

**OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE PROCESO REQUERIDOS PARA EL
ESCALAMIENTO DE UN BIOPROCESO ORIENTADO AL DESARROLLO DE
MEJORADORES DE SUELO A BASE DE EXTRACTOS DE MICROALGAS**

ANDRÉS MAURICIO MONTENEGRO JARAMILLO

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS
CHÍA
2009**

**OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE PROCESO REQUERIDOS PARA EL
ESCALAMIENTO DE UN BIOPROCESO ORIENTADO AL DESARROLLO DE
MEJORADORES DE SUELO A BASE DE EXTRACTOS DE MICROALGAS**

ANDRÉS MAURICIO MONTENEGRO JARAMILLO

**Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Diseño y Gestión de
Procesos**

**Director
Dra. Gloria Eugenia González Mariño
Directora Doctorado en Biociencias Universidad de La Sabana**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS
CHÍA
2009**

Nota de aceptación:

Director

Jurado 1

Jurado 2

Jurado 3

Chía, noviembre 23 de 2005

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES	18
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVO GENERAL	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1. ORGANISMOS	31
4.2. MEDIO DE CULTIVO	31
4.3. PRUEBAS EXPERIMENTALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS	32
4.3.1. MONTAJES DE ESTANDARIZACIÓN	32
4.3.1.1 Diseño experimental	32
4.3.1.2 Diseño del análisis	33
4.3.2. MONTAJES DE OPTIMIZACIÓN	35
4.3.2.1 Diseño experimental	35
4.3.2.2 Diseño del análisis	37
4.3.3. MONTAJES DE VALIDACIÓN	39
4.3.4. EXTRACCIÓN Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	40
4.3.4.1. Centrifugación: frecuencia y tiempo	40
4.4. DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	41
4.4.1 MONITOREO DE BIOMASA Y MEDIO DE CULTIVO	41
4.4.2 PARÁMETROS CINÉTICOS	41
4.4.3 CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA EN BIOMASA	41
4.4.4 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	42

4.4.5 CONCENTRACIÓN DE AUXINAS	42
4.4.6 CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS Y EXOPOLISACÁRIDOS	43
4.4.6.1 Análisis de carbohidratos totales intracelulares (Y_{chb})	43
4.4.6.2. Análisis de carbohidratos extracelulares o exopolisacáridos - EPS (Y_{ch} mg L ⁻¹)	43
4.4.7 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO – IAA (Y_p , nM L ⁻¹)	43
4.4.8 VISCOSIDAD DINÁMICA Y DENSIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO	44
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1. MONTAJES DE ESTANDARIZACIÓN	45
5.2. MONTAJES DE OPTIMIZACIÓN	56
5.2.1. COEFICIENTE ESPECÍFICO DE CRECIMIENTO (μ , d ⁻¹) COMO VARIABLE DE RESPUESTA	57
5.2.2. CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN EL SOBRENADANTE - EXOPOLISACÁRIDOS (Y_{ch} , mg L ⁻¹) COMO VARIABLE DE RESPUESTA	62
5.2.3. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (Y_A , nM L ⁻¹) COMO VARIABLE DE RESPUESTA	69
5.3. MONTAJES DE VALIDACIÓN	73
5.4. EXTRACCIÓN Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	77
5.4.1. CENTRIFUGACIÓN: FRECUENCIA Y TIEMPO	77
6. CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS	99

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición básica medio Bristol para el cultivo de microalgas	31
Cuadro 2. Concentración de promotores de crecimiento, fitohormonas-auxinas, en fracciones extracto microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> , durante los ensayos de estandarización	53
Cuadro 3. Concentración de carbohidratos-exopolisacáridos en medio microalgas, <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> , durante los ensayos de estandarización	55
Cuadro 4. Consolidado de respuestas por variable experimental durante los ensayos de optimización, diseño experimental factorial 2 ² por metodología de <i>Screening</i> en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	56
Cuadro 5. Respuesta óptima establecida para los montajes de validación diseño experimental de <i>Screening</i> con la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	73
Cuadro 6. Consolidado resultados ensayos de validación (montajes A, B, C) y respuesta óptima diseño experimental <i>Screening</i> para la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	75
Cuadro 7. Consolidado resultados ensayos diseño experimental para extracción y obtención de extractos para la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción del diseño experimental base usado en la optimización, caracterización del sistema de producción e identificación de los parámetros de proceso en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	36
Tabla 2. Descripción de la corrida experimental usada para estandarización y validación de la respuesta óptima obtenida durante el diseño experimental de optimización. Los ensayos se efectuaron con la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	39
Tabla 3. Análisis de Varianza diseño experimental de <i>Screening</i> para <i>S. obliquus</i> usando el coeficiente específico de crecimiento (μ , d^{-1}) como variable de respuesta	57
Tabla 4. Respuesta óptima para el diseño experimental de <i>Screening</i> VR Coeficiente Específico de Crecimiento (μ , d^{-1}) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> .	61
Tabla 5. Análisis de Varianza diseño experimental de <i>Screening</i> para <i>S. obliquus</i> usando la concentración de exopolisacáridos (Y_{ch} , $mg L^{-1}$) como variable de respuesta	62
Tabla 6. Respuesta óptima para el diseño experimental de <i>Screening</i> variable de respuesta EPS (Y_{ch} , $mg L^{-1}$) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	66
Tabla 7. Análisis de Varianza diseño experimental de <i>Screening</i> para <i>S. obliquus</i> usando la concentración de promotores de crecimiento (Y_A , $nM L^{-1}$) como variable de respuesta	69
Tabla 8. Respuesta óptima para el diseño experimental de <i>Screening</i> variable de respuesta IAA (Y_A , $nM L^{-1}$) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales rutas metabólicas para la síntesis de algunos metabolitos primarios y secundarios en microalgas	23
Figura 2. Posibilidades tróficas para microalgas, considerando el crecimiento heterotrófico y autotrófico como los principales	24
Figura 3. Diagrama de las interacciones representativas entre el ambiente celular (“envirome”) y el metabolismo celular	27
Figura 4. Diagrama del desarrollo secuencial de la estrategia operativa seguida para el cumplimiento de los objetivos principales del proyecto	30
Figura 5. Plan de desarrollo y experimentación establecido para el proyecto en función del plan operativo y orientado al desarrollo de la materia prima del proyecto, extracto de microalga	30
Figura 6. Montaje Pruebas preliminares de estandarización sistema de producción en el cultivo fotoautótrofo de las microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	32
Figura 7. Montajes de optimización para la evaluación de las variables experimentales en diseño factorial por metodología de <i>Screening</i> en el cultivo fotoautótrofo de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	37
Figura 8. Coeficientes de crecimiento para las especies <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	45
Figura 9. Curvas de crecimiento <i>Chlorella vulgaris</i> montajes de estandarización Montajes por triplicado (R1, R2, R3) y curva promedio (P), durante 20 días de cultivo	46
Figura 10. Curvas de crecimiento <i>Scenedesmus obliquus</i> montajes de estandarización. Montajes por triplicado (R1, R2, R3) y curva promedio (P), durante 20 días de cultivo	47
Figura 11. Curvas de crecimiento promedio-comparativo en las microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> durante los ensayos de estandarización	47
Figura 12. Segmentos representativos para la curva de crecimiento promedio-comparativa en las microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> , ajustado acorde a los resultados obtenidos en tres réplicas por especies	48
Figura 13. Concentración pigmentos fotosintéticos microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	49
Figura 14. Coeficiente de absorción, K_a , calculado para las especies de microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	50
Figura 15. Concentración de biomoléculas de interés en la biomasa de las microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> : Auxinas y Proteína	51
Figura 16. Concentración de biomoléculas de interés en sobrenadante de las microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> : Auxinas y Proteína	52
Figura 17. Concentración de carbohidratos biomasa y sobrenadante de las microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> .	54
Figura 18. Variación en la viscosidad dinámica (μ) para los medios de cultivo durante el desarrollo de las especies de microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	55
Figura 19. Diagrama de Pareto para el estudio de los factores de crecimiento sobre el coeficiente específico de crecimiento (μ , d^{-1}) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	58
Figura 20. Diagrama de efectos principales para el coeficiente específico	

de crecimiento (μ , d^{-1}) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	59
Figura 21. Diagrama de interacciones para las variables experimentales – VE en función de la variable de respuesta coeficiente específico de crecimiento (μ , d^{-1}) correspondiente a la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	59
Figura 22. Diagrama desglosado para la interacción flujo luminoso/Iluminancia (A) contra el régimen de flujo/rpm (C) en función de la variable de respuesta VR coeficiente específico de crecimiento (μ , d^{-1}), para la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	60
Figura 23. Superficie de respuesta obtenida del diseño experimental de <i>Screening</i> para la VR Coeficiente Específico de Crecimiento (μ , d^{-1}) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	61
Figura 24. Diagrama de Pareto para el estudio de los factores de crecimiento sobre la concentración de exopolisacáridos (Y_{ch} , $mg L^{-1}$) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	62
Figura 25. Diagrama de efectos principales para la concentración de exopolisacáridos (Y_{ch} , $mg L^{-1}$) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	63
Figura 26. Diagrama de interacciones para las variables experimentales - VE en función de la variable de respuesta exopolisacáridos (Y_{ch} , $mg mL^{-1}$), correspondiente a la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	64
Figura 27. Superficie de respuesta obtenida del diseño experimental de <i>Screening</i> para la VR Exopolisacáridos (Y_{ch} , $mg L^{-1}$) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	65
Figura 28. Variación en la viscosidad dinámica (μ) en los medios de cultivo para la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	65
Figura 29. Diagrama desglosado para la interacción Flujo Luminoso/Iluminancia (A) contra la Fuente de Carbono (B) en función de la variable de respuesta VR = exopolisacáridos/EPS ($mg L^{-1}$), para la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	67
Figura 30. Diagrama de Pareto para el estudio de los factores de sobre la concentración de promotores de crecimiento (Y_A , $nM L^{-1}$) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	70
Figura 31. Diagrama de efectos principales para la concentración de promotores de crecimiento (Y_A , $nM L^{-1}$) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	70
Figura 32. Diagrama de interacciones para las variables experimentales - VE en función de la variable de respuesta - VR Ácido Indol Acético (Y_A , $nM L^{-1}$), correspondiente a la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	71
Figura 33. Superficie de respuesta obtenida del diseño experimental de <i>Screening</i> para la VR Promotores de crecimiento (Y_A , $nM L^{-1}$) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	72
Figura 34. Comparativo concentración de biomoléculas durante los ensayos de validación diseño experimental en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> vs. coeficiente específico de crecimiento	76
Figura 35. Comparativo VR promedio para los ensayos de validación del diseño experimental en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> vs. valores predichos por modelo diseño experimental	76
Figura 36. Comparativo valores reales montajes de validación vs. valores proyectados modelo diseño experimental con intervalos de confianza al 95% para la producción de EPS ($mg L^{-1}$) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	77
Figura 37. Gráfico VR consolidado diseño experimental centrifugación	79
Figura 38. Diagramas de Pareto para el estudio de los factores experimentales, frecuencia (rpm) y tiempo (min), sobre la remoción de células (A, células mL^{-1})	

y la turbidez del extracto (B, NTU) en los extractos de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	80
Figura 39. Diagrama de efectos principales para la concentración de células en el extracto (A, células mL ⁻¹) y turbidez del extracto (B, NTU) en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> , durante pruebas experimentales de centrifugación.	80
Figura 40. Diagrama de interacciones para las variables experimentales: A - tiempo (min) vs. frecuencia (rpm), B – frecuencia (rpm) vs. tiempo durante diseño experimental de centrifugación realizado con extractos de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> para Y_e (A, células mL ⁻¹) y T_e (B, NTU)	81
Figura 41. Superficie de respuesta para la VR número de células en sobrenadante (células mL ⁻¹) obtenido durante ensayos experimentales para definir los parámetros óptimos del proceso centrifugación, en la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	82
Figura 42. Superficie de respuesta para la VR Turbidez (NTU) obtenido durante ensayos experimentales para definir los parámetros óptimos del proceso de centrifugación, a partir de los extractos de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	82
Figura 43. Mecanismo de respuesta ante estímulos medioambientales, factores de estrés o limitantes, de células u organismos vivos	83
Figura 44. Consolidado comparativo de VR promotores de crecimiento (IAA, nM L ⁻¹) vs. exopolisacáridos (EPS, mg L ⁻¹) obtenido durante ensayos experimentales de optimización (M1-M3) y estandarización (M5) en <i>Scenedesmus obliquus</i>	84
Figura 45. Coeficiente específico de crecimiento (μ , d ⁻¹) en función de la concentración de biomoléculas, fitohormonas (IAA, nM L ⁻¹) y exopolisacáridos (EPS, mg L ⁻¹) obtenido durante ensayos de optimización con la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	85
Figura 46. Elementos del desarrollo de procesos considerados para la obtención de los parámetros de proceso para el escalamiento de un fotobioproceso	86
Figura 47. Parámetros de procesos y sus interacciones considerados como fundamentales durante el cultivo de organismos fotoautótrofos	87
Figura 48. Variables de proceso a considerar en el diseño y desarrollo de sistemas de producción para organismos fotótrofos a escala industrial	88

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Esquema general polinomio que genera el diseño experimental de <i>Screening</i> para predecir respuesta a partir del consolidado general de ensayos para la respuesta	38
Ecuación 2. Coeficiente específico de crecimiento cuando la mortalidad de células (m) es igual a cero	41
Ecuación 3. Duplicaciones de la población por día	41
Ecuación 4. Duplicaciones de la población por día modificada	41
Ecuación 5. Tiempo de duplicación de la población de células	41
Ecuación 6. Concentración clorofila <i>a</i> en biomasa de microalga	42
Ecuación 7. Concentración clorofila <i>b</i> en biomasa de microalga	42
Ecuación 8. Coeficiente de absorción (K_a) de la biomasa en función del contenido total de clorofila	42
Ecuación 9. Número de Reynolds impulsor (Re_i)	44
Ecuación 10. Polinomio con coeficientes de regresión calculados a partir del diseño experimental de <i>Screening</i> para la variable de respuesta μ (d^{-1})	74
Ecuación 11. Polinomio con coeficientes de regresión calculados a partir del diseño experimental de <i>Screening</i> para la variable de respuesta Y_{ch} ($mg L^{-1}$)	74
Ecuación 12. Polinomio con coeficientes de regresión calculados a partir del diseño experimental de <i>Screening</i> para la variable de respuesta Y_A ($nM L^{-1}$)	74

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Consolidado análisis estadísticos comparativos grupo de datos cinéticos fase estandarización entre las microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	100
ANEXO B. Consolidado análisis comparativos grupo de datos concentración de biomoléculas fase de estandarización entre las microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	102
ANEXO C. Estadísticos y tablas complementarias diseño experimental de optimización	107
ANEXO D. Números de Reynolds impulsor (Re_i) calculados para los montajes de optimización	111
ANEXO E. Estadísticos complementarios análisis diseños experimentales de validación	112
ANEXO F. Descripción y análisis estadísticos complementarios diseño experimental de centrifugación	113

GLOSARIO

ACIDO INDOL ACETICO: también conocido como la IAA, es un compuesto heterocíclico perteneciente al grupo de las fitohormonas llamado auxinas. La molécula se deriva del indol, que contiene un grupo de carboximetilcelulosa (ácido acético).

AUXINAS: grupo de fitohormonas que funcionan como reguladoras del crecimiento vegetal.

CICLOS LUZ/OSCURIDAD (L/D): se refiere a los periodos de tiempo en el que las células se encuentran expuestas a la luz en contra de los periodos en los que no. La luz puede ser suministrada de manera intermitente o continua.

COLOROFLA: son una familia de pigmentos lipofílicos (*a*, *b*, *c* y *d*) que consisten de un anillo tetrapirrol con un átomo central de magnesio y que se encuentran en la mayoría de los organismos fotosintéticos.

DISEÑO EXPERIMENTAL: metodología que utiliza principios estadísticos para diseñar pruebas o ensayos que generen la mayor cantidad de información sobre el sistema bajo estudio con la mayor confiabilidad en el menor tiempo posible y al menor costo.

EXOPOLISACARIDOS: macromoléculas de carbohidratos, son sintetizadas por enzimas asociadas a la membrana interna empleando sustratos citoplasmáticos, debiendo cruzar la pared celular antes de ser liberadas en el medio extracelular.

FACTORES: variables que influyen y se controlan sobre una unidad experimental. Son las variables experimentales que inciden sobre la variable de respuesta.

FITOHORMONA: son hormonas que regulan de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas. Controlan un gran número de sucesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación.

FOTOBIOREACTOR: es un reactor en el cual organismos fotótrofos se cultivan y en los que una gran proporción de luz no se aplica directamente sobre la superficie del cultivo.

FOTOSINTESIS: es la conversión de energía luminosa en energía química estable, siendo el adenosín trifosfato (ATP) la primera molécula en la que queda almacenada esa energía química.

ILUMINANCIA: es la cantidad de flujo luminoso que incide sobre una superficie por unidad de área. Su unidad de medida en el SI es el lux: $1 \text{ lux} = 1 \text{ lumen m}^{-2}$.

IRRADIANZA: cantidad de energía lumínica que incide sobre una superficie por unidad de área. Esta dado en unidades de potencia por área (W m^{-2} , $\text{Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ o $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

MICROALGA: microorganismo unicelular que contienen clorofila, además de otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar la fotosíntesis. Incluye a un diverso grupo de microorganismos tanto eucariotas como procariontas.

NIVEL: es un valor específico, ya sea cualitativo o cuantitativo, de la variable experimental seleccionada para el experimento.

NUMERO DE REYNOLDS: es un número adimensional utilizado en mecánica de fluidos, para caracterizar el movimiento de un fluido o su régimen de flujo.

VARIABLE EXPERIMENTAL: en un diseño experimental es una variable que el experimentador manipula.

VARIABLE DE RESPUESTA: en un diseño experimental es una variable que el experimentador mide después de llevar a cabo los tratamientos, para ver como es afectada por la variable experimental.

RESUMEN

Con el propósito de normalizar las condiciones óptimas para la producción de biomasa y biomoléculas de microalgas orientadas al desarrollo de un bio-insumo agrícola se seleccionaron dos microalgas, *Scenedesmus obliquus* (UTEX 393) y *Chlorella vulgaris* (UTEX 295) (Chlorophyceae), para la estandarización de las condiciones de producción y se realizó una evaluación comparativa de estas especies que favoreció a *Scenedesmus obliquus*, organismo utilizado para una fase adicional de optimización. Para este propósito se evaluó el efecto de tres variables de proceso en la productividad y producción de biomoléculas, exopolisacáridos (EPS) y fitohormonas (IAA, ácido indol acético), en *Scenedesmus obliquus*, aplicando un diseño experimental factorial 2^3 por metodología de *Screening*. Las variables experimentales (VE) del diseño: agitación (R_f , rpm), Iluminancia (I_a , lux) y fuente de carbono suministrada (C^* , mezcla de aire enriquecida con CO_2 en % v/v), se trabajaron en tres niveles y el coeficiente específico de crecimiento (μ , d^{-1}), concentración de IAA (Y_A , $nM L^{-1}$) y EPS (Y_{ch} , $mg L^{-1}$) en el sobrenadante, se usaron como variables de respuesta (VR). Las pruebas experimentales entregaron condiciones óptimas para las VR consideradas con μ $0.64 d^{-1}$, EPS y IAA de $24.7 mg L^{-1}$ y $5.42 nM L^{-1}$ respectivamente, para el punto óptimo en los niveles máximos de las VE (11.000 lux, 4% mezcla CO_2 -aire, 1.200 rpm). La ratificación de los modelos polinómicos generados por el diseño experimental de optimización, en montajes de validación adicionales, certificó la representatividad de los análisis realizados en la identificación de los parámetros de proceso que condicionan mayoritariamente la eficiencia de los fotobioprocesos. Pruebas para la recuperación de la biomasa de microalgas permitieron ratificar la preponderancia del tiempo (t , min) y frecuencia (Z_g , rpm) en la eficiencia de esta operación que requerirá un paso adicional de floculación o coagulación para reducir el gasto energético del sistema de recuperación.

Palabras Claves: Chlorophyceae, ácido indol acético, exopolisacáridos, diseño experimental factorial, *Screening*, parámetros de proceso, optimización.

1. INTRODUCCIÓN

En 2030, 8300 millones de personas vivirán en el planeta. Para alimentarlos, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) calcula que se deberá incrementar la producción de granos en 30%. Esta problemática se relaciona con el hecho de que, acorde con los estudios realizados por Pimentel, 1994¹, para alimentar a una persona con una dieta equilibrada y diversa, se requiere cerca de 0.5 ha de tierra labrable per cápita, hace 15 años disponíamos de solamente 0.27 ha per cápita y, dentro de 20 años, la pérdida de suelos y el rápido crecimiento de la población habrán reducido a 0.14 ha la tierra labrable disponible per cápita.

Debido a la pérdida de productividad del suelo asociada a la erosión y al crecimiento de la población, el suministro de alimentos per cápita se ha venido reduciendo durante los últimos años y acorde con estudios realizados (FAO, Statistical Data)² continúa con esta tendencia, por lo que se hace necesario desarrollar alternativas tecnológicas sostenibles y sustentables que puedan responder a esta apremiante necesidad del sector agrícola primario.

En Colombia el Plan 2019 del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) y el Departamento Nacional de Planeación (DNP)³ ha priorizado el cultivo de varias hortalizas como fuente de exportación nacional⁴. Sin embargo el cultivo de estas hortalizas y su productividad se podría ver limitado en área y capacidad de producción. El uso de fertilizantes, pesticidas, y sistemas de irrigación ayuda a compensar los efectos adversos de la erosión pero tiene el potencial de crear problemas de salud y de polución, destruir los hábitats, y contribuir al alto consumo de energía dirigiendo los sistemas agrícolas hacia la insustentabilidad (Pimentel et al., 1995)⁵.

El rol de algunos microorganismos en aplicaciones agrícolas, particularmente hongos y bacterias, es ya corriente en los sistemas de producción agrícolas actuales y sus beneficios igualmente ampliamente reconocidos. Los microorganismos son indispensables para la descomposición del material orgánico y el suministro de sustancias inorgánicas no asimilables directamente por las plantas o cultivos.

Como miembros de la comunidad microbiana de los suelos, las microalgas son conocidas por contribuir a la fertilidad del suelo y a su estabilización gracias a su habilidad para la producción de polímeros extracelulares (Barclay y Lewin, 1985)⁶. La evidencia sobre la producción de sustancias con interés comercial en las microalgas de la división Chlorophyta, particularmente exopolisacáridos y fitohormonas, ha sido documentada por diversos autores que justifican el potencial de los géneros *Scenedesmus sp.* y *Chlorella sp.* en la producción de diversos metabolitos, particularmente exopolisacáridos, fitohormonas y ácidos grasos.

De igual manera estas posibilidades en el desarrollo de productos se ven fortalecidas por el hecho de que las microalgas, como organismos fotoautótrofos, requieren para su crecimiento, luz solar y dióxido de carbono (CO₂) uno de los principales gases de efecto invernadero, generando en el mismo proceso oxígeno (O₂) y acumulando el carbono en sus tejidos o en moléculas de interés.

No obstante el gran potencial de este sector biotecnológico, los desarrollos e innovaciones en sus procesos aún incipientes en nuestro medio, abren un abanico para la generación de conocimiento, capacidades y aplicaciones tecnológicas con enfoque de mercado que consoliden un cluster agro-biotecnológico con énfasis en sistemas de producción no contaminantes y altamente intensivos en conocimiento, ingeniería y tecnología.

Adicionalmente las nuevas reglamentaciones asociadas al comercio y exportación de productos agroindustriales o agroalimentarios como las Buenas Prácticas Agrícolas (*GAP*, por sus siglas en inglés) promovidas por la Unión Europea y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, apoyan ampliamente el uso de productos biológicos, en reemplazo de los productos agroquímicos derivados del petróleo altamente contaminantes, en defensa de paquetes tecnológicos con énfasis biológico, que cumplen estas y otras reglamentaciones, favoreciendo la calidad e inocuidad de los productos. Esta dinámica con gran demanda y poca oferta crea una oportunidad comercial y tecnológica que no se puede desaprovechar.

El presente proyecto pretende, atendiendo las problemáticas y oportunidades descritas anteriormente, obtener los parámetros de proceso requeridos en el desarrollo de bioprocesos para la producción de extractos de microalgas que contribuyan a generar nuevas herramientas tecnológicas e innovativas para su uso en el diseño, validación e implementación de propuestas en el manejo integrado y sostenible del suelo, orientado a alcanzar la productividad, sanidad, calidad y los estándares de inocuidad requeridos internacionalmente para el cultivo de hortalizas.

2. ANTECEDENTES

Durante el siglo pasado, una gran cantidad de la superficie terrestre del planeta ha sido transformada por un amplio rango de fenómenos (Vitousek, 1997)⁷ que afectan de manera diversa los ecosistemas terrestres y su capacidad de desarrollo (Wardle et al., 2004)⁸. Directa o indirectamente toda persona y sociedad dependen de los recursos que el suelo provee, principalmente alimentos y nutrientes.

De manera preferencial, la agricultura promueve la erosión del suelo al ampliar las áreas de producción destruyendo zonas aluviales, bosques y páramos, modificar la biota nativa y su estructura por prácticas de labranza y por el rápido crecimiento de la población asociado a nuevas prácticas agrícolas (McNeill, 2004)⁹. Estas actividades inducidas por el hombre han generado en los últimos 60 años la erosión y destrucción de los ecosistemas del suelo a niveles sin precedentes (McNeill, 2000)¹⁰.

