérgicamente en vortex (Velp Científica, modelo CLASSIC Vortex) durante 1 minuto. Las muestras se centrifugan durante 15 minutos a 15000 rpm (microcentrífuga Dragon Lab, modelo D2012). El sobrenadante obtenido se lo considera “extracto”. Se tomó 1 ml de dicho extracto y se lo pasó a un tubo de ensayo donde se le adicionó 1 ml de fenol al 80 % p/p. Se agitó enérgicamente y se le agregó 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, de manera tal que el ácido impacte sobre la superficie del líquido. Se agitó nuevamente y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente otros 10

minutos a 25 °C. Se empleó un espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1700) de doble haz, usando agua destilada como referencia y se determinó el valor de absorbancia a una longitud de 490 nm.

Preparación de la curva de calibración: para la elaboración de la curva de calibración se utilizó una solución estándar de glucosa (1 mg/ml) preparada en NaOH 1M. La curva de calibración se armó según lo indicado en la Tabla 10.

Tabla 10: Preparación de la curva de calibración para la determinación de carbohidratos por el método de Dubois.

Curva de calibración- Determinación de Carbohidratos							
Tubo	Blanco	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Glucosa (ml)	0.0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
NaOH 1M (ml)	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
Agitar en vortex							
Fenol 80 % p/p (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Agitar en vortex, agregar ácido sulfúrico de manera que impacte sobre la superficie del líquido							
Ac. Sulfúrico (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Agitar, dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente, y luego 10 minutos en estufa a 25 °C. Determinar la absorbancia de cada punto a una longitud de onda de 490 nm							

Los valores de absorbancia de la glucosa estándar se utilizaron para la elaboración de la curva de calibración mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados, y los valores de carbohidratos (mg/ml) en las muestras problemas fueron calculados por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de carbohidratos totales se expresó en porcentaje, con relación a la masa seca y correspondió al promedio de todas las réplicas.

4.4.3 Determinación de lípidos

Los lípidos totales fueron cuantificados con el método de la sulfo-fosfo-vainillina (Mishra et al., 2014) en forma directa sobre la suspensión microalgal. Los lípidos insaturados reaccionan con el ácido sulfúrico en caliente con formación de iones carbonio. En una segunda etapa, éstos, en presencia de sulfo-fosfo-vainillina generan una coloración rosada (Figura 13). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de lípidos totales presente en la muestra ensayada.



Figura 13: Coloración de la curva de calibración para la determinación de lípidos.

La ventaja de este método es que permite la cuantificación de lípidos directamente sobre una suspensión de microalgas.

Preparación de la solución de sulfo-fosfo-vainillina (SFV): la preparación de la solución debe realizarse al momento de hacer el ensayo:

- Disolver 0.075 g de vainillina en 1.25 ml de etanol absoluto
- Añadir 1.125 ml de agua destilada y agitar.
- Añadir 50 ml de ácido fosfórico concentrado.

Preparación de las muestras: a 1 ml de suspensión de microalgas se lo centrifugó durante 15 minutos a 15000 rpm (microcentrífuga Dragon Lab, modelo D2012), se retiraron 0.85 ml del sobrenadante y los 0.15 ml restantes se pasaron a un tubo de ensayo donde se le adicionó 2 ml de H_2SO_4 al 98 %. Los tubos se calentaron durante 10 min a 100 °C en baño termostático (Viking, modelo Masson), y se enfriaron durante 5 min en baño de hielo. Luego se les adicionaron 5 ml de la solución de sulfo-fosfo-vainillina. Se incubaron durante 15 minutos a 37 °C en estufa (ORL) y luego se midió la absorbancia a 530 nm con cubeta de 10 mm de paso óptico. Se empleó un espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1700) de doble haz, usando agua destilada como referencia.

Preparación de la curva de calibración: para la elaboración de la curva de calibración se utilizó aceite de canola virgen comercial (marca krol). Se pesaron 20 mg de aceite en 50 ml de cloroformo. Se dejó evaporar el solvente bajo campana y se procedió a preparar la curva de calibración como se indica en la Tabla 11.

Tabla 11: Preparación de la curva de calibración para la determinación de lípidos.

Curva de calibración- Determinación de Lípidos							
Tubo	Blanco	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Solución patrón (ml)	0.0	0.05	0.10	0.20	0.40	0.80	1.00
Evaporar el disolvente bajo campana y luego añadir 0.15 ml agua.							
H ₂ SO ₄ , 98 % (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Los tubos se calentaron durante 10 min a 100 °C, y luego se enfriaron durante 5 min en baño de hielo.							
SFV (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Las muestras se incubaron durante 15 min a 37 °C. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm.							

Con los valores de absorbancia medidos se realizó la curva de calibración en función de la cantidad de aceite (μg) mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados, y los valores de lípidos (mg) en las muestras problemas fueron calculados por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de lípidos es referido al volumen de extracto utilizado y a la cantidad de biomasa (g PS) presente en dicho extracto. Se expresó el contenido de lípidos en porcentaje, con relación a la masa seca y correspondió al promedio de todas las réplicas.

4.5 Determinación de Pigmentos

Los métodos para la cuantificación de pigmentos presentan tres pasos. En el primero se realiza la extracción de los pigmentos con solventes adecuados, a la vez que se promueve la ruptura celular. En el segundo paso se clarifica el extracto, separando los productos de la lisis celular que podrían interferir en la medición. El último paso consiste en un barrido espectral del extracto. A partir de los valores de absorbancia a determinadas longitudes de onda, se calcula la concentración de pigmentos mediante el empleo de correlaciones empíricas.

4.5.1 Determinación de Ficocianina

La determinación de ficocianina, se realizó según el método de Tandeau De Marsac y Hourmad (1988). A partir de un pellet de microalgas, el cual fue preparado de la misma manera a lo enunciado para la determinación de proteínas, se le adicionó 3 ml de solución buffer acetato¹ 10 mM a pH = 5.5. Con el fin de romper las paredes celulares se sometieron las muestras a un proceso de sonicado (sonicador Qsonica, modelo Q55) durante 3 minutos en baño de hielo a una potencia de 30 Hz. Luego se les adicionó 1 ml de una solución de sulfato de estreptomicina (1 % m/v) y se dejaron durante 30 minutos a 4 °C. Luego las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm a 4 °C (Heal Force, modelo Neofuge 18R). Se tomó el sobrenadante de color azulado (Figura 14), y se le midió la absorbancia a 620 y 650 nm de longitud de onda, utilizando como blanco la solución buffer acetato. En la Figura 15 se observa el barrido

¹Preparación de la solución buffer: Para preparar medio Litro: 0,3606 g Acetato de Sodio Anhidro, 0,6 ml de Ácido Acético 1 M (5,7 ml de ácido acético glacial / 100 ml). Luego se lo llevo a pH 5.5.

espectral del extracto obtenido para la determinación de ficocianina, donde se puede apreciar el pico característico de este pigmento a una longitud de onda de 620 nm.



Figura 14: Extracto clarificado para la cuantificación de ficocianina según el método de Tandeau De Marsac y Hourmad.

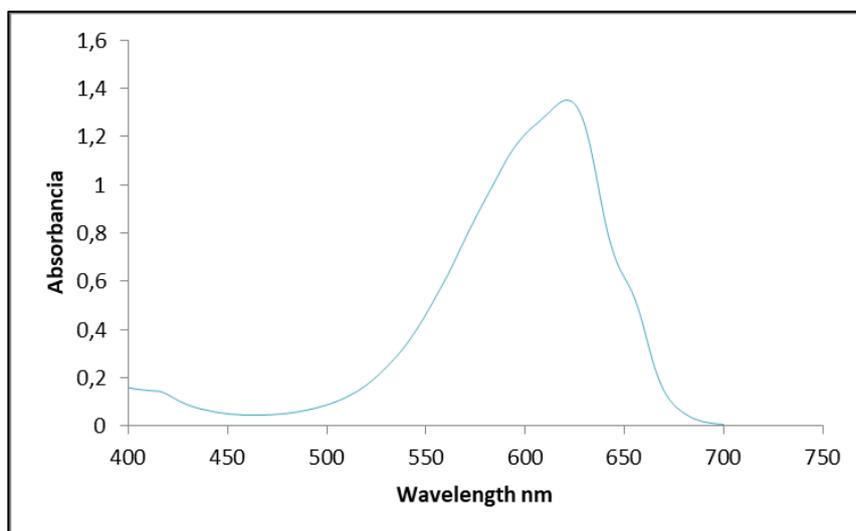


Figura 15: Barrido espectral del extracto de ficocianina, con el pico característico a 620nm.

El contenido de ficocianina se calculó según la Ecuación 5 de Bennett and Bogorad (1973), y los coeficientes de extinción de Bryant et al. (1979).

$$PC (mg/ml) = \frac{Abs_{620 nm} - 0.7 \cdot Abs_{650 nm}}{7.38} \quad \text{Ecuación 5}$$

El contenido de ficobiliproteínas es referido al volumen de extracto utilizado y a la cantidad de biomasa (g PS) de la cual proviene dicho extracto. Se expresó el contenido en porcentaje, con relación a la masa seca y correspondió al promedio de todas las réplicas.

4.5.2 Determinación de Clorofila *a* y Carotenoides

La determinación de clorofila y carotenoides se realizó según el método de Wegmann y Metzner (1971), en donde a un pellet de microalgas se le adicionó como solvente de extracción 3 ml de acetona al 90 % v/v. Para favorecer la ruptura de la pared celular las muestras fueron sonicadas (sonicador Qsonica, modelo Q55) durante 3 minutos a 30 Hz. Luego fueron guardadas en oscuridad a 4 °C durante 24 hs. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos y 10000 rpm y al sobrenadante (Figura 16) se les midió mediante espectrofotómetro la absorbancia a 663, 644 y 453 nm de longitud de onda. En la Figura 17 se puede ver el barrido espectral del extracto donde se visualizan los picos correspondientes a clorofila *a* y carotenoides.

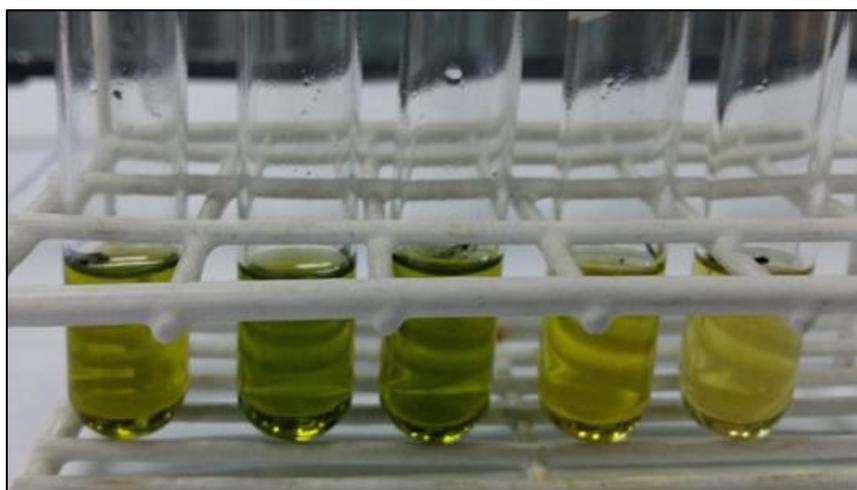


Figura 16: Extracto clarificado para la cuantificación de clorofila *a* y carotenoides según el método de Wegman y Metzner.

La cuantificación de clorofila *a* y carotenoides se realizó mediante las Ecuaciones 6 y 7. Los valores obtenidos fueron referidos al volumen de extracto y a la cantidad de biomasa (g PS) de la cual proviene dicho extracto. Se expresó el contenido de clorofila en porcentaje, con relación a la masa seca y correspondió al promedio de todas las réplicas.

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/ml}) = 10.3 \cdot \text{Abs}_{663 \text{ nm}} - 0.918 \cdot \text{Abs}_{644 \text{ nm}} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/ml}) = 4.20 \cdot \text{Abs}_{453 \text{ nm}} - 0.0264 \cdot [\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/ml})] \quad \text{Ecuación 7}$$

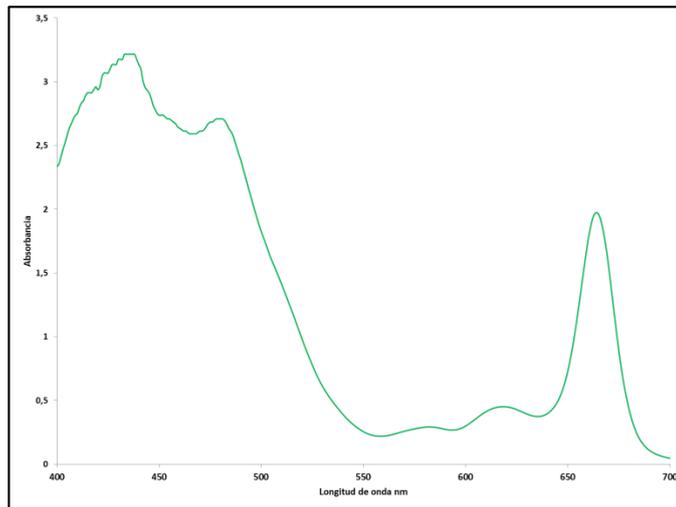


Figura 17: Barrido espectral de un extracto con pico característico de clorofila *a* y carotenoides

4.6 Análisis estadístico

Los valores obtenidos referidos a la cantidad de biomasa microalgal, composición bioquímica y contenido de pigmentos corresponden a promedios con sus desviaciones estándar respectivas. A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Para todas las comparaciones de medias se realizó la prueba de rangos múltiples de Tukey y fue tomado un nivel de confianza del 95 % una probabilidad de (<0.05 %) como significativo. Dichos análisis se realizaron mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XV (02/15/06 V, 2007).

4.7 Desarrollo experimental

Se realizaron tres tipos de ensayos, en función de distintos parámetros que definen la luz: fotoperíodo, intensidad de luz, y longitud de onda. En base al análisis de los resultados obtenidos en estos tres experimentos se realizó un cuarto ensayo en donde se planteó un cultivo en dos etapas buscando incrementar la producción de ficocianina.

Todos los ensayos se realizaron en cámara de cultivo. La misma consta de una plataforma con seis superficies de 2700 cm^2 cada una (útil para 27 Erlenmeyers de 250 ml). Cada superficie se encuentra provista de cuatro lámparas fluorescentes tipo tubo de 6500 K de tonalidad (OSRAM, modelo L18-765), pudiendo cada lámpara ser accionada individualmente para lograr distintas intensidades lumínicas. Cada superficie dispone también de un dispositivo para la programación semanal del fotoperíodo. La cámara de cultivo fue provista de un aire acondicionado frío calor (Electra, modelo Geo Plus Smart Ready 3400W F/C) y un datalogger (KI&BNT, modelo RC-1+), por lo que la temperatura puede ser controlada y monitoreada.

Para todos los ensayos realizados, la cepa madre de *S. platensis* que funcionó como inóculo, fue cultivada en la cámara de cultivo a 2800 lux durante aproximadamente 15 días, a una temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$,

con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, utilizando medio de cultivo Zarrouk en recipientes de 1 litro con volumen final de cultivo de 400 ml.

Para iniciar los ensayos, se determinó la densidad óptica del inóculo y luego se realizaron diluciones de tal manera que la D.O. inicial de los ensayos fuera cercana a 0.05 de absorbancia medidos a un $\lambda = 680$ nm.

Todos los cultivos de los ensayos se realizaron en Erlenmeyers de 500 ml, conteniendo medio de cultivo Zarrouk con un volumen final de 100 ml, y cada condición se realizó por triplicado. A todos los cultivos se les aplicó agitación manual en forma diaria.

A continuación se detallan las diferentes condiciones de los ensayos realizados.

4.7.1 Ensayo: Efecto de los ciclos de luz y oscuridad (fotoperíodo)

Se establecieron cuatro condiciones de ciclos de luz y oscuridad, con el fin de evaluar su influencia en el crecimiento y la composición bioquímica de cultivos de *S. platensis*. Como condición control se utilizó un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Las condiciones de cultivo se indican en la Tabla 12. La intensidad lumínica fue medida con luxómetro y se expresó inicialmente en klux. Luego estos valores se convirtieron en densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD), expresada en μmol fotones por segundo por metro cuadrado ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) utilizando $12 \mu\text{mol}$ fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ klux⁻¹ como factor de conversión para luz fluorescente blanca (Sassano et al., 2010).

Tabla 12: Condiciones de cultivo para evaluar los efectos de los ciclos de luz / oscuridad (fotoperíodo) en cultivos de *S. platensis*.

Condición	Detalle
Control (C12:12)	12 horas de luz / 12 horas de oscuridad
L6:18	6 horas de luz / 18 horas de oscuridad
L18:6	18 horas de luz / 6 horas de oscuridad
L24:0	24 horas de luz continua
Intensidad de luz: 2500 lux / 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	
Biomasa inicial : 0.03 g / l	
Temperatura: 28 ± 2 °C	
Duración del ensayo : 21 días	

Para cada condición estudiada se siguió el crecimiento microalgal, y se determinó su composición en proteínas, carbohidratos totales, lípidos totales, clorofila *a*, carotenoides totales y ficocianina.

4.7.2 Ensayo: Efecto de la intensidad de la luz

Para evaluar la influencia de la intensidad de la luz sobre el crecimiento y la composición bioquímica de *S. platensis*, se establecieron diferentes condiciones de cultivo, tal como se muestran en la Tabla 13. En todas las condiciones se utilizaron tubos de luz de 6500 K de tonalidad (OSRAM, modelo L18-765). Para determinar los valores de intensidad de luz se utilizó un luxómetro (Schwyz, modelo sc 105)), y la conversión a $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se realizó según lo detallado en la sección 4.7.1

Tabla 13: Condiciones de cultivo para evaluar los efectos de la intensidad de la luz en cultivos de *S. platensis*.