La capacidad productiva y sostenible del suelo tiene en la erosión su principal amenaza ambiental. En los países en desarrollo la tierra labrable se está perdiendo en gran parte por las malas prácticas agrícolas inducidas por el hombre, esto se refleja en las altas tasas de erosión en Asia, África y Sur América, cuyos suelos presentan pérdidas promedio de 30 a 40 T_m ha⁻¹ año⁻¹, en comparación con las 17 T_m ha⁻¹ año⁻¹ que promedian los Estados Unidos y Europa (Barrow, 1991)¹¹.

En el primer estudio sobre el mal uso del suelo en la tierra, científicos del Internacional Soil Reference and Information Centre (ISRIC) en Holanda, estimaron que, en 1991, la humanidad había degradado casi 20 millones de kilómetros cuadrados de tierras (Mann, 2008)¹² y continua degradándola a una tasa de 10 millones de hectáreas por año (Pimentel et al., 1995)⁵.

El uso de grandes cantidades de fertilizantes, pesticidas, y sistemas de irrigación ayuda a compensar los efectos adversos de la erosión pero tiene el potencial de crear problemas de salud y de polución, destruir los hábitats, y contribuir al alto consumo de energía dirigiendo los sistemas agrícolas hacia la insustentabilidad (Pimentel, 1994)¹.

Todos los ecosistemas de suelo y sus componentes, por encima y por debajo, interactúan de manera dinámica a través de procesos y propiedades propias que determinan flujos de retroalimentación positivos o negativos (Wardle et al., 2004)⁸. Particularmente para los suelos tropicales presentes en zonas como Colombia, esta dinámica se hace más representativa dado que los regímenes de temperatura y lluvia los hacen mucho más dinámicos, presentando cerca de cinco veces mayor capacidad de descomposición de materia orgánica que los suelos no tropicales (Sánchez y Buol, 1975)¹³.

Acorde con esta perspectiva se precisan de prácticas adecuadas de manejo de suelos ya que está claramente establecido que el crecimiento de los cultivos y sus rendimientos dependen de una combinación favorable de luz, soporte mecánico, calor, aire, agua, y nutrientes (Larson et al., 1983)¹⁴. Por tanto el suelo se convierte, básicamente, en un ambiente para el desarrollo de raíces y el agotamiento-consumo de agua y nutrientes.

La materia orgánica es un componente necesario del suelo, facilita la formación de agregados de suelo, incrementa la porosidad del suelo, y por consiguiente mejora su

estructura, la infiltración de agua y de manera preferencial la productividad global de los cultivos (Chaney y Swift, 1984)¹⁵. Asimismo, la materia orgánica promueve la captación de agua, facilita el intercambio catiónico, incrementa el desarrollo radicular y estimula la proliferación de importante biota del suelo (Allison, 1973)¹⁶. El agotamiento de la materia orgánica del suelo repercute, de manera directa, en la productividad del suelo y en los rendimientos de los cultivos, debido a la degradación de la estructura del suelo y al agotamiento de los nutrientes (Pimentel et al., 1995)⁵.

El papel de los microorganismos en el suministro de compuestos inorgánicos con una equivalencia química apropiada para que sean asimilados por las plantas superiores es bien conocido (Grant y Long, 1989)¹⁷. Los microorganismos son indispensables para la descomposición del material orgánico, de igual forma el depósito de materia orgánica del suelo (detritus) debe mantenerse en estado uniforme y esto se debe en gran parte a la descomposición microbiana de los materiales orgánicos perdurables del suelo.

La biota del suelo, micro y macro, es por tanto un componente crítico del suelo y constituye una larga porción de la biomasa presente en este. Una hectárea de suelo de buena calidad contiene, en promedio, 1.000 kg de lombrices, 1.000 kg de artrópodos, 150 kg de protozoos, 150 kg de microalgas, 1.700 kg de bacterias, y 2.700 kg de hongos (Pimentel et al., 1980)¹⁸. Esta biota recicla los nutrientes disponibles en el suelo y adicionalmente libera componentes que normalmente no se encuentran disponibles para el aprovechamiento de los cultivares que en este se desarrollan (Wardle, 2004)⁸.

Los agregados del suelo compuestos básicamente por materia orgánica e inorgánica, determinan su estabilidad principalmente por la presencia de arcillas, sustancias del humus y exopolisacáridos de origen unicelular. La importancia de estos exopolisacáridos producidos por microorganismos presentes en el suelo se ha demostrado por la observación comparativa de la estructura del suelo tras tratamientos con periodato (NaIO₄), los cuales destruyen los polisacáridos presentes, causando frecuentemente la pérdida de estructura de los agregados (Grant y Long, 1989)¹⁷.

Adicionalmente los exopolisacáridos en el suelo, dadas sus características particulares, son considerados entidades separadas y distintas. Estos exopolisacáridos pueden alcanzar el 0.1% de la materia orgánica de los suelos y son extremadamente resistentes a la degradación o a la modificación (Grant y Long, 1989)¹⁷.

Particularmente para un grupo mayoritario presente en la microflora del suelo, las microalgas presentes en este, son notoriamente difíciles de identificar y las especies encontradas no se diferencian significativamente de las encontradas en medios acuáticos. Las microalgas son específicamente importantes en la prevención de la erosión superficial de los cultivos. Las especies pertenecientes a la división *Chlorophyta* y *Bacillariophyta*, se distribuyen preferencialmente en suelos ácidos y neutros, mientras que las microalgas de la división *Cyanophyta*, cianobacterias, tales como *Anabaena*, *Calothrix*, *Oscillatoria* y *Nostoc* spp. se encuentran en suelos predominantemente alcalinos (Pimentel et al., 1980)¹⁸.

Se demostrado que las microalgas contribuyen de manera significativa en la dinámica del suelo y en su estabilización debido a la segregación de sustancias extracelulares, polímeros, que mejoran la composición orgánica del suelo y modifican su estructura

(Mazor et al., 1996)²². Los biopolímeros de este tipo por consiguiente pueden ser de importancia biológica en suelos agrícolas como herramienta para el mejoramiento de su estructura (Barclay y Lewin, 1985)⁶. Adicionalmente se ha demostrado que los polisacáridos están entre los tipos más efectivos de polímeros orgánicos para el mejoramiento de la estabilidad de los agregados del suelo y su capacidad de retención de agua (Lewin, 1997¹⁹; Foster, 1981²⁰; Metting et al., 1990²¹), adicionalmente su papel dentro de la dinámica productiva de los suelos ha sido ampliamente evaluada desde diversos puntos de vista (Metting et al., 1990)²¹.

Al respecto existe evidencia de que los exopolisacáridos (EPS) producidos por *Microcoleus sp.* adicionados en muestras de arena (5 mg EPS g⁻¹ de arena) retenían aproximadamente en un 30% su capacidad ligante de agua luego de desecar las muestras de arena durante 24 horas a 55 °C, mientras que las muestras sin tratar con EPS se secaban completamente al estar bajo las mismas condiciones (Mazor et al., 1996)²². De igual forma en suelos con elevada salinidad existe evidencia de que los EPS liberados por microalgas aminoran el impacto y mejoran su calidad y producción (Apte y Thomas, 1997)²³ (Kaushik y Venkataraman, 1982)²⁴ al atrapar, probablemente, los iones Na⁺ en biofilms que restringen el influjo de Na⁺ hacia las raíces de la planta (Ashraf et al., 2006)²⁵.

Las microalgas también constituyen una fuente valiosa de productos como ficobiliproteínas, polisacáridos, proteínas, hidrógeno, y otros metabolitos secundarios (Cohen, 1986²⁶; Ördog et al., 2004²⁷; Roeselers et al., 2008²⁸). Diversos estudios describen el uso potencial de las microalgas para la producción de compuestos bioactivos de alto valor (Borowitzka, 1986²⁹; Bubrik, 1991³⁰; Pulz et al., 2001³¹; Banerjee et al., 2002³²). Las aplicaciones actuales para los compuestos químicos aislados de diversas clases de algas es enorme y dentro de estas aplicaciones sobresale la química ecológica. Igualmente existe un gran potencial en el desarrollo de aplicaciones para nutrición humana y animal, cosméticos, ácidos grasos y pigmentos (Spolaore et al., 2006)³³.

Otros compuestos de especial interés producidos por algas son los esteroides, lecitinas, micosporinas, compuestos halogenados, poliquétidos y toxinas (Cardozo et al., 2007)³⁴. Por consiguiente, un suministro mayor de extractos de microalgas, fracciones o compuestos puros para el sector económico se hace necesario (Dos Santos et al., 2005)³⁵.

Una propiedad funcional adicional de los extractos de algas es proporcionar factores de crecimiento, que adicional al aporte de polisacáridos y macronutrientes, estimulan el desarrollo de microorganismos rizosféricos, promueven el crecimiento radicular y disminuyen la incidencia y severidad de los fitopatógenos (Stirk et al., 2002³⁶; Ördog et al., 2004²⁷). Estas afirmaciones están basadas en evidencia acumulada (Augier, 1978³⁷; Buggeln, 1981³⁸; Jacobs, 1986³⁹; Evans y Trewavas 1991⁴⁰) de que algunas hormonas que operan en organismos superiores (plantas terrestres) pudieran tener un rol similar en las algas abriendo un área de investigación con gran potencial de impacto.

Estos promotores de crecimiento, i.e. fitohormonas, serían acorde a lo descrito por Bradley, 1991⁴¹ y, en un sentido amplio y aplicado, cualquier sustancia química capaz de afectar el crecimiento y desarrollo de un organismo vivo empleado en concentraciones menores de aquellas requeridas para los nutrientes. Las respuestas a las fitohormonas es

generalmente la suma de efectos para las distintas combinaciones de una sustancia dada, e.g. auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido absísico y poliaminas, actuando de manera conjunta o en oposición de manera compleja. Ellas también interactúan con otros compuestos, i.e. fenoles, los cuales acorde con los estudios adelantados por Kefeli y Dashek, 1994⁴², tienen propiedades protectivas, estimuladoras, o inhibitorias.

Los géneros *Scenedesmus* y *Chlorella*, que pueden ser encontrados en todo tipo de fuentes de agua dulce, son usados ampliamente en aplicaciones tecnológicas e industriales para producción de biomasa y, para investigación básica, ofrecen acorde con diversos autores (Martínez Sancho et al., 1999⁴³; Sánchez et al. 2008⁴⁴) material experimental adecuado en el estudio de la fotosíntesis y otros problemas fundamentales en bioquímica y fisiología que influyen los sistemas de producción.

Adicionalmente los reportes sobre la capacidad de producción de exopolisacáridos y fitohormonas en microalgas verdes como *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. han sido descritos en diversos estudios (Stirk et al., 2002⁴⁵; Bailey et al. 1973⁴⁶) los cuales hacen de estos géneros una opción adecuada para el desarrollo de aplicaciones tecnológicas con impacto en el sector agrícola o alimentario.

Estas posibilidades en el desarrollo de productos se ven fortalecidas por el hecho de que las microalgas, como organismos fotoautótrofos, requieren para su crecimiento, luz solar y dióxido de carbono (CO₂) uno de los principales gases de efecto invernadero, generando en el mismo proceso oxígeno (O₂) y acumulando el carbono en sus tejidos o en moléculas de interés.

En el presente estudio al hablar de microalga nos referimos, específicamente, a las algas microscópicas y a las bacterias fotosintéticas oxigénicas, i.e. cianobacterias. El interés en la explotación de estos grupos de organismos fotótrofos se fundamenta en su potencial uso para la producción de biomasa en diversas aplicaciones que van desde la elaboración de alimentos y aditivos hasta una gran cantidad de compuestos químicos de diverso valor agregado y de mercado.

Las microalgas presentan distintos tipos de organización celular y adaptaciones morfológicas que diferencian las distintas divisiones y clases existentes. Otro aspecto de gran importancia es el tipo de pigmento para la recolección de la energía solar que se usará en la fotosíntesis y el carbohidrato de reserva (polisacárido) que servirá para acumular la energía generada en este proceso.

La fotosíntesis es un proceso único de conversión de la energía lumínica del sol, a través del cual, se produce materia orgánica a partir de compuestos inorgánicos y energía solar, teniendo como intermediarios de este proceso a organismos fotoautótrofos. La fotosíntesis puede ser de dos tipos: anoxigénica y oxigénica. En el presente documento nos enfocaremos en la fotosíntesis oxigénica dado que es el proceso predominante de las microalgas en estudio.

La fotosíntesis oxigénica es básicamente una reacción redox, en la cual dióxido de carbono y agua son convertidos en carbohidratos y oxígeno, gracias a la energía lumínica recolectada y acumulada por moléculas de clorofila. Estas moléculas hacen parte de un

aparato fotosintético que se organiza en organelos especiales, el cloroplasto, el cual contiene láminas alternadas de membranas de lipoproteínas, tilacoides, y fases acuosas, el estroma.

El proceso de conversión se divide tradicionalmente en dos etapas o fases (Masojídek et al., 2005)⁴⁷: reacciones luminosas y reacciones oscuras. Las reacciones de la fase luminosa están atadas a las membranas fotosintéticas; en esta etapa la energía lumínica es convertida en energía química (enlace químico) generando un *reductor bioquímico* NADPH₂ y un compuesto de *alta energía* ATP. En la fase oscura, llevada a cabo en el estroma, el NADPH₂ y ATP generados previamente, son utilizados en la reducción bioquímica secuencial de dióxido de carbono (CO₂) a carbohidratos.

La energía de la fotosíntesis es entregada en forma de luz, es decir, radiación electromagnética que viaja a una velocidad de $3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$. Basados en la longitud de onda, la radiación electromagnética puede ser dividida en varios componentes, sin embargo, como luz se denota la radiación con longitudes de onda entre 10^{-3} y 10^{-8} m (10^6 a 10^1 nm). La parte visible del espectro de luz se encuentra en el rango de los 380 nm a los 750 nm. Este rango de longitudes de onda, del violeta hasta el rojo, corresponde a la radiación fotosintéticamente activa, PAR por sus siglas en inglés, la cuál es a su vez la radiación utilizable en la fotosíntesis.

Acorde con la teoría cuántica, la energía lumínica es suministrada en la forma de paquetes separados denominados *fonones*, i.e. cuantos unitarios de luz (energía). Los pigmentos fotosintéticos absorben la energía de los fonones, y los transfieren a los centros de reacción donde es utilizada para diversas reacciones fotoquímicas. Según la ley de Einstein, una mol de un compuesto debe absorber la energía de N fonones ($N=6.023 \times 10^{23}$, el número de Avogrado) para iniciar una reacción. Esta unidad es denominada un Einstein ($E=6.023 \times 10^{23}$ quanta).

El flujo luminoso se mide en *lumens* (lm); la intensidad de la iluminación, *iluminancia*, es expresada en *lux* (lm m^{-2}) y expresa la intensidad lumínica sobre una superficie (cantidad fotométrica). En ficología también es común la medición de la energía lumínica incidente sobre una superficie, i.e. flujo de energía radiante o flujo luminoso, *irradianza*, en unidades de potencia por la unidad de área (W m^{-2} o $\text{J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, cantidad radiométrica). Sin embargo, dado que las reacciones fotoquímicas en la fotosíntesis dependen del número de fonones incidentes sobre una superficie, resulta lógico expresar la irradianza como el número de quanta (fonones) que alcanzan una unidad de superficie en la unidad de tiempo correspondiente, i.e. se mide la densidad del flujo de fonones fotosintéticos en $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ o $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Los organismos fotótrofos, sin excepción, contienen pigmentos fotosintéticos para la recolección de la energía lumínica. Existen tres clases principales de pigmentos: clorofilas (Chl), carotenoides y ficobilinas. Las Chl (pigmentos verdes) y los carotenoides (pigmentos naranjas y amarillos) son lipofílicos y se encuentran asociados en complejos Chl-proteína, mientras que las ficobilinas son hidrofílicas.

Las moléculas de Chl consisten de un anillo tetrapirrol (cabeza polar, cromóforo) que contiene un átomo central de magnesio, y una cadena larga de alcohol terpenoide (exceptuando la Chl c). Estas moléculas están unidas de forma no-covalente a las

apoproteínas, formando complejos para la recolección de luz/energía o fotosistemas. Estructuralmente, los varios tipos de moléculas de Chl designadas *a*, *b*, *c* y *d* difieren en los radicales sustitutos del anillo tetrapirrol. Todas las clorofilas tienen dos bandas principales de absorción: azul o verde-azul (450-475 nm) y rojo (630-675 nm). La Chl *a* está presente en todos los fotoautótrofos oxigénicos como una parte del núcleo y centros de reacción de los complejos pigmento-proteína, y en las antenas colectoras de luz está acompañada de Chl *b* o Chl *c*. Los denominados pigmentos accesorios (antenas) Chl *b*, *c* y *d* extienden el rango de absorción de luz.

El ciclo de Calvin-Benson es la principal ruta metabólica para la formación de compuestos orgánicos a partir de dióxido de carbono. En este proceso, la energía y el poder reductor del ATP y NADP, respectivamente, es usado en la síntesis de azúcares que pueden ser oxidados inmediatamente para la generación de energía, combinados en polisacáridos de bajo peso molecular para procesos de transporte, o almacenados-excretados en largas cadenas de polisacáridos.

Las algas del presente estudio, *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., pertenecen a la clase Chlorophyceae orden Chlorococcales. Estas microalgas presentan clorofilas *a* y *b* así como diversidad de carotenoides que se acumulan en diversas condiciones de estrés. El carbohidrato de reserva es el almidón, polímero compuesto de amilasa y amilopectina el cual, a diferencia de otras microalgas, es formado en el interior del cloroplasto (Tomaselli, 2005)⁴⁸. Las aplicaciones comerciales que explotan las microalgas verdes se relacionan con un estrecho número de generos de Chlorophyceae entre las cuales se destaca *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Botryococcus* y *Scenedesmus*.

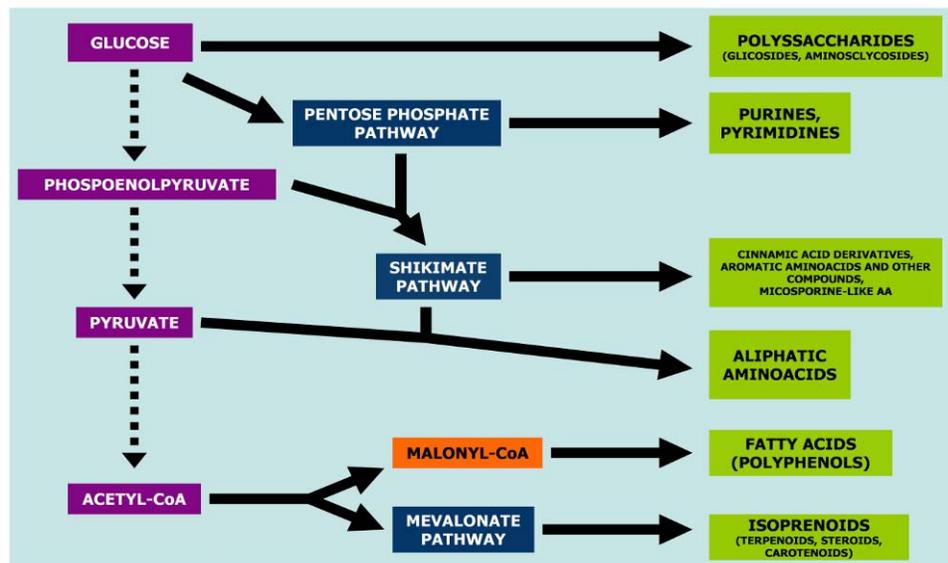


Figura 1. Principales rutas metabólicas para la síntesis de algunos metabolitos primarios y secundarios en microalgas. Adaptado de Burja et al., 2001⁵⁴.

Las especies de los géneros *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. han sido evaluadas en diversas investigaciones (Lombardi et al. 2005⁴⁹; Becker 1984⁵⁰; Ördög et al. 2004⁵¹;

Martínez Sancho et al. 1999⁴³; Roeselers et al. 2008⁵²; Mandal y Mallick 2009⁵³) para el uso de su biomasa o metabolitos en una gran diversidad de aplicaciones, e.g. agregación de partículas de suelo, atrapamiento de iones-bioremediación, nutrición humana, pigmentos-luteína, antimicrobianos, anticancerígenos, tratamiento de residuos, acuicultura-piensos, entre otras.

Dichas aplicaciones representan un amplio potencial dada la diversidad de productos que se pueden generar a partir de estos organismos y a la particularidad metabólica que presentan los organismos fotoautótrofos (ver figura 1). Los principios básicos para el cultivo microbiano en general son aplicables a las microalgas. Sin embargo, su capacidad de utilizar la luz solar como fuente de energía los ubica en un lugar preferencial con relación a otros microorganismos.

Como se mencionaba anteriormente las microalgas son capaces de desarrollar diversos mecanismos tróficos para su replicación y crecimiento centrados de manera preferencial en las dos principales formas de nutrición: autotrofia (fototrofia) y heterotrofia (fagotrofia), de las cuales la autotrofia es ampliamente la que reviste mayor importancia en la biotecnología de las microalgas.

Las diferentes rutas metabólicas posibles para las microalgas se muestran en la figura 2. Los organismos autotróficos obtienen su energía por medio de la captación y absorción de energía lumínica para la reducción de CO₂ a través de la oxidación de sustratos, principalmente agua, con la consiguiente liberación de O₂ (fotótrofos oxigénicos). Los organismos fotoautótrofos solo requerirán iones minerales inorgánicos para realizar sus diversas reacciones metabólicas. No obstante, un gran grupo de estos organismos requerirá cantidades mínimas de compuestos orgánicos para su crecimiento, e.g. vitaminas.

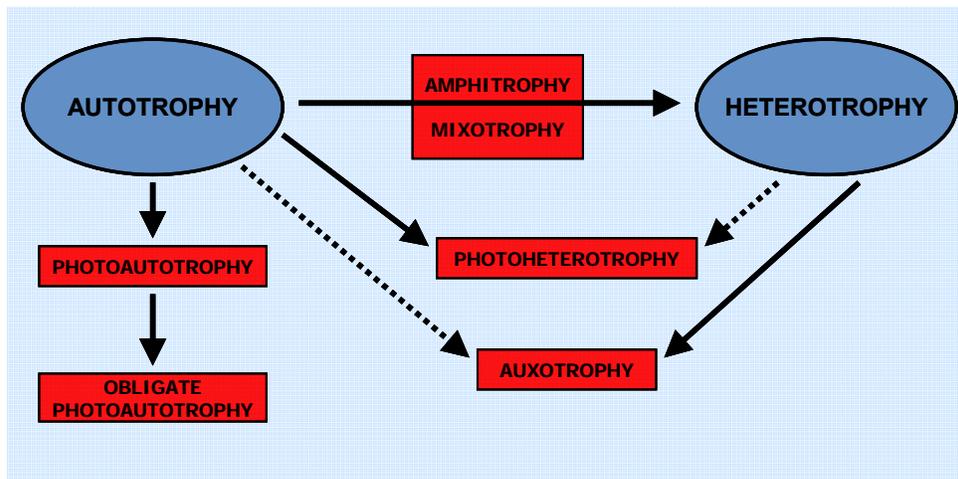


Figura 2. Posibilidades tróficas para microalgas, considerando el crecimiento heterotrófico y autotrófico como los principales. Adaptado de Grobbelaar, 2005⁵⁹.

Las posibilidades tróficas en las microalgas generalmente se intercambian en función de las condiciones de crecimiento dentro del medio o sistema. Un importante aspecto al respecto, identificado y descrito por Fogg, 1966⁵⁵ y Grobbelaar, 1983⁵⁶, es el rol de las

sustancias orgánicas que son excretadas bajo ciertas condiciones medioambientales, e.g. ácido glicólico, fosfatasa alcalina y un grupo amplio de exudados orgánicos. Richmond, 2000⁵⁷, y Grobbelaar, 1985⁵⁸, han realizado sugerencias relacionadas con el efecto y función de estos exudados durante el cultivo.

El hecho de que las microalgas actúen como bombas orgánicas y que cantidades apreciables de estas sustancias sean excretadas, sugiere que una parte significativa de la productividad global no forma parte de la fracción particulada, la cuál es normalmente medida cuando los rendimientos son determinados, estudios detallados al respecto han sido realizados por Grobbelaar, 2005⁵⁹, con *Scenedesmus obliquus* como organismo de estudio.

Dado la condición metabólica de los organismos fotoautótrofos para su crecimiento resulta claro que el principal aspecto que condiciona el cultivo en masa de estos microorganismos está en el uso eficiente y efectivo de la totalidad de energía (luz solar) disponible para maximizar la productividad fotosintética de biomasa, e.g. células y metabolitos secundarios. Esto es particularmente válido para el cultivo en masa de microalgas a campo abierto, proceso en el cual el uso de la energía solar, acorde a lo establecido por Richmond, 2005⁶⁰, es piedra angular sobre la cuál los prospectos para esta rama de la biotecnología descansan.

Los sistemas para producción de microalgas a nivel industrial se pueden catalogar en dos tipos principales: abiertos y cerrados. Los desarrollos iniciales para la producción en masa de microalgas y sus metabolitos a nivel comercial se centraron en el uso de sistemas abiertos (open ponds), sin embargo un reducido número de especies se cultivan en estos, dado que se requiere de ambientes altamente selectivos debido a que existe un alto riesgo de contaminación del medio de cultivo por hongos, bacterias y protozoos, y a que se presente antagonismo con otras microalgas que tienden a ser dominantes en el cultivo en lugar de la especie original usada como inóculo.