Condición	
L1: 150 Lux	/ 1.8 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
L2: 700 Lux	/ 8.4 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
L3: 1500 Lux	/ 18 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
L4: 2500 Lux	/ 30 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
L5: 4500 Lux	/ 54 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Fotoperíodo: 12 horas de luz : 12 horas de oscuridad	
Biomasa inicial : 0.04 g /l	
Temperatura: 30 ± 2 °C	
Duración del ensayo : 21 días	

Para cada condición estudiada se siguió el crecimiento microalgal, y se determinó al final del ensayo su composición en proteínas, carbohidratos totales, lípidos totales, clorofila a , carotenoides totales y ficocianina.

4.7.3 Ensayo: Efecto de las longitudes de onda

Para la realización de este ensayo, se cambiaron los tubos fluorescentes de luz blanca de la cámara de cultivo por tubos fluorescentes de color de bajo consumo de 18 W (marca MP LAMP), como se muestra en la Figura 18.

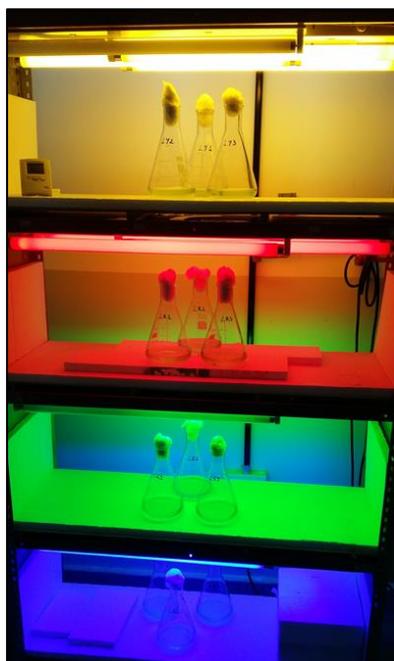


Figura 18: Cultivos de *S. platensis* expuestos a distintas longitudes de onda, utilizando tubos de colores

Los tubos fluorescentes utilizados son de vidrio de color rojo, amarillo, verde y azul. Dichos colores permitieron evaluar distintas condiciones de longitud de onda, como se indica en la Tabla 14. Como condición control se utilizó luz blanca, aportada por tubos fluorescentes, los cuales fueron los utilizados en los demás ensayos. El resto de los parámetros de cultivo permaneció constante. Como en los casos anteriores, se realizó un seguimiento de la biomasa microalgal y se determinó al final del ensayo su

composición en proteínas, carbohidratos totales, lípidos totales, clorofila *a*, carotenoides totales y ficocianina.

Tabla 14: Condiciones de cultivo para evaluar los efectos de distintas longitudes de onda en cultivos de *S. platensis*.

Condición	Longitud de onda	Intensidad de Luz	Cantidad de lámparas
Control (LC)	400 - 800 nm	2500 Lux	2
Luz Roja (LR)	620 - 750 nm	1640 Lux	4
Luz Amarilla (LY)	570 - 590 nm	2046 Lux	2
Luz Verde (LG)	495 - 570 nm	2060 Lux	2
Luz Azul (LB)	450 - 495 nm	1500 Lux	4
En todos los casos el fotoperíodo utilizado fue de 12 horas de luz : 12 horas de oscuridad			
Biomasa inicial : 0.02 g /l			
Temperatura: 28 ± 2 °C			
Duración : 21 días			

4.7.4 Ensayo: Cultivo en dos etapas

En base a los resultados obtenidos en las secciones anteriores, resultó interesante evaluar los efectos de la aplicación en dos etapas de las condiciones de cultivo analizadas previamente sobre cultivos de *S. platensis*. Esto es, promover el cultivo bajo una condición de luz inicial que favorezca el crecimiento, y posteriormente transferir la biomasa producida a otra condición que favorezca la producción de algún pigmento de interés.

El ensayo se realizó, al igual que todos los anteriores, en Erlenmeyers de 500 ml conteniendo medio de cultivo Zarrouk en un volumen final de 100 ml.

El cultivo en dos etapas consistió en una primera etapa de cultivo a una intensidad de luz de 2500 lux, y luego de 19 días de cultivo se inició una segunda etapa, donde se cambiaron los cultivos a:

- a) Una condición de baja intensidad de luz (700 lux)
- b) Una condición de luz azul

El diseño experimental incluyó tres cultivos control, correspondientes a las diferentes condiciones de cultivo estudiadas (control de luz blanca a 2500 lux, control de luz blanca a 700 lux, control de luz azul), tal como se muestra en la Tabla 15. A los 19, 21 y 26 días de cultivo se determinó el contenido de pigmentos (ficocianina, clorofila y carotenoides), en cada una de las condiciones ensayadas. Todas las condiciones se realizaron por triplicado.

Tabla 15: Condiciones empleadas en el ensayo de cultivo en dos etapas de *S. platensis*.

Condición	Primera etapa (Día 1 al 19)		Segunda etapa (Día 19 al 26)
Control (LC)	Luz blanca-2500 lux		Luz blanca-2500 lux
Control Azul (BC)	Luz azul-1500 lux		Luz azul-1500 lux
Control Intensidad (IC)	Luz blanca-700 lux		Luz blanca-700 lux
Cambio de Intensidad (LI)	Luz blanca-2500 lux	→	Luz blanca-700 lux
Cambio de λ (LB)	Luz blanca-2500 lux	→	Luz azul-1500 lux
En todos los casos el fotoperíodo utilizado fue de 12 horas de luz : 12 horas de oscuridad			
Biomasa inicial : 0.04 g /l			
Temperatura: 30± 2 °C			
Duración Primera etapa : 19 días			
Duración Segunda etapa: 7 días			
Duración total : 26 días			

5 Resultados y Discusión

5.1 Determinación de Biomasa: Curva densidad óptica versus peso seco

A partir de los datos obtenidos se realizó la curva de calibración (Figura 19) que permitió cuantificar la cantidad de biomasa expresada en gramos de peso seco por litro de cultivo (g PS/l) en función de la medición de la densidad óptica (D.O) a una $\lambda=560\text{nm}$. La Ecuación 8 representa la correlación lineal obtenida junto con su valor de R^2 . Cada punto de la curva corresponde al promedio de $n=3$ y su desvío estándar (D.S.).

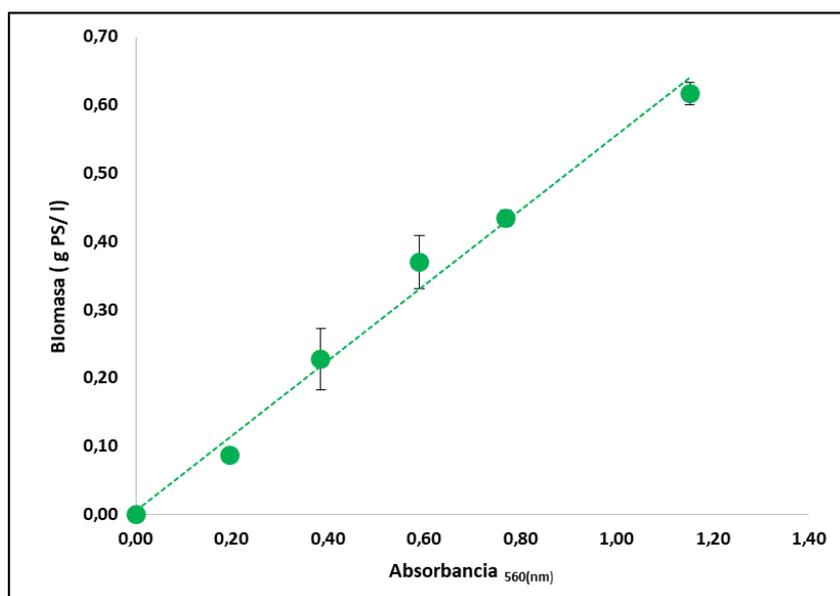


Figura 19: Curva de calibración de Absorbancias $_{560\text{ nm}}$ versus Biomasa (g PS/l).

$$\text{Biomasa (g PS/l)} = 0.5504 \cdot \text{Abs}_{560\text{ nm}} + 0.0056 \quad R^2 = 0.9887 \quad \text{Ecuación 8}$$

Al observar los puntos en la gráfica, se puede apreciar que estos ajustan a una recta, lo cual indica una buena correlación de los valores obtenidos. Además, esto es corroborado por el valor del coeficiente de determinación R^2 (0.9887).

5.2 Efecto de los ciclos de luz y oscuridad (fotoperíodo) sobre cultivos de *S. platensis*

Se estudió el efecto de los ciclos de luz y oscuridad sobre el crecimiento de *S. platensis*. Luego de 21 días de cultivo se evaluó la composición bioquímica (proteínas, lípidos y carbohidratos), y la producción de pigmentos (ficocianina, clorofila y carotenoides) de la biomasa microalgal producida.

5.2.1 Producción de biomasa y parámetros de crecimiento

En la Figura 20 se muestran las curvas de crecimiento de *S. platensis* obtenidas para los distintos ciclos de luz y oscuridad evaluados. Las mismas representan la concentración de la biomasa (g PS /l) en función del tiempo (días). Se puede observar que a medida que aumenta la cantidad de horas de luz, también lo hace la producción de la biomasa, presentando un valor mínimo en la condición L6:18 de 1.21 ± 0.08 g PS/l, lo que representa una disminución de 40.4 % respecto del control (C12:12 = 2.04 ± 0.07 g PS/l). Mientras que en las condición de 18 horas de luz L18:6 la biomasa obtenida fue de 2.18 ± 0.07 g PS/l y en la condición de luz continua (L24:0), se puede ver un aumento del 16.3 % respecto del control. A partir del día 18 se puede observar que en las condiciones C12:12, L18:6 y L24:0 el crecimiento entra en una fase estacionaria. Este proceso posiblemente se deba a que, en cultivos de tipo *batch* y en ausencia de agitación, el aumento de la concentración de la biomasa microalgal produce efectos de sombreado celular que afectan la capacidad fotosintética, convirtiéndose la luz en un factor limitante del crecimiento.

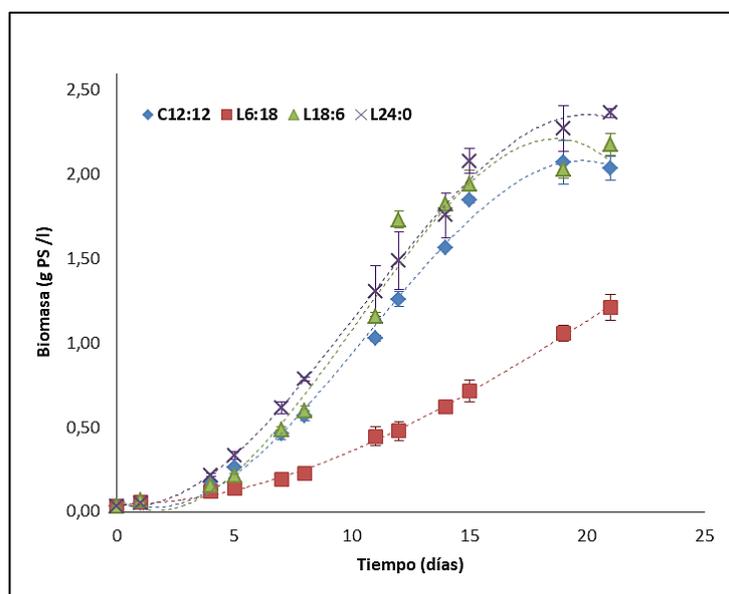


Figura 20: Curvas de crecimiento de *S. platensis* bajo diferentes fotoperíodos (L6:18, 6 horas de luz y 18 horas de oscuridad; L18:6, 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad; L24:0, 24 horas de luz, C12:12, condición control de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad).

Los valores son el promedio \pm S.D, para n =3

Respecto a la velocidad específica de crecimiento (μ), como se muestra en la Tabla 16, se aprecia un aumento de la misma a medida que se incrementan las horas de exposición a la luz respecto a la condición control (C12:12), resultando en un incremento máximo del 39 % bajo la presencia de luz continua (L24:0). No obstante, si las horas de exposición disminuyen respecto del control, como en el caso de la condición L6:18, se puede observar una disminución del 26 % en el valor de μ .

Tabla 16: Parámetros de crecimiento obtenidos en cultivos de *S. platensis* bajo distintos ciclos de luz y oscuridad (L6:18, 6 horas de luz y 18 horas de oscuridad; L18:6, 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad; L24:0, 24 horas de luz, C12:12, condición control de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad)

Condición	Biomasa (g PS/l)	μ (día ⁻¹)	Td (día)	IC
C12:12	2,04 ± 0,07 ^a	0,23 ± 0,01 ^a	3,03 ± 0,06 ^a	58,39 ± 2,07 ^a
L6:18	1,21 ± 0,08 ^b	0,17 ± 0,01 ^b	4,06 ± 0,31 ^b	34,39 ± 2,29 ^b
L18:6	2,18 ± 0,07 ^{a,c}	0,27 ± 0,02 ^c	2,54 ± 0,20 ^{a,c}	62,56 ± 1,92 ^{a,c}
L24:0	2,37 ± 0,03 ^c	0,32 ± 0,01 ^d	2,16 ± 0,04 ^c	68,04 ± 0,82 ^c

Los valores son el promedio ± S.D, para n =3. Dentro de la misma columna, letras diferentes representan valores significativamente (p<0,05) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey.

Los resultados enunciados difieren de los obtenidos por Patres et al. (2015), quienes analizaron la cepa *Spirulina* sp. LEB 18, bajo condiciones de 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad y luz continua, obteniendo un aumento del 36 % de la producción de biomasa bajo luz continua, respecto del ciclo de 12 horas de luz a los 10 días de cultivo. Sin embargo, respecto a la velocidad específica de crecimiento (μ), los autores no informaron cambios significativos bajo las condiciones ensayadas, mientras que, como se muestra en la Tabla 16, los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas.

Por otro lado, Pareek y Srivastava (2001) concluyeron para otra cepa de *S. platensis* que el crecimiento óptimo se obtuvo a una condición de 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad.

Jacob-Lopes et al. (2009), evaluaron el crecimiento de la microalga *Aphanothece microscopica Nägeli* bajo diferentes períodos de luz y bajo luz continua, y observaron una reducción en la producción de biomasa en paralelo con la reducción de los períodos de luz, de forma similar a lo registrado para la cepa estudiada en este trabajo.

En base a los resultados obtenidos se podría afirmar que existe una relación entre la cantidad de horas de exposición a la luz y la tasa de crecimiento de esta cepa de *S. platensis* a una luz incidente constante (Figura 21). El crecimiento microalgal depende de la cantidad de energía recibida por los cultivos, por lo tanto, cuanto mayor es la duración de la iluminación, el proceso de división celular se torna más breve (Bouterfas et al., 2006), y como consecuencia bajo luz continua el crecimiento resulta máximo. Sin embargo, se debe considerar que la biomasa generada en cada condición de fotoperíodo podría tener una composición bioquímica diferente (Jacob-Lopes et. al., 2009).

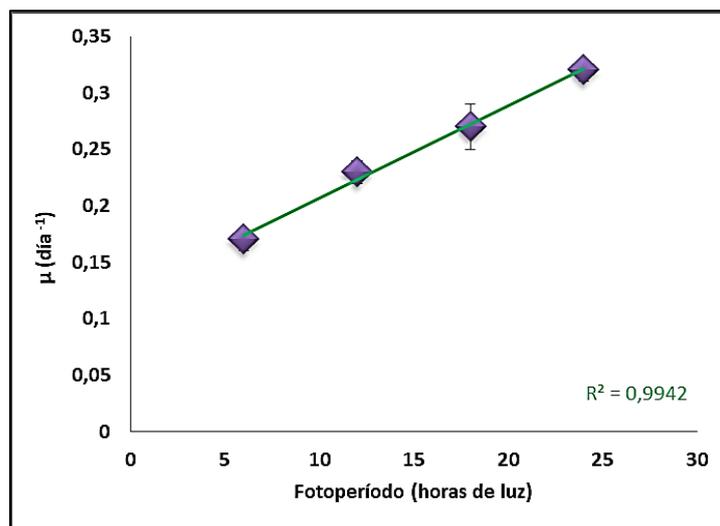


Figura 21: Relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la cantidad de horas de exposición a la luz en cultivos de *S. platensis*. Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$

5.2.2 Composición bioquímica de la biomasa

Respecto a la composición bioquímica de *S. platensis*, como se puede apreciar en la Figura 22, se observa una tendencia de incremento en el contenido proteico para las condiciones L6:18 (54.89 ± 1.48 % PS) y L18:6 (53.24 ± 2.67 %), sin embargo, el análisis de ANOVA mostró que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a la condición control (47.55 ± 2.87 % PS). Asimismo, bajo 24 horas de luz continua, el contenido de proteínas tuvo un valor mínimo de 39.21 ± 0.57 % PS. Dicho resultado difiere de lo encontrado por Patres et al. (2015), quienes informaron que el contenido de proteínas para la cepa de *Spirulina* sp. LEB18 fue de 41.20 ± 0.60 % bajo una condición de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y de 50.11 ± 2.75 % bajo luz continua, los cuales no representaron una diferencia significativa ($p < 0.05$). En el caso de *Chlorella vulgaris*, tampoco se hallaron diferencias significativas entre una condición control de 12 horas de exposición a la luz y luz continua (Seyfabadi et al., 2011).