Los sistemas de producción cerrados, de aquí en adelante fotobioreactores (PBR), proporcionan un ambiente aislado que facilita el cultivo de especies sensibles que no pueden ser cultivadas en sistemas abiertos. Tredici, 2005⁶¹, establece que el PBR se puede definir como un reactor en el cual organismos fotótrofos (bacterias, algas o células vegetales) son cultivados o usado para llevar a cabo una reacción fotobiológica en la que una gran proporción de la luz (>90%) no se aplica directamente sobre la superficie del cultivo, sino que tiene que pasar a través de las paredes transparentes del sistema (reactor) para alcanzar las células cultivadas. Los PBR ofrecen un ambiente cerrado de cultivo que facilita por lo tanto un ambiente controlado que asegura en gran medida el desarrollo de la especie deseada. Por tal razón, estos sistemas permiten la explotación de la gran diversidad de las cerca de 50.000 especies de microalgas conocidas, muchas de las cuales tienen un gran potencial para la producción de biomasa o metabolitos secundarios.

Estudios adelantados por Janssen et al., 2000⁶², establecen que el régimen de luz dentro de un PBR es caracterizado por un gradiente de luz que varía proporcionalmente desde la superficie hasta el interior, de mayor a menor respectivamente. Esto principalmente debido a que los PBR son especialmente confinados por las dimensiones del recipiente, limitando la energía lumínica que se entrega en el sistema y, adicionalmente, dificultan el

intercambio directo de gases con sus alrededores. Por tal razón el sistema deberá maximizar la eficiencia para lograr la conversión de la luz (energía) entregada (OPD) por unidad de área/volumen.

Diversos factores determinan la eficiencia de un PBR para la producción de biomasa, no obstante estos factores pueden resumirse en un adecuado control de los gradientes, transversales y longitudinales, de diferentes parámetros o variables (v.g. temperatura, luz, régimen de flujo, concentración de gases CO₂/O₂) en el medio de cultivo.

A nivel industrial el uso de cultivos celulares de alta densidad es la principal alternativa para lograr altos rendimientos. Estos cultivos incrementan la densidad celular de manera exponencial hasta que toda la energía lumínica disponible (PAR) es absorbida por el cultivo. Una vez que esta concentración celular es alcanzada, la masa celular alcanza un estado estacionario de acumulación, rata linear, hasta que la luz por célula o algún substrato en el medio de cultivo se vuelva limitante, o alternativamente, alguna actividad o condición inhibitoria detenga el crecimiento celular.

Adicionalmente, dependiendo de las características de flujo o mezcla dentro del PBR, las microalgas estarán expuestas a ciertas variaciones hidrodinámicas que afectan la conversión de luz de manera positiva o negativa. Estas limitaciones, descritas por Rosello Sastre et al., 2006⁶³, afectan la eficiencia de los sistemas de producción al generar zonas oscuras de flujo que limitan el diseño, y por ende, la tasa fotosintética del proceso.

Las fluctuaciones que se presentan por tanto en el sistema de producción inciden en el metabolismo algal, particularmente por la generación de gradientes, debido a que los sistemas de producción de mayor uso, *tubulares* y *air-lift*, operan como sistemas o reactores *plug-flow*, que limitan la geometría de diseño. Esto es particularmente importante desde el punto de vista ingenieril, puesto que el CO₂ como fuente de carbono del proceso puede convertirse en limitante a lo largo del eje longitudinal de operación del reactor y el O₂ puede acumularse en niveles tóxicos. Los gradientes transversales serán igualmente otra gran limitación en el diseño debido a que la tasa de penetración de la luz o energía en el cultivo se ve afectada sensiblemente en cultivos de alta densidad. Yang, 2000⁶⁴, Sánchez, 2008⁶⁵, Greque de Morais, 2007⁶⁶, entre otros autores establecen en sus estudios que otros factores de proceso a considerar en la operación y diseño de PBR podrían ser los coeficientes de dilución, los tiempos de residencia, la alternancia de ciclos luz/oscuridad, composición del medio de cultivo y los materiales de construcción del equipo.

A las complejidades propias de la ingeniería del proceso, descritas anteriormente, deberá añadirse factores medio ambientales como los ciclos circadianos, variaciones de temperatura durante el día, variabilidad en la irradianza solar debido a cambios estacionales, orientación del equipo para maximizar la eficiencia por unidad volumétrica y de área, efectos de sombreado en cultivos de alta densidad, entre otros. Brevemente se podría decir que el reactor podría ser un generador de ambiente o “envirome” y el objetivo, específicamente en sistemas fotobiológicos, sería definir y controlar factores limitantes de tal manera que el sistema sea optimizado usando variables que condicionen todos los procesos biológicos relacionados; una representación de este planteamiento se muestra en la figura 3. Vunjak-Novakovik, 2005⁶⁷, establece que en última instancia todos los factores ambientales descritos anteriormente afectarán la cinética de la división celular

o de la síntesis de metabolitos y, en nuestro caso y de manera consecuente el funcionamiento y viabilidad del sistema de producción.

La gran variabilidad de especies y productos, característica principal de la biotecnología de las microalgas, implica un amplio espectro de técnicas de separación que pueden o deben ser aplicadas para el aislamiento de metabolitos o biomasa. Sin embargo, se puede generalizar sobre los procesos *downstream* en cultivos de microalgas, que se requerirán al menos uno o más pasos de separación sólido-líquido para la obtención o separación del producto deseado. La biomasa de microalgas es usualmente recolectada por sedimentación, centrifugación o filtración, generalmente de manera adicional se requerirá un paso de floculación o coagulación adicional.

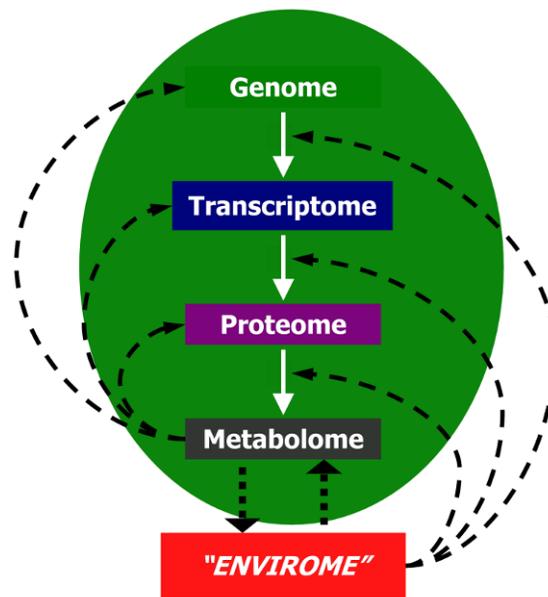


Figura 3. Diagrama de las interacciones representativas entre el ambiente celular ("envirome") y el metabolismo celular. Adaptado de Liden, 2002⁶⁸.

Sin embargo esta generalización sobre los sistemas de recuperación no obedece a procesos específicos y, por el contrario, el sistema de recuperación y purificación u obtención del producto final deberá obedecer a consideraciones de mercado y económicas preferencialmente. Muffler y Ulber, 2005⁶⁹, incluyen adicionalmente dentro del proceso de recuperación algunos parámetros del sistema de producción (*upstream*) que influyen el proceso de recuperación o *downstream* que se deberán considerar:

- Propiedades características del microorganismos o línea celular (e.g. tamaño, forma)
- Ubicación del producto (i.e. intra-extra celular)
- Estabilidad del producto (e.g. labilidad, composición)
- Sub-productos o impurezas (e.g. sales, fragmentos celulares)

- Concentración del producto deseado (biomasa o metabolito) en el medio de cultivo del cual deberá ser recuperado.

Gudin y Therpenier, 1986⁷⁰, han determinado que particularmente para los procesos de recuperación de células de microalgas el proceso de recuperación representa cerca de un 20-30% de los costos totales de producción. Esto se debe principalmente al tamaño de las microalgas y a su baja concentración en el medio de cultivo.

Al igual que en otros bioprocesos las actividades de procesamiento *downstream* en la biotecnología algal presentan un desarrollo incipiente y se convierten por tanto en un área activa de investigación. Tal como se lo discute líneas arriba, el desarrollo de un método de recuperación y purificación de biomasa o metabolitos proveniente de microalgas, requiere del análisis detallado del sistema de producción y necesidades de comercialización que permitan el diseño e implementación de un sistema económico, eficiente, efectivo y adaptado a las necesidades o consideraciones propias del sistema de producción diseñado.

Acorde con lo planteado, la biotecnología de microalgas y sus aplicaciones representa un potencial bastante amplio con relación al desarrollo de sus procesos, sistemas y productos que se relaciona preferencialmente con problemáticas de desarrollo con alto impacto en la generación de desarrollo y bienestar para la sociedad.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener los parámetros de proceso requeridos para el escalamiento de un bioproceso orientado al desarrollo de mejoradores de suelos a base de extractos de microalgas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Estandarizar las condiciones de cultivo y la producción de biomasa para las especies de microalgas *Scenedesmus sp.* - *Chlorella sp.*

3.2.2. Establecer alternativas y metodologías para el diseño y desarrollo del proceso de obtención de extractos o biomoléculas de las microalgas *Scenedesmus sp.* y *Chlorella sp.*

3.2.3. Analizar y caracterizar las fracciones de la biomasa obtenida y evaluar comparativamente su potencial uso agronómico.

3.2.4. Analizar y definir los parámetros de proceso que permitan el diseño del sistema de producción requerido para la producción de biomasa o biomoléculas de la especie de microalga que haya presentado el mayor potencial de uso agronómico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El cumplimiento de las actividades planteadas en el presente proyecto se desarrolló, de manera general, acorde con el diagrama descrito en la figura 4. Básicamente el proceso se dividió en dos etapas principales de evaluación que si bien se muestran secuencialmente, no necesariamente siguieron estrictamente este patrón. Cada una de las cuatro etapas descritas profundiza de manera específica en los resultados principales del proyecto descritos para los objetivos del proyecto (numeral 3.2).

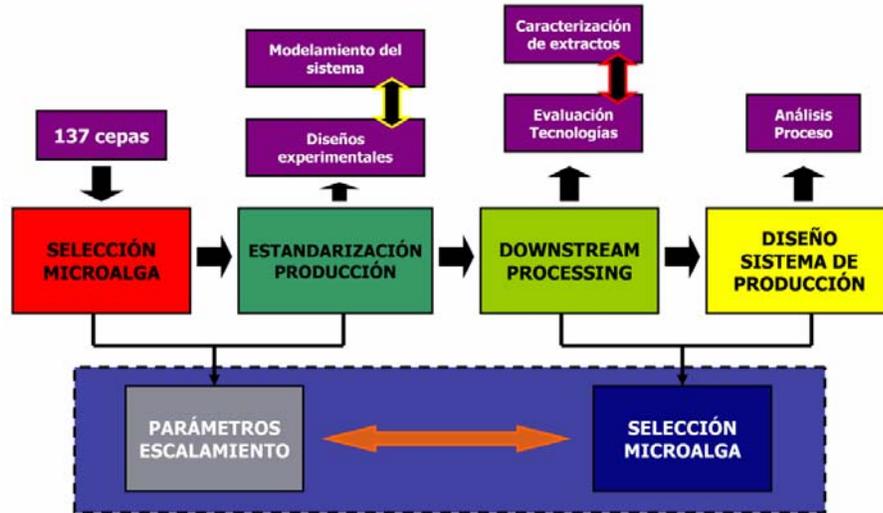


Figura 4. Diagrama del desarrollo secuencial de la estrategia operativa seguida para el cumplimiento de los objetivos principales del proyecto. La secuencia de actividades/resultados no se corresponde necesariamente en su orden.

Acorde con el plan operativo se estableció un esquema de trabajo a nivel experimental y analítico que permitiera establecer las principales actividades e insumos requeridos para el cumplimiento de los objetivos planteados. El esquema descrito en la figura 5, detalla un proceso continuo de experimentación y de análisis transversal que consolida los principales pasos requeridos para la obtención de los parámetros de proceso estipulados en el objetivo general del proyecto.

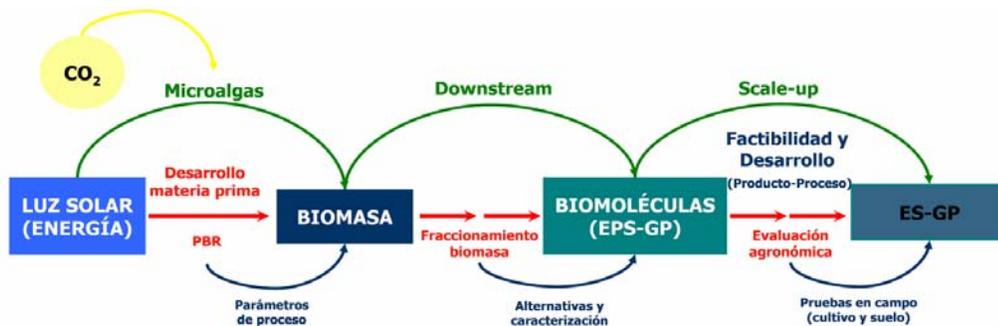


Figura 5. Plan de desarrollo y experimentación establecido para el proyecto en función del plan operativo y orientado al desarrollo de la materia prima del proyecto, extracto de microalga; donde EPS = exopolisacáridos, GP = promotores de crecimiento, ES = estructurador de suelo.

En las actividades de *downstream* y *scale-up* se puede observar una doble línea de desarrollo para su cumplimiento que relaciona el trabajo, autónomo pero interdependiente, de otros profesionales que hacen parte del proyecto y que atienden actividades especializadas en estos procesos particularmente.

4.1. ORGANISMOS

Scenedesmus obliquus (UTEX 393) y *Chlorella vulgaris* (UTEX 295), algas verdes, se usaron como organismos de estudio para los desarrollos y actividades descritas en el presente documento. Las especies pertenecen a la división Chlorophyta, y se distinguen por sus pigmentos fotosintéticos, clorofilas (Chl) a y b, y su carbohidrato de reserva, almidón. Este género abarca un gran grupo de organismos con una gran variabilidad morfológica y comprende cuatro clases: Micromonadophyceae, Charophyceae, Ulvophyceae y Chlorophyceae. Las algas del presente estudio, *C. vulgaris* y *S. obliquus*, pertenecen a la clase Chlorophyceae orden Chlorococcales

Las cepas fueron seleccionadas basadas en cinco criterios relacionados con los objetivos y actividades planteadas en la presente investigación; estos se describen a continuación:

1. Requerimientos de producción simples y similares,
2. Disponibilidad de información para su cultivo/producción,
3. Que pH suelo del cultivo meta, *Brassica oleracea*, y pH predominante para desarrollo microalgas fuera similar,
4. Que existiera evidencia de que fueran productoras de polisacáridos extracelulares y/o promotores de crecimiento,
5. Los géneros seleccionados deberían tener reportes documentados sobre su uso efectivo en el mejoramiento de la calidad de suelo o la productividad de materias primas agrícolas.

4.2. MEDIO DE CULTIVO

Cuadro 1. Composición básica del medio Bristol para el cultivo de microalgas

#	Componente	Cantidad	Concentración de la solución stock	Concentración final
1	NaNO ₃	30 mL/L	10 g/400mL dH ₂ O	8.82 mM
2	CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mL/L	1 g/400mL dH ₂ O	0.17 mM
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 mL/L	3 g/400mL dH ₂ O	0.3 mM
4	K ₂ HPO ₄	10 mL/L	3 g/400mL dH ₂ O	0.43 mM
5	KH ₂ PO ₄	10 mL/L	7 g/400mL dH ₂ O	1.29 mM
6	NaCl	10 mL/L	1 g/400mL dH ₂ O	0.43 mM
7	P-IV Metal Solution*	6 mL/L		
8	Vitamins Solution**	6 mL/L		

El medio de cultivo utilizado para todos los ensayos realizados con las dos especies de microalgas bajo estudio fue el medio *Bristol*, recomendado por la UTEX, el cual está básicamente compuesto por sales y minerales, mas una solución de vitaminas, constituida básicamente por tiamina y biotina. La composición detallada se muestra en el cuadro 1.

4.3. PRUEBAS EXPERIMENTALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS

Acorde con el plan experimental establecido, el cultivo de las microalgas bajo estudio por el proyecto se realizó en dos etapas principales: estandarización y optimización. Los ensayos de estandarización se utilizaron como referencia para el establecimiento de una línea base de producción a partir de la cual se especificó un sistema o plan de ensayos para optimización que permitiera establecer los parámetros de proceso base y objeto de investigación. Una etapa adicional de validación se utilizó para certificar las respuestas óptimas y los modelos obtenidos en la fase de optimización.

4.3.1. MONTAJES DE ESTANDARIZACIÓN

4.3.1.1 Diseño experimental. Se utilizaron recipientes de vidrio translúcido con un volumen total de 5 L que trabajó a un volumen estándar de 2 L. Para la producción de la biomasa, crecimiento fotoautótrofo, se utilizó medio de cultivo Bristol (ver sección 4.2), y como fuente de carbono se utilizó CO₂ gaseoso. Un esquema del montaje se muestra en la figura 6.

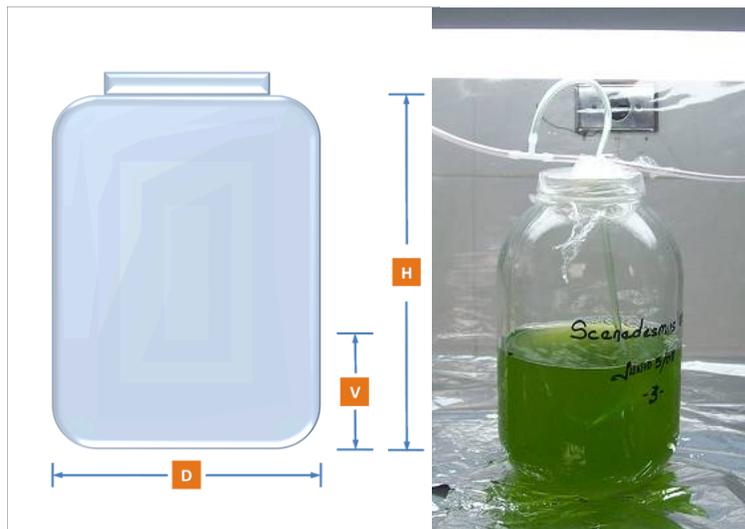


Figura 6. Montaje Pruebas preliminares de estandarización sistema de producción en el cultivo fotoautótrofo de las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*.

La energía para la reducción del carbono inorgánico se suministró con lámparas de barra fluorescente Phillips de 60 W ubicadas en la parte superior de los recipientes. Se trabajaron fotoperíodos de 24 horas en todas las réplicas para cada especie con una iluminancia (I_a) promedio durante los ensayos de 1.250 lux d^{-1} , medida con un luxómetro Minipa MLM 1010. El pH se ajustó al inicio de cada prueba en 6.8 y se trabajó todos los ensayos a temperatura ambiente. Para cada réplica del experimento se evaluó el crecimiento celular (Y_c) mediante conteo de células por unidad de volumen (Células mL^{-1}).

Los ensayos de esta etapa se analizaron comparativamente para las dos especies bajo estudio, considerando de manera preferencial la productividad en el tiempo para cada una y calculando los coeficientes de crecimiento y otros parámetros de utilidad para este propósito descritos por Wood, 2005⁷¹, y que se describen con detalle en la sección 4.4. Adicionalmente en estos experimentos se cuantificó la concentración de auxinas y exopolisacáridos (EPS) presentes en el sobrenadante de cada una de las especies al finalizar su fase de crecimiento exponencial.

Concluidas las pruebas experimentales de esta y, basados en los resultados finales encontrados, se realizó la selección de la cepa que presentaba un mayor potencial en cuanto a su productividad en biomasa, exopolisacáridos y fitohormonas (auxinas) para su uso en el desarrollo del objetivo del proyecto.

4.3.1.2 Diseño del análisis. En la identificación de las principales condiciones y parámetros que inciden sobre la respuesta de las especies bajo estudio y considerando preferencialmente los análisis comparativos que permitieran seleccionar la especie con mayor potencial para su uso en los montajes de optimización, el conjunto de estadísticos seleccionados para la interpretación de los resultados fueron los siguientes:

- **Media (\bar{X}):** medida de tendencia central que refleja el valor promedio de un conjunto de datos experimentales
- **Varianza (σ^2):** es una medida de variabilidad que me permite estandarizar la desviación de un fenómeno (factor o variable) con respecto a su media, al elevarlo al cuadrado.
- **Desviación estándar (σ):** es otra medida de variabilidad que básicamente me permite definir cuanto se separan los datos de la media. Formalmente es la raíz cuadrada de la varianza por lo que su valor estará en las mismas unidades del factor o variable bajo estudio.
- **Rango (W):** estadístico descriptivo que mide la amplitud o separación de un conjunto de datos experimentales calculado a partir de los valores mínimos y máximos del conjunto.
- **Mínimos y Máximos:** representan los límites superiores e inferiores del conjunto de datos evaluados para la variable bajo estudio.

- Prueba (estadístico) de asimetría: la asimetría es el tercer momento que describe la naturaleza de una distribución; que tan ladeado está el conjunto de datos analizados (hacia la izquierda o derecha). Una distribución asimétrica hacia la izquierda tendrá una asimetría negativa, por correspondencia una asimetría positiva será indicativo de que la distribución será asimétrica hacia la izquierda.
Este efecto puede ser usado para definir si un conjunto de datos proviene de una distribución normal, en el estadístico de asimetría se considerará que cuando este presente valores fuera del rango de -2 a +2 indicaría diferencias significativas de la normalidad, lo cual tiende a invalidar pruebas que comparan las desviaciones estándar de un conjunto de datos.
- Prueba (estadístico)-t: esta prueba de hipótesis permite definir si conjuntos de datos normales de dos muestras, que se asume tienen la misma varianza, tienen medias significativamente diferentes. La prueba construye igualmente los intervalos de confianza para la diferencia de medias el cual si no contiene el valor 0.0 en su rango querrá decir que existe una diferencia estadística significativa entre las medias de las dos muestras con un nivel del 95.0% de confiabilidad.
La prueba-t también puede usarse para determinar una hipótesis específica sobre si la diferencia entre las dos medias de las poblaciones que proviene las muestras es igual a 0.0. En este caso la hipótesis nula es que la diferencia entre las medias es igual a 0.0 y la alternativa será que la diferencia no es igual a 0.0. En esta prueba si el valor-P calculado es menor de 0.05 se descarta la hipótesis nula (media 1 = media 2) a favor de la alternativa (media 1 \neq media 2).
- Prueba (estadístico)-F: esta prueba de hipótesis compara las varianzas de dos muestras y también construye los intervalos de confianza para cada desviación estándar y para el coeficiente de las varianzas. El intervalo de confianza para los coeficientes de las varianzas indica cuando este contiene el valor 1.0, que no existe una diferencia estadística significativa entre las desviaciones estándar de las dos muestras al 95% de confianza.
La prueba-F también puede usarse para determinar una hipótesis específica sobre las desviaciones estándar de las poblaciones de las que provienen las dos muestras. Esta prueba ha sido construida para determinar si el coeficiente de las desviaciones estándar es igual a 1.0 contra la hipótesis alternativa de que el coeficiente no es igual a 1.0. Cuando el valor-P calculado para esta prueba es menor de 0.05 se descarta la hipótesis nula ($\sigma 1 = \sigma 2$) en favor de la alternativa ($\sigma 1 \neq \sigma 2$).
- Prueba de Kolmogorov-Smirnov: esta prueba de hipótesis compara las distribuciones de las dos muestras. Esta prueba computa la distancia máxima entre las distribuciones acumulativas de las dos muestras. Cuando el valor-P de esta prueba es mayor o igual a 0.05, no existe diferencia estadística significativa entre las dos distribuciones a un nivel de confianza del 95.0%.

Estos estadísticos que incluye medidas de tendencia central, medidas de variabilidad, medidas de forma y pruebas de hipótesis, se utilizarán para comparar y evidenciar si existe una diferencia significativa entre las respuestas consideradas durante estos ensayos para las dos especies (muestras) evaluadas.

4.3.2. MONTAJES DE OPTIMIZACIÓN

4.3.2.1 Diseño experimental. Los métodos estadísticos de diseño de experimentos tienen como principal función encontrar las condiciones óptimas de un proceso o sistema de producción con mínimo esfuerzo y con la máxima confiabilidad.

Las técnicas de diseño experimental son ampliamente utilizadas en la actualidad debido a que proporcionan una serie de ventajas evidentes respecto a los métodos tradicionales de investigación ya que permiten estudiar simultáneamente distintas variables (factores), pueden evidenciar las interacciones existentes entre las mismas, suponen un ahorro importante de experimentos, tiempo y recursos, permiten estimar la fiabilidad de los resultados y, en general, proporcionan mayor información.

Una forma para optimización de procesos con técnicas de diseño experimental es el uso de diseño factoriales. En el diseño factorial se fijan unos niveles para los factores y se planifican experiencias en las que se combinan dichos niveles de todas las formas posibles para la realización de un experimento. Así todos los niveles para un factor se combinan con todos los niveles de los demás factores considerados en la programación del experimento. El cambio de nivel en los factores tiene su influencia dentro del modelo matemático empleado para la descripción del sistema.

Dentro del diseño factorial la metodología de superficie de respuesta permite evaluar y caracterizar la información obtenida con la experimentación que depende de k factores, mediante una superficie con $k + 1$ dimensiones. En el caso más simple, el estudio de la influencia de 2 variables X e Y (factores) sobre una función objetivo Z , denominada respuesta, dará lugar a una superficie formada por la unión de todos los puntos (X, Y, Z) que satisfagan la relación $Z = f(X, Y)$. Esto puede observarse en un diagrama XYZ, en el cual cada pareja de valores (X, Y, Z) de los factores llevará asociado un valor (Z) correspondiente a la respuesta.

Debido a que es prácticamente imposible determinar todos los puntos del dominio experimental, se utilizan modelos matemáticos empíricos que permiten describir el comportamiento del sistema de interés sin que se estudie completamente la región experimental. Esto permite obtener, a partir de la experimentación en algunos puntos seleccionados (niveles) para los factores, los coeficientes de un modelo descriptivo del sistema estimado mediante regresión.

Los diseños bajo metodología de *Screening* utilizan una superficie de respuesta plana que genera un modelo polinómico de primer grado. El estimado para los valores de los coeficientes del modelo polinómico que se pretenden modelar es calculado utilizando el mínimo de experimentos posibles. Al diseño factorial se le pueden añadir nuevos puntos, algunos de los cuales se sitúan en el centro del diseño para poder estimar el error experimental.

La optimización se realizó aplicando un diseño factorial 2^k , con $k=3$ factores, agitación (R_r , rpm), Iluminancia (I_a , lux) y fuente de carbono suministrada (C^* , mezcla de aire enriquecida con CO_2 en % v/v), analizados en dos niveles. El diseño factorial por metodología de *Screening*, permite estimar los efectos principales y las interacciones de primer orden. Adicionalmente se utilizaron 4 experimentos en el punto central para poder

estimar el error experimental asociado a las respuestas: coeficiente específico de crecimiento (μ , d^{-1}), concentración de exopolisacáridos-EPS en el sobrenadante (Y_{ch} , $mg L^{-1}$), y de ácido indol acético-IAA (Y_A , $nM L^{-1}$). De esta forma se obtuvo un diseño con 12 experimentos para 3 factores evaluados en 3 niveles (ver Tabla 1). El análisis de las respuestas para cada ensayo se realizó utilizando el software estadístico Statgraphics plus 5.0⁷².

Para el desarrollo de estos ensayos se utilizaron recipientes para cultivo Kontes de 500 mL (ver figura 7), que se mantuvieron a una temperatura constante de $27\text{ }^{\circ}C \pm 5\text{ }^{\circ}C$. En los ensayos que requerían agitación para modificar el régimen de flujo (R_f) se equipó cada recipiente Kontes con un impulsor de base magnético y la velocidad se controló manualmente tal como se muestra en la figura 4. La iluminancia se midió en el centro geométrico de cada recipiente con un luxómetro Minipa MLM 1010 y la intensidad del flujo luminoso, I_a (lux), se ajustó modificando la capacidad (W) de la fuente de luz. La concentración de carbono en la mezcla, C^* (% CO_2 v/v) se controló mediante ajuste de la presión de descarga del sistema.

Tabla 1. Descripción del diseño experimental base usado en la optimización, caracterización del sistema de producción e identificación de los parámetros de proceso en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Diseño Base					
Número de factores experimentales	3		Resumen Diseño		
Número de respuestas	3		Clase	Factorial	
Número de corridas	12		Nombre	Screening 2^3	
Factores	Discretizados		Experimental		
	Bajo	Alto	Bajo	Alto	Unidades
Intensidad flujo luminoso	-1.0	1.0	5,000	11,000	lux
Fuente de carbono	-1.0	1.0	0	4	% CO_2 v/v
Régimen de flujo	-1.0	1.0	0	1,200	rpm
Respuestas			Unidades		
Concentración de Exopolisacáridos			mg L-1		
Concentración de Ácido Indol Acético			nM L-1		
Coeficiente específico de crecimiento			d-1		

El diseño se seleccionó basado en el control local disponible para el ensayo ya que la información a la mano para el procedimiento no era muy amplia. La metodología, acorde a lo descrito por Box y Hunter, 1986⁷³, se aplica para propósitos de optimización y de igual forma todas las variables de los ensayos eran continuas, permitiendo el uso adecuado de esta técnica.

También fue importante para la elección de este diseño buscar interacciones entre los factores experimentales seleccionados; cabe recordar que las interacciones solo se hacen visibles en experimentos factoriales, y la metodología de *Screening* permite una aproximación fácil para la identificación de estas interacciones tal como ha sido descrito por Sharma et al., 1999⁷⁴.

Otra variable de proceso calculada en los presentes ensayos fue el número de Reynolds impulsor, Re_i . Considerando los hallazgos realizados por Pruvost, 2008⁷⁵, esta variable y el hecho de que la condición hidrodinámica del cultivo afecta la conversión de luz en los sistemas de producción fotoautotróficos permitirá a través de su cuantificación apoyar análisis relacionados con los regímenes de flujo evaluados en el diseño.

La respuesta óptima que se encontraría en los presentes ensayos se utilizaría para la validación del modelo generado y para la estabilización final del sistema de producción más adecuado acorde con las variables experimentales establecidas.

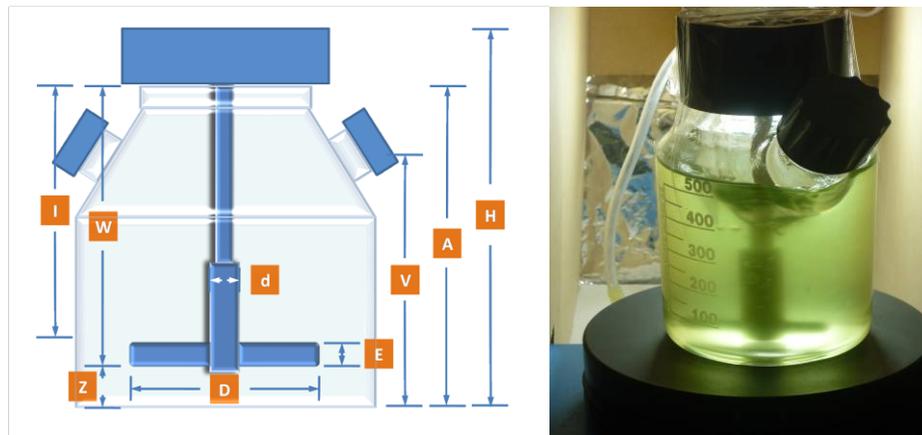


Figura 7. Montajes de optimización para la evaluación de las variables experimentales en diseño factorial por metodología de Screening en el cultivo fotoautótrofo de la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Finalmente, se debe resaltar que el diseño experimental realizado se utilizó únicamente para la especie de microalga *Scenedesmus obliquus*, dada su evaluación superior durante la fase de estandarización.

4.3.2.2 Diseño del análisis. Para la elección de las tablas, figuras y pruebas estadísticas que se prepararían para ayudar a descifrar los efectos bajo estudio, se tuvo en consideración que el material proporcionara gran cantidad de información en forma clara, concisa y de fácil interpretación. Acorde con esto las siguientes pruebas estadísticas y diagramas fueron seleccionadas:

- Diagrama de Pareto: el gráfico esquematiza de manera simplificada la representatividad de cada factor evaluado así como cada pareja de interacciones acorde con el experimento realizado. El nivel de las barras representará que tan significativo es, de mayor a menor, cada factor o interrelación en función de una respuesta específica. Adicionalmente el gráfico incluye la línea de significancia de cada efecto acorde con el valor P calculado en el análisis de varianza para cada factor e interacción, esta línea representa por tanto el valor P (correspondiente a 0.05) a partir del cual valores inferiores se podrán considerar significativos en la respuesta con un 95% de confiabilidad.

- Diagrama de interacciones: esta representación gráfica muestra para una pareja de factores (e.g. A-B) el tipo de relación que presentan en función de una respuesta específica. Para el análisis siendo la interacción AB sujeta a evaluación, la variable A se ubicará sobre el eje de abscisas en sus niveles correspondientes mientras la variable B se graficará como un par de líneas que corresponderán a sus niveles máximos (líneas +,+) y mínimos (líneas -,-). La línea graficada y su pendiente que están en función de la respuesta deberán interpretarse acorde con el tipo de interrelación que pueda existir para los factores correspondientes.
- Diagrama de efectos principales: este gráfico muestra la interrelación entre los niveles considerados para un factor unitario y su efecto en la respuesta del experimento a través de una proyección lineal del efecto. La proyección se realiza para los factores que se ubican en el eje de abscisas mientras que la respuesta, en el eje de ordenadas, se ve relacionada con el factor correspondiente y su nivel a partir de la proyección lineal del efecto. La representatividad del factor sobre la respuesta dependerá de la pendiente de la línea.
- Superficie de respuesta con contornos: esta representación representa la interrelación de k factores mediante una superficie de $k+1$ dimensiones. En los presentes ensayos la superficie representará el efecto de dos variables (X, Y) sobre una respuesta (R) mientras se mantiene la otra variable (Z) constante. La superficie ajusta en sus contornos una descripción estimada del comportamiento a partir de puntos específicos (niveles) desde los que se estima una región experimental completa.
- Análisis de varianza (ANOVA): la tabla ANOVA realiza una partición de la variabilidad en la respuesta correspondiente en piezas separadas para cada uno de los efectos. Posteriormente prueba la significancia estadística de cada efecto al comparar la media cuadrática contra un estimado del error experimental. Los valores P generados en la tabla permiten estimar cuando un factor o interacción son significativamente diferentes de cero, valor P menor de 0.05, con un nivel de confiabilidad del 95%.
- Modelo matemático: a través de un análisis de regresión se genera una ecuación, polinomio de primer grado, la cual ha sido ajustada acorde con los datos obtenidos durante la experimentación. El modelo ajustado para cada variable de respuesta permite modelarlo y realizar una descripción empírica de las variables en función de una respuesta que estará dentro de los rangos o niveles límite considerados en los niveles de cada factor y sus interacciones. El polinomio ajustado a las condiciones experimentales tiene la siguiente conformación básica:

$$R = C + x^*A + y^*B + z^*C + x_i^*AB + y_i^*AC + z_i^*BC \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

R = Valor estimado por el modelo para la variable de respuesta
 C = Constante empírica de la ecuación

x, y, z = Constantes empíricas de cada variable experimental
 x_i, y_i, z_i = Constantes empíricas de cada interacción entre variables
 A, B, C = Constante empírica correspondiente a cada variable experimental (solo válido dentro del rango evaluado)

Todas las constantes se considerarán por tanto coeficientes de regresión que corresponden de manera específica a una variable de respuesta. Los valores de las variables y la respuesta asociada están especificados en las unidades originales usadas durante el experimento.

- Respuesta óptima: este análisis muestra la combinación de factores y niveles que maximiza (o minimiza de ser deseado) la variable de respuesta dentro de la región correspondiente a la experimentación. Dicha respuesta será por tanto el objetivo final de la experimentación de optimización.

4.3.3. MONTAJES DE VALIDACIÓN. Para la validación de la respuesta óptima encontrada en el diseño experimental de *Screening* se realizó un montaje final con las condiciones óptimas por triplicado. En estos ensayos se evaluó la productividad del cultivo (Y_c , células mL^{-1}), clorofilas y proteínas de la biomasa acorde con las metodologías estandarizadas para este propósito. La evaluación de EPS en el sobrenadante (Y_{ch} , $mg L^{-1}$) para verificar la presencia y cantidad de polisacáridos en esta fase. La determinación de auxinas se centró en la cuantificación de IAA (Y_A , $nM L^{-1}$), fitohormona representativa del grupo de auxinas y con relevancia en diversas aplicaciones industriales y agroalimentarias.

Las respuestas de los diferentes ensayos se graficaron y examinaron con ayuda del software para análisis estadístico Statgraphics plus 5.0, utilizado en la evaluación de resultados para toda las pruebas de la investigación. La respuesta óptima validada en los ensayos experimentales se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción de la corrida experimental usada para estandarización y validación de la respuesta óptima obtenida durante el diseño experimental de optimización. Los ensayos se efectuaron con la microalga *Scenedesmus obliquus*.

RESPUESTA ÓPTIMA					
Factores	Discretizados		Experimental		Unidades
	Bajo	Alto	Bajo	Alto	
Intensidad flujo luminoso	-	1.0	-	11,000	lux
Fuente de carbono	-	1.0	-	4	% CO2 v/v
Régimen de flujo	-	1.0	-	1,200	rpm
Respuestas				Unidades	
Concentración de Exopolisacáridos				mg L-1	
Concentración de Ácido Indol Acético				nM L-1	
Coeficiente específico de crecimiento				d-1	

4.3.4. EXTRACCIÓN Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS. Dado que los procesos de obtención de microalgas cuentan generalmente con dos o más pasos para la recuperación de biomasa o metabolitos debido a la alta dilución de los cultivos, se decidió evaluar la eficiencia del principal proceso de recuperación, centrifugación, como alternativa tecnológica para maximizar la eficiencia de las operaciones *Downstream*. El procedimiento básicamente se fundamentó en la evaluación de eficiencias, expresadas en la remoción de biomasa del medio, analizando en el proceso la interacción entre las variables que inciden en su respuesta y su significancia en niveles para de esta forma obtener la respuesta óptima, i.e. combinación de niveles entre variables, que permita analizar la alternativa de recuperación valorada.

4.3.4.1. Centrifugación: frecuencia y tiempo. La recuperación centrifuga de células y biomasa algal es, acorde con lo descrito por Mohn, 1980⁷⁶, y Molina-Grima, 2003⁷⁷, el método preferido en las operaciones *downstream*, debido a que la gran mayoría de microalgas pueden ser separadas de la suspensión por este método. La eficiencia de este sistema está estrechamente relacionada con las características de asentamiento de las células, el tiempo de residencia del proceso, la profundidad de asentamiento, concentración de la suspensión y la intensidad de la centrifugación, i.e. gravedades a las que se somete el extracto diluido.

Considerando que la operación de centrifugación es intensiva en energía la relación de tiempo/gravedades óptima que maximice la concentración del extracto sería el objetivo de estas pruebas experimentales. Para esto, considerando que se tenía buen control local de las variables de proceso y claridad en su representatividad sobre la respuesta, se utilizó un diseño experimental por metodología de superficie de respuesta 2^2 más puntos estrella centrado en las caras. Las variables experimentales, tiempo (t , min) y frecuencia (Z_g , rpm), se manejaron en niveles máximos y mínimos contra dos variables de respuesta: turbidez (T_{NTU} , NTU) y células removidas (Y_R , Células mL^{-1}).

Las variables de respuesta se calcularon de manera independiente buscando minimizar en ambos casos, la concentración de células y la turbidez del medio. Adicionalmente y como apoyo para el análisis de las corridas se calculo el porcentaje de eficiencia de la remoción de células, el cual expresa la relación entre variables experimentales en función de su capacidad para concentrar la biomasa del extracto y obtener por tanto una fase sólida (biomasa/pellet) y líquida (sobrenadante). Las mediciones de turbidez y células removidas se realizaron sobre el sobrenadante y el porcentaje de eficiencia se calculó al relacionar la respuesta obtenida de cada corrida con el valor inicial de un blanco, i.e. extracto algal con concentración celular de 1.02×10^7 células mL^{-1} , valor que fue constante para todos los ensayos. Las lecturas de turbidez se realizaron en un turbidímetro Orion aquafast II de Thermo Electron Corporation. La concentración celular se cuantificó midiendo la absorbancia del medio de cultivo a 560 nm y los resultados se calcularon a partir de la curva de calibración estandarizada para este propósito (ver sección 4.4). La descripción del diseño experimental se muestra en el anexo F.

4.4. DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 MONITOREO DE BIOMASA Y MEDIO DE CULTIVO. Los valores de biomasa (Y_c , células mL^{-1}) fueron cuantificados usando un contador de partículas (Beckman, USA) en lecturas por duplicado y adicionalmente se validó la concentración de células reportada midiendo la densidad óptica del cultivo a 560 nm para *S. obliquus* y a 550 nm para *C. vulgaris* acorde con los procedimientos descritos por Martínez Sancho, 1999, y Shamala, 1982 I. Para las mediciones de densidad óptica del cultivo se utilizaron cubetas en vidrio de 1 cm y las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Varian-Cary 100 equipado con lámparas de luz visible y UV.

4.4.2 PARÁMETROS CINÉTICOS. Los valores de biomasa (Y_c , células mL^{-1}) y regresiones exponenciales fueron usados para calcular el coeficiente de crecimiento específico máximo (μ_{max} , d^{-1}), ecuación 1, durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo. La duplicación por día se calculó a partir de la ecuación 4, y el tiempo de duplicación acorde con la ecuación 5:

$$r = \text{Ln} (N_t/N_0) / \Delta t \rightarrow \text{Ln} N_t - \text{Ln} N_0 / \Delta t$$

$$r = \mu - m \rightarrow \text{si } m = 0, \text{ tenemos que: } r = \mu \quad \text{Ecuación 2}$$

$$K = r / 0,6931 \quad \text{Ecuación 3}$$

$$K = \text{Log} 2 (N_t - N_0) / \Delta t \quad \text{Ecuación 4}$$

$$t_d = 0,6931 / r \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

r = coeficiente específico de crecimiento cuando la mortalidad (m) es igual a cero (d^{-1})

μ = coeficiente específico de crecimiento (d^{-1})

m = mortalidad de las células (d^{-1})

K = Duplicaciones de la población por día (células d^{-1})

N_t = Tamaño de la población al final del intervalo de tiempo (células mL^{-1})

N_0 = Tamaño de la población al inicio del intervalo de tiempo (células mL^{-1})

Δt = Intervalo de tiempo (día)

t_d = Tiempo de duplicación de la población de células (d^{-1})

4.4.3 CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA EN BIOMASA. La medición de clorofilas se realizó a través del método espectrofotométrico descrito por Hansman, 1973⁷⁸, ajustado a las condiciones existentes. El método se estandarizó en un espectrofotómetro Varian-Cary 100 equipado con lámparas de luz visible y UV, las lecturas se realizaron a 665, 645 y 630 nm. Para las lecturas la biomasa fue tratada con una mezcla de acetona-agua para extraer los pigmentos, sometiendo a ultrasonido por 10 minutos y dejando hidrolizar a 4 °C por 24 horas. El extracto obtenido fue centrifugado a 4.000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante fue recuperado para ser leído en el espectrofotómetro. El valor de

concentración para clorofilas *a* y *b* en la biomasa se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Chl } a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 11,6 \text{ DO } 665 - 1,31 \text{ DO } 645 - 0,14 \text{ DO } 630 \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\text{Chl } b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 20,7 \text{ DO } 645 - 4,34 \text{ DO } 665 - 4,42 \text{ DO } 630 \quad \text{Ecuación 7}$$

El contenido total de clorofilas en la biomasa (Y_p) se estableció como la suma total de clorofilas *a* y *b*. A partir de estos valores se calculó el coeficiente de absorción de la biomasa (K_a) como una función del contenido total de pigmento a partir de la siguiente ecuación (Acién Fernández et al., 1998)⁷⁹:

$$K_a = 0.01 + 2.99 * Y_p \quad r^2 = 0.8746 \quad \text{Ecuación 8}$$

4.4.4 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA. El análisis de proteínas se dividió en dos etapas: extracción y cuantificación. Para la primera etapa se probaron los diferentes métodos de extracción de proteínas en microalgas descritos por Meijer, 1998⁸⁰. El análisis y validación de los métodos permitió seleccionar aquellos que mejor se ajustaban a cada una de las especies de microalgas bajo estudio.

El protocolo establecido para los análisis y seleccionado para los procedimientos fue el de Meijer⁸⁰, modificado. A las células se les adiciona una solución de NaOH y se someten a un proceso térmico a una temperatura de 90 °C por 30 minutos, a continuación se realiza un choque térmico y se neutraliza la solución, se lleva a cabo una centrifugación a 4.000 rpm por 5 minutos y se procede a la siguiente etapa de cuantificación espectrofotométrica.

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Bradford Modificado, 1976⁸¹. Se realizó una curva de calibración utilizando una solución estándar de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 0,1 mg mL⁻¹. Las lecturas se hicieron a dos longitudes de onda de 590 y 450 nm.

Las muestras algales una vez sometidas al proceso de extracción se trataron con el reactivo de Bradford y la determinación de concentración de proteína se realizó a través de lectura en espectrofotómetro, Varian-Cary 100, tomando como referencia la curva de calibración descrita anteriormente.

4.4.5 CONCENTRACIÓN DE AUXINAS. La determinación de auxinas (Y_{AX} , µg mL⁻¹) se realizó por método colorimétrico utilizando como indicador el reactivo de Salkowsky acorde a lo descrito por Gordon y Weber, 1950⁸², compuesto por HClO₄ y FeCl₃ en proporción 2:1. Con el reactivo se elaboró una curva de calibración a una concentración de 0.03 mg mL⁻¹ utilizando como patrón ácido indol acético - IAA. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Varian-Cary 100 a 530 nm.

Para determinar la concentración de auxinas en las dos fracciones, biomasa y sobrenadante de las dos microalgas, se realizaron tratamientos previos a la adición del reactivo de Salkowsky. Para el sobrenadante se realizó la clarificación por filtración,

mientras que la biomasa se trato con nitrógeno para realizar el rompimiento celular seguido de una maceración con arena abrasiva y centrifugando el extracto a 4.000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante de este proceso junto con el sobrenadante clarificado fue utilizado para la reacción con el reactivo de Salkowsky en proporción 1:2, respectivamente. Las concentraciones finales se expresaron en mg mL⁻¹.

4.4.6 CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS Y EXOPOLISACÁRIDOS. Para la cuantificación de carbohidratos intracelulares y extracelulares se estandarizaron dos procedimientos independientes que se describen a continuación.

4.4.6.1 Análisis de carbohidratos totales intracelulares (Y_{chb}). La concentración de carbohidratos totales intracelulares se realizo por el método de antrona-ácido sulfúrico descrito por Yemm y Willis, 1954⁸³. El reactivo de antrona se preparo con 0,01 g de antrona en H₂SO₄ 72% w/w; se procedió a elaborar una curva de calibración utilizando como patrón una solución stock de D-Glucosa, las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Varian-Cary 100, a 630 nm.

La extracción de carbohidratos de la biomasa microalgal se realizó teniendo en cuenta la metodología utilizada por Yemms y Willis⁸³, y modificada por Band, 1999⁸⁴. Las células se someten a un proceso de hidrólisis por 24 horas en una mezcla CHCl₃-CH₃OH, transcurrido este tiempo, se realizan varios lavados y se centrifuga a 4.000 rpm por 5 minutos, se adiciona HCl sometiendo a ebullición por 1 hora, transcurrido este paso se realiza una última centrifugación a las mismas condiciones descritas anteriormente. El sobrenadante obtenido se analiza utilizando el reactivo de antrona con la curva de calibración realizada previamente.

4.4.6.2. Análisis de carbohidratos extracelulares o exopolisacáridos - EPS (Y_{ch} mg L⁻¹). El análisis de carbohidratos extracelulares o EPS en el sobrenadante de los cultivos de las dos especies de microalgas se realizó teniendo en cuenta la metodología descrita por Lewin, 1956⁸⁵, y modificada por Moore, 1964⁸⁶. El sobrenadante es clarificado por filtración, procediendo a la precipitación de los carbohidratos con etanol para concentrar posteriormente por evaporación. Los extractos libres de materia orgánica son pesados para determinar la cantidad de carbohidratos presentes en éste.

4.4.7 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO – IAA (Y_p , nM L⁻¹). La determinación de IAA se realizó teniendo en cuenta la metodología descrita por Mazur et al., 2001⁸⁷. Los sobrenadantes clarificados fueron ajustados a pH 3 con HCl 4M sujetos a una columna de amberlita XAD-4. La cuantificación de ácido indol acético se realizo por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), utilizando una columna Microsorb MV 100-5 C18 (150 x 4.6mm) con una fase móvil compuesta por dos solventes: CH₃OH - CH₃COOH al 1% en relación 10:90; y CH₃OH - CH₃COOH al 1% en relación 99:1. Las lecturas se realizaron con una bomba BAS acoplada a un detector UV Varian-Prostar 225 a 280 nm, por un tiempo de 20 minutos.

4.4.8 VISCOSIDAD DINÁMICA Y DENSIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO. La cuantificación de la viscosidad dinámica (μ , mPa s⁻¹) del medio de cultivo durante el crecimiento de las microalgas se realizó utilizando un viscosímetro con cabeza de alfiler (Brook Field, LDVD-1+T). Las mediciones de densidad (ρ , g mL⁻¹) y viscosidad correspondientes se realizaron acorde con los métodos descrito por Wazer et al., 1963⁸⁸ y el valor reportado corresponde al promedio de tres réplicas.

Los valores de μ y ρ se utilizaron para el cálculo del número de Reynolds impulsor (Re_i) acorde con la ecuación 9 descrita por Doran, 1995. Estos valores se utilizaron para los análisis experimentales y de resultados durante las pruebas de optimización y validación.

$$Re_i = N_i D_i^2 \rho / \mu$$

Ecuación 9

Donde N_i es la velocidad del impulsor, D_i es el diámetro del impulsor, los valores de ρ y μ corresponden a las mediciones del medio de cultivo descritas líneas arriba. El patrón o régimen de flujo en los recipientes Kontes usados en los ensayos por lo tanto podrá, al igual que el flujo en tuberías, ser laminar o turbulento en función del valor de Re_i . Este valor por tanto marca la transición del régimen de flujo, aunque depende de la geometría del impulsor y del tanque. Para los presentes análisis se considerará que los régimen de flujo para un Re_i determinado se especificarán dentro de los siguientes valores: flujo laminar $Re_i < 10$; flujo en transición $10 \leq Re_i \leq 10.000$; flujo turbulento $Re_i > 10.000$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el análisis de las pruebas y diseños experimentales de estandarización, optimización y validación se utilizó el software estadístico Stathgraphics plus versión 5.0.