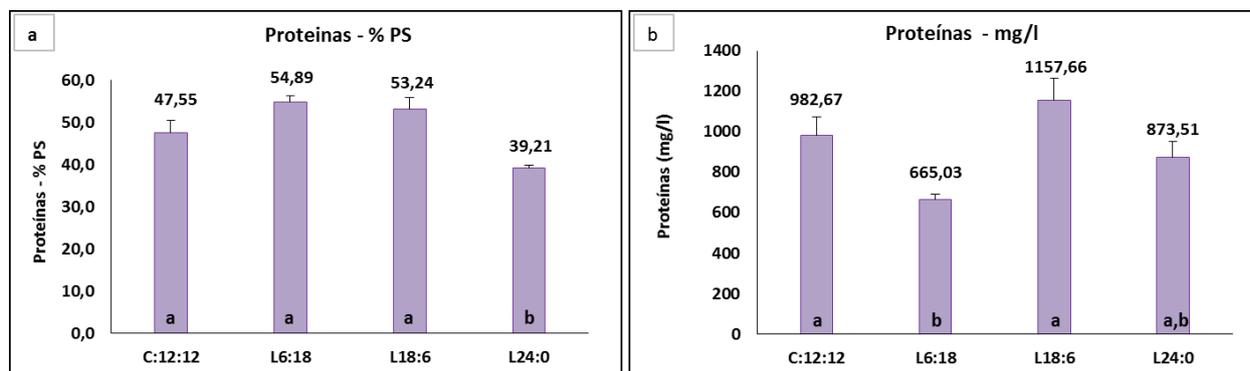


Figura 22: Contenido de proteínas de *S. platensis* bajo distintos fotoperíodos: a) expresado en % PS, b) expresado en mg proteínas/l de cultivo. (L6:18, 6 horas de luz y 18 horas de oscuridad; L18:6, 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad; L24:0, 24 horas de luz, C12:12, condición control de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad).

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p < 0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey.

En la Figura 23 se puede observar que el aumento en la cantidad de horas de luz incrementa el contenido de lípidos, alcanzando un valor máximo de 8.75 ± 0.49 % PS en la condición L18:6, lo que representan un aumento del 29 % respecto del control. Este incremento resultó similar al encontrado en la cepa *Spirulina* sp. LEB 18 (Patres et al., 2015), quienes registraron un aumento del 27% bajo una condición de luz continua frente a una condición control de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. En el caso de la microalga *Chlorella vulgaris* (Atta et al., 2013), el contenido de lípidos puede aumentar un 20.9 % en 10 días de cultivo bajo un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. En un estudio realizado por Khoeyi et al. (2012), la composición de ácidos grasos de *C. vulgaris* cambió considerablemente a diferentes regímenes de luz: el porcentaje máximo de ácidos grasos saturados (33.38%) se registró en un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, mientras que los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) disminuyeron al aumentar la duración de las horas de luz.

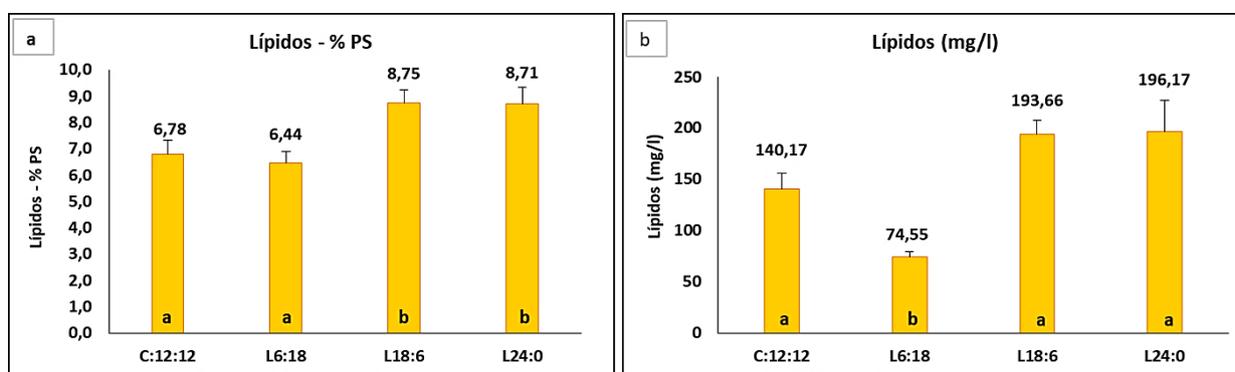


Figura 23: Contenido de lípidos de *S. platensis* bajo distintos fotoperíodos: a) expresado en % PS, b) expresado en mg lípidos/ l de cultivo. (L6:18, 6 horas de luz y 18 horas de oscuridad; L18:6, 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad; L24:0, 24 horas de luz, C12:12, condición control de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad)

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p<0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey.

Al analizar el contenido de carbohidratos, como se puede ver en la Figura 24, el mismo no presenta diferencias estadísticamente significativas, con un intervalo de confianza del 95%. Sin embargo, se puede apreciar una tendencia a disminuir el contenido porcentual de carbohidratos al aumentar la cantidad de horas de luz, lo que es coincidente con lo encontrado en la cepa *Spirulina* sp. LEB 18 (Patres et al., 2015).

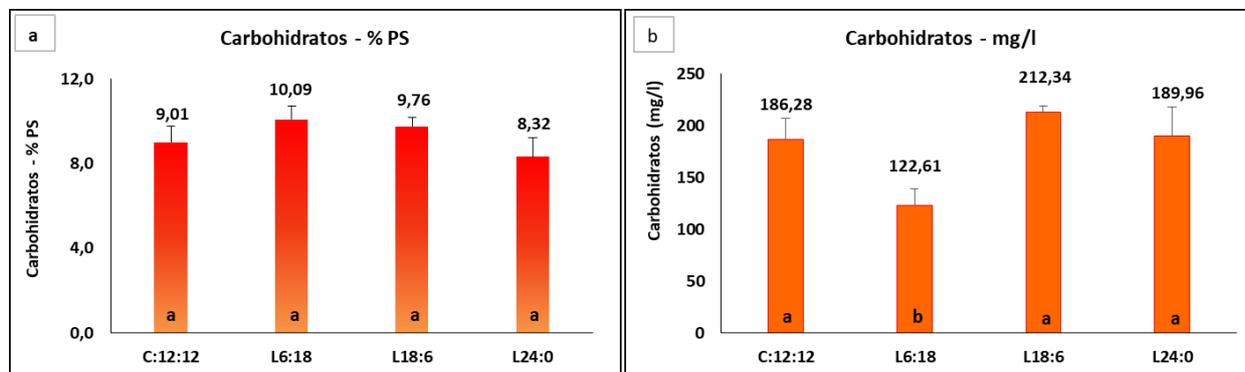


Figura 24: Contenido de carbohidratos de *S. platensis* bajo distintos fotoperíodos: a) expresado como % PS, b) expresado en mg carbohidratos/ l de cultivo. (L6:18, 6 horas de luz y 18 horas de oscuridad; L18:6, 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad; L24:0, 24 horas de luz, C12:12, condición control de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad)

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p<0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey.

La cantidad de horas de exposición a la luz influye en el ritmo circadiano de la fotosíntesis, la respiración, la división celular y la velocidad de crecimiento (Bouterfas et al., 2006). Durante el régimen de luz, la adenosina trifosfato (ATP) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) se generan, mientras que durante la fase oscura, las proteínas celulares, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos se biosintetizan (Atta et al., 2013). Además, se ha informado que algunas enzimas del ciclo de las pentosas de la fotosíntesis y de la fijación del CO₂ están inactivas durante la iluminación (Bouterfas et al., 2006). Por lo tanto, todos estos procesos derivados de la presencia o ausencia de la luz afectan directamente a la composición bioquímica, principalmente al contenido de proteínas.

5.2.3 Producción de pigmentos:

En relación con la producción de pigmentos de *S. platensis*, la concentración de ficocianina se vio significativamente afectada por la luz continua. Como se observa en la Figura 25, bajo esta condición el contenido de ficocianina fue de un 6.63 ± 0.86 % PS, lo que representa una disminución del 28.00 % respecto del control. Esta disminución podría deberse a la necesidad de una fase de oscuridad donde se lleve a cabo la fijación del CO₂, hecho indispensable para los procesos anabólicos de formación de pigmentos (Bouterfas et al., 2006).

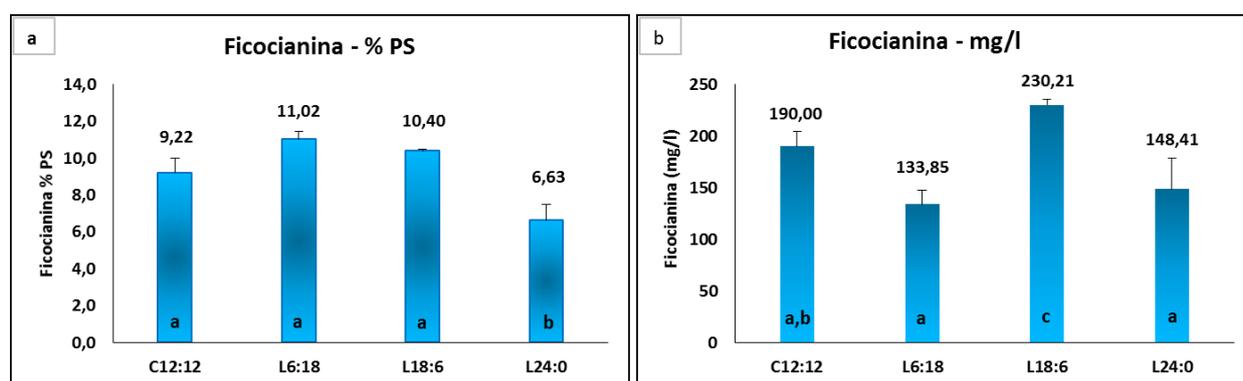


Figura 25: Contenido de ficocianina de *S. platensis* bajo distintos fotoperíodos: a) expresado como % PS, b) expresado en mg de ficocianina/l de cultivo. (L6:18, 6 horas de luz y 18 horas de oscuridad; L18:6, 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad; L24:0, 24 horas de luz, C12:12, condición control de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad)

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n = 3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p < 0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

El máximo porcentaje de ficocianina respecto al peso seco se observa en la condición L6:18 (11.02 ± 0.43 %PS). En el caso de *Oscillatoria redekei* (Foy and Gibson, 1982), se encontró un aumento del 58.9 % del porcentaje de ficocianina bajo una condición de 6 horas de luz en relación a un control de 12 horas de luz. Dicho efecto podría estar en relación con la necesidad del alga de mejorar su eficiencia fotosintética en condiciones de pocas horas de luz.

Si bien el porcentaje de ficocianina aumentó en la condición de L6:18, dada la poca biomasa producida, la concentración de ficocianina resultó solo de 133.8 ± 13.8 mg/l. Por otra parte, la condición L18:6 no generó un cambio significativo en el porcentaje de ficocianina (10.40 ± 0.09 % PS) respecto del control (9.22 ± 0.81 %PS). No obstante, debido a que en dicha condición se presentó una alta producción de biomasa, se

registró un aumento del 21,1 % en la concentración de ficocianina en relación a la condición control. Este período de exposición a la luz representaría una condición óptima para la producción de ficocianina en esta cepa de *S. platensis*. En el caso de *Spirulina* sp. LEB 18 (Patres et al., 2015), un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad resultó la condición óptima de producción de ficocianina, en la cual se alcanzó un aumento de 2.2 veces respecto a una condición de la luz continua.

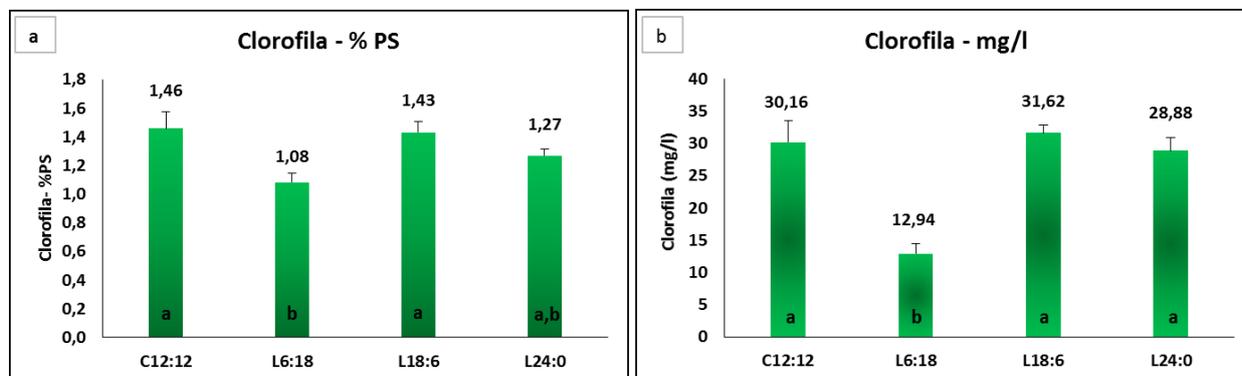


Figura 26: Contenido de clorofila de *S. platensis* bajo distintos fotoperíodos, a) expresado como % PS, b) expresado en mg de clorofila / l de cultivo. (L6:18, 6 horas de luz y 18 horas de oscuridad; L18:6, 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad; L24:0, 24 horas de luz, C12:12, condición control de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad)

Los valores son el promedio \pm S.D., para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p<0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

En cuanto al contenido de clorofila de *S. platensis* (Figura 26), se registró un mínimo en la condición L6:18 (1.08 ± 0.07 %PS). Este fenómeno estaría directamente relacionado con la menor cantidad de horas de exposición a la luz experimentada por la microalga en estas condiciones. Una fase luminosa más prolongada genera una mayor producción de compuestos dependientes de la luz (ATP; NADPH) que luego pueden ser utilizados en la fase oscura para la síntesis de moléculas esenciales para el crecimiento y para la fase luminosa (Khoeyi et al., 2012).

Por otro lado, la aplicación de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad (1.43 ± 0.08 %PS), no generó diferencias significativas respecto a la condición control (1.47 ± 0.12 %PS). Si dichos valores son referidos a mg clorofila/l litro de cultivo, la condición L18:6 presenta un incremento del 4,8 % respecto del control, aunque no resulta estadísticamente diferente. Asimismo, bajo luz continua, el contenido de clorofila (1.27 ± 0.05 %) no mostró diferencias significativas respecto de las otras condiciones. Lo mismo ocurrió con la cepa *Chlorella kessleri* (Lee y Lee, 2001), donde no se encontraron diferencias en el contenido específico de clorofila para las condiciones de luz continua y fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Por el contrario, un trabajo reportado por Nhu (2017) demostró que la luz blanca y la iluminación continua (24 horas) eran condiciones apropiadas para el aumento de biomasa y la producción de clorofila *a* en *Spirulina* sp., obteniendo 2.23 veces más clorofila bajo condiciones de luz continua que bajo un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Otro trabajo reportado por Pareek y Srivastava (2001), mostró que la condición óptima para la obtención de clorofila en cultivos de *Spirulina* sp. fue de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, y que la iluminación continua tiende a suprimir la síntesis de clorofila observándose un impacto nocivo en el complejo fotosintético.

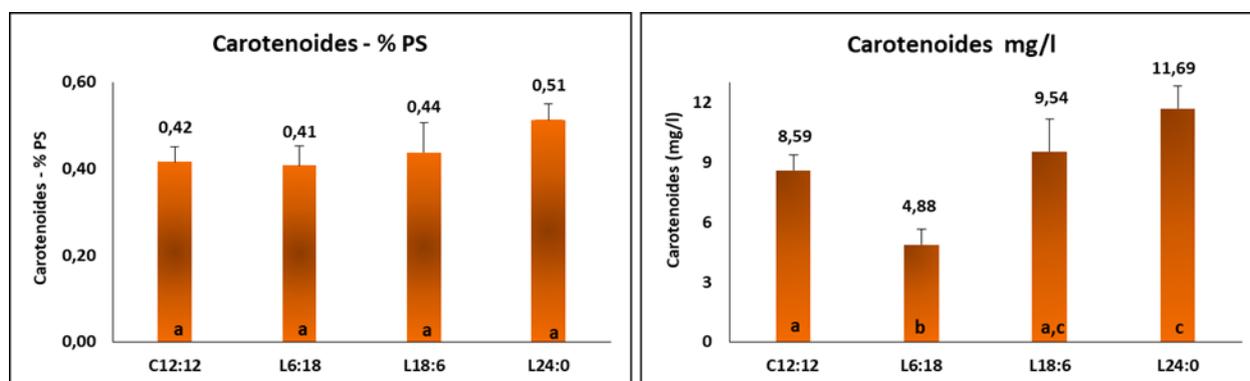


Figura 27: Contenido de carotenoides de *S. platensis* bajo distintos fotoperíodos a) expresado como % PS, b) expresado en mg de carotenoides/l de cultivo. (L6:18, 6 horas de luz y 18 horas de oscuridad; L18:6, 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad; L24:0, 24 horas de luz, C12:12, condición control de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad).

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p<0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

Respecto al contenido de carotenoides, no se apreciaron diferencias significativas en las condiciones evaluadas, como se puede apreciar en la Figura 27. Estos resultados son consistentes con lo obtenido en una cepa de *C. vulgaris*. (Seyfabadi et al., 2012).

La condición de luz continua presenta el mayor rendimiento de carotenoides (11.69 ± 1.13 mg/l) debido a una concentración celular mucho más elevada bajo esta condición.

5.3 Efecto de la intensidad de la luz sobre cultivos de *S. platensis*

A continuación se analizarán los resultados obtenidos en cultivos de *S. platensis* sometidos a diferentes intensidades de luz.

5.3.1 Producción de biomasa y parámetros de crecimiento

El crecimiento de *S. platensis* se ve directamente influenciado por la intensidad de la luz, tal como se muestra en la Figura 28 y Figura 29, donde se ve reflejado que el aumento de la intensidad de la luz se traduce en un incremento de la producción de la biomasa microalgal, alcanzando un valor de concentración máxima en la condición L5:4500 Lux (2.60 ± 0.14 g PS/l). Este valor máximo indica un aumento del 20.38 % respecto a la condición L4:2500 lux, la cual representa la intensidad de luz estándar para el cultivo de *S. platensis* (condición control).