5.1. MONTAJES DE ESTANDARIZACIÓN. Las pruebas para estandarización del sistema de producción se enfocaron en la obtención de información relacionada con la capacidad de crecimiento y de producción de biomoléculas para las especies bajo estudio. Los resultados presentados corresponden al promedio de ensayos por triplicado para cada especie.

En la figura 8 se muestra el resultado para los coeficientes de crecimiento más relevantes de manera comparativa. Los valores de μ (d^{-1}) presentan rangos variables de 0.29 – 0.35 para *C. vulgaris* y de 0.47 – 0.50 en *S. obliquus*, con cifras promedio de 0.31 y 0.48 respectivamente. El análisis de asimetría para las dos muestras certifica que los datos provienen de una distribución normal con valores para *C. vulgaris* y *S. obliquus* dentro del rango -2 a +2 (0.6613 para los dos conjuntos), lo que valida análisis comparativos que se puedan hacer con las desviaciones estándar de estas muestras.

El análisis comparativo de las medias de μ para ambas especies acorde con la prueba-t permite afirmar que los valores son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, ver anexo A) y que la especie *Scenedesmus obliquus* tiene parámetros cinéticos superiores a *Chlorella vulgaris* bajo las condiciones consideradas en los ensayos. A partir de este resultado se deduce que, al ser la duplicación por día (K) y el tiempo de duplicación (t_d), dependientes de μ el análisis comparativo de estas variables será igualmente válido entre ambas especies.

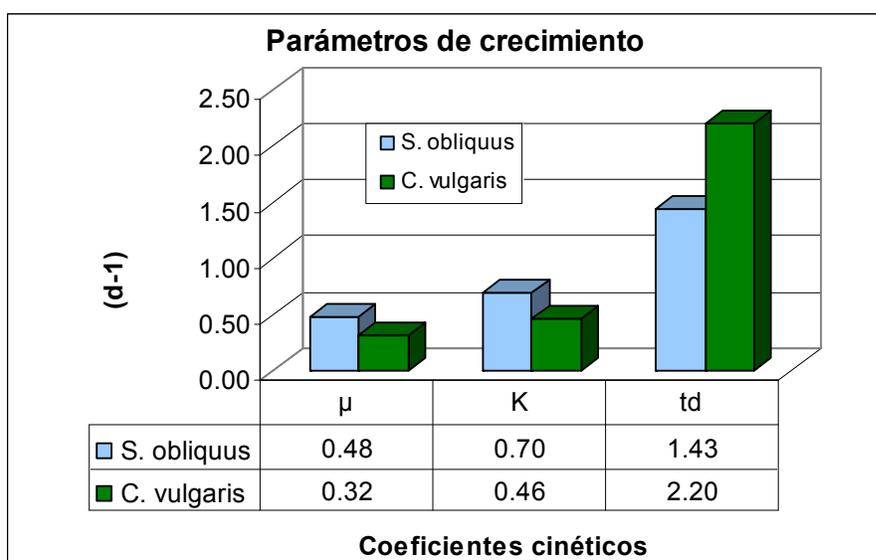


Figura 8. Coeficientes de crecimiento para las especies *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*. μ : coeficiente específico de crecimiento (d^{-1}), K: duplicación por día (d^{-1}), t_d : tiempo de duplicación (d^{-1})

Adicional al valor de los coeficientes cinéticos calculados, en las figuras 9 y 10 se muestra la gráfica de productividad celular (Células mL⁻¹) contra el tiempo (11 mediciones durante un periodo de 20 días) para *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* respectivamente. Estas curvas permiten validar cualitativamente los valores cinéticos que estadística y gráficamente muestran un rendimiento superior en productividad y de manera primordial en reproducibilidad para la microalga *Scenedesmus obliquus* sobre *Chlorella vulgaris*. En estas gráficas se puede observar que *Chlorella vulgaris* muestra un fase de adaptación al inicio del ciclo que la retrasa con relación a *Scenedesmus obliquus*.

Es conveniente considerar la relativa homogeneidad en las curvas hasta puntos cercanos al exponente 1×10^7 , punto en el que para ambas especies, se observa mayor discrepancia en los datos. Este efecto se puede considerar asociado al efecto limitante de algún sustrato que ocasiona una descompensación de las células y que por la disparidad que genera en las curvas, podría asociarse con la luz y su dispersión en el medio. Resulta igualmente relevante considerar la mayor disparidad en las curvas para *Chlorella vulgaris* al compararla con *Scenedesmus obliquus* especie que muestra un crecimiento muy homogéneo para los tres ensayos realizados.

Adicionalmente, si se observa comparativamente las curvas promedio para ambas especies (figura 11), es clara la diferencia en homogeneidad para estas, lo cual se ratifica al ajustar la curva a una línea de tendencia exponencial que muestra *Chlorella vulgaris*, un bajo ajuste incluso para sus valores promedio al presentar un valor R² de 0.8966 contra 0.9654 en *S. obliquus*.

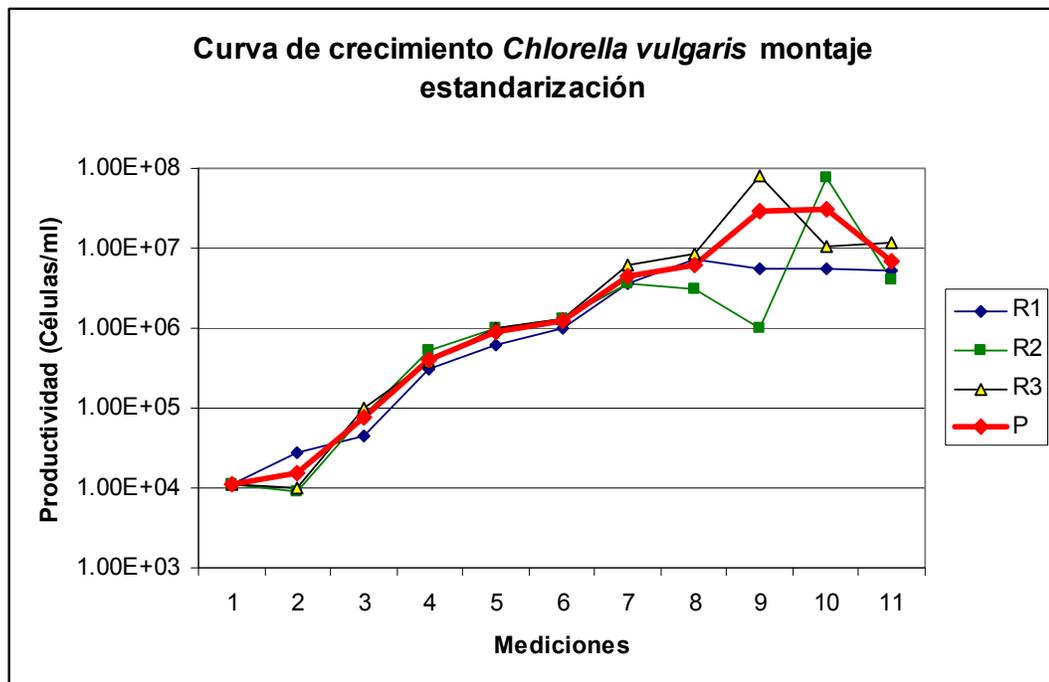


Figura 9. Curvas de crecimiento *Chlorella vulgaris* montajes de estandarización. Montajes por triplicado (R1, R2, R3) y curva promedio (P), durante 20 días de cultivo.

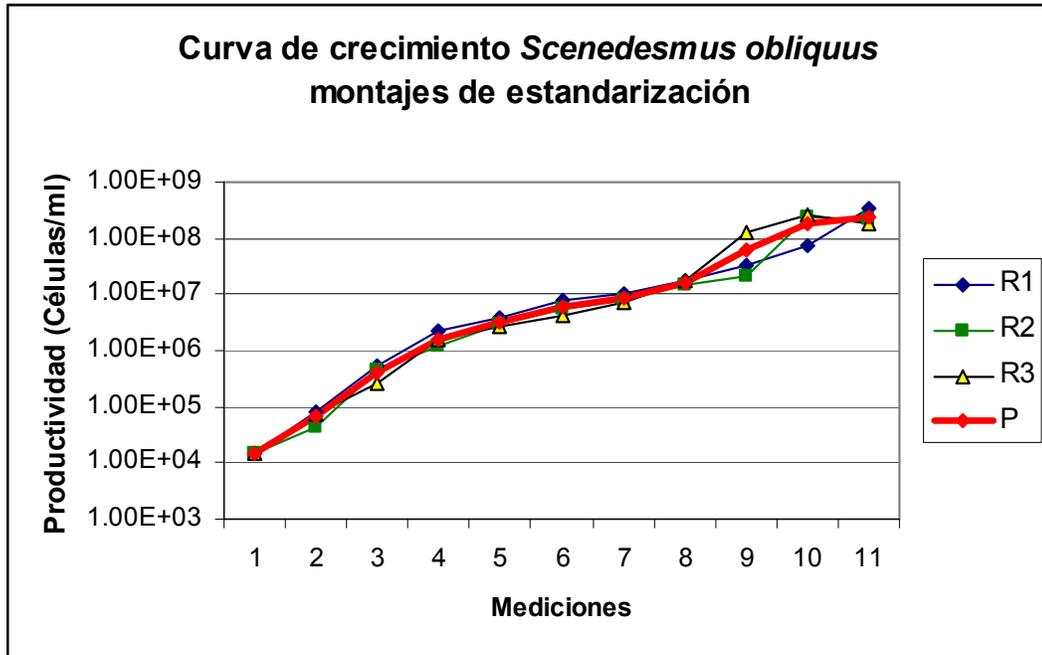


Figura 10. Curvas de crecimiento *Scenedesmus obliquus* montajes de estandarización. Montajes por triplicado (R1, R2, R3) y curva promedio (P), durante 20 días de cultivo.

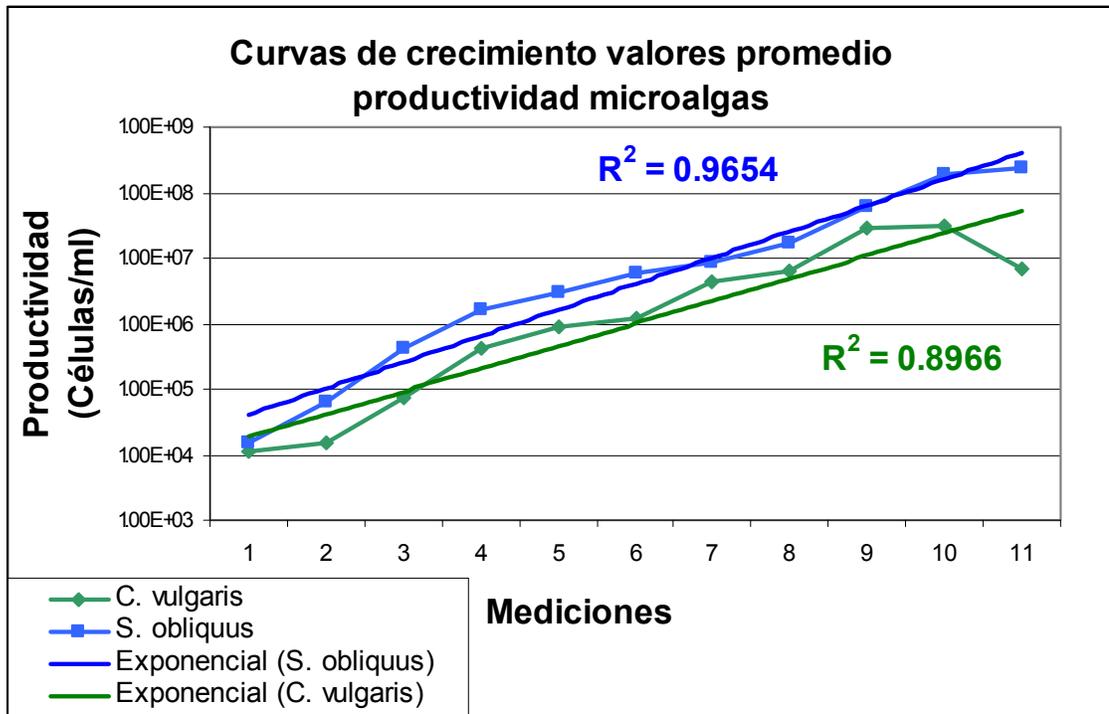


Figura 11. Curvas de crecimiento promedio-comparativo en las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris* durante los ensayos de estandarización.

En la figura 12 se muestran los segmentos representativos de las curvas de crecimiento, acorde con los resultados obtenidos en los ensayos para ambas especies. A partir de este análisis se distinguen tres zonas (rojo, azul y verde) con diferente pendiente asociada al incremento en el número de células. Estudios independientes (Pulz, 2001³¹; Csögör, 1999⁹⁰; Tredici, 1999⁹¹) podrían explicar y justificar este comportamiento al considerar que con el incremento de células en el medio el efecto de la luz sobre estas es menor debido a que una mayor densidad celular reduce la profundidad de la trayectoria (path length) de los fotones sobre el medio y con esto la disponibilidad de energía para las diferentes reacciones fotobiológicas.

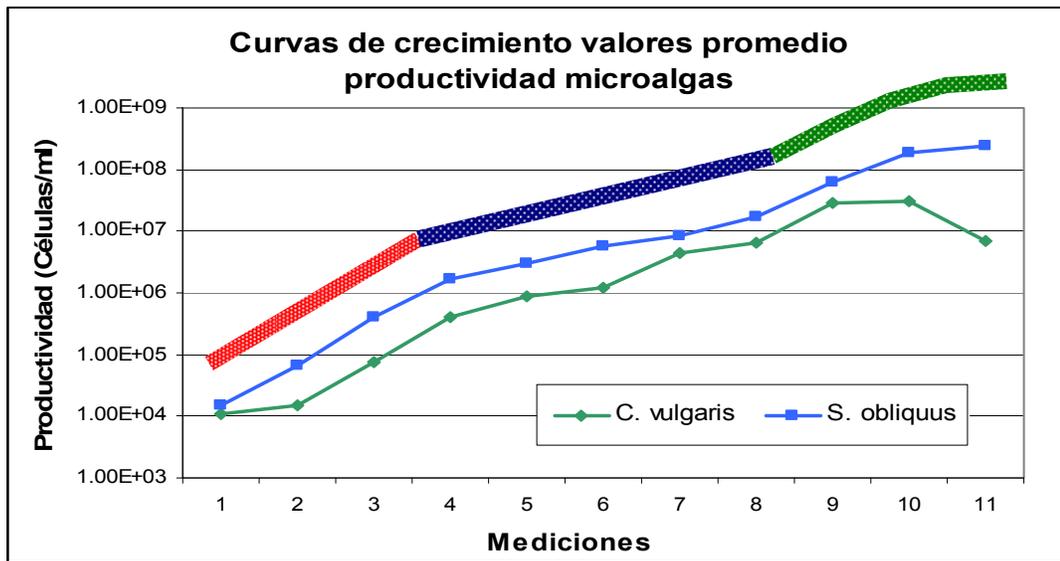


Figura 12. Segmentos representativos para la curva de crecimiento promedio-comparativa en las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*, ajustado acorde a los resultados obtenidos en tres réplicas por especies.

La microalga al contar con energía suficiente (luz/fotones) para su desarrollo presentará un rápido crecimiento (zona roja) que continuará hasta que la densidad del cultivo modifique sustancialmente la disponibilidad de luz y se requiera un ajuste fisiológico para continuar con el crecimiento. Estas tres zonas en la curva (roja, azul, verde) serían equivalentes a las zonas superficiales, fóticas y oscuras descritas para los sistemas de producción (Ación Fernández, 1997⁹²; Burgess, 2006⁹³; Qiang, 1998⁹⁴), fotobioreactores, de alta densidad celular utilizados a gran escala.

Evidencia relevante que respalda esta afirmación ha sido publicada por Osborne, 1986⁹⁵, en la que se ha identificado adaptaciones fisiológica de las microalgas para bajos niveles de luz en el medio, condiciones en la que estos organismos inician un proceso de compensación en el cuál se incrementa la síntesis de proteína y clorofila, componentes esenciales de los complejos fotosintéticos. Molina Grima, 1996⁹⁶, describe como durante este proceso el crecimiento celular continua pero se hace más lento, debido al mayor requerimiento energético de mantenimiento para el cultivo (tramo azul) hasta que se alcanza un nivel de compensación en el cuál la microalga estabiliza o detiene su

crecimiento (tramo verde) ya que la energía absorbida es utilizada en su totalidad para el mantenimiento de sus actividades metabólicas básicas.

Dado que el análisis de sistemas complejos como los biológicos requiere de una amplia cantidad de datos que permitan fortalecer su estudio, se incluyeron los análisis de clorofilas a y b (figura 13) de la biomasa. Esto considerando el hecho de que, como pigmentos fotosintéticos principales de las microalgas pertenecientes a la división Chlorophyta, su presencia en la célula está estrechamente relacionada con la productividad y cinética de desarrollo de estos microorganismos (Janssen, 2003)⁹⁷.

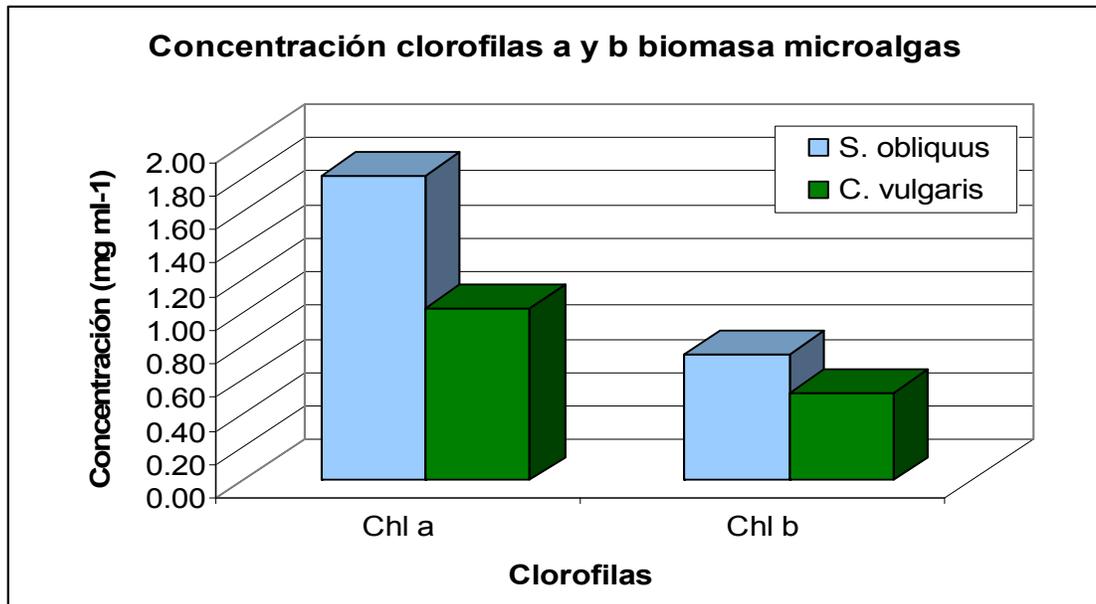


Figura 13. Concentración pigmentos fotosintéticos microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*. Chl a: clorofila a, Chl b: clorofila b.

En el anexo B se muestran los resultados obtenidos para los análisis estadísticos comparativos realizados para las biomoléculas consideradas: clorofilas (a y b), auxinas, carbohidratos y proteína.

La valoración y cuantificación de clorofila a para las microalgas en estudio se validó estadísticamente encontrando que para los valores promedio de *C. vulgaris* y *S. obliquus*, 1.03 mg mL⁻¹ y 1.81 mg mL⁻¹ respectivamente, se puede asumir el hecho de que los datos provienen de una distribución normal. Contando con esto, el análisis comparativo (prueba-t) certifica la diferencia entre las medias de concentración para este pigmento en las especies. Igual procedimiento se siguió para las clorofilas b para ambas especies que mostraron medias de 0.52 mg mL⁻¹ en *C. vulgaris* y en 0.75 mg mL⁻¹ *S. obliquus* las cuales no se diferencian estadísticamente.

Considerando por tanto la concentración total de pigmentos (Y_p , clorofilas a y b) en la biomasa es evidente la diferencia favorable para *Scenedesmus obliquus* (2.57 mg mL⁻¹ contra 1.55 mg mL⁻¹), aspecto que confirma los valores de los coeficientes cinéticos (μ , K,

t_d) reportados en la figura 8. El cálculo del coeficiente de absorción (K_a), ecuación 8 y figura 14, fortalece el planteamiento según el cuál un mayor crecimiento de *Scenedesmus obliquus* debería reflejarse en una mayor concentración de pigmento fotosintético y de proteína, claves en el andamiaje de captura y transferencia energética requerido para alcanzar tasas de crecimiento más altas y eficientes, estudios independientes y relacionados con este aspecto (Pirt, 1986⁹⁸; Bonardi, 2005⁹⁹) respaldan este análisis.

De manera adicional en los resultados de clorofila deberá considerarse como aspecto suplementario la relación entre Chl *a* y *b* para ambas especies. La Chl *a* está presente como una parte de los núcleos y centros de reacción de los complejos pigmento-proteína, y en las antenas recolectoras de luz está acompañada por Chl *b* en nuestro caso. Particularmente en este análisis la presencia mayoritaria de Chl *a* en relación a la Chl *b* para *S. obliquus* hace pensar que la longitud de sus antenas podría ser mas corta y por tanto la distribución de luz dentro del cultivo sería más homogénea. La evidencia respaldaría esta afirmación y nos permitiría tener en consideración que la distribución de luz dentro del cultivo es un factor determinante para mejorar las eficiencias de los procesos fotobiológicos en sistemas cerrados.

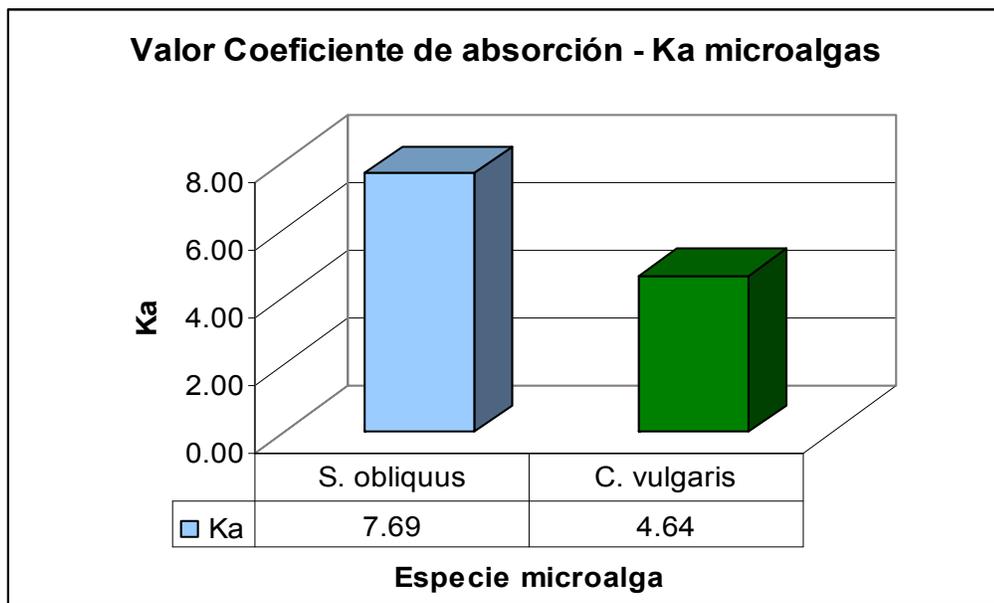


Figura 14. Coeficiente de absorción, K_a , calculado para las especies de microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*.

Las biomoléculas de interés principal para el proyecto, exopolisacáridos y auxinas, se cuantificaron para cada especie y, al igual que con los coeficientes de crecimiento, se validaron estadísticamente para ratificar la diferencia entre los valores medios reportados. Adicional a estas sustancias se cuantificó la concentración de proteína total al ser este un polímero de especial interés en aplicaciones agrícolas. La evaluación de estas sustancias se hizo para la biomasa y el sobrenadante, fracciones que se generaban tras centrifugación del medio a 20.000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4 °C.

La concentración de biomoléculas, auxinas y proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$), en la biomasa se muestra en la figura 15 para las dos especies. La concentración de auxinas de esta fracción (Y_{AXb}) para *S. obliquus* varía en el rango de 5.0 – 11.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con una media estimada de 9.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. *C. vulgaris* muestra un rango similar de 6.2 – 11.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aunque la media de 8.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ es ligeramente inferior. El análisis de asimetría para las dos muestras valida análisis comparativos y acorde con la prueba-t no se puede considerar que la diferencia de auxinas es estadísticamente valida, por lo que se considera que su concentración es igual y para efectos de producción se producirían en la misma proporción en esta fracción.

Considerando que para una cantidad de extracto unitaria estándar el valor de Y_{AXb} en la biomasa es prácticamente igual entre especies, no se podría afirmar que la presencia de estas sustancias incida de manera significativa en la cinética del crecimiento, ya que al ser los parámetros cinéticos ampliamente variables entre especies se esperaría una respuesta similar para estas biomoléculas. Deberá considerarse sin embargo que bajo condiciones constantes de cultivo la variación de estas moléculas es prácticamente inexistente y por tanto se producirían de manera regular para el desarrollo y mantenimiento de la célula. Adicionalmente, se podría especular sobre el hecho de que este tipo de moléculas varía de manera amplia su presencia en los tejidos de organismos fotosintéticos en función de factores medioambientales o fisiológicos inestables que estimulan o inhiben su producción como mecanismo de adaptación tal como lo describe Evans y Trewanas⁴⁰.