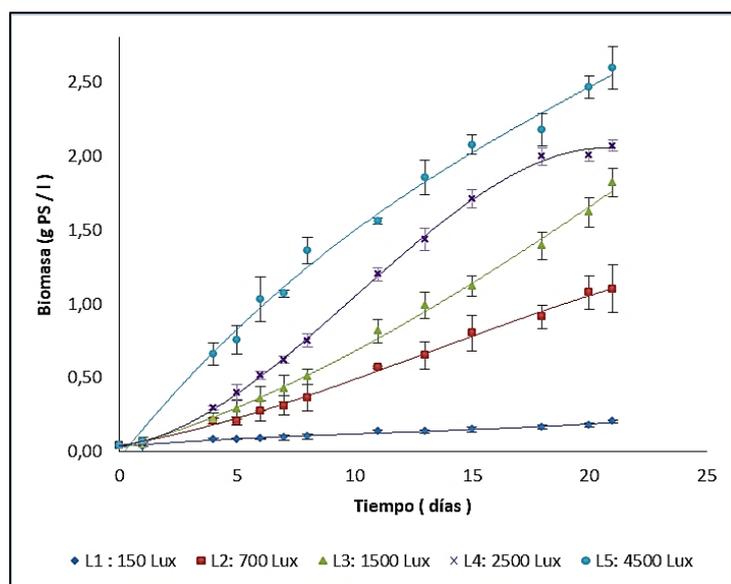


Figura 28: Curvas de crecimiento de *S. platensis* a distintas intensidades de luz. Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$



Figura 29: Efecto de distintas intensidades de luz sobre la producción de biomasa de *S. platensis*

Por otro lado, en la condición L1 se puede observar que el crecimiento es casi nulo, dando como resultado un índice de crecimiento de 3.91 ± 0.28 (Tabla 17). Si bien, es sabido que para los organismos fotosintéticos creciendo de forma fotoautotrófica es indispensable la luz, dicha condición se planteó como control negativo del crecimiento y para hacer más significativo el efecto de la intensidad de luz en la composición bioquímica y pigmentaria. La condición L2:700 lux presentó una disminución del 46.9 % respecto de L4:2500 lux, mientras que la condición L3:1300 lux solamente del 12.1 %.

Tabla 17: Parámetros de crecimiento obtenidos en cultivos de *S. platensis* bajo distintas intensidades de luz.

Condición	Biomasa (g PS/l)	μ (día ⁻¹)	Td (día)	IC
L1 : 150 Lux (1.2 μ mol/m ² s ⁻¹)	0,20 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	13,58 \pm 0,35 ^a	3,91 \pm 0,28 ^a
L2: 700 Lux (8.4 μ mol/m ² s ⁻¹)	1,10 \pm 0,16 ^b	0,13 \pm 0,06 ^b	5,17 \pm 0,50 ^b	25,39 \pm 3,88 ^b
L3: 1500 Lux (18 μ mol/m ² s ⁻¹)	1,82 \pm 0,09 ^c	0,17 \pm 0,01 ^b	4,20 \pm 0,07 ^b	42,69 \pm 2,28 ^c
L4: 2500 Lux (30 μ mol/m ² s ⁻¹)	2,07 \pm 0,04 ^c	0,23 \pm 0,02 ^c	3,03 \pm 0,30 ^c	48,68 \pm 0,93 ^c
L5: 4500 Lux (54 μ mol/m ² s ⁻¹)	2,60 \pm 0,14 ^d	0,41 \pm 0,01 ^d	1,69 \pm 0,06 ^d	61,28 \pm 3,45 ^d

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p<0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

El aumento de la producción de biomasa proporcional a la intensidad de la luz resulta coincidente con lo reportado por otros autores trabajando con otras cepas de *S. platensis* (Ravelonandro et al., 2008; Markou et al., 2012b; Fagiri et al., 2013; Lee et al., 2016.). No obstante, no todas las cepas de *Spirulina* responden de la misma manera. Tal es el caso de lo reportado por Kumar et al. (2011), quienes hallaron la máxima producción de biomasa microalgal a una intensidad de luz de 2000 lux, y por el contrario, a una intensidad de 3000 lux la producción de biomasa fue considerablemente menor, e incluso mínima a 3500 lux.

Cabe destacar, que en el presente trabajo no se encontró inhibición del crecimiento de *S. platensis* por acción de la luz (fotoinhibición) para el rango de intensidades evaluadas, dado que las mismas se encuentran alejadas de los valores reportados por otros autores (Sección 2.4.2-Intensidad de la Luz).

Cuando los cultivos fueron sometidos a bajas intensidades de luz (150 lux y 700 lux, principalmente), se puede observar que el perfil de las curvas de crecimiento de *S. platensis* tienen a ser lineales. Perfiles de este estilo han sido reportados por Wahidin et al. (2013), quienes trabajaron con la microalga *Nannochloropsis* sp., y observaron que el crecimiento logarítmico no prevalece cuando la intensidad de luz es demasiado baja.

Si bien la biomasa de *S. platensis* se incrementa al aumentar los valores de la intensidad de la luz, también lo hace la velocidad específica de crecimiento (μ). Como se puede apreciar en la Figura 30, existiría una correlación entre la intensidad de la luz y la velocidad específica de crecimiento, la cual se manifiesta de manera lineal con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.982. Este tipo de comportamiento podría ayudar a predecir y/o simular los efectos de la intensidad de la luz sobre la μ de *S. platensis*. Este resultado es análogo a lo encontrado por Wang et al. (2007), quien también reportó un comportamiento lineal de la μ a bajas intensidades de luz.

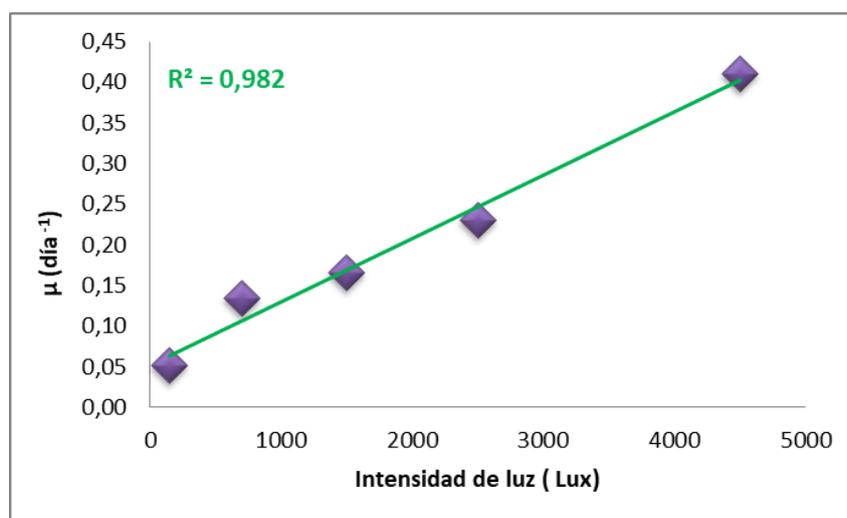


Figura 30: Relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la intensidad de la luz en cultivos de *S. platensis*

5.3.2 Composición bioquímica de la biomasa

En relación a la composición bioquímica de la biomasa microalgal, el porcentaje de proteínas no fue significativamente afectado por las distintas condiciones de intensidad de luz ensayadas (Figura 31), con excepción de la condición L1:150 Lux, donde la baja intensidad de la luz no le estaría proporcionando al cultivo la energía necesaria para poder sintetizar proteínas. El máximo porcentaje de proteínas (45.04 ± 3.27 %PS) se encontró en la condición L4: 2500 lux. Estos resultados, resultan coincidentes a lo hallado por Ravelonandro et al (2008), quienes no encontraron diferencias respecto al porcentaje de proteínas a intensidades de luz entre 800 y 1200 lux en cultivos de *S. platensis*.

Asimismo, se observó que, a pesar de no ser estadísticamente diferente, ocurrió una disminución del contenido proteico en la condición L5:4500 Lux (38.25 ± 1.17 %PS). Markou et al. (2012b), quienes evaluaron el contenido proteico en un rango de intensidades de luz entre 2000 y 5000 lux, de igual manera observaron que a la mayor intensidad ensayada el contenido proteico disminuía respecto de las otras condiciones.

Analizando la cantidad total de proteínas obtenida por litro de cultivo, las condiciones L4:2500 lux y L5:4500 lux presentan los valores más elevados. Asimismo, si bien entre ambas condiciones no existe una diferencia significativa, la condición L4:2500 lux resultaría la mejor opción, ya que no solo posee el porcentaje de proteínas más elevado (% PS), sino que además implicaría un ahorro energético que tiene impacto en el costo del proceso.

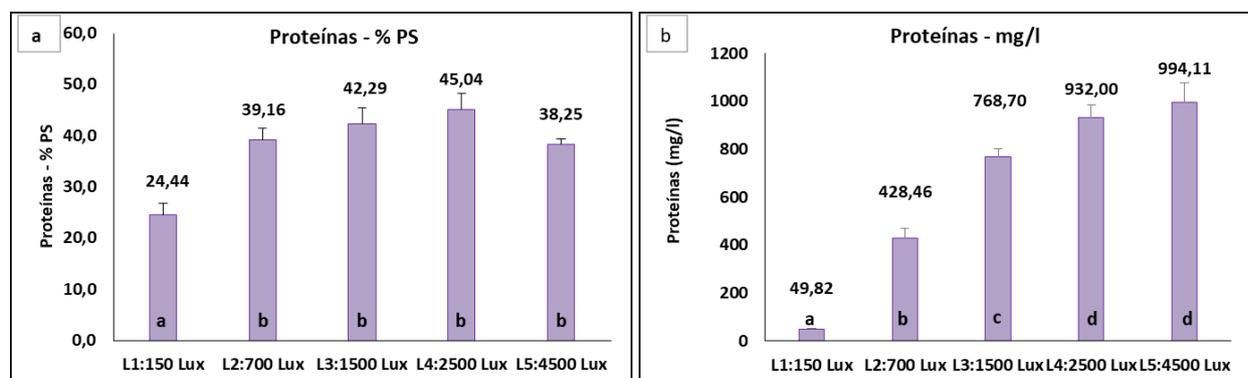


Figura 31: Contenido de proteínas de *S. platensis* cultivada a distintas intensidades de luz, a) expresado como % PS, b) expresado como concentración (mg de proteínas / l de cultivo)

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p<0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

En cuanto al contenido de lípidos, éste se vio incrementado en la condición L1:150 lux, siendo el mismo del 12.82 ± 0.11 % PS, tal como se muestra en la Figura 32. Sin embargo, en dicha condición, dada la baja biomasa producida, se obtiene el menor contenido total de lípidos por litro de cultivo (26.20 ± 1.44 mg/l).

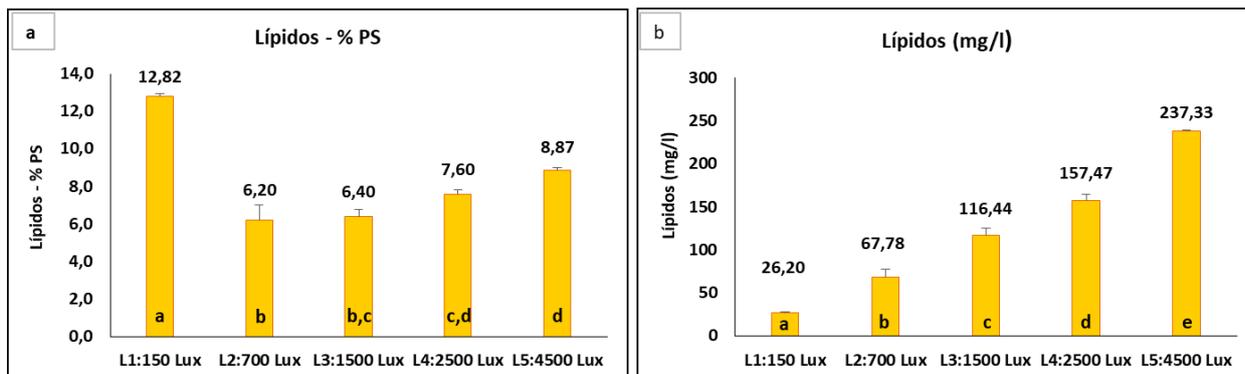


Figura 32: Contenido de lípidos de *S. platensis* cultivada a distintas intensidades de luz, a) expresado como % PS, b) expresado como concentración (mg de lípidos/l de cultivo)

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p<0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

Klyachko-Gurvich et al. (1999), sugirieron que los ácidos grasos poliinsaturados totales (PUFA) son necesarios para el mantenimiento de la función de la membrana fotosintética y que también juegan un papel importante en la aclimatación bajo condiciones de poca luz. El incremento en el contenido de lípidos ocurre generalmente con la finalidad de generar una reserva energética, en respuesta a la disminución en el contenido de proteínas.

Las condiciones L4:2500 Lux (7.60 ± 0.20 %PS) y L5:4500 lux (8.87 ± 0.12 %PS) no mostraron diferencias significativas, sin embargo representan un aumento del 15.8 % y 27.8 % respecto de las condiciones L2:700 lux y L3:1500 lux, respectivamente. De forma análoga, Danesi et al. (2004) no hallaron diferencias en el porcentaje de lípidos de *S. platensis* a intensidades de luz de 2000 lux a 5000 lux, aunque los valores reportados para la cepa utilizada en sus ensayos resultaron más elevados (14.7 %) que para la cepa LMPA55 utilizada en este trabajo. Igualmente, Markou et al. (2012b) tampoco encontraron diferencias significativas en el contenido lipídico trabajando con intensidades de luz entre 2000 lux y 5000 lux. No obstante, los valores obtenidos rondan los 7.33 % y 7.46 %, los cuales son similares a los hallados en este trabajo.

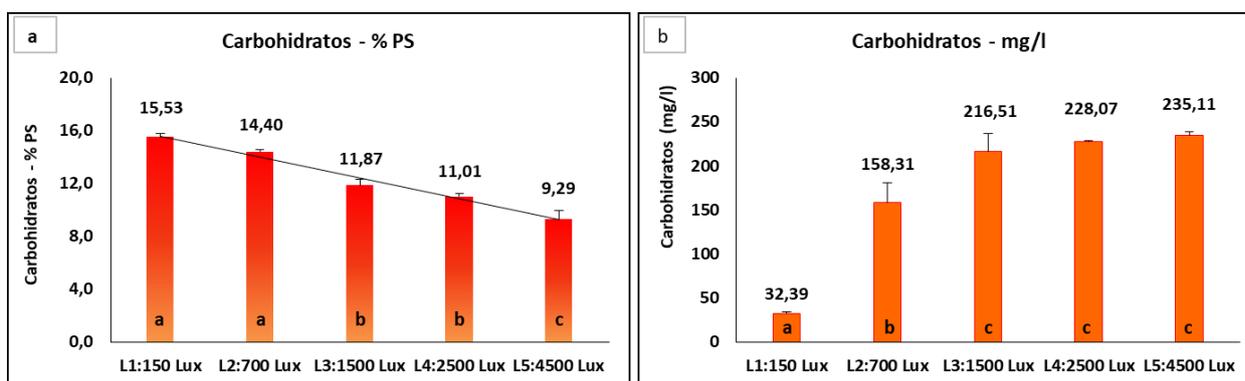


Figura 33: Contenido de carbohidratos de *S. platensis* cultivada a distintas intensidades de luz, a) expresado como % PS, b) expresado como concentración (mg de carbohidratos/l de cultivo)

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p<0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

El contenido porcentual de carbohidratos (Figura 33) presentó una disminución gradual con tendencia lineal a medida que se incrementó la intensidad de la luz. El contenido máximo de carbohidratos (15.53 ± 0.27 % PS) correspondió a la menor intensidad de luz ensayada (L1: 150 lux).

Durante el régimen de luz se producen adenosina trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), y la producción de los mismos es mayor a mayor intensidad de luz (Cheirsilp y Torpee, 2012). Las cianobacterias tienden a incrementar su contenido en carbohidratos, a expensas de una disminución en la concentración de proteínas, con la finalidad de incrementar las reservas energéticas y optimizar la baja disponibilidad de ATP. Esto es posible debido a que las proteínas requieren 4 ATP para su síntesis mientras que los carbohidratos (glucosa) utilizan 0,5 ATP. La acumulación de energía en forma de carbohidratos representa entonces un empleo más eficiente del ATP (Markou, 2012)

5.3.3 Producción de Pigmentos

La producción de ficocianina se vio afectada bajo las distintas condiciones de luz ensayadas como se muestra en la Figura 34.

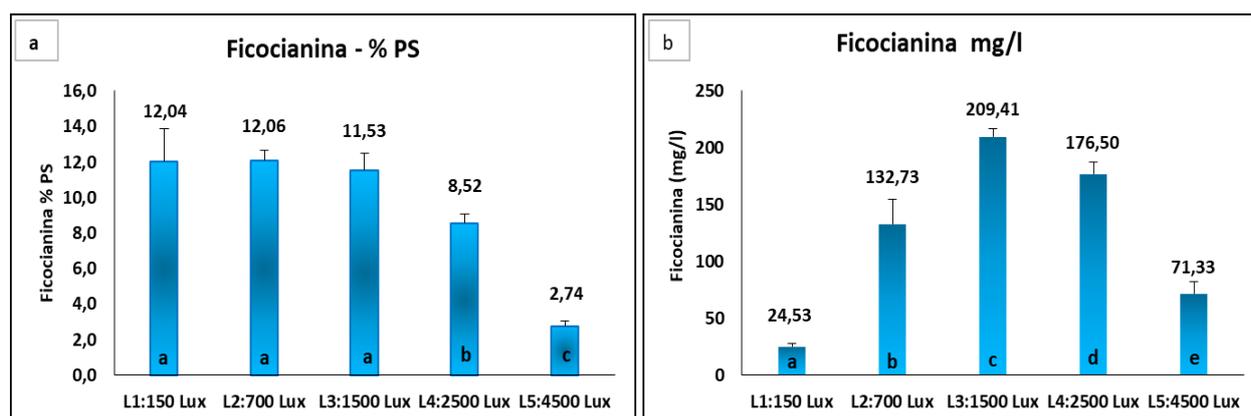


Figura 34: Contenido de ficocianina de *S. platensis* cultivada a distintas intensidades de luz, a) expresados como % PS, b) expresado como concentración (mg de ficocianina / l de cultivo). Los valores son el promedio \pm S.D, para $n = 3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p < 0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey.