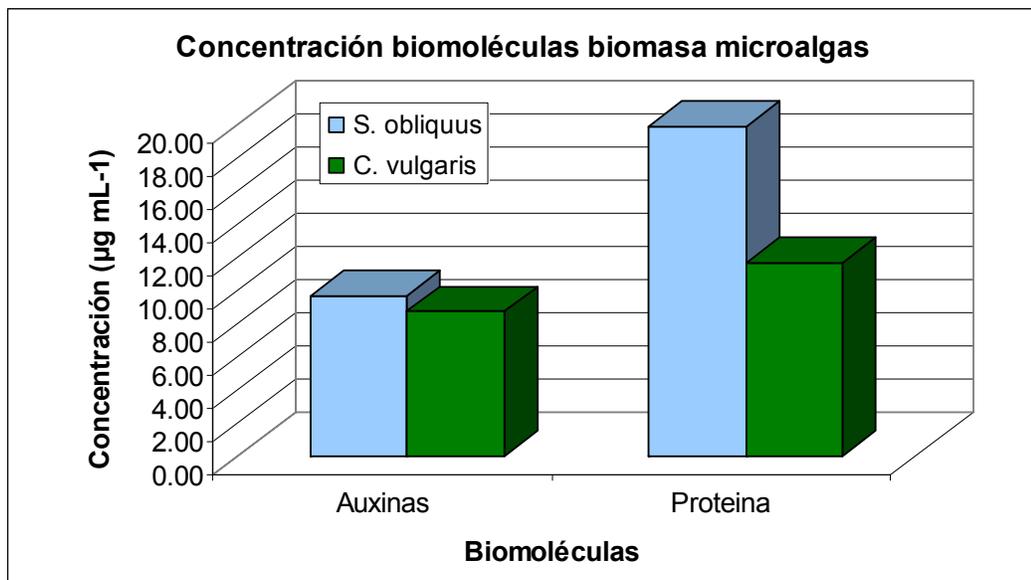


Figura 15. Concentración de biomoléculas de interés en la biomasa de las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*: Auxinas y Proteína.

La evaluación de proteína muestra medias con diferencia significativa en su concentración, 11.67 y 19,87 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para *C. vulgaris* y *S. obliquus* respectivamente. Acorde con la prueba de simetría los valores proceden de una distribución normal y la

prueba-t valida estadísticamente la diferencia de concentración entre especies al presentar un valor P menor a 0.05 corroborando la amplia diferencia registrada en la figura 15. Al estar la concentración de proteína relacionada con el aparato fotosintético, altas productividades se relacionarían con cultivos que disponen mayor proporción de esta biomolécula. Estas afirmaciones apoyadas en diversos estudios (Renaud, 2001¹⁰⁰; Guil-Guerrero, 2008¹⁰¹) justificarían la mayor productividad y concentración de proteína en *S. obliquus*.

El análisis de auxinas y proteína para la fracción del sobrenadante se muestra en la figura 16. Para *S. obliquus* la diferencia en la concentración de auxinas en esta fracción (Y_{AXs}) es aproximadamente el 45% del valor reportado para la biomasa con un valor promedio total de $4.40 \mu\text{g mL}^{-1}$. *C. vulgaris* muestra un comportamiento similar, con una concentración Y_{AXs} de $3.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ que representa aproximadamente un 35% de la concentración reportada en la biomasa.

Los estadísticos de asimetría y la prueba-t en auxinas evidenciaron lo visto previamente en la fracción de biomasa, al encontrar que no existe una diferencia estadística significativa entre especies. La diferencia en concentración de auxinas para las fracciones, biomasa y sobrenadante, en ambas especies es superior en la biomasa tal como se muestra en el cuadro 2, sin embargo debe considerarse que la proporción de estos promotores de crecimiento (GP), cercana al 30% en cada una, es ampliamente significativa. Las concentraciones y niveles de GP en el sobrenadante hacen preveer la existencia de un mecanismo de regulación cinético, fisiológico o metabólico que se activa bajo condiciones que se describirán con detalle en la sección 4.2 y que promueven la liberación de compuestos de bajo peso molecular al medio que podrían cumplir funciones protectoras o atractivas tal como se ha propuesto en otros estudios (Tarackhovskaya, 2006¹⁰²).

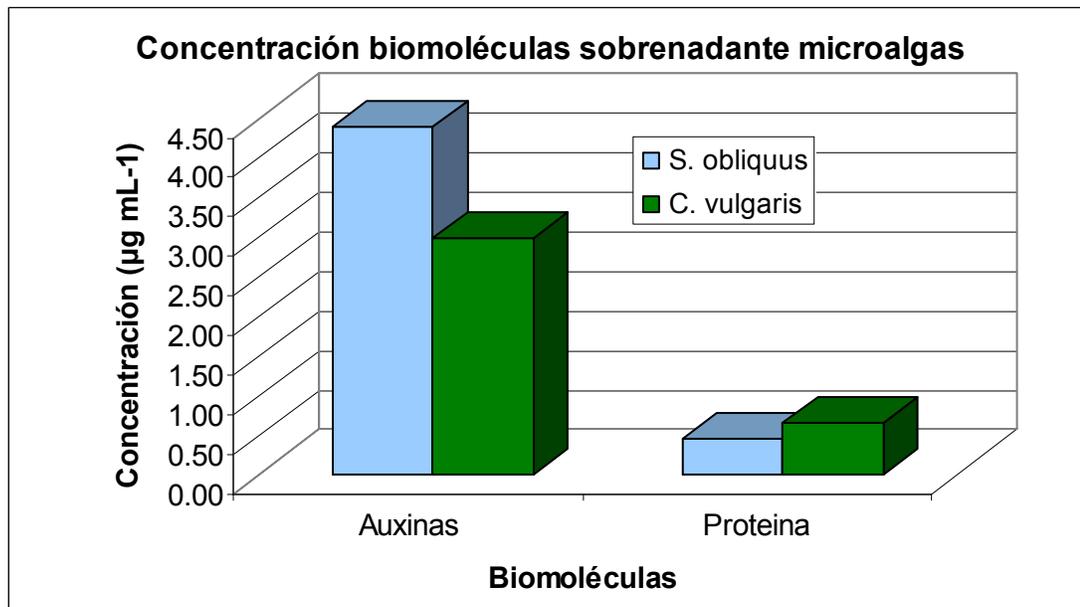


Figura 16. Concentración de biomoléculas de interés en sobrenadante de las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*: Auxinas y Proteína.

Estos sistemas secundarios de regulación metabólica no tendrían, basados en los resultados encontrados, un efecto significativo en la cinética de desarrollo (metabolismo primario) y su naturaleza y función estaría más relacionado a sistemas de compensación que se activarían para alguna función de protección o compensación fisiológica particular. Los ensayos de optimización que evalúan interacciones entre variables permitirán describir con mayor claridad los posibles factores que se asocian a la producción de estas sustancias.

Los valores promedio de proteína en el sobrenadante de 0.67 y 0.47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. vulgaris* y *S. obliquus* respectivamente, se pueden considerar provenientes de una distribución normal acorde con la prueba de asimetría. La comparación de medias acorde con la prueba-t revela que la diferencia entre medias no es estadísticamente significativa ($P > 0.05$), a diferencia del valor de proteína en biomasa reportado líneas arriba. En *S. obliquus* la concentración de proteína es ampliamente superior en la biomasa, más de 42 veces, si se compara los 0.47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteínas del extracto (Y_{Ps}). En *C. vulgaris* el valor de Y_{Ps} , 17 veces inferior al encontrado en la biomasa y es correspondiente al resultado general de esta fracción para ambas especies.

Cuadro 2. Concentración de promotores de crecimiento, fitohormonas-auxinas, en fracciones extracto microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*, durante los ensayos de estandarización.

Distribución promotores de crecimiento (auxinas) en microalgas				
Fracción	<i>S. obliquus</i>	% Fracción	<i>C. vulgaris</i>	% Fracción
Biomasa	9,67	69%	8,73	74%
Sobrenadante	4,40	31%	3,00	26%
TOTAL	14,07	100%	11,73	100%

En la figura 17 se muestra los valores consolidados del análisis de carbohidratos para las dos fracciones analizadas del extracto, biomasa y sobrenadante. Los resultados para la fracción biomasa muestran una diferencia significativa en los rangos de concentración para cada especie con valores entre 800 – 1.400 mg L^{-1} para *C. vulgaris* y de 2.600 – 3.500 mg L^{-1} en *S. obliquus*. Los promedios para *C. vulgaris* y *S. obliquus*, 1.100 y 2.933 mg L^{-1} , se diferencian claramente y acorde con la prueba de asimetría, ambos provienen de una distribución normal (ver anexo 3).

La prueba-t para las medias de concentración de carbohidratos/polisacáridos en la biomasa (Y_{chb}) certifica la diferencia observada en la figura 17, al presentar un valor P inferior a 0.05 que ratifica la hipótesis alternativa lo cual permite afirmar que existe una diferencia estadística significativa entre las medias para ambas especies.

El consolidado para el análisis de carbohidratos en sobrenadante (Y_{ch} mg L^{-1}), i.e. EPS en la figura 17, muestra una diferencia significativa en los valores promedio para *S. obliquus* y *C. vulgaris* que presentaron cifras promedio de 61.85 y 44.52 mg L^{-1} , respectivamente. Los rangos de dichas mediciones entre 42.89 – 45.59 mg L^{-1} para *C. vulgaris* y 60.62 – 63.96 mg L^{-1} en *S. obliquus*, provienen de una distribución normal acorde con la prueba de asimetría. Al comparar las medias queda en evidencia, con un nivel de confianza del

95%, que los datos para concentración de EPS son al igual que en la biomasa estadísticamente diferentes para las especies bajo estudio a favor de *S. obliquus*.

Comparativamente las concentraciones de carbohidratos en las fracciones evaluadas son ampliamente superiores en la biomasa para ambas especies de microalgas. En *S. obliquus* los exopolisacáridos representan poco más del 2% del total de carbohidratos en el extracto, cifra que en términos absolutos sería cerca de 47 veces inferior en comparación al valor correspondiente encontrado en la fracción de biomasa. Para *C. vulgaris* la relación porcentual de carbohidratos es igualmente superior en la biomasa con los exopolisacáridos representando el 4.1% del total y siendo la diferencia absoluta ampliamente inferior para esta especie con 24.4 veces más carbohidratos en la fracción de la biomasa si se comparan sus totales en el extracto.

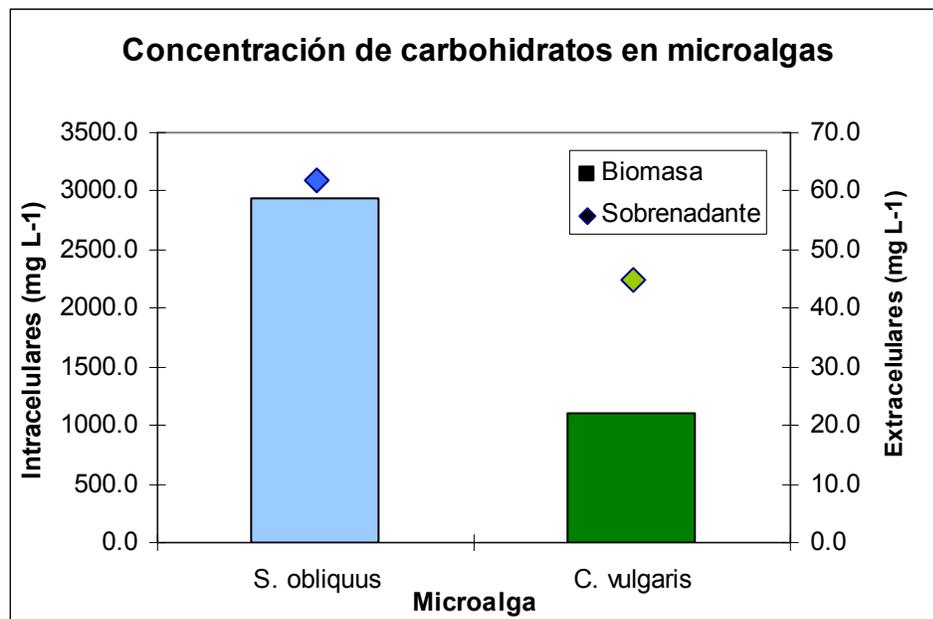


Figura 17. Concentración de carbohidratos biomasa y sobrenadante de las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*: Carbohidratos.

Para el análisis de carbohidratos/exopolisacáridos se observó una diferencia significativa en los promedios que nuevamente fueron favorables a *Scenedesmus obliquus* aunque con una diferencia estadística significativa para las dos fracciones. En el cuadro 3 se muestra el comparativo entre especies que permite determinar que la concentración de carbohidratos en la biomasa (capsulares e intracelulares) de *Scenedesmus obliquus* es superior en poco más del 63% de la encontrada en *Chlorella vulgaris*, dicha diferencia de concentraciones podría explicar la diferencia de comportamiento durante el desarrollo que mostró patrones muy diferentes para ambas especies (figura 10), ya que al contar con una mayor fuente energética acumulada *Scenedesmus obliquus* tendría mejor capacidad de compensación ante cambios en las condiciones ambientales, particularmente los efectos de auto-sombreado (self-shading) y dispersión de la luz (scattering), que afectan la trayectoria de luz al interior del cultivo y que acorde con algunos estudios (Ogbonna,

2000¹⁰³) condicionan la disponibilidad de energía requerida para la fijación de carbono, desarrollo y productividad del cultivo.

Los niveles de exopolisacáridos en el sobrenadante son igualmente superiores en los medios de *Scenedesmus obliquus*, 27% superiores, es decir cerca de 1.4 veces la cantidad encontrada en *Chlorella vulgaris*. Este valor superior de carbohidratos en el sobrenadante se ve reflejado en los datos de viscosidad dinámica (μ , mPa*s) calculados para el medio de cultivo durante los ensayos y que se muestran en la figura 18.

Cuadro 3. Concentración de carbohidratos-exopolisacáridos en medios de cultivo microalgas, *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*, durante los ensayos de estandarización. Los valores de concentración de carbohidratos se dan en mg L⁻¹.

Distribución carbohidratos (exopolisacáridos) en microalgas				
Fracción	<i>S. obliquus</i>	% Fracción	<i>C. vulgaris</i>	% Fracción
Biomasa	2933,33	98%	1100,00	96%
Sobrenadante	62,00	2%	45,00	4%
TOTAL	2995,33	100%	1145,00	100%

Para *S. obliquus* el incremento en el valor de viscosidad del medio al finalizar el cultivo fue superior al 100% al pasar de 1,407 mPa s⁻¹ a cerca de 2,84 mPa s⁻¹, valor que duplica el inicial. Por el contrario en *C. vulgaris* el incremento fue solamente del 16,4% con un valor final de 1,64 mPa s⁻¹. Sobre estos resultados debe considerarse sin embargo que las sustancias poliméricas producidas por *C. vulgaris* presentaban una propiedad particular que promovía la formación de películas sobre las superficies de los recipientes y demás dispositivos que entraban en contacto con el medio, por el contrario en *S. obliquus* este fenómeno no se observó lo que coincide con reportes (Roselers, 2008¹⁰⁴) que señalan que la producción de estas sustancias para esta especie está relacionada con la formación de agregados de células que se generan ante condiciones adversas.

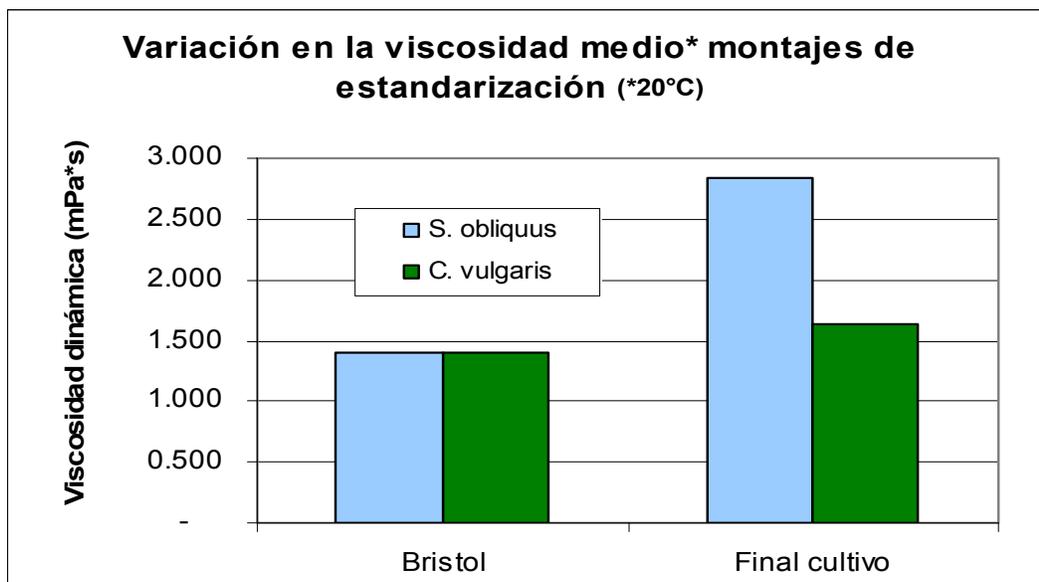


Figura 18. Variación en la viscosidad dinámica (μ) para los medios de cultivo durante el desarrollo de las especies de microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*. Los valores μ se dan en mPa*S y fueron calculados a una temperatura de 20°C.

A partir de los resultados de viscosidad encontrados para los presentes ensayos queda en evidencia la relación directa entre la producción y liberación de exopolisacáridos en el medio y su efecto en la reología del medio. Estos resultados, similares a aquellos evidenciados por Singh et al. 2000¹⁰⁵, se relacionarían por tanto con la capacidad para la fijación de carbono y síntesis de carbohidratos intracelulares (polímeros) puesto que la mejor respuesta en la producción de estas sustancias en *S. obliquus* fue consistente con los análisis que relacionan la productividad y producción de estas sustancias en las dos fracciones consideradas.

El análisis de los presentes resultados favorece de manera general a *Scenedesmus obliquus*, organismo que se utilizará por tal razón en las pruebas de optimización y validación del sistema ya que presenta, claramente, un comportamiento más favorable para el cumplimiento y desarrollo de los objetivos planteados en el presente proyecto.

5.2. MONTAJES DE OPTIMIZACIÓN

El consolidado de las respuestas para los presentes ensayos se muestra en el cuadro 4. Considerando que para los ensayos se utilizaron tres variables de respuesta, en el análisis experimental se describirán de manera detallada y utilizando el software estadístico Statgraphics plus 5.0, los resultados correspondientes a cada variable de respuesta (VR) establecida, en secciones independientes. En los presentes análisis aquellas tablas, gráficas, cuadros que no sean relacionados durante el desarrollo del texto pero que sean referenciados se incluyen en el anexo C.

Cuadro 4. Consolidado de respuestas por variable experimental durante los ensayos de optimización, diseño experimental factorial 2² por metodología de *Screening* en la microalga *Scenedesmus obliquus*. Donde, I_a : flujo luminoso-iluminancia (lux); C^* : fuente de carbono (mezcla aire-CO₂ % v/v); R_f : régimen de flujo medio (rpm); Y_A : concentración de ácido indol acético en extracto-IAA (nM L⁻¹); Y_{ch} : concentración de exopolisacáridos en sobrenadante (mg L⁻¹); μ : coeficiente específico de crecimiento (d⁻¹).

Montaje	VE por niveles			Respuesta montaje		
	I_a	C^*	R_f	μ d ⁻¹	Y_{ch} mg L ⁻¹	Y_A nM L ⁻¹
1	1	1	1	0,66	24,7	5,418
2	1	-1	1	0,39	15,05	7,392
3	1	-1	-1	0,35	8,8	9,046
4	-1	1	1	0,42	16,17	4,423
5	-1	-1	1	0,27	13,3	3,615
6	0	0	0	0,36	17,96	5,369
7	1	1	-1	0,62	13,44	7,794
8	-1	-1	-1	0,32	13,7	6,237
9	-1	1	-1	0,42	15,07	2,636
10	0	0	0	0,36	14,76	5,567
11	0	0	0	0,35	14,5	5,734
12	0	0	0	0,37	14,63	6,003

Dado que para estos montajes se utilizó un diseño experimental con tres variables de respuesta, i.e. coeficiente específico de crecimiento-CEC (μ , d^{-1}); concentración ácido indol acético-IAA en el sobrenadante (Y_A , $nM L^{-1}$) y concentración de exopolisacáridos-EPS en el sobrenadante (Y_{ch} , $mg L^{-1}$), se incluyen en el presente capítulo las interpretaciones correspondientes a los resultados reportados más relevantes y que contribuyen de manera significativa, acorde con el autor, al desarrollo, comprobación y análisis de los efectos encontrados.

5.2.1. COEFICIENTE ESPECÍFICO DE CRECIMIENTO (μ , d^{-1}) COMO VARIABLE DE RESPUESTA. Los resultados obtenidos a partir del diseño experimental utilizando esta VR muestran valores bastante confiables tal como se evidencia en la tabla ANOVA (tabla 3) que reporta un error cuadrático medio (Mean Square), una medida de la variación al azar, bastante bajo. Esto permite argumentar que la confianza en los resultados obtenidos es bastante buena.

De la tabla también puede obtenerse como principal resultado, que el valor P es significativo para dos de los efectos, I_a (lux) y C^* (CO_2 , % v/v), al presentar valores P inferiores a 0.05 a un nivel de confiabilidad del 95%. Altamente llamativo resulta el bajo nivel de significancia de R_f (rpm) en los resultados con un valor P muy por encima de 0.05 que implicaría una baja relevancia de esta variable en el incremento celular.

Contando con la amplia significancia del I_a y C^* , debe destacarse que el efecto de todas las variables y sus interacciones repercute directamente y de manera positiva en la maximización de μ , respuesta bajo análisis. Esto resultados indican que con objeto de optimizar la respuesta en ensayos posteriores, los niveles (rangos) estudiados para cada variable experimental no ejercieron un efecto negativo en la respuesta final obtenida. Esta significancia, alta para las variables I_a y C^* , y baja para R_f y demás interacciones entre variables, puede verse de manera más clara en el diagrama de Pareto, figura 19. Para destacar adicionalmente en este diagrama la preponderancia de las interacciones $I_a - C^*$ e $I_a - R_f$.

Tabla 3. Análisis de Varianza diseño experimental de Screening para *S. obliquus* usando el coeficiente específico de crecimiento (μ , d^{-1}) como variable de respuesta.

Analysis of Variance for CEC

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Flux	0.0435125	1	0.0435125	15.48	0.0110
B:CO2	0.0780125	1	0.0780125	27.76	0.0033
C:Agitación	0.0001125	1	0.0001125	0.04	0.8493
AB	0.0105125	1	0.0105125	3.74	0.1109
AC	0.0021125	1	0.0021125	0.75	0.4256
BC	0.0003125	1	0.0003125	0.11	0.7523
Total error	0.01405	5	0.00281		
Total (corr.)	0.148625	11			

R-squared = 90.5467 percent

Acorde con lo planteado se entiende que la dinámica de las reacciones químicas en los procesos fotobiológicos se relacionan de manera primordial con el suministro de gases (i.e. fuente de carbono, CO₂) y la intensidad de la fuente de luz utilizada. Estos factores controlarían, para una temperatura y pH relativamente constante o dentro de un margen manejable, los procesos o reacciones relacionados con la productividad del cultivo. El valor del estadístico R-cuadrado (*R-squared*, en la tabla 3) respaldaría esta afirmación ya que tal como el diseño fue ajustado, el modelo explica un 90.55% de la variabilidad en μ , valor que permite afirmar que el diseño fue bien ajustado y permite realizar análisis confiables a partir de las variables, experimentales y de respuesta, incluidas para este propósito.

Standardized Pareto Chart for CEC

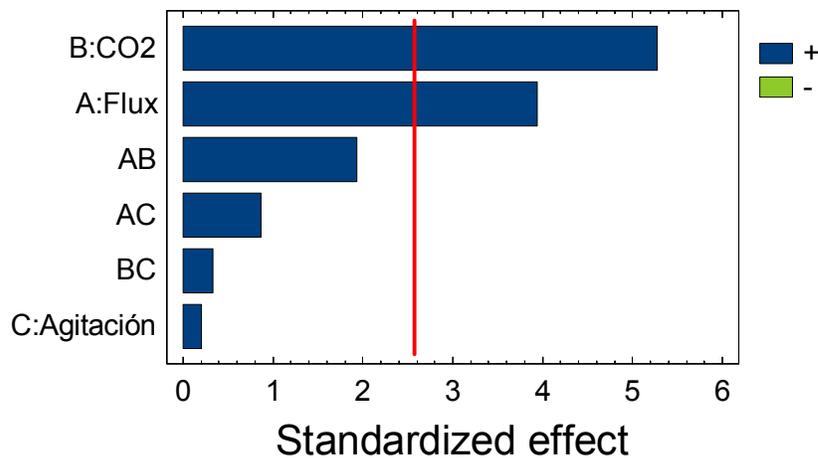


Figura 19. Diagrama de Pareto para el estudio de los factores de crecimiento iluminancia (A), fuente de carbono (B) y régimen de flujo (C) sobre el coeficiente específico de crecimiento (μ , d⁻¹) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

La representatividad de los efectos para factores experimentales en μ , queda evidenciada al observar el diagrama de efectos principales en la figura 20. En el diagrama los tres factores, eje de abscisas, se muestran en su respuesta óptima para cada nivel evaluado (mínimo, medio y máximo; -1, 0, 1 respectivamente) en correlación para la variable de respuesta en el eje de ordenadas. La pendiente de los tres efectos muestra ser positiva para cada una de ellas, sin embargo, el nivel de esta es notoriamente más representativo para interacciones I_a y C*.