En referencia al contenido porcentual de ficocianina, este disminuye con el aumento de la intensidad de la luz, desde un valor de 12.04 ± 1.83 %PS (condición L1:150 lux) hasta un valor de 2.74 ± 0.26 %PS (condición L5:4500 lux). Sin embargo, las bajas producciones de biomasa registradas en las condiciones L1 y L2, condujeron a la obtención de bajas concentraciones de ficocianina, 24.53 ± 2.86 mg/l y 132.73 ± 21.42 mg/l, respectivamente. La mayor producción de ficocianina (209.41 ± 7.29 mg/l) se obtuvo bajo la condición L3:1500 lux, la cual resultó similar al valor de 237 mg/l hallado a una intensidad de luz de 1700 lux en la cepa *S. platensis* Paracas cultivada en fotobiorreactores (Walter et al., 2011). En un reciente trabajo reportado por Lee et al. (2016), el contenido de ficocianina fue más elevado a intensidades de luz entre 25 y $75 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ (2000 y 6250 lux, respectivamente). A una intensidad de luz de $75 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ encontraron el máximo contenido de ficocianina (209 mg/l), que resultó similar al máximo encontrado en esta

investigación a una intensidad menor (1500 lux). Por el contrario, Chen et al. (2010), informaron que si bien una mayor intensidad de luz es mejor para la producción de biomasa, afecta negativamente a la producción de ficocianina en el caso de *S. platensis*.

En términos generales, la producción específica (%PS) de ficocianina se ve incrementada a bajas intensidades de luz, ya que al ser un pigmento accesorio, con el fin de aumentar la eficiencia fotosintética, este pigmento recolecta la energía de la luz a longitudes de onda donde las clorofilas absorben pobremente para luego transferir dicha energía a las clorofilas en las membranas tilacoidales (Xie et al., 2015; Eriksen, 2008; Kuddus et al., 2013). Por otro lado, de acuerdo con Raps et al. (1983), un aumento de la intensidad de la luz disminuye las concentraciones específicas (%PS) de clorofila y ficocianina. Esto es, a mayores intensidades de luz las células disminuyen la cantidad de membranas tilacoidales y ficobilisomas para disminuir la cantidad de energía radiante absorbida como sea posible (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993).

Respecto al contenido de clorofila (Figura 35), se puede observar una tendencia similar a la presentada en el contenido de ficocianinas. A bajas intensidades de luz, especialmente L1:150 Lux y L2:700 Lux, se obtuvieron los porcentajes más altos de clorofila (1.86 ± 0.21 % PS y 1.68 ± 0.05 % PS, respectivamente), mientras que bajo la condición L5: 4500 lux se encontró el mínimo valor porcentual (0.78 ± 0.04 %PS). Si se analiza el contenido total de clorofila por litro de cultivo, las condiciones L3:1500 lux y L4:2500 lux presentan las concentraciones más elevadas (27.21 ± 2.71 mg/l y 24.05 ± 3.97 mg/l).

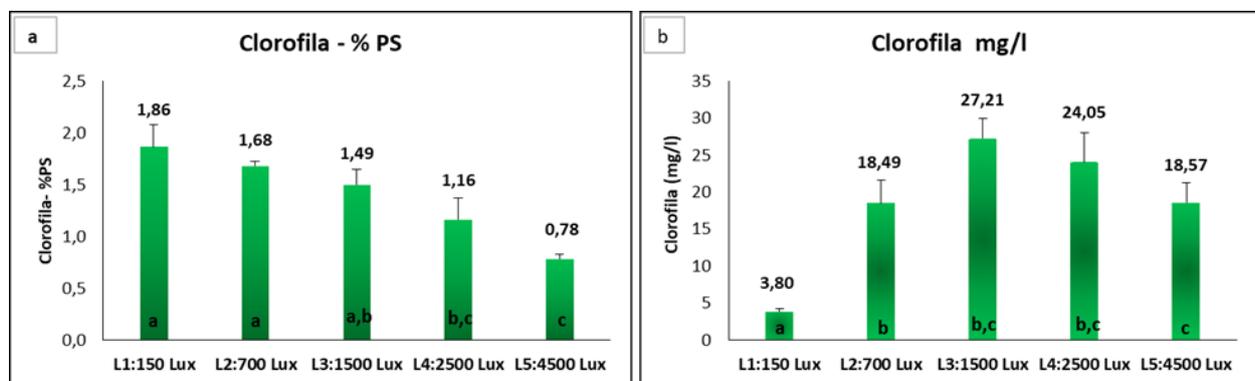


Figura 35: Contenido de clorofila de *S. platensis* cultivada a distintas intensidades de luz, a) expresado como % PS, b) expresado como concentración (mg de clorofila/l de cultivo)

Los valores son el promedio \pm S.D., para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p<0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

Los resultados son coincidentes con lo reportado por Danesi et al. (2004), quienes afirman que una mayor irradiancia en el cultivo de *S. platensis* favorece el crecimiento celular y disminuye el contenido de clorofila *a* de la biomasa. En cultivos de *Anabaena* PCC7120 se logró un aumento del contenido de clorofila *a* del 19,7 % al bajar la intensidad de la luz en un 34.5 % (Loreto et al., 2003). En el caso de *Nostoc* spp (de Oliveira et al., 2014), se encontró el mayor contenido de clorofila *a* fue producido en cultivos a baja intensidad de luz ($10 \mu\text{moles}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$). Además, cultivos de *S. platensis* expuestos a un rango de intensidad de luz entre

3000 y 5000 lux aumentaron el contenido de clorofila *a*, de 9.8 ± 0.07 mg/g a 14.2 ± 0.08 mg/g, a medida que se disminuyó la intensidad de la luz (Pandey et al., 2010).

La clorofila *a* desempeña un papel fundamental en la captura de energía lumínica cuando la disponibilidad de luz es baja. A bajas intensidades de luz, las células promueven el aumento de las membranas tilacoides y de los ficobilisomas para capturar la mayor cantidad de energía radiante posible (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993).

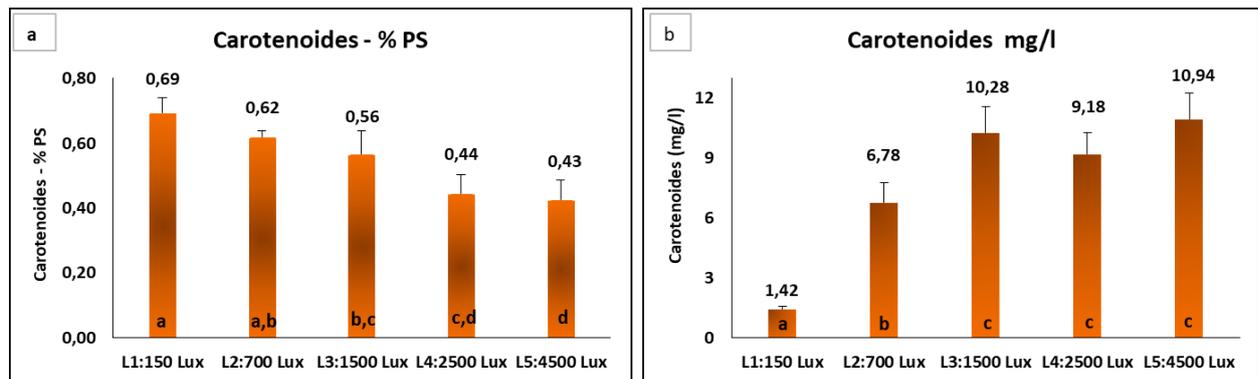


Figura 36: Contenido de carotenoides de *S. platensis* cultivada a distintas intensidades de luz, a) expresado como % PS, b) expresado como concentración (mg de carotenoides/l de cultivo)

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n = 3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p < 0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

El contenido de carotenoides (Figura 36), presenta el mismo patrón que los otros pigmentos estudiados. A la intensidad de luz más baja se obtuvo el máximo porcentaje de carotenoides (0.69 ± 0.05 %PS), mientras que a la máxima intensidad de luz se registró el valor más bajo (0.43 ± 0.06 %PS). La mayor concentración de carotenoides se obtuvo en la condición L5:4500 lux, el cual resultó de 10.94 ± 1.30 mg/l.

En condiciones de poca luz, los carotenoides funcionan como pigmentos accesorios de antena en la absorción de la luz, lo que incrementa la eficacia de la fotosíntesis. Esta función se lleva a cabo porque los carotenoides están cercanos de las moléculas de clorofila *a* en los fotosistemas y transfieren la energía absorbida a estas últimas (de Oliveira et al., 2014). Por lo tanto, los niveles reducidos de carotenoides en las intensidades de luz más altas, indicarían que el aumento en el contenido de pigmentos ya no resulta necesario ya que la luz se encontró cada vez más disponible. Como consecuencia, la mayor disponibilidad de energía lumínica provocó una disminución en el contenido de carotenoides.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que una selección adecuada de la intensidad de la luz no solo podría conducir a una mayor producción de biomasa microalgal, sino que representaría una variable esencial para manipular la composición bioquímica y la producción de pigmentos en cultivos de *S. platensis*.

5.4 Efecto de las longitudes de onda sobre cultivos de *S. platensis*

Se evaluaron los efectos de varios colores de la luz (longitudes de onda) sobre el crecimiento, la composición química y el contenido de pigmentos de cultivos de *S. platensis*.

5.4.1 Producción de biomasa y parámetros de crecimiento

El crecimiento y la producción de biomasa de *S. platensis* se vieron influenciados por las distintas longitudes de onda aplicadas (Figura 37). Las máximas producciones de biomasa se obtuvieron en presencia de luz roja (LR) y luz amarilla (LY), lo que representó un aumento del 38.4 % y del 43.6 %, respectivamente, en comparación con la condición control (LC) (1.72 ± 0.08 g PS/l). Por otro lado, la aplicación de luz verde (LG) disminuyó la producción de biomasa en un 42.4 % en relación a la luz blanca control (LC), mientras que la luz azul (LB) acrecentó esa disminución hasta un 74.4 %, alcanzándose una concentración mínima de biomasa de 0.44 ± 0.05 g PS/l.

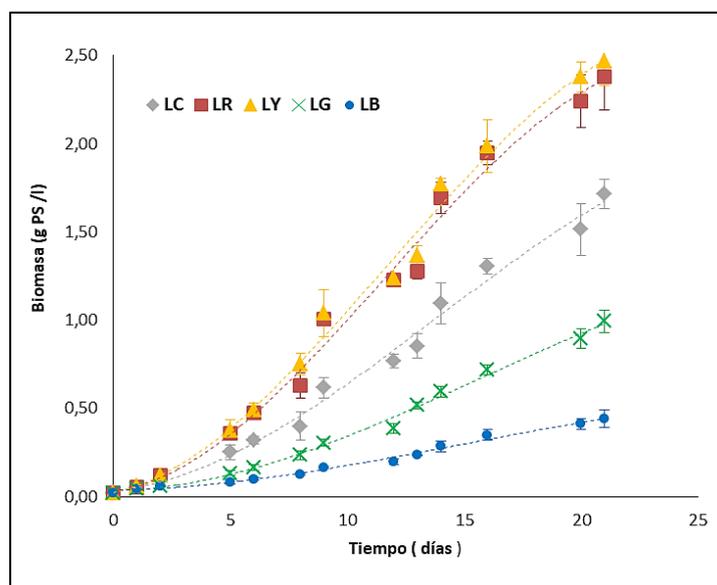


Figura 37 : Curvas de crecimiento de *S. platensis* a distintas longitudes de onda (LR=luz roja, LY=luz amarilla, LG=luz verde, LB=luz azul, LC=luz blanca control) Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$

En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos de los principales parámetros de crecimiento de *S. platensis* bajo diferentes longitudes de onda. Como se puede observar, la velocidad específica de crecimiento (μ), no presentó diferencias significativas entre las condiciones de luz amarilla y la luz roja. La luz amarilla presentó el valor máximo de μ lo que representó un aumento del 22.6 % respecto del control (luz blanca). Se observó una disminución significativa de la μ del 16.7 % y 41.6 % cuando se aplicaron la luz verde y la luz azul, respectivamente.

Tabla 18: Parámetros de crecimiento de *S. platensis* a distintas longitudes de onda (LR=luz roja, LY=luz amarilla, LG=luz verde, LB=luz azul, LC=luz blanca control)

Condición	Biomasa (g PS/l)	μ (día ⁻¹)	Td (día)	IC
Control (LC)	1.72 ± 0.08 ^a	0.24 ± 0.01 ^{a,b}	2.84 ± 0.10 ^{a,b}	72.72 ± 3.63 ^a
Luz Roja (LR)	2.38 ± 0.19 ^b	0.30 ± 0.02 ^a	2.35 ± 0.19 ^a	101.39 ± 8.10 ^b
Luz Amarilla (LY)	2.47 ± 0.14 ^b	0.31 ± 0.02 ^a	2.22 ± 0.13 ^a	105.08 ± 5.95 ^b
Luz Verde (LG)	0.99 ± 0.07 ^c	0.20 ± 0.01 ^b	3.37 ± 0.14 ^b	41.71 ± 2.81 ^c
Luz Azul (LB)	0.44 ± 0.05 ^d	0.14 ± 0.01 ^c	4.84 ± 0.34 ^c	17.98 ± 2.10 ^d

Los valores son el promedio ± S.D, para n =3. Letras diferentes representan valores significativamente ($p < 0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey.

El crecimiento de *S. platensis* bajo diferentes longitudes de onda es posible dada la presencia de distintos pigmentos (clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas) que, como se muestra en la Figura 8, permiten la captación de energía en varias regiones del espectro de luz visible. Esta mezcla característica de pigmentos de *S. platensis*, absorbe más luz incidente cerca de longitudes de onda entre 620 nm a 670 nm (luz roja), siendo estas longitudes las más eficientes para llevar a cabo la fotosíntesis por parte de las microalgas (Wang et al., 2007), y por ende, las de mayor producción de biomasa, tal como se observó en la Figura 37. Por otro lado, a pesar de que la clorofila *a* presenta otro pico de absorción en la región correspondiente a la luz azul (435 nm), varios autores (Vijaya y Anand, 2009; Wang et al., 2007; Walter et al., 2011), coinciden en que la menor eficiencia en la conversión de fotones (baja eficiencia fotosintética), resultó bajo la incidencia de la luz azul, por lo cual el crecimiento en dicha condición resulta mínimo. Por otro lado, la luz de otros colores solo puede ser parcialmente absorbida y utilizada para la fotosíntesis.

Se podría deducir a partir de estos resultados, que la banda del espectro de emisión de la luz amarilla tiene una gran superposición con la de la luz roja. Mientras tanto, la banda del espectro de luz verde solo se superpone mínimamente con la de la luz azul. Esta podría ser la razón por la cual el índice de crecimiento con luz amarilla fue similar a la presentada con luz roja, mientras que con luz verde se presentaron valores intermedios entre el control (luz blanca) y la luz azul.

Los resultados encontrados son coincidentes con los reportados por Markou (2014), cuya producción de biomasa de *S. platensis* aumentó un 58 % utilizando luces LED de color rojo y disminuyó un 64% utilizando luces LED de color azul. Además, Chen et al. (2010) y Wang et al. (2007), quienes estudiaron la influencia de los colores azul, verde, rojo, amarillo y blanco en cultivos discontinuos de *A. Platensis*, informaron que el uso de luces LED rojas produjeron las tasas de crecimiento más altas, mientras que las tasas de crecimiento más bajas se obtuvieron bajo luces LED azules.

En el caso de la cepa de *S. platensis* TISTR 8172, la luz blanca generó la mayor producción de biomasa (0.96 ± 0.08 g/l) frente a lo obtenido bajo luz roja (0.86 ± 0.04 g/l) y amarilla (0.89 ± 0.03 g/l). Igualmente, la menor producción de biomasa se obtuvo bajo luz azul (0.63 ± 0.06 g/l) (Chainapong et al., 2012). La diferencia entre la concentración de biomasa obtenida por estos autores y la cepa LMPA55 de la presente

investigación se debe fundamentalmente al sistema de cultivo empleado (fotobiorreactores vs Erlenmeyers), y la fuente de luz (luz solar con aplicación de filtros vs. tubos fluorescentes de colores).

En contraste, un estudio realizado por Madhyastha y Vatsala (2007) en *S. fussiformis*, muestra que el crecimiento se vio inhibido a los 6 días de cultivo frente a la luz roja y la luz amarilla, mientras que bajo otras condiciones de luz (blanca, azul y verde) no se observaron cambios significativos en la producción de biomasa. En otro estudio realizado por Kumari et al. (2014), sobre cultivos de *S. platensis* NCIM-5143, el uso de luces LED de color azul originó la mayor producción de biomasa (1200 mg/l). Estos últimos resultados demuestran que no todas las especies y cepas del género *Spirulina* se comportan de la misma manera, siendo fundamentales los mecanismos de adaptación intrínsecos a las distintas condiciones ambientales.

5.4.2 Composición bioquímica de la biomasa

En relación a la composición bioquímica de *S. platensis*, como se puede observar en la Figura 38, el contenido porcentual de proteínas resultó mayor en la condición control con iluminación de luz blanca (44.28 ± 1.14 % PS), aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre dicha condición y lo obtenido bajo luz roja y amarilla. Ya que la mayor producción de biomasa se registró en estas últimas condiciones, la concentración de proteínas (mg/l) se hizo máxima bajo luz amarilla (1023.35 ± 119.82 mg/l). Por el contrario, la luz verde y azul mostraron un efecto negativo sobre el contenido proteico, no solo en su contenido porcentual (30.29 ± 5.47 % PS y 32.28 ± 4.53 % PS, respectivamente), sino también en su concentración (299.14 ± 38.39 mg/l y 141.66 ± 15.31 mg/l, respectivamente).