Para complementar el análisis de los efectos principales es necesario verificar los efectos de las interacciones entre factores experimentales sobre la respuesta, razón principal para el uso de este diseño factorial. Las interacciones entre variables experimentales, representativo acorde con la tabla ANOVA y el diagrama de Pareto, se muestra en el diagrama de interacciones, figura 21.

Main Effects Plot for CEC

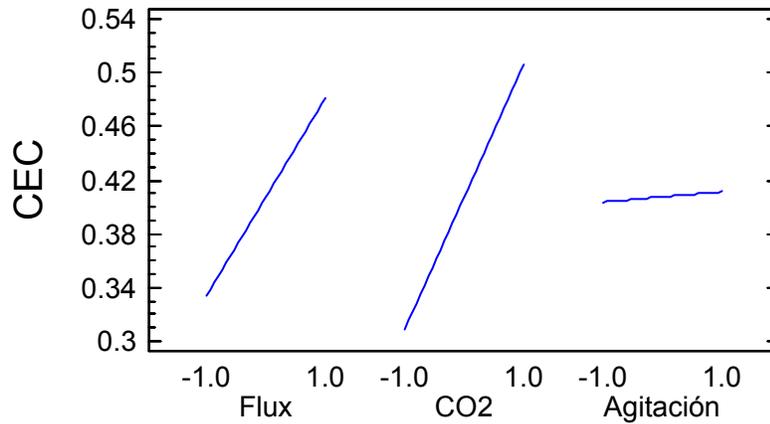


Figura 20. Diagrama de efectos principales para el coeficiente específico de crecimiento (μ , d⁻¹) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Los efectos de aditividad de todas las interacciones (líneas que no se cruzan) entre variables para los niveles considerados resultan evidentes en su objetivo de maximizar la respuesta considerada. La interacción entre I_a y C^* resulta evidente al mostrar en el nivel máximo para C^* la pendiente más pronunciada (línea +,+; interacción AB en la figura 21). De igual manera para las interacciones adicionales, si bien no tan claro como para AB, el efecto de las variables en su nivel máximo maximiza μ en todas las combinaciones de factores consideradas (AC y BC).

Interaction Plot for CEC

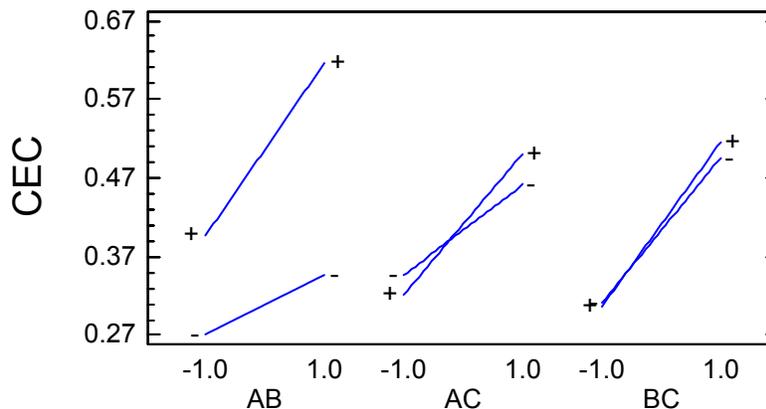


Figura 21. Diagrama de interacciones para las variables experimentales - VE en función de la variable de respuesta - VR; donde: VR = coeficiente específico de crecimiento (μ , d⁻¹), A = Iluminancia (lux), B = fuente de carbono (CO₂ % v/v), C = régimen de flujo (rpm). Valores correspondientes a la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Gran parte del efecto y representatividad del régimen de flujo se podría asociar a procesos mecánicos relacionados con la fisiología y estabilidad de la célula en el medio de cultivo, sin embargo, y de manera particular en sistemas de producción para

organismos fotoautótrofos, la dinámica de flujo incide sobre la eficiencia en la distribución de la luz asociada con la dispersión de las células en el medio y a los efectos de auto-sombreado (*self-shading*) que se generan en cultivos de alta densidad. Si se analiza con detenimiento la interacción AC de la figura 21 se puede evidenciar el efecto de la hidrodinámica en la creación de diferentes ciclos de iluminación, ciclos de luz-oscuridad (L/D), que hacen variar la intermitencia a la cual la energía lumínica es suministrada en las microalgas. La intermitencia en la iluminación para los cultivos con microorganismos fotoautótrofos es análoga a la alimentación discontinua de cultivos heterótrofos cuando esta es su fuente de energía tal como ha sido planteado por Lee y Pirt, 1981¹⁰⁶.

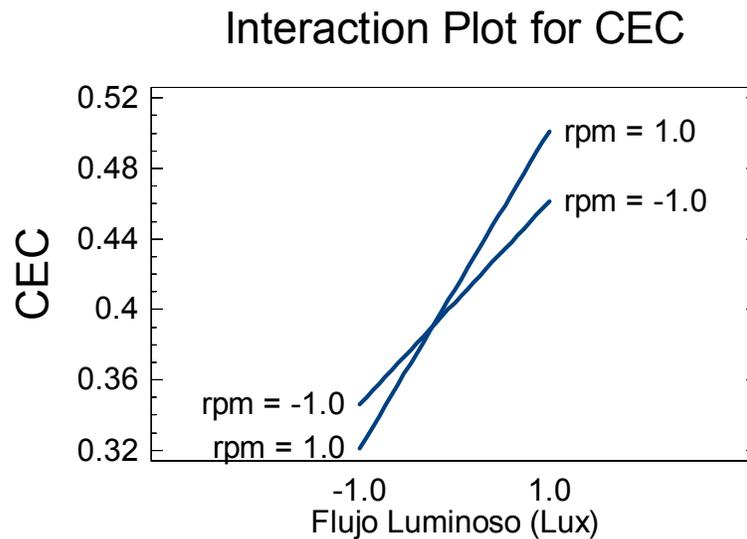


Figura 22. Diagrama desglosado para la interacción flujo luminoso/iluminancia (A) contra el régimen de flujo/rpm (C) en función de la variable de respuesta VR = coeficiente específico de crecimiento (μ , d^{-1}). Los valores corresponden a aquellos reportados para la microalga *Scenedesmus obliquus* en la figura 21 pero solo para la interacción correspondiente.

La figura 22 representa la interacción AB entre I_a y R_f para la VR μ , d^{-1} , de manera más detallada. En el eje de abscisas muestra los niveles máximos (11,500 lux) y mínimos (5,500 lux) de I_a ; a su vez para R_f la línea -1.0 a -1.0 representa el nivel mínimo ($Re_i \sim 0$) y la línea 1.0 a 1.0 representa el nivel máximo ($Re_i \sim 90,000$). Al considerar el cultivo con una densidad celular constante se debe tener en cuenta que aquellas células que cuentan con un régimen de flujo turbulento tendrán ciclos L/D mucho más cortos que aquellas que manejan un régimen de flujo menos turbulento o laminar. La productividad (μ , d^{-1}) en relación a los ciclos L/D se ve ampliamente afectada por la intensidad de luz, entre mayor sea la intensidad de esta menor deberá ser el ciclo, fracciones de luz más cortas y proporcionalmente mayor turbulencia en el medio. En otras palabras, entre mayor iluminación, más largo el periodo de oscuridad que debe ser proporcionado por el sistema para evitar pérdidas de productividad-desarrollo, estos efectos han sido evidenciados de igual forma en los estudios realizados por Wu y Merchuk, 2001¹⁰⁷.

Acorde con esto y considerando la productividad (μ , d^{-1}), se debería entender que bajos niveles de iluminación maximizarían el desarrollo de la microalga con regimenes de flujo

laminares y por el contrario al incrementar la turbulencia del medio se debería esperar mayores productividades con flujos luminosos altos. Esta interacción es exactamente la que se representa en la figura 22 y, por lo tanto, confirmaría el efecto de interacción entre estas variables que relacionaría la disponibilidad de luz y la dinámica de flujo a través de ciclos L/D que dependen del tipo de flujo y de la intensidad de iluminación.

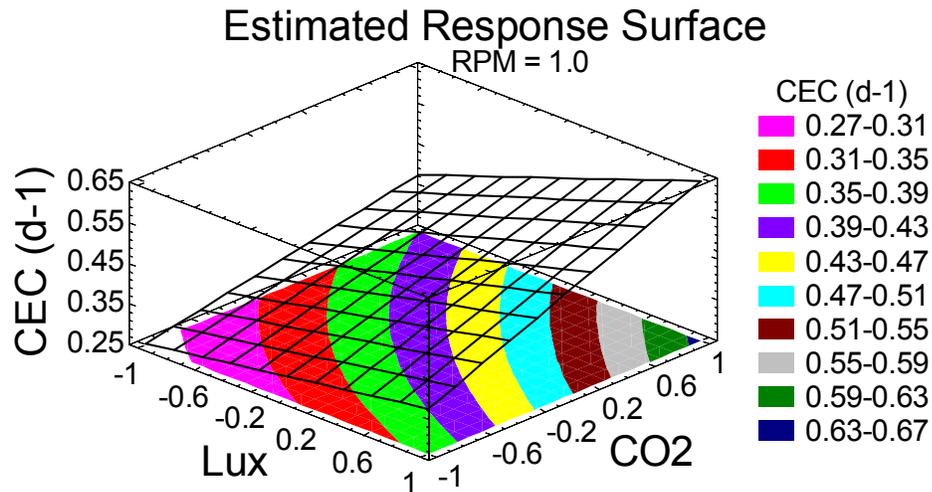


Figura 23. Superficie de respuesta obtenida del diseño experimental de *Screening* para la VR Coeficiente Específico de Crecimiento (μ , d^{-1}) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

La figura 23 muestra la superficie de respuesta para el diseño experimental considerando μ , como VR. La superficie complementa claramente el análisis de interacciones y de efectos principales mostrando una respuesta óptima de μ en los niveles máximos de todas las variables con descensos bastante marcados cuando se trabaja en los niveles mínimos (-1) de I_a y C^* , lo cual concuerda con la información reportada en las figuras 19 y 20 (Diagramas de Pareto y de Efectos Principales respectivamente).

La respuesta óptima para los ensayos refleja los efectos ideales evidenciados en las gráficas y tablas del diseño, señalando un óptimo para validación de todos los factores en su nivel máximo (tabla 4).

Tabla 4. Respuesta óptima para el diseño experimental de *Screening* VR Coeficiente Específico de Crecimiento (μ , d^{-1}) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Optimize Response

Goal: maximize CEC

Optimum value = 0.6425

Factor	Low	High	Optimum
Flux	-1.0	1.0	1.0
CO2	-1.0	1.0	1.0
Agitación	-1.0	1.0	1.0

5.2.2. CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN EL SOBRENADANTE - EXOPOLISACÁRIDOS (Y_{ch} , mg L⁻¹) COMO VARIABLE DE RESPUESTA. La relevancia de los resultados, la evidencia sobre las interacciones y su representatividad es altamente confiable, acorde con la tabla ANOVA (Tabla 5). El error cuadrático medio (Mean Square), no es muy bajo, sin embargo, apoyados en el valor de R-cuadrado (92.82 %) de la misma tabla se puede afirmar que el ajuste del diseño con relación a esta variable de respuesta es representativo y permite realizar análisis confiables de las variables, sus interacciones y respuestas.

Tabla 5. Análisis de Varianza diseño experimental de *Screening* para *S. obliquus* usando la concentración de exopolisacáridos (Y_{ch} , mg L⁻¹) como variable de respuesta.

Analysis of Variance for Exopolisacáridos

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Flux	1,75781	1	1,75781	0,85	0,4000
B:CO2	42,9201	1	42,9201	20,65	0,0061
C:Agitación	41,4505	1	41,4505	19,94	0,0066
AB	12,6253	1	12,6253	6,07	0,0569
AC	35,322	1	35,322	16,99	0,0092
BC	5,29751	1	5,29751	2,55	0,1713
Total error	10,3922	5	2,07844		
Total (corr.)	149,765	11			

R-squared = 93,061 percent

El diagrama de Pareto (Figura 24) muestra que dos de los parámetros, C* y Rf, así como una de las interacciones (Ia – Rf, AC), tienen un efecto significativo en la respuesta obtenida. Este resultado se puede corroborar al revisar el valor P en la tabla ANOVA que evidencia para estos factores su representatividad al mostrar valores menores de 0.05 para este estadístico.

Standardized Pareto Chart for Exopolisacáridos

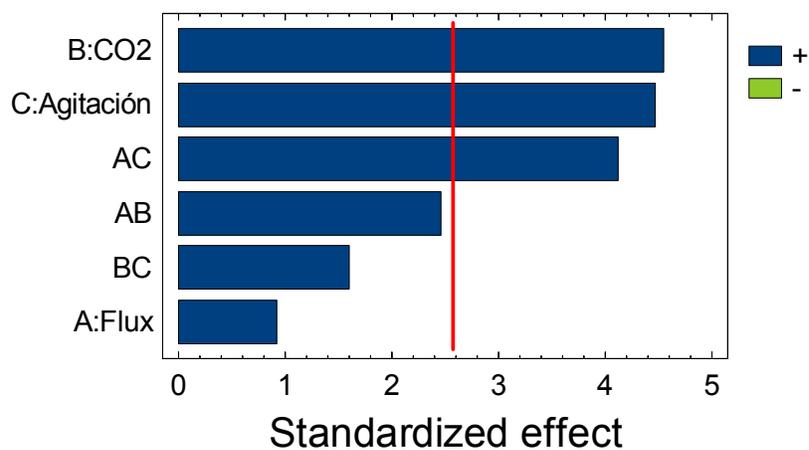


Figura 24. Diagrama de Pareto para el estudio de los factores de crecimiento Iluminancia (A), Fuente Carbono (B) y Agitación (C) sobre la concentración de exopolisacáridos (Y_{ch} , mg L⁻¹) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Es importante destacar que todas las variables y sus interacciones tienen efectos positivos en la respuesta (barras azules para todas las respuestas en la figura 24) y, a diferencia de la evaluación con la variable de respuesta μ , el efecto de R_f fue altamente significativo en los resultados encontrados.

El efecto de R_f sobre la respuesta durante el diseño experimental se relaciona con el parámetro adimensional definido en el número de Reynolds impulsor (Re_i), descrito en el capítulo 3, ecuación 9. En el anexo D se muestran los valores calculados de Re_i durante los ensayos para los niveles de agitación considerados. En el desarrollo y análisis de fotobiorreactores (PBR) el papel de esta variable es clave al considerar su efecto en el comportamiento fotosintético del cultivo, debido a que la cadena de procesos asociados con la captura de energía y la síntesis de moléculas orgánicas cubre un amplio rango de etapas con diferentes constantes de tiempo que, específicamente para la fijación de CO_2 , se corresponde con los órdenes de magnitud del proceso de mezcla.

Este aspecto, evidenciado por Merchuk et al., 2007¹⁰⁸, se relaciona ampliamente con la relevancia del régimen de flujo evidenciada durante los ensayos, particularmente en la producción de EPS que se vio ampliamente favorecida por los regímenes de flujo turbulentos tal como se demuestra al observar el diagrama de efectos principales para Y_{ch} ($mg L^{-1}$) en la figura 25, en esta figura la representatividad de los efectos para las variables experimentales en Y_{ch} queda evidenciada al observar las tres variables experimentales, eje de abscisas, en su efecto sobre la respuesta óptima para cada nivel evaluado (-1, 0, 1) en correlación para la VR, en el eje de ordenadas. La pendiente de los tres efectos muestra ser positiva para cada una de ellas, sin embargo, el nivel de esta es notoriamente más representativo para las variables R_f y C^* .

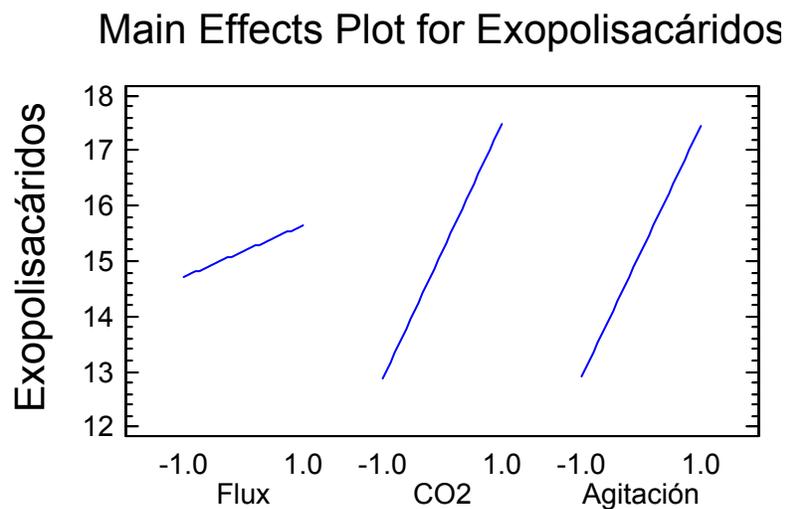


Figura 25. Diagrama de efectos principales para la concentración de exopolisacáridos (Y_{ch} , $mg L^{-1}$) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

El efecto particular del patrón de flujo en el medio de cultivo también podría estar asociado a respuestas sobre el estrés hidrodinámico que ocasiona el impulsor y que induce en el organismo adaptaciones fisiológicas y bioquímicas para reducir la

susceptibilidad al daño. Gran parte del proceso de adaptación estaría relacionado con la sobreproducción de EPS ya que como se puede evidenciar en la figura 26, su producción se maximiza de manera considerable cuando el régimen de flujo es más turbulento (interacciones AC y BC, líneas +,+). Evidentemente el efecto está igualmente asociado a una mayor disponibilidad y mejor distribución de la fuente de energía (luz) y carbono (CO₂), ya que la figura demuestra de manera clara que la sobreproducción está atada a altas concentraciones de carbono en el medio y altos niveles de iluminancia sobre la célula.

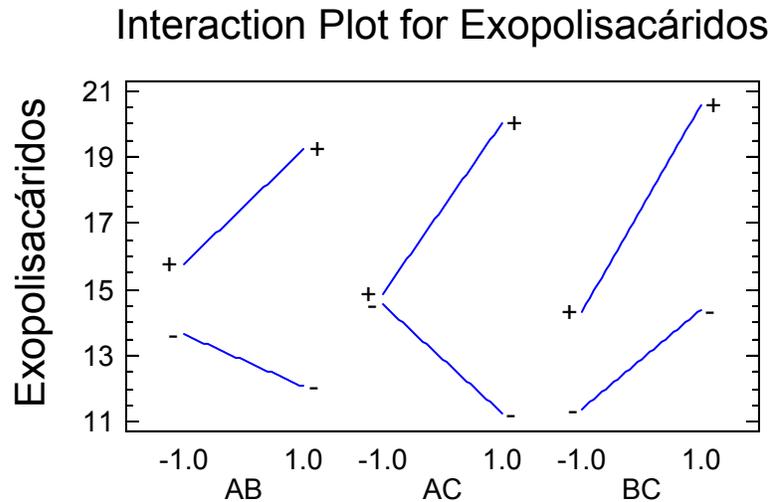


Figura 26. Diagrama de interacciones para las variables experimentales - VE en función de la variable de respuesta - VR; donde: VR = Exopolisacáridos (Y_{ch}, mg mL⁻¹), A = Iluminancia (lux), B = Fuente de Carbono (CO₂ % v/v), C = Agitación (rpm). Valores correspondientes a la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Adicionalmente en la misma figura 26, con el análisis complementario de los efectos principales, se observa un comportamiento bastante particular para la respuesta Y_{ch}, en el que las líneas para las interacciones AB (I_a y C*) y AC (I_a y R_f) muestran interacciones importantes entre niveles que muestran pendientes que maximizan la variable de respuesta en su nivel máximo (líneas +,+ con pendiente hacia arriba) y que la minimizan en su nivel mínimo (líneas -,- con pendiente hacia abajo). Para la interacción BC (C* y R_f) el efecto es aditivo en los dos niveles, sin embargo la diferencia de pendiente para el nivel máximo es bastante favorable con relación a Y_{ch}.

La figura 27 correspondiente a la superficie de respuesta para Y_{ch} (mg L⁻¹), muestra niveles óptimos en los valores máximos de los tres factores experimentales considerados. El efecto de C* y R_f es bastante evidente en la inclinación del entramado y, adicionalmente, debe notarse que la variable I_a muestra una pendiente que en relación con la VR, disminuye desde el nivel mínimo (-1.0) al máximo (1.0) de manera consistente con el diagrama de interacciones para EPS (figura 26), que en las interacciones AB (I_a y C*) y AC (I_a y R_f) mostró el mismo tipo de comportamiento al trabajar I_a en sus niveles mínimos.

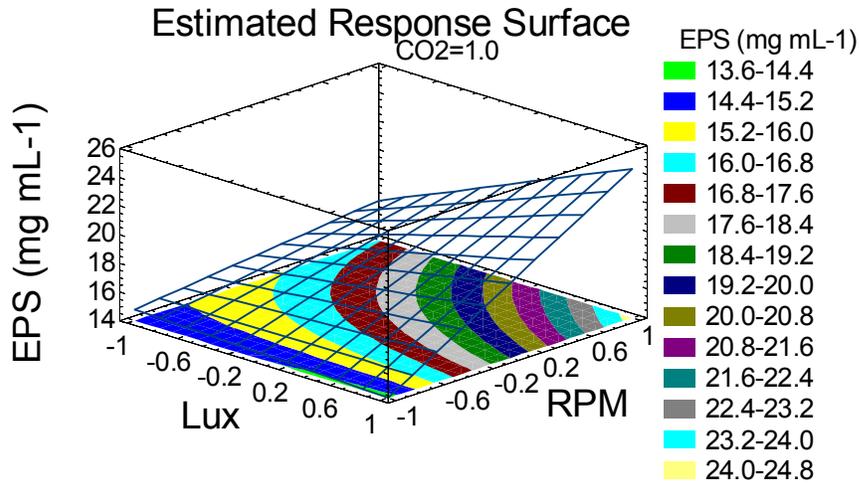


Figura 27. Superficie de respuesta obtenida del diseño experimental de *Screening* para la VR Exopolisacáridos (Y_{ch} , mg L⁻¹) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Dentro de lo planteado se debe considerar que el aumento en la producción de EPS afecta la viscosidad del medio y que esto a su vez reduce la velocidad de agitación del impulsor, lo que proporcionalmente afectará el régimen de flujo. El incremento en la viscosidad del medio, asociado a la producción de EPS y directamente proporcional a su concentración en el medio tal como se muestra en la figura 28, se consideraría por tanto una adaptación fisiológica de la microalga a las condiciones ambientales del sistema de producción buscando generar protección sobre la pared celular al recubrirla y consecuentemente apilar las células formando agregados que aparentemente constituyen una protección efectiva contra el daño mecánico. Evidencias presentadas por Märkl et al. 1991¹⁰⁹ respaldan esta afirmación.

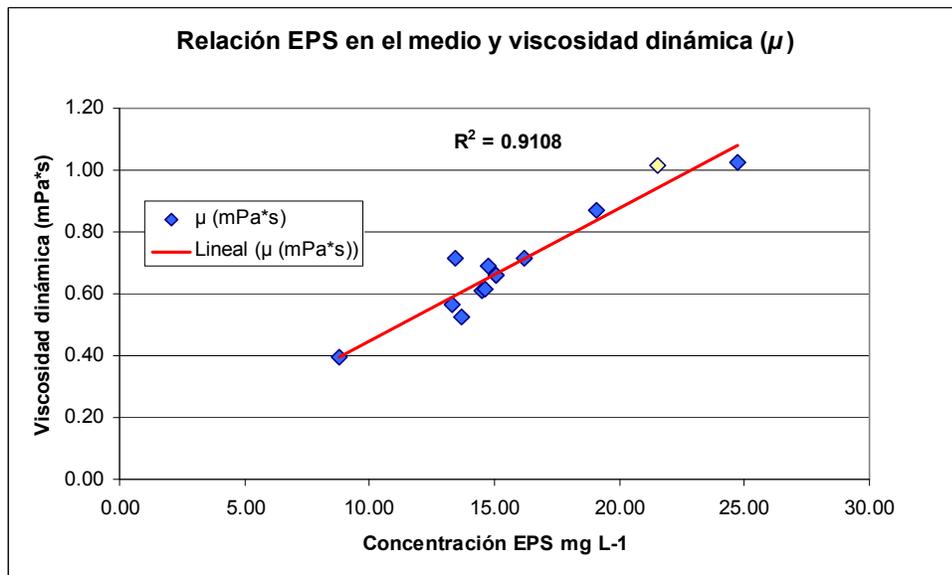


Figura 28. Variación en la viscosidad dinámica (μ) en los medios de cultivo para la microalga *Scenedesmus obliquus*, Los valores μ se dan en mPa*s⁻¹ y corresponden a mediciones realizadas a 18 °C.

La respuesta óptima para los ensayos, consistente en la maximización de la VR para los niveles máximos de cada factor y sus interacciones correspondientes, afianza los óptimos del proceso. Estos resultados coinciden por tanto con la respuesta óptima encontrada para μ , y se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Respuesta óptima para el diseño experimental de *Screening* variable de respuesta EPS (Y_{ch} , mg L⁻¹) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Optimize Response

Goal: maximize Exopolisacáridos

Optimum value = 24.4117

Factor	Low	High	Optimum
Flux	-1.0	1.0	1.0
CO2	-1.0	1.0	1.0
Agitación	-1.0	1.0	1.0

Particularmente para las dos respuestas evaluadas, μ y Y_{ch} , el proceso de fijación de carbono asociado al desarrollo celular y a la producción de sustancias poliméricas requiere el suministro de una fuente inorgánica de carbono que, acorde con los resultados encontrados (ver diagramas de Pareto, figuras 19 y 24), se convierte en el principal factor de productividad para el proceso.