Respecto de los resultados informados para la condición de luz azul, los mismos coinciden a lo informado por Markou (2014) y Ravelonandro et al. (2008), quienes también observaron el mínimo porcentaje de proteínas en cultivos de *S. platensis*. No obstante, ambos autores reportaron que con luz verde el porcentaje de proteínas fue similar al obtenido bajo luz blanca, mientras que bajo luz roja el contenido proteico fue menor que el control de luz blanca. El trabajo de Kumari et al. (2014), no presentó diferencias respecto al contenido porcentual de proteínas de *S. platensis* bajo diferentes longitudes de onda ensayadas (luz blanca, luz roja, luz verde, luz amarilla y luz azul).

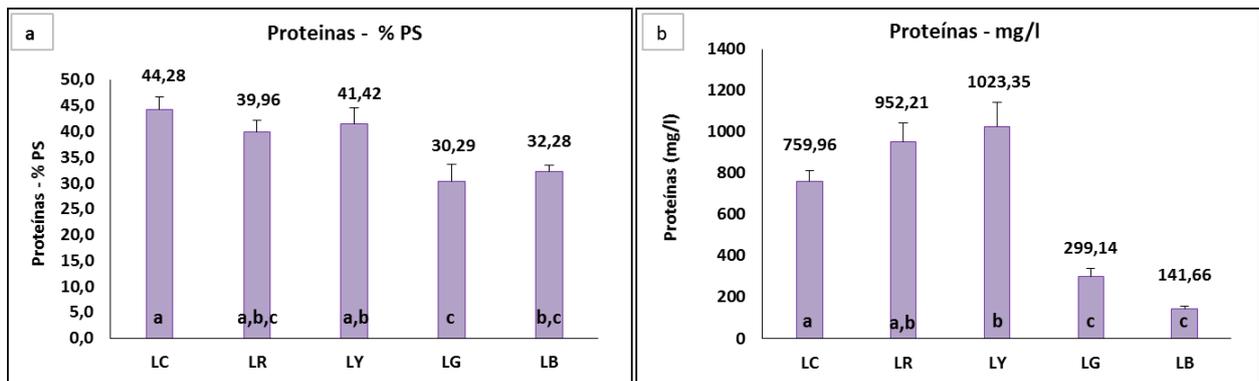


Figura 38: Contenido de proteínas de *S. platensis* cultivada a distintas longitudes de onda, a) expresado como % PS, b) expresado como concentración (mg de proteínas / l de cultivo). (LR=luz roja, LY=luz amarilla, LG=luz verde, LB=luz azul, LC=luz blanca control)
 Los valores son el promedio \pm S.D, para n =3. Letras diferentes representan valores significativamente ($p < 0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

El porcentaje de lípidos de cultivos de *S. platensis* (Figura 39), aumentó un 40.03 % en presencia de luz azul y un 21 % bajo luz roja en relación al control de luz blanca (6.62 ± 0.13 % PS). Aunque si se expresa ese contenido de lípidos en función del volumen del cultivo (mg/l), se obtiene la mínima concentración de lípidos en presencia de luz azul (40.65 ± 0.30 mg/l), y la máxima concentración bajo la luz roja (191.36 ± 18.27 mg/l). En presencia de luz amarilla y luz verde, el contenido porcentual de lípidos no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al control. Al igual que en el contenido de proteínas, el estudio realizado por Kumari et al. (2014), no mostró diferencias significativas en la producción de lípidos bajo distintas longitudes de onda.

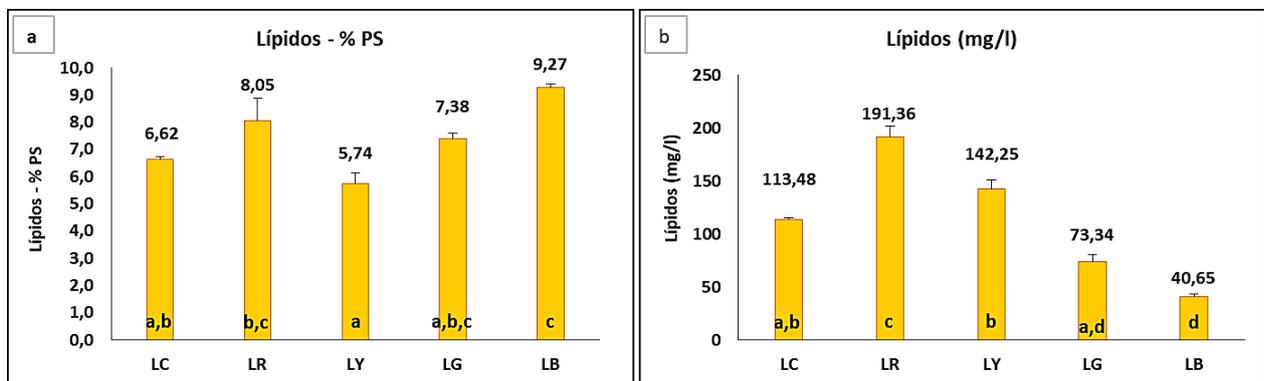


Figura 39: Contenido de lípidos de *S. platensis* cultivada a distintas longitudes de onda, a) expresado como % PS, b) expresado como concentración (mg lípidos / l de cultivo). (LR=luz roja, LY=luz amarilla, LG=luz verde, LB=luz azul, LC=luz blanca control)
 Los valores son el promedio \pm S.D, para n =3. Letras diferentes representan valores significativamente ($p < 0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

En referencia al contenido de carbohidratos (Figura 40), el porcentaje obtenido bajo la condición de luz azul (15.90 ± 2.14 % PS) es la única que mostró una diferencia significativa respecto al control (9.00 ± 0.53 % PS) en los cultivos de *S. platensis*. Aunque, como ocurrió con las demás macromoléculas, la producción volumétrica (mg/l) resultó mínima (69.62 ± 4.93 mg/l). Estos incrementos porcentuales en el contenido de lípidos y carbohidratos detectados en presencia de luz azul resultaron coincidentes con lo hallado por Markou (2014) en cultivos de *S. platensis*.

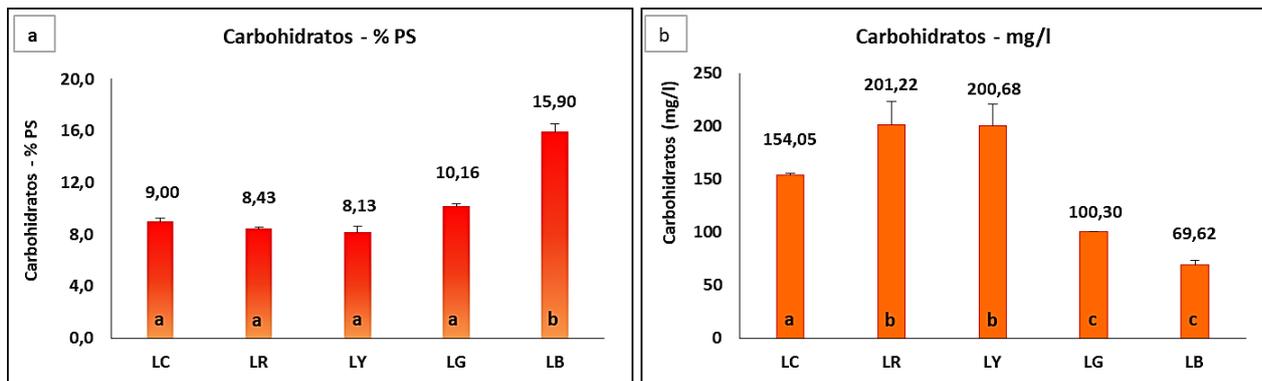


Figura 40: Contenido de carbohidratos de *S. platensis* cultivada a distintas longitudes de onda, a) expresado como % PS, b) expresado como concentración (mg carbohidratos / l de cultivo) (LR=luz roja, LY=luz amarilla, LG=luz verde, LB=luz azul, LC=luz blanca control) Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p<0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

Los diversos componentes de la biomasa, como los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, se sintetizan por diferentes vías metabólicas después de varios pasos enzimáticos que consumen energía. Para la síntesis de carbohidratos, solo se necesitan cinco pasos enzimáticos, por lo que los carbohidratos consumen menos energía, mientras que los lípidos demandan más energía porque doce etapas enzimáticas están involucradas para su síntesis. En el caso de las proteínas, su síntesis es más complicada y consume más energía. Basado en el consumo de energía, una expectativa lógica es que en presencia de colores que no proporcionan suficientes fotones (energía), la composición de la biomasa se ajustaría y se sintetizarían menos compuestos que demanden más energía (Markou, 2014). En este caso, la composición de la biomasa de *S. platensis* se ajustaría a la baja eficiencia fotosintética de la luz azul, produciendo una disminución del contenido proteico, y acumulando reservas bajo la forma de lípidos y carbohidratos.

5.4.3 Producción de pigmentos

En cuanto a la producción de pigmentos de *S. platensis*, como se puede observar en la Figura 41, el contenido porcentual de ficocianina se vio modificado principalmente por acción de la luz azul y la luz roja. En la condición control se obtuvo un contenido de ficocianina del 10.30 ± 0.79 % PS, mientras que el cultivo bajo luz azul alcanzó el máximo porcentaje de dicho pigmento (14.50 ± 0.18 % PS), siendo este último muy similar al alcanzado por el cultivo expuesto a luz roja (14.21 ± 0.54 % PS). El porcentaje mínimo de ficocianina se registró en presencia de luz verde (9.49 ± 0.11 % PS), aunque dicho valor no representó una diferencia significativa respecto al control. Evaluando la concentración de ficocianina (mg/l), la mayor producción se observó bajo el tratamiento con luz roja (337.90 ± 15.15 mg/l), lo que representa un aumento del 47.68 % respecto de la condición control.

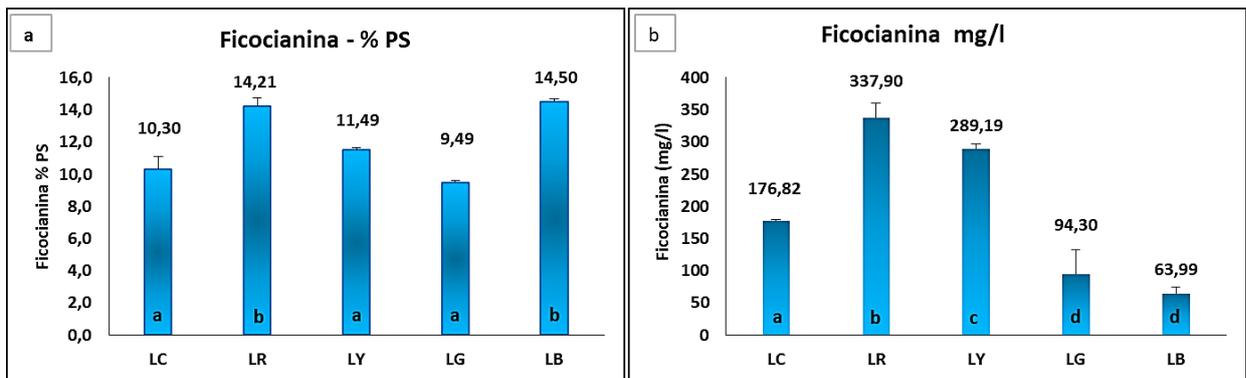


Figura 41: Contenido de ficocianina de *S. platensis* cultivada a distintas longitudes de onda, a) expresado como % PS, b) expresado como concentración (mg de ficocianina / l de cultivo). (LR=luz roja, LY=luz amarilla, LG=luz verde, LB=luz azul, LC=luz blanca control)
 Los valores son el promedio \pm S.D, para n =3. Letras diferentes representan valores significativamente ($p < 0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

El contenido de clorofila no se vio afectado por las distintas longitudes de onda, como se muestra en la Figura 42. A pesar de esto, se pudo registrar un valor máximo en la condición control (1.18 ± 0.03 % PS) y un mínimo en presencia de luz verde (0.89 ± 0.15 % PS).

En relación al contenido de carotenoides (Figura 43), se detectó una disminución del 27.5 % por acción de la luz roja. No obstante, la luz azul y luz verde (0.39 ± 0.03 % PS y 0.34 ± 0.04 % PS, respectivamente), no causaron modificaciones en el contenido porcentual en comparación con el control de luz blanca (0.40 ± 0.01 % PS).

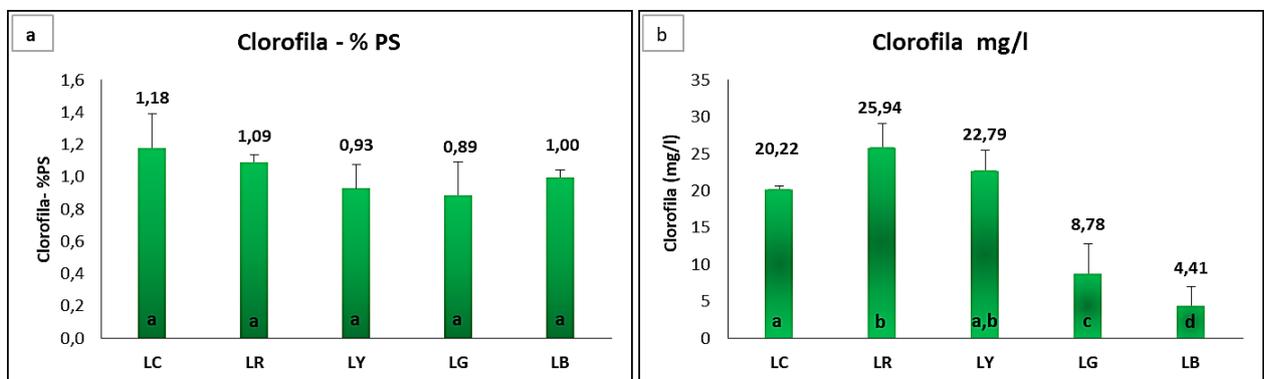


Figura 42: Contenido de clorofila de *S. platensis* cultivada a distintas longitudes de onda, a) expresado como % PS, b) expresado como concentración (mg de clorofila / l de cultivo). (LR=luz roja, LY=luz amarilla, LG=luz verde, LB=luz azul, LC=luz blanca control)
 Los valores son el promedio \pm S.D, para n =3. Letras diferentes representan valores significativamente ($p < 0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

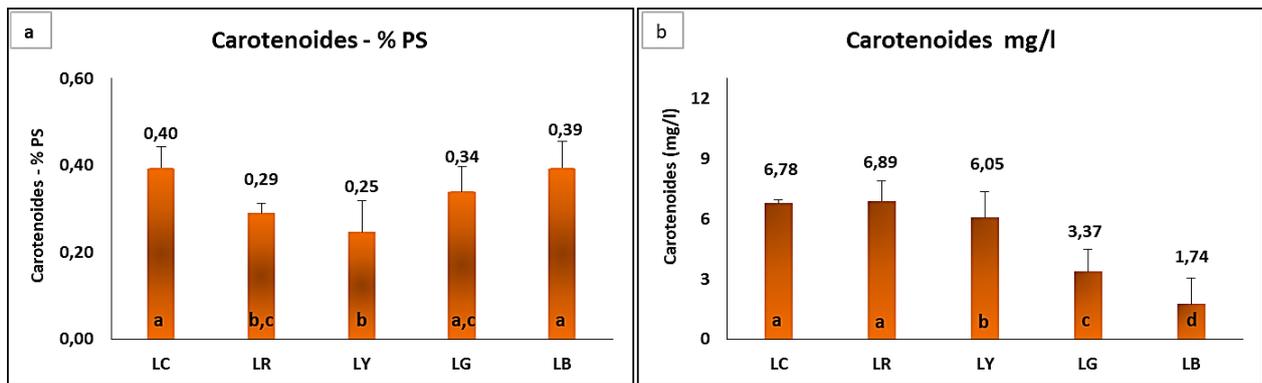


Figura 43: Contenido de carotenoides de *S. platensis* cultivada a distintas longitudes de onda, a) expresado como % PS, b) expresado como concentración (mg carotenoides / l de cultivo). (LR=luz roja, LY=luz amarilla, LG=luz verde, LB=luz azul, LC=luz blanca control) Los valores son el promedio \pm S.D., para $n=3$. Letras diferentes representan valores significativamente ($p<0,05$) diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

De forma análoga a la producción de ficocianina, las concentraciones de clorofila y carotenoides exhibieron los valores más elevados (25.94 ± 2.19 mg/l y 6.89 ± 0.25 mg/l, respectivamente) en presencia de luz roja.

El efecto de las distintas longitudes de onda sobre la composición de pigmentos de *S. platensis* es comparable con lo informado por Chainapong et al. (2012), quien también obtuvo los máximos porcentajes de ficocianina en las condiciones de luz roja y azul. Además, no registró diferencias en el contenido de clorofila y carotenoides, lo cual marca una diferencia respecto a lo hallado en este trabajo. De acuerdo a lo reportado por Markou (2014), el uso de luces LED de color azul incrementó el porcentaje de ficocianina hasta un 17.6 % en cultivos de *S. platensis*, mientras que con luces de color rojo el porcentaje fue similar al obtenido bajo luz blanca. Además, según Walter et al. (2011), el uso de filtros de luz roja disminuyó la cantidad de ficocianina obtenida en un 16% en comparación con el cultivo estándar. Sin embargo, la pureza de la ficocianina resultó un 30% mejor.

Los principales pigmentos fotosintéticos de *S. platensis* son la ficocianina y la clorofila *a*, mientras que los carotenoides también pueden estar contenidos en cantidades considerables. La ficocianina presenta un pico de absorción a los 620 nm (Figura 15), por lo cual es de esperar que este pigmento fotosintético aumente al estar en presencia de la luz roja. Generalmente, el pigmento que absorbe las longitudes de onda de la luz incidente se vuelve más predominante (Bennett y Bogorad, 1973). En forma similar ocurre con el contenido de carotenoides, donde la luz azul (450-495 nm) y la luz verde (495-570nm) coinciden con los picos de absorción de dichos pigmentos. Mientras que la iluminación con luz roja y amarilla producen un menor porcentaje dado que emiten en zonas más alejadas del espectro.

La alta producción de ficocianina bajo luz azul indicaría que esta cepa es capaz de realizar procesos de aclimatación cromática, es decir, que es capaz de modificar sus características de absorción de la luz para regular y acompañar a los procesos fotosintéticos (Vijaya y Anand, 2009). Mientras que, para Chen et al. (2010), indicaría que el lento crecimiento de las algas bajo luz azul favorecería la síntesis de ficocianina.

El uso de tubos fluorescentes de colores no proporciona picos de emisión bien definidos, a diferencia de las luces LED monocromáticas, sino que probablemente emiten en un rango, lo cual no permite sacar conclusiones respecto a lo que realmente sucede con las zonas medias del espectro visible (luz amarilla y verde). Se considera que otros estudios que utilizan fuentes de luz con un espectro de emisión más estrecho pueden proporcionar un mayor control de la misma, lo que permitiría analizar con más certeza los efectos ocasionados bajo dichas condiciones.

El cultivo realizado en presencia de luz roja, presentaría una alternativa interesante para el cultivo de *S. platensis*, no solo teniendo como objeto una mayor producción de biomasa microalgal, sino también para incrementar la obtención de compuestos de alto valor agregado, como la ficocianina. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para la obtención de estos resultados, tuvieron que utilizarse cuatro tubos de luz fluorescente (como fue informado en la sección 4.7.3), mientras que bajo la condición control de luz blanca solamente fueron utilizados dos tubos fluorescentes. Esto traería como consecuencia un mayor gasto energético, que resultaría el doble bajo una condición de luz roja en relación a la aplicación de luz blanca.

5.5 Cultivo de *S. platensis* en dos etapas

Teniendo en cuenta que, las condiciones de cultivo para una óptima producción de biomasa microalgal difieren de las condiciones que optimizan la producción de algún metabolito de interés (Colla et al., 2007), y en base a los resultados obtenidos, resultó interesante evaluar los efectos de la aplicación en dos etapas de las condiciones de cultivo analizadas previamente sobre cultivos de *S. platensis*. Esto es, promover el cultivo bajo una condición de luz inicial que favorezca el crecimiento, y posteriormente transferir la biomasa producida a otra condición que favorezca la producción de algún pigmento de interés.

Para ello, se evaluaron dos condiciones: por un lado estimular la producción de biomasa a una intensidad de luz de 2500 lux, y luego favorecer la producción de pigmentos sometiendo a los cultivos de *S. platensis* a una baja intensidad de luz (700 lux), ó a un cambio de λ (la presencia de luz azul).

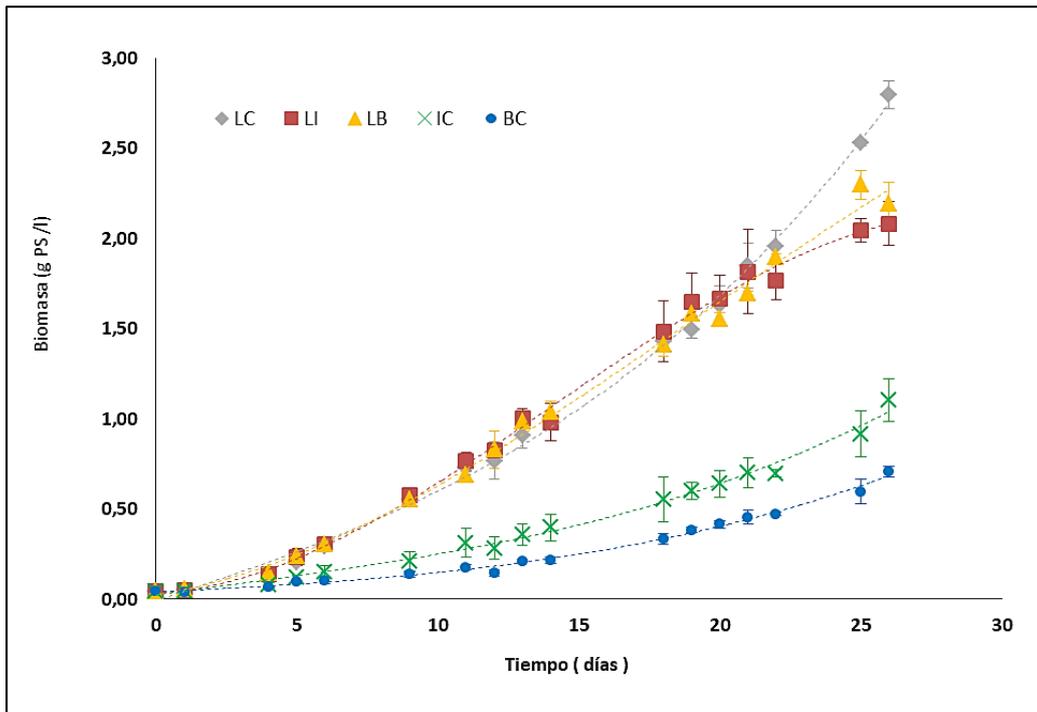


Figura 44 : Curvas de crecimiento de *S. platensis* cultivadas en dos etapas. LC: condición control a 2500 lux, IC: condición control a 700 lux, BC condición control bajo luz azul, LI: cultivo en dos etapas (primera etapa: 2500 lux + segunda etapa: 700 lux) y LB: cultivo en dos etapas (primera etapa: 2500 lux + segunda etapa: luz azul). Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$.

En la Figura 44 se pueden observar las curvas de crecimiento de *S. platensis* cultivadas en dos etapas. En ellas, se puede apreciar que desde el día 0 y hasta el día 19 (previo al cambio de condición de cultivo en una segunda etapa), las curvas LC, LI y LB presentaron un crecimiento similar. Mientras que en las curvas obtenidas a baja intensidad de luz (IC) y en presencia de luz azul (BC) el crecimiento fue notablemente menor en el mismo período de cultivo.

Posterior al día 19 y hasta el día 26, los cultivos que funcionaron como control (LC, IC y BC), incrementaron aún más la producción de biomasa como lo venían haciendo desde el inicio del cultivo. Sin embargo, los cultivos que fueron cambiados de condición en una segunda etapa (LI y LB), disminuyeron su tasa de crecimiento, las cuales resultaron menores al cultivo control (LC).

Tabla 19: Parámetros de crecimiento obtenidos en cultivos de *S. platensis* realizados en dos etapas.

Condición	Primera Etapa		Segunda Etapa	
	Biomasa g PS/l	IC	Biomasa g PS/l	IC
	Día 19	Día 1 al 19	Día 26	Día 19 al 26
Control (LC)	1.50 \pm 0.05 ^a	34.38 \pm 0.37	2.80 \pm 0.08 ^a	0.87 \pm 0.09
Cambio de Intensidad (LI)	1.65 \pm 0.16 ^a	35.86 \pm 3.82	2.08 \pm 0.12 ^b	0.27 \pm 0.05
Cambio de λ (LB)	1.58 \pm 0.03 ^a	36.21 \pm 0.82	2.19 \pm 0.12 ^b	0.39 \pm 0.06
Control Intensidad (IC)	0.60 \pm 0.05 ^b	13.51 \pm 1.18	1.10 \pm 0.12 ^c	0.83 \pm 0.07
Control Azul (BC)	0.38 \pm 0.01 ^c	8.27 \pm 0.30	0.71 \pm 0.03 ^c	0.84 \pm 0.02

Los valores son el promedio \pm S.D, para $n=3$. Dentro de la misma columna, letras diferentes representan valores significativamente diferentes, según prueba de rangos múltiples de Tukey

Como se muestra en la Tabla 19, al día 19 donde se efectuó el cambio de condición, los cultivos (LC, LI y LB) presentaron una concentración de biomasa microalgal similar (1.50 ± 0.05 g PS/l, 1.65 ± 0.16 g PS/l y 1.58 ± 0.03 g PS/l, respectivamente). Por otra parte, los índices de crecimiento (IC) de los cultivos BC e IC, resultaron considerablemente menores en comparación con el índice de crecimiento de los cultivos control (LC), lo que se corresponde con los menores valores de biomasa obtenidos al día 19. Asimismo, el análisis de lo ocurrido desde el día 19 hasta el día 26 (segunda etapa), reveló que los cambios de condición de los cultivos LI y LB (700 lux y luz azul, respectivamente), generaron índices de crecimiento mucho menores que los obtenidos en las condiciones control (LC, IC y BC).

El contenido de los pigmentos (ficocianina, clorofila y carotenoides), fue llevado a cabo al final de la primera etapa (día 19), y posteriormente a los días 21 y 26, con el objeto de verificar si durante la segunda etapa se modificaban las cantidades de los mismos.

Como se puede ver en la Figura 45, el contenido porcentual de ficocianina de *S. platensis* no presentó cambios en los cultivos sometidos a dos etapas (LI y LB) en relación al cultivo control (LC). Esto es, 10.36 ± 0.06 % PS y 9.72 ± 0.49 % PS, para los cultivos LI y LB respectivamente, a los 26 días de cultivo, en comparación con los 10.32 ± 0.44 % PS correspondientes a la condición control (LC) en el mismo período de tiempo.

La máxima concentración de ficocianina se encontró en la condición control a los 26 días de cultivo, siendo el mismo de 285.13 ± 7.43 mg /l, a raíz de la concentración de biomasa producida bajo estas condiciones.

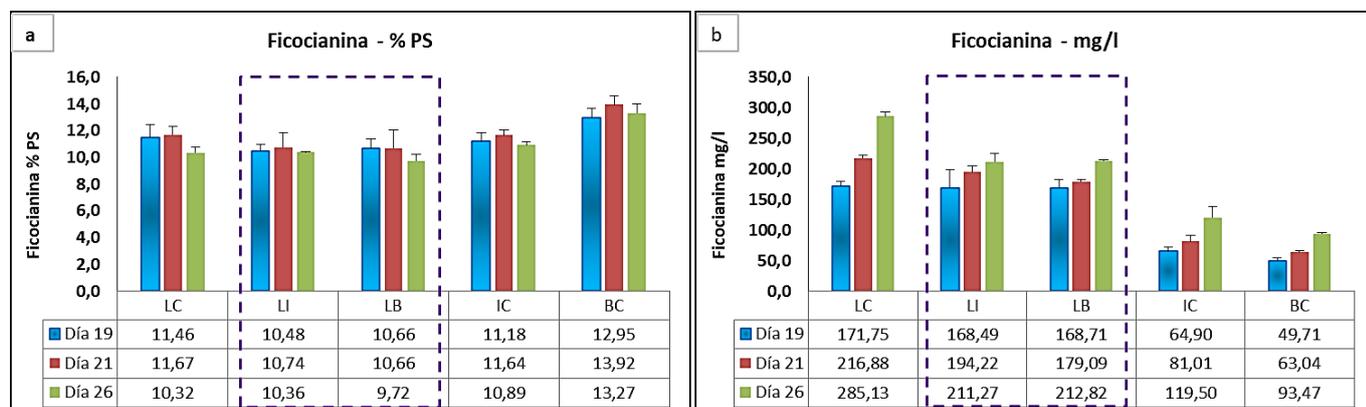


Figura 45 : Contenido de ficocianina de *S. platensis* cultivada en dos etapas, a) expresado en % PS, b) expresado como concentración (mg /l de cultivo). El recuadro punteado indica los resultados de los cultivos sometidos a dos etapas. Los valores son el promedio \pm S.D, para n =3

En la Figura 46 y Figura 47 se muestran los resultados respecto al contenido de clorofila y carotenoides de *S. platensis*. Al igual que lo ocurrido con el contenido de ficocianina, los resultados no fueron los esperados, ya que no se produjo un incremento en la producción de estos pigmentos en los cultivos sometidos a dos etapas (LI y LB) en relación al control (LC).

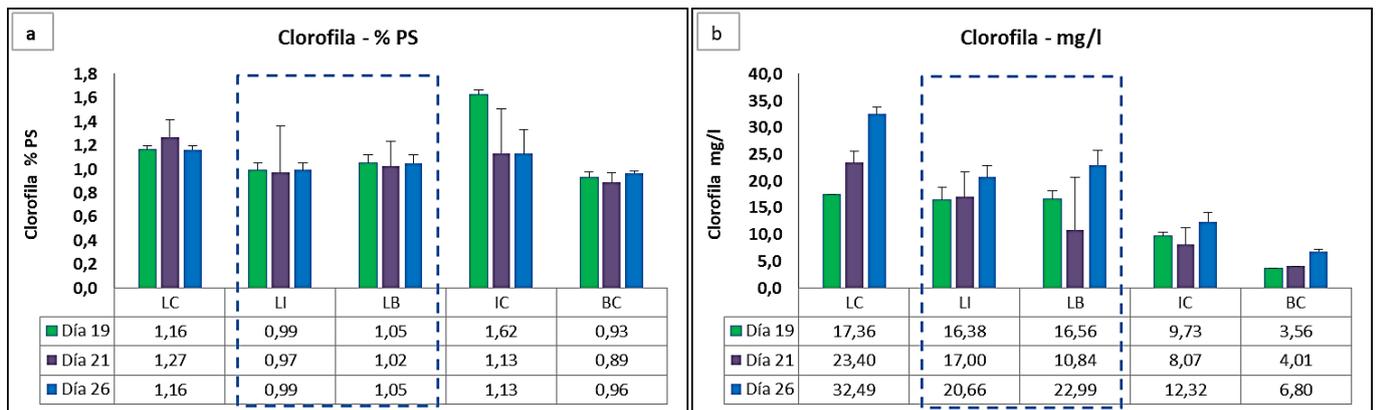


Figura 46 : Contenido de clorofila de *S. platensis* cultivada en dos etapas, a) expresado en % PS, b) expresado como concentración (mg / l de cultivo)
El recuadro punteado indica los resultados de los cultivos sometidos a dos etapas
 Los valores son el promedio \pm S.D, para n =3

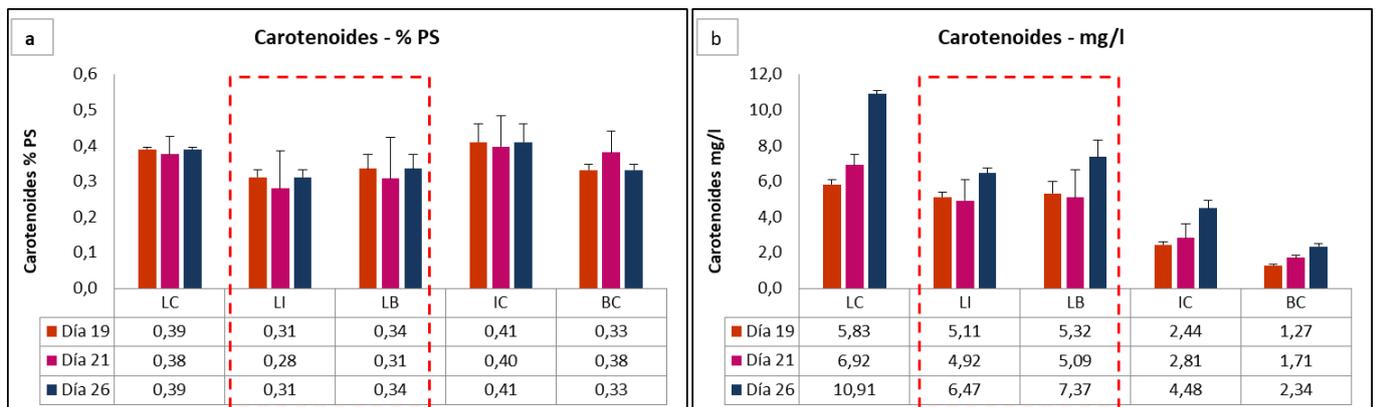


Figura 47 : Contenido de carotenoides de *S. platensis* cultivada en dos etapas, a) expresado en % PS, b) expresado como concentración (mg / l de cultivo)

El recuadro punteado indica los resultados de los cultivos sometidos a dos etapas
 Los valores son el promedio \pm S.D, para n =3

En un estudio realizado por Danesi et al. (2004), se observaron incrementos de hasta un 29% en la producción total de clorofila de cultivos de *S. platensis* a los que se les redujo la intensidad de la luz (de 5000 lux a 2000 lux), en comparación con cultivos realizados a intensidades de luz fija. En este trabajo, el cambio de intensidad de luz fue realizado a los 9 días de cultivo, a diferencia de nuestros experimentos en donde la segunda etapa comenzó a los 19 días de cultivo. Es muy probable, que la ausencia de diferencias significativas observadas en el contenido de los pigmentos, pueda deberse a esta diferencia de duración entre la primera y segunda etapa de cultivo. El inicio tardío de la segunda etapa en el día 19, podría haber afectado los mecanismos de adaptación de la cepa a las nuevas condiciones de cultivo, por lo cual sería recomendable realizar este cambio durante una fase temprana de crecimiento.

A pesar de que los resultados obtenidos no fueron los esperados, el cultivo de *S. platensis* llevado a cabo en dos etapas con cambios en las condiciones de luz, representaría una alternativa viable e interesante para modificar la producción de sus pigmentos. No obstante, esta estrategia necesita ser estudiada en profundidad.

6 Conclusiones

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

- Las condiciones lumínicas evaluadas en el presente trabajo (fotoperíodo, intensidad de la luz y longitudes de onda) afectaron a los cultivos de *S. platensis*, y permitirían no solo incrementar la producción de la biomasa sino también controlar la composición de la misma e inducir la producción de los pigmentos de interés (ficocianina, clorofila y carotenoides).
- Un fotoperíodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad resultaría una opción válida para la producción de biomasa, lípidos y ficocianina en cultivos de *S. platensis*.
- El uso de luz continua podría considerarse una alternativa para incrementar la producción de biomasa y carotenoides en cultivos de *S. platensis*. Sin embargo, implicaría un mayor costo energético en comparación con los procesos que poseen ciclos de luz y oscuridad.
- Tanto la intensidad de la luz como la cantidad de horas de exposición a la misma estarían en relación con la velocidad específica de crecimiento de esta cepa de *S. platensis*.
- En relación a la intensidad de la luz, las condiciones de cultivo para una óptima producción de biomasa microalgal difieren de las condiciones que optimizan la producción de algún metabolito en cultivos de *S. platensis*.
- Una intensidad de luz de 1500 lux, representaría una opción para obtener una considerable cantidad de biomasa e incrementar la producción de ficocianina, sin afectar la composición bioquímica de los cultivos de *S. platensis*.
- La aplicación de una baja intensidad de luz (150 lux), o de luz azul, serían una alternativa para estimular la producción de lípidos, carbohidratos y pigmentos en cultivos de *S. platensis*. No obstante, bajo estas condiciones el crecimiento se encuentra limitado.
- La aplicación de luz roja sobre cultivos de *S. platensis* favorecería la producción de biomasa e incrementaría el contenido de lípidos y ficocianina, pero a un costo mayor de gasto energético.
- Los cultivos de *S. platensis* realizados en dos etapas de condiciones lumínicas, no respondieron con un aumento del contenido pigmentario. Esto podría deberse al inicio tardío de la segunda etapa, la cual podría haber afectado los mecanismos de adaptación de la cepa a las nuevas condiciones de cultivo.
- Si bien los resultados obtenidos no fueron los esperados, el cultivo de *S. platensis* llevado a cabo en dos etapas con cambios en las condiciones de luz, representaría una alternativa viable e interesante para modificar la producción de sus pigmentos. No obstante, esta estrategia necesita ser estudiada en profundidad.

7 Bibliografía

- Abalde, J., Fabregas, J., & Herrero, C. (1991). β -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Bioresource technology*, 38(2-3), 121-125.
- Allen, M. M., & Smith, A. J. (1969). Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Archiv für Mikrobiologie*, 69(2), 114-120.
- Al-Qasmi, M., Raut, N., Talebi, S., Al-Rajhi, S., & Al-Barwani, T. (2012, July). A review of effect of light on microalgae growth. In *Proceedings of the world congress on engineering* (Vol. 1, pp. 4-6).
- Anderson, R.A., 2005. *Algal Culturing Techniques*. Academic Press Publication, West Boothbay Harbor.
- Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., & Wahidin, S. (2013). Intensity of blue LED light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, 148, 373-378.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology*, 58(2), 419-435.
- Betancourt, L. (1997). Producción, purificación y caracterización de la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 aislada en aguas de Cuba. *Biología Celular y Molecular. Universidade da Coruna, A Coruna*, 189.
- Bishop, W. M., & Zubeck, H. M. (2012). Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *J Nutr Food Sci*, 2(5), 1-6.
- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R. H., & Janssen, M. (2013). Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Research*, 2(4), 333-340.
- Borowitzka, M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 393.
- Boussiba, S., & Richmond, A. E. (1980). C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 125(1-2), 143-147.
- Bouterfas, R., Belkoura, M., & Dauta, A. (2006). The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. *Limnetica*, 25(3), 647-656.
- Bryant, D. A., Guglielmi, G., de Marsac, N. T., Castets, A. M., & Cohen-Bazire, G. (1979). The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology*, 123(2), 113-127.
- Chainapong, T., Traichaiyaporn, S., & Deming, R. L. (2012). Effect of light quality on biomass and pigment production in photoautotrophic and mixotrophic cultures of *Spirulina platensis*. *J Agr Technol*, 8(2012), 1593-1604.
- Cheirsilp, B., & Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource technology*, 110, 510-516.
- Chen, H. B., Wu, J. Y., Wang, C. F., Fu, C. C., Shieh, C. J., Chen, C. I., Wang C.Y. & Liu, Y. C. (2010). Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. *Biochemical Engineering Journal*, 53(1), 52-56

- Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource technology*, *102*(1), 71-81.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, *25*(3), 294-306.
- Ciferri, O. (1983). Spirulina, the edible microorganism. *Microbiological reviews*, *47*(4), 551.
- Cohen, Z. (1997). The Chemicals of *Spirulina*. En: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press, 175-204.
- Colla, L. M., Reinehr, C. O., Reichert, C., & Costa, J. A. V. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource technology*, *98*(7), 1489-1493.
- Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. D. O., De Carvalho, J. C. M., & Sato, S. (2002). An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, *23*(4), 261-269.
- Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. O., Carvalho, J. C. M., & Sato, S. (2004). Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, *26*(4), 329-335.
- de Oliveira, C. A., de Castro Oliveira, W., & Rocha, S. M. (2014). Effect of light intensity on the production of pigments in *nostoc spp.* *European Journal of Biology and Medical Science Research*, *2*(1), 23-36.
- Demmig-Adams, B., & Adams, W. W. (2002). Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, *298*(5601), 2149-2153.
- Díaz Domínguez, G., Marsán Suárez, V., & del Valle Pérez, L. O. (2016). Principales propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de la ficobiliproteína C-ficocianina. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, *32*(4), 447-454.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, *28*(3), 350-356.
- Durand-Chastel, H. (1980). Production and use of Spirulina in Mexico. *Algae biomass: production and use/[sponsored by the National Council for Research and Development, Israel and the Gesellschaft für Strahlen-und Umweltforschung (GSF), Munich, Germany]; editors, Gedaliah Shelef, Carl J. Soeder*.
- Eriksen, N. T. (2008). Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied microbiology and biotechnology*, *80*(1), 1-14.
- Fagiri, Y. M. A., Salleh, A., & El-Nagerabi, S. A. (2013). Influence of chemical and environmental factors on the growth performance of *Spirulina platensis* strain SZ100. *J Algal Biomass Utiln*, *4*(2), 7-15.
- Flores, C. C., Peña-Castro, J. M., Flores-Cotera, L. B., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, *28*(8), 450-456.
- Foy, R. H., & Gibson, C. E. (1982). Photosynthetic characteristics of planktonic blue-green algae: changes in photosynthetic capacity and pigmentation of *Oscillatoria redekei* Van Goor under high and low light. *British phycological journal*, *17*(2), 183-193.
- Gallardo, C. Á., Cano, E., López, G. E., Blas, V., Olvera, R., Franco, M., & Ortiz, R. (2010). Las ficobiliproteínas de *Spirulina maxima* y *Pseudanabaena tenuis* protegen contra el daño hepático y el estrés oxidativo ocasionado por el Hg²⁺. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *41*(2).

- García, J. L., Vicente, M., & Galan, B. (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial biotechnology*, 10(5), 1017-1024.
- George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T., & Mishra, S. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*—A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource technology*, 171, 367-374.
- González-Fernández, C., & Ballesteros, M. (2012). Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnology advances*, 30(6), 1655-1661.
- Gordon, J. M., & Polle, J. E. (2007). Ultrahigh bioproductivity from algae. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(5), 969-975.
- Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of microbiological methods*, 85(2), 119-123.
- Grobbelaar, J. U. (2000). Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 201-206.
- Grossman, A. R., Bhaya, D., & He, Q. (2001). Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11449-11452.
- Habib, M. A. B., Parvin, M., Huntington, T. C., & Hasan, M. R. (2008). *A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish*. Food and agriculture organization of the united nations.
- Huarachi-Olivera, R., Yapo-Pari, Ú., Dueñas-Gonza, Á., González-Juárez, R., Condori-Huamanga, J., Pacheco-Salazar, D. G., & Soto-Flores, J. (2015). Adaptabilidad de Spirulina (Arthrospira) platensis (Cyanophyta) en fotobiorreactor tubular cónico bajo condiciones ambientales. *Idesia (Arica)*, 33(1), 103-112.
- Humphrey, G. F. (1979). Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light-dark regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 40(1), 63-70.
- Jacob-Lopes, E., Scoparo, C. H. G., Lacerda, L. M. C. F., & Franco, T. T. (2009). Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), 306-310.
- Kebede, E., & Ahlgren, G. (1996). Optimum growth conditions and light utilization efficiency of *Spirulina platensis* (= *Arthrospira fusiformis*) (Cyanophyta) from Lake Chitu, Ethiopia. *Hydrobiologia*, 332(2), 99-109.
- Khoeyi, Z. A., Seyfabadi, J., & Ramezanpour, Z. (2012). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20(1), 41-49
- Klyachko-Gurvich, G. L., Tsoglin, L. N., Doucha, J., Kopetskii, J., & Semenenko, V. E. (1999). Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity. *Physiologia Plantarum*, 107(2), 240-249.
- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoyanin. *BioMed research international*, 2013.
- Kumar, M., Kulshreshtha, J., & Singh, G. P. (2011). Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 1128-1135.

- Kumari, A., Sharma, V., Pathak, A. K., & Guria, C. (2014). Cultivation of *Spirulina platensis* using NPK-10: 26: 26 complex fertilizer and simulated flue gas in sintered disk chromatographic glass bubble column. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(3), 1859-1869.
- Lan, J. C. W., Raman, K., Huang, C. M., & Chang, C. M. (2013). The impact of monochromatic blue and red LED light upon performance of photo microbial fuel cells (PMFCs) using *Chlamydomonas reinhardtii* transformation F5 as biocatalyst. *Biochemical engineering journal*, 78, 39-43.
- Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M., & Sinnecker, P. (2005). Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*, 38(8-9), 885-891.
- Lee, K., & Lee, C. G. (2001). Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(3), 194-199.
- Lee, S. H., Lee, J. E., Kim, Y., & Lee, S. Y. (2016). The production of high purity phycocyanin by *Spirulina platensis* using light-emitting diodes based two-stage cultivation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178(2), 382-395.
- Listado de centros adheridos (2012). Obtenido el 17 de diciembre de 2017, de Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina, Sistema Nacional de Datos Biológicos: <http://www.sndb.mincyt.gob.ar/pdfs/Adheridos-SNDB.pdf>
- Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J., & Morales, E. (2003). Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena PCC 7120* en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana. Botánica*, 60(2), 83-89
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- Madhyastha, H. K., & Vatsala, T. M. (2007). Pigment production in *Spirulina fusciformis* in different photophysical conditions. *Biomolecular engineering*, 24(3), 301-305.
- Markou, G. (2012). Alteration of the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresource technology*, 116, 533-535.
- Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2012a). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(3), 631-645.
- Markou, G., Chatzipavlidis, I., & Georgakakis, D. (2012b). Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(8), 2661-2670.
- Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E., & Georgakakis, D. (2013). Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Energies*, 6(8), 3937-3950.
- Markou, G. (2014). Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(5), 2758-2768.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Francisco, J. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 54(2), 149-155.

Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource technology*, 155, 330-333.

Mittag, M. (2001). Circadian rhythms in microalgae. In *International review of cytology* (Vol. 206, pp. 213-247). Academic Press.

Naciones Unidas (2005) La utilización de microalgas alimenticias contra la malnutrición aguda en las emergencias humanitarias y para el desarrollo sostenible. Tema 52 de la comisión de desarrollo sostenible. Recuperado de <http://hgl.la/download/Resolucion%20Naciones%20Unidas%20-%20Spirulina.pdf> , el 19/3/2018.

Nhu, N. T. H. (2017). The effect of pH, dark-light cycle and light colour on the chlorophyll and carotenoid production of *Spirulina* sp. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 19, 190-197.

Olaizola, M., & Duerr, E. O. (1990). Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 2(2), 97-104.

Pandey, J. P., Pathak, N., & Tiwari, A. (2010). Standardization of pH and Light Intensity for the Biomass Production of *Spirulina platensis*. *J. Algal Biomass Utln*, 1(2), 93-102.

Pareek, A. y Srivastava, P. (2001). Optimum photoperiod for the growth of *Spirulina platensis*. *Journal of Phytological Research*, 13, 99-100.

Pedroza-Bezerra, R. P., Matsudo, M. C., Sato, S., Perego, P., Converti, A., & de Carvalho, J. C. M. (2012). Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. Bioenergetic aspects. *Biomass and bioenergy*, 37, 309-317.

Prates, D.F., Barcia, M.T., Radmann, E.M., Costa, J.A.V. (2015). *Photoperiod effect on Spirulina sp. LEB 18 growth for phycocyanin and biomass production*. Trabajo presentado en el IV Congreso Latinoamericano SOLABIAA (Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, Brazil.

Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *J algal biomass utln*, 3(4), 89-100.

Ramírez-Moreno, L., & Olvera-Ramírez, R. (2006). Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*, 31(9), 657-663.

Raps, S., Wyman, K., Siegelman, H. W., & Falkowski, P. G. (1983). Adaptation of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to light intensity. *Plant physiology*, 72(3), 829-832.

Ravelonandro, P. H., Ratianarivo, D. H., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., & Raherimandimby, M. (2008). Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Spirulina platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 83(6), 842-848.

Renaud, S. M., Parry, D. L., Thinh, L. V., Kuo, C., Padovan, A., & Sammy, N. (1991). Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 3(1), 43-53.

Richmond, A. (Ed.). (2008). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. John Wiley & Sons.

Rodríguez, A.; Triana, F. 2006. Evaluación del pH en el cultivo de *Spirulina* spp. (= *Arthrospira*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

- Salla, A. C. V., Margarites, A. C., Seibel, F. I., Holz, L. C., Brião, V. B., Bertolin, T. E., ... & Costa, J. A. V. (2016). Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource technology*, 209, 133-141.
- Sánchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C., & Rodríguez, I. (2003). *Spirulina* (*Arthrospira*): an edible microorganism: a review. *Universitas Scientiarum*, 8(1), 7-24.
- Saranraj, P., & Sivasakthi, S. (2014). *Spirulina platensis*—food for future: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 4(1), 26-33.
- Sassano, C. E. N., Gioielli, L. A., Ferreira, L. S., Rodrigues, M. S., Sato, S., Converti, A., & Carvalho, J. C. M. (2010). Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass and Bioenergy*, 34(12), 1732-1738.
- Sasson, A. (1997). Microalgal Biotechnologies: Recent developments and prospects for developing countries. In 2. *Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference and 3. Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology, Phuket (Thailand), 7-10 May 1997*.
- Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., Khoeyi, Z. A. (2011) Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of applied phycology*, 23(4), 721-726.
- Sforza, E., Simionato, D., Giacometti, G. M., Bertucco, A., & Morosinotto, T. (2012). Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS one*, 7(6), e38975.
- Shi, X.-M., Liu, H.-J., Zhang, X.-W., Chen, F. (1999) Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. *Process Biochemistry* 34: 341-347.
- Soletto, D., Binaghi, L., Ferrari, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M., Zilli, M., & Converti, A. (2008). Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 39(2), 369-375.
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2017). *Spirulina*—From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology*.
- Song, T., Mårtensson, L., Eriksson, T., Zheng, W., & Rasmussen, U. (2005). Biodiversity and seasonal variation of the cyanobacterial assemblage in a rice paddy field in Fujian, China. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(1), 131-140.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Subramoniam, A., Asha, V. V., Nair, S. A., Sasidharan, S. P., Sureshkumar, P. K., Rajendran, K. N., Karunakaran, D. & Ramalingam, K. (2012). Chlorophyll revisited: anti-inflammatory activities of chlorophyll a and inhibition of expression of TNF- α gene by the same. *Inflammation*, 35(3), 959-966.
- Tandeau De Marsac, N. (1983). Phycobilisomes and complementary chromatic adaptation in Cyanobacteria. *Bull. Inst. Pasteur*. 81: 201-254.
- Tandeau De Marsac, N. y Houmard, J. (1988) Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra. *Methods in enzymology*, vol. 167, (pp. 318-328).
- Tandeau De Marsac, N., and Houmard, J. (1993) Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps toward molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 104, 119-190.

- Tandeau De Marsac N. T. (2003) Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. *Photosynth. Photosynthesis Research*, 76(1-3), 193-205.
- Tanticharoen, M., Reungjitchachawali, M., Boonag, B., Vonktaveesuk, P., Vonshak, A., & Cohen, Z. (1994). Optimization of γ -linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*. *Journal of applied phycology*, 6(3), 295-300.
- Tomaselli, L. (1997). Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. En: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press, 1-16.
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource technology*, 99(10), 4021-4028.
- Vásquez-Villalobos, V., Vergaray, D., Méndez, J., Barrios, I., Baquedano, R., Caldas, C., Cruz, J., Gamboa, J. & Rivera, I. (2017). Efecto de la intensidad de diodos electroluminosos y fotoperiodo en la optimización de la producción de biomasa de *Spirulina (Arthrospira)*. *Scientia Agropecuaria*, 8(1), 43-55.
- Vermorel, M., Toullec, G., Dumond, D., & Pion, R. (1975). Valeur proteique et energetique des algues bleues spirulines supplementees en acides amines: Utilisation digestive et metabolique par le rat en croissance. In *Annales de la nutrition et de l'alimentation*.
- Vernerey, A., Albiol, J., Lasseur, C., & Godia, F. (2001). Scale-up and design of a pilot-plant photobioreactor for the continuous culture of *Spirulina platensis*. *Biotechnology progress*, 17(3), 431-438.
- Vijaya, V., & Anand, N. (2009). Blue light enhance the pigment synthesis in cyanobacterium *Anabaena ambigua* rao (nostacales). *ARPJ. Agricul. Biol. Sci*, 4, 1-8.
- Villa, A., Herazo, D., & Torregroza, A. C. (2014). Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (clon c-cal) en cultivos estáticos. *Intropica*, 9, 111-117.
- Vonshak, A. (1997). Use of *Spirulina* Biomass. En: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press, 131-158.
- Wahidin, S., Idris, A., & Shaleh, S. R. M. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource technology*, 129, 7-11.
- Walter, A., Carvalho, J. C. D., Soccol, V. T., Faria, A. B. B. D., Ghiggi, V., & Soccol, C. R. (2011). Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 675-682.
- Wang, C. Y., Fu, C. C., & Liu, Y. C. (2007). Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 21-25.
- Wegmann, K. y Metzner, H. (1971). Synchronization of *Dunaliella* cultures. *Archives of Microbiology*. 78(4), 360-367.
- Xie, Y., Jin, Y., Zeng, X., Chen, J., Lu, Y., & Jing, K. (2015). Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation. *Bioresource technology*, 180, 281-287.
- Xue, S., Su, Z. & Cong, W., (2011). Growth of *Spirulina platensis* enhanced under intermitent illumination. *Journal of Biotechnology, Issue 151*, 271-277

Zarrouk, C. (1966). *Contribution à l'étude d'une Cyanophycée, influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de "Spirulina maxima"*(Setch et Gardner) Geitler. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de París. 41 pp.