Establecida su relevancia primordial dentro del sistema de producción es importante considerar que su respuesta óptima en los distintos ensayos está ampliamente ligada al tipo de interacción que condiciona su disponibilidad en el medio, a través del régimen de flujo, y la eficiencia del proceso, dependiente del flujo luminoso, ya que al observar comparativamente los diagramas de efectos principales para las VR μ y Y_{ch} , figuras 20 y 25, si bien el CO₂ es la variable más relevante del proceso su efecto se acentúa de manera preferencial al interactuar con el flujo luminoso en función de la productividad y, al ser la productividad asociada a la producción de EPS, es su interacción con el régimen de flujo la más relevante dentro del proceso. Esto se sustenta igualmente al observar las correspondientes interacciones en las tablas de ANOVA para cada respuesta específica.

Considerando que los estudios sobre el metabolismo de la fotosíntesis han distinguido entre reacciones de la fase oscura y reacciones de la fase luminosa. Para el caso de las algas verdes, e.g. *Scenedesmus obliquus*, las reacciones fotosintéticas de la fase luminosa básicamente toman la energía lumínica, i.e. fotones, para la oxidación catalítica de moléculas de agua (H₂O), formando y acumulando durante el proceso poder reductor (NADPH) y compuestos altamente energéticos (ATP); las reacciones de la fase oscura usan el NADPH y ATP como sustratos para ciclo de Calvin-Benson y se refiere básicamente a la fijación de carbono inorgánico (CO₂) en moléculas 3-C que se asimilan en azúcares, almidón, y lípidos, o otras moléculas requeridas para el crecimiento celular.

Dicho esto, en la interacción fuente de carbono – régimen de flujo, BC en las figuras 21 y 26, se observa una respuesta prioritariamente aditiva de la interacción entre variables que relaciona el efecto de la agitación en la mayor disponibilidad, altos coeficientes de

transferencia de masa, del carbono inorgánico añadido al medio y por ende en la productividad (μ , d^{-1}) y producción de EPS. Sin embargo, debe notarse que el efecto aditivo descrito en la figura 21 es mínimo en comparación al observado en la figura 26, esto permitiría confirmar que la síntesis de EPS se dispararía preferencialmente durante situaciones adversas, en cambio la productividad en función de esta interacción BC (C^* y R_f) permanecería relativamente constante. Esto implica que la mayor disponibilidad para el almacenamiento de carbono asociada al régimen de flujo por la mejora de los procesos de mezcla y distribución en el medio, incrementa la productividad aunque no de manera directamente proporcional ya que durante el proceso se promueve la síntesis de agentes de protección que modifican metabólicamente y fisiológicamente las reacciones asociadas con la fijación de carbono y el uso de la energía disponible.

Si se considera por tanto que una mayor disponibilidad de CO_2 en el medio promueve favorablemente la productividad del cultivo, debe incluirse dentro del cuadro el efecto de la iluminación sobre la respuesta. Al observar la figura 29 se puede observar que la incidencia del flujo luminoso (lux) sobre la producción de EPS en su nivel máximo (11,500 lux) es bastante significativa cuando se trabaja con altos flujos luminosos, no es el caso cuando la disponibilidad de carbono es mínima en el medio ($\sim 0\% CO_2$), línea -1.0 a -1.0, en cuyo caso la tendencia en la respuesta es negativa como evidencia la pendiente de la línea.

Interaction Plot for Exopolisacáridos

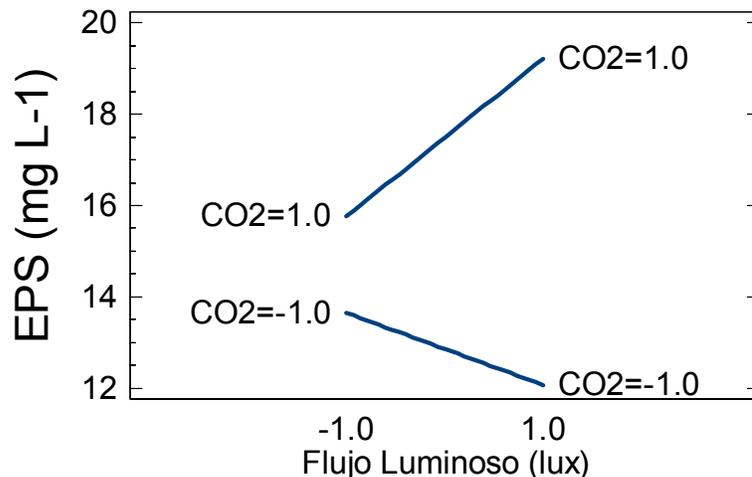


Figura 29. Diagrama desglosado para la interacción Flujo Luminoso/Iluminancia (A) contra la Fuente de Carbono (B) en función de la variable de respuesta VR = exopolisacáridos/EPS ($mg L^{-1}$). Los valores corresponden a aquellos reportados para la microalga *Scenedesmus obliquus* en la figura 26 pero solo para la interacción correspondiente.

Si adicional a la revisión de la interacción representada en la figura 29, consideramos la misma interacción, AB en la figura 21 (línea -,-), se deduce que a bajos niveles de carbono en el medio, la fijación de carbono y síntesis molecular prioriza por mantener el crecimiento celular y, a su vez esto repercute en la disminución de concentración de EPS en el medio, ya que las reservas de azúcares se destinan hacia otras actividades de mantenimiento metabólico. Este hecho implica que bajas disponibilidades de luz

equivalen a bajos niveles de fijación de carbono, si a esto se suma su carencia en el medio, el ciclo de absorción de carbono (fase oscura del proceso), no tendría insumos suficientes para mantener la eficiencia correspondiente, ya que el carbono fijado sería mínimo y se consumiría para sostener el desarrollo de la microalga, efectos similares han sido encontrados en estudios asociados al crecimiento bajo condiciones limitantes (Grobbelaar, 1994)¹¹⁰.

Planteado el efecto de niveles mínimos en la interacción flujo luminoso – fuente de carbono (AB), se debe hacer el reconocimiento sobre su notable producción cuando los niveles máximos de ambas variables coinciden. Este efecto, evidente considerando que altas disponibilidades de energía se asociarían con mayor generación de poder reductor y ATP, insumos base para las reacciones de la fase oscura de la fotosíntesis, incrementaría la eficiencia en la fijación de CO₂ y por tanto las productividades en biomasa y biomoléculas. Efectos similares han sido encontrados en cepas de *B. braunii* (Dayananda et al., 2007)¹¹¹ que presentaron el mismo efecto de maximización, incluso bajo diversas condiciones adversas, al igual que en los presentes ensayos.

De manera adicional se debe considerar que el efecto del flujo luminoso ha sido reportado en otros estudios (Reboloso et al., 1999)¹¹² como una de las causas para sobreproducción de EPS por parte de microalgas. En los presentes ensayos y acorde con la figura 24, el efecto de esta variable no incide de manera negativa en la respuesta, adicionalmente la pendiente muestra una tendencia ampliamente positiva en los niveles máximos de esta variable (figuras 20 y 29). Deberá considerarse no obstante que los niveles de flujo luminoso que promueven la secreción de EPS se asocian a niveles inhibitorios que, acorde con los presentes ensayos, no estarían dentro los niveles evaluados durante el conjunto de pruebas establecidas en el diseño experimental.

La eficiencia fotosintética, productividad en biomasa o moléculas, se asocia de manera preferencial a una interacción entre I_a y C^* de manera prioritaria. La superficie de respuesta para μ (figura 23), permite identificar una zona bastante reducida que se asocia con la respuesta óptima, zona azul oscura en el contorno de la superficie, y que claramente se encuentra en los niveles máximos de I_a y C^* . La eficiencia fotosintética del proceso queda claramente determinada por los contornos de la superficie, que muestran una proporcionalidad en las bandas de productividad (μ , d⁻¹) casi directa entre estos dos parámetros.

Considerando dentro de la eficiencia fotosintética un suministro adecuado de la fuente de carbono, mezcla aire-CO₂ al 4% v/v como máximo en los presentes ensayos, la disponibilidad de luz y su adecuada distribución se considerarían el principal efecto a evaluar para optimizar la producción. La distribución homogénea de la luz sobre las células del cultivo permite un control adecuado de las reacciones asociadas y promueve incrementos de productividad en función del flujo luminoso que a su vez se relaciona con el régimen de flujo que experimentan las células en el sistema.

La superficie de respuesta para la producción de EPS (Figura 27), muestra un efecto significativo a considerar en el proceso ya que si bien el punto óptimo es bastante claro en el entramado de la superficie, el efecto sobre el contorno muestra como se maximiza de manera progresiva la interacción entre estas variables cuando sus niveles aumentan. Considerando que la dinámica de flujo es el factor clave que condiciona la historia de

iluminación de las células según ha sido establecido por otros autores (Wu y Merchuk¹⁰⁷; Vunjak-Novakovic⁶⁷), y su control en el proceso afecta los rendimientos de manera apreciable acorde con Miller et al. 1964¹¹³, la sensibilidad de estos parámetros en la productividad debería hacerse mayor, tal como lo muestra el contorno, en los niveles máximos para dichas variables.

Al considerar los efectos positivos de estos parámetros, claramente demostrados en las respuestas sobre la productividad y producción de biomoléculas, debe aclararse de manera puntual por que las respuestas encontradas para la fitohormona-auxina ácido indol acético – IAA no se corresponde con las afirmaciones realizadas previamente. Esta respuesta particular será analizada en la siguiente sección.

5.2.3. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (Y_A , nM L⁻¹) COMO VARIABLE DE RESPUESTA. Acorde con los valores reportados en la tabla de ANOVA (tabla 7) la relevancia de los datos, si bien más baja que para μ y Y_{ch} , resulta ampliamente significativa al presentar un valor del estadístico R-cuadrado de 89.61%. De manera adicional, el error cuadrático medio (Mean Square en tabla 7) es relativamente bajo, por lo que se considera que las interpretaciones e información que se pueda obtener de los resultados obtenidos para Y_A serán confiables y significativos.

Solamente un efecto, I_a , resultó significativo para esta VR al presentar un valor P inferior a 0.05 (ver anexo C). Sin embargo, los valores de C^* y R_f presentaron efectos importantes sobre la respuesta acorde con el diagrama de Pareto (figura 30), la representatividad de la respuesta se da con un 95% de confiabilidad. Particularmente para este diagrama resulta muy interesante destacar que, a diferencia de las otras dos respuestas consideradas, para Y_A se registraron efectos negativos de las variables experimentales y de sus interacciones las cuales sin ser altamente significativas afectarán como se muestra más adelante, la respuesta óptima que maximiza la producción de esta biomolécula.

Tabla 7. Análisis de Varianza diseño experimental de *Screening* para *S. obliquus* usando la concentración de promotores de crecimiento (Y_A , nM L⁻¹) como variable de respuesta.

Analysis of Variance for IAA

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Flux	20.2853	1	20.2853	28.42	0.0031
B:CO2	4.52855	1	4.52855	6.35	0.0532
C:Agitación	2.95853	1	2.95853	4.15	0.0974
AB	0.0234361	1	0.0234361	0.03	0.8633
AC	1.276	1	1.276	1.79	0.2388
BC	1.69925	1	1.69925	2.38	0.1835
Total error	3.56859	5	0.713717		
Total (corr.)	34.3396	11			

R-squared = 89.608 percent

Standardized Pareto Chart for IAA

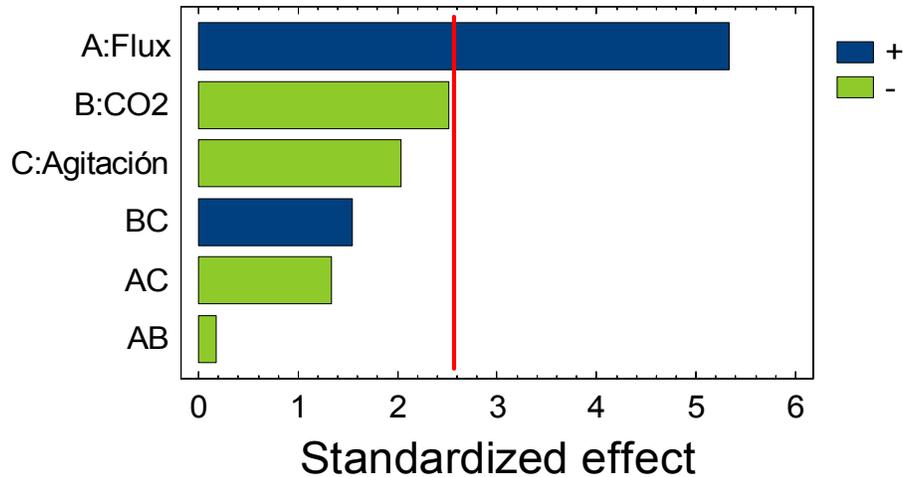


Figura 30. Diagrama de Pareto para el estudio de los factores de crecimiento Iluminancia (A), Fuente de Carbono (B) y Agitación (C) sobre la concentración de promotores de crecimiento (Y_A , nM L⁻¹) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

En el diagrama de efectos principales que se muestra en la figura 31, el efecto negativo de los factores C* y R_f es bastante claro al evaluar la respuesta de sus niveles en relación a la pendiente. El aumento de intensidad y concentración, en la agitación y fuente de carbono respectivamente, afecta de manera importante las concentraciones finales de Y_A en *S. obliquus*. Por el contrario I_a muestra una respuesta bastante positiva con el cambio de niveles, evidenciado en la fuerte pendiente que forma en la gráfica al comparar los niveles mínimos y máximos evaluados para este factor.

Main Effects Plot for IAA

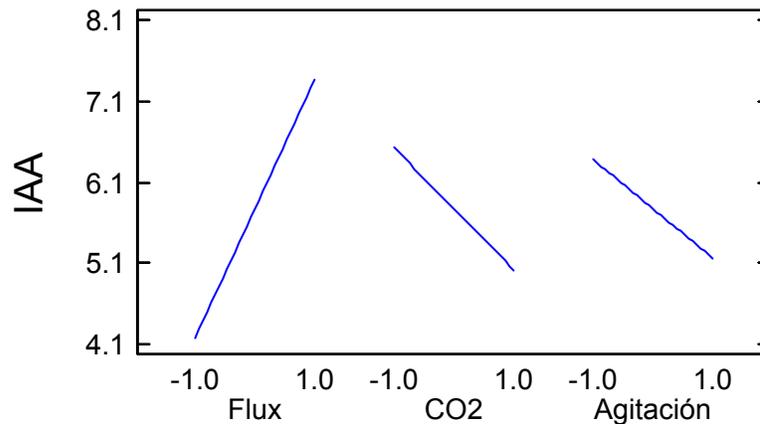


Figura 31. Diagrama de efectos principales para la concentración de promotores de crecimiento (Y_A , nM L⁻¹) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Los efectos observados muestran claramente que el mecanismo para regular la producción de IAA está relacionado con bajas disponibilidades de los medios nutritivos en el medio, fuente de carbono y minerales, ya que al incrementar su concentración en el medio se observa un efecto negativo en el valor de Y_A , evidenciado en la pendiente para

los factores C^* y R_f en la figura 31. Se podría relacionar este efecto considerando que acorde con diversos estudios descritos por Tarakhovskaya¹⁰², existe evidencia de que la producción de IAA se relaciona con el desarrollo celular al proporcionar una mejor y rápida capacidad de uso y economía, de los recursos básicos para la nutrición (luz y nutrientes), ya que se considera que su efecto primario es la activación del complejo H^+ -ATPasa en el plasmalema.

Esta afirmación tendría un efecto importante en el proceso estudiado ya que se consideraría que bajo condiciones óptimas en el medio, abundancia de nutrientes y distribución homogénea asociadas a valores altos de los factores C^* y R_f , la célula no tendría la necesidad de producir estos metabolitos secundarios para apoyar las funciones de absorción de nutrientes para garantizar su desarrollo. Bajo condiciones adversas no obstante, la excreción de estas sustancias sería determinante, ya que mejoraría la eficiencia de los procesos fotosintéticos para la generación de energía requerida para el mantenimiento y la viabilidad de la célula. Esta relación de efectos explicaría con claridad las pendientes para los tres factores experimentales en la gráfica 31 y también justificaría el por que C^* y R_f muestran un efecto negativo en la respuesta, ya que su abundancia o incremento sería básicamente un supresor para la sobreproducción de IAA al medio. Estas condiciones de estrés que maximizan la producción de IAA también han sido encontradas en la diatomea *Skeletonema costatum* (Bentley-Mowat, 1967)¹¹⁴.

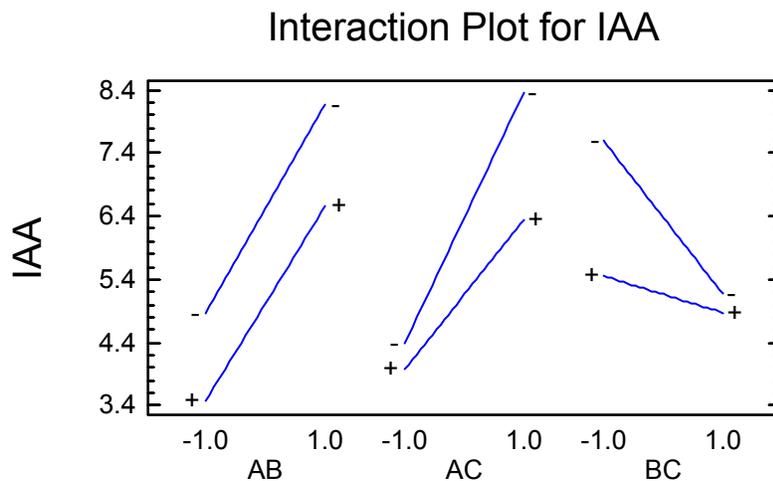


Figura 32. Diagrama de interacciones para las variables experimentales - VE en función de la variable de respuesta - VR; donde: VR = Ácido Indol Acético (Y_A , $nM L^{-1}$), A = Iluminancia (lux), B = Fuente de Carbono (CO_2 % v/v), C = Agitación (rpm). Valores correspondientes a la microalga *Scenedesmus obliquus*.

La consideración de los efectos principales apoyado en las interacciones de los factores sobre Y_A que se muestran en la figura 32, hace evidente el efecto negativo en todos sus niveles y combinaciones, para C^* y R_f (B y C respectivamente en la figura 32). Las pendientes que consideran el flujo luminoso dentro de la interacción (AB y AC) muestran una pendiente positiva que maximiza Y_A , sin embargo debe notarse que la respuesta óptima está para cada interacción en el nivel mínimo (línea -,-). Igualmente el efecto negativo de la interacción BC en Y_A es claro y concuerda con los análisis previos de las variables independientes; esto constituye una evidencia consistente sobre las condiciones que favorecen la producción del ácido indol acético-IAA en la microalga *S. obliquus*.

La aditividad (líneas que no se cruzan) en la relación entre los factores experimentales es claramente evidente y simplemente aclara el panorama descrito previamente al mostrar respuestas siempre favorables a los niveles mínimos de C^* y R_f . Debe notarse sin embargo, que el flujo luminoso favorece en todo caso y de manera positiva la producción de IAA. Considerando que la producción de estos metabolitos secundarios está atada a la productividad y desarrollo celular, una mayor disponibilidad energética asociada a los procesos de fijación de carbono y de síntesis molecular justificaría claramente este comportamiento.

En la figura 33 la superficie de respuesta para IAA simplemente afirma lo visto en las figuras y tablas previas mostrando claramente un máximo de productividad de Y_A en los niveles máximos de I_a , y en niveles mínimos de C^* y R_f , asociados a privación de carbono y nutrientes en el medio, para la respuesta óptima. Estas condiciones serán evidentemente el punto óptimo para la producción de la fitohormona que en los presentes ensayos tuvo una concentración máxima para la respuesta óptima (ver tabla 8) de 9.046 nM L^{-1} de IAA.

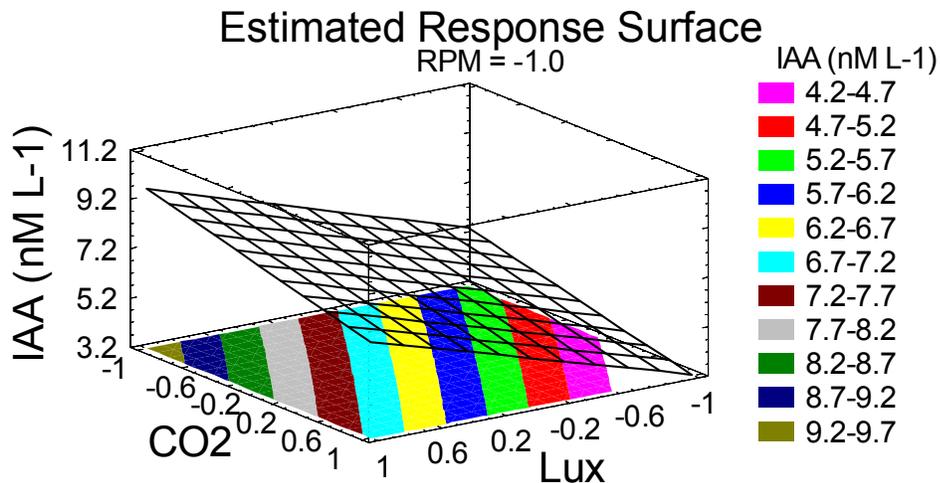


Figura 33. Superficie de respuesta obtenida del diseño experimental de *Screening* para la VR Promotores de crecimiento (Y_A , nM L^{-1}) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Las mejores productividades observadas no obstante se obtienen bajo condiciones que acorde a lo encontrado en las variables de respuesta μ y Y_{ch} , podríamos considerar de bajo rendimiento o productividad. Este aspecto, evidenciado por Mazur et al. 2001¹¹⁵, en células de *Scenedesmus armatus* y *Chlorella pyrenoidosa*, implica un óptimo no ideal para los procesos de producción debido a que la productividad en el tiempo no sería favorable en función de la biomasa obtenida para el mismo. La productividad máxima de la respuesta óptima para Y_A que se muestra en la tabla 8 no se considerará por tal razón durante los ensayos de validación de los modelos generados para esta respuesta, aunque deberá considerarse que se estima una productividad aproximada de IAA similar a la

encontrada en el punto óptimo seleccionado y que se discutirá con detalle en la siguiente sección.

Tabla 8. Respuesta óptima para el diseño experimental de *Screening* variable de respuesta IAA (Y_A , nM L⁻¹) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

```

Optimize Response
-----
Goal: maximize IAA

Optimum value = 9.63675

Factor          Low          High          Optimum
-----
Flux            -1.0         1.0           1.0
CO2             -1.0         1.0           -1.0
Agitación       -1.0         1.0           -1.0
  
```

5.3. MONTAJES DE VALIDACIÓN.

Partiendo de las respuestas óptimas encontradas para las tres variables de respuesta consideradas las cuales se muestran consolidadas en el cuadro 4, se procedió a correr un ensayo que validara el valor óptimo de las variables experimentales que maximizara la producción de biomasa y exopolisacáridos y que permitiera certificar, con precisión y exactitud, el valor óptimo propuesto por el diseño experimental.

Sin embargo, considerando que la respuesta óptima (RO) para maximizar la producción de Y_A no coincidía con la respuesta óptima de los otros dos factores, se seleccionó como RO para la validación, aquella combinación de factores que maximizara Y_{ch} (mg L⁻¹) y μ (d⁻¹), esto debido a que el punto óptimo que maximiza la concentración de Y_A presenta valores de μ de 0.34 d⁻¹ y concentración de Y_{ch} de 8.8 mg L⁻¹ tal como se muestra en el cuadro 4, montaje 7. Estos valores correspondían para μ con rendimiento por debajo del óptimo (μ de 0.66 d⁻¹) de aproximadamente 47% y a su vez para la productividad de Y_{ch} , cuyo óptimo fue de 24.7 mg L⁻¹ siendo por tanto un 64% inferior al óptimo esperado para esta respuesta.

Evidentemente la producción de IAA no sería la óptima encontrada (9.05 nM L⁻¹) en el punto óptimo seleccionado para validación, los valores de Y_A estarían aproximadamente un 40% por debajo de la mejor respuesta, sin embargo la productividad asociada en el tiempo y por unidad de área se vería muy favorecida debido a que las productividades en biomasa se incrementarían notablemente y de manera proporcional la producción de esta fitohormona.

Cuadro 5. Respuesta óptima establecida para los montajes de validación diseño experimental de *Screening* con la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Respuesta óptima corridas validación			Valor	
Factor (VE)	Unidades	Nivel	Codificado	Real
Flujo luminoso	Lux	Máximo	1.0	11500
Fuente carbono	% mezcla A-CO2	Máximo	1.0	4%
Agitación	rpm	Máximo	1.0	1200

Los

factores y

niveles establecidos para realizar los montajes de validación se muestran en el cuadro 5 y los resultados de estos montajes, por triplicado, se muestran consolidados en el cuadro 6. El resumen de los estadísticos que incluye medidas de tendencia central, medidas de variabilidad, y medidas de forma, se muestra de manera detallada en el anexo E. De particular interés para estos análisis resulta considerar que el estadístico de asimetría muestra para cada una de las VR valores dentro del rango -2 a +2, por lo que se consideran provenientes de una distribución normal. Igualmente resulta relevante para los valores que se proyectaron de acuerdo con la RO de las tablas 4 y 6, μ (d^{-1}) y Y_{ch} ($mg L^{-1}$) respectivamente, que los resultados proyectados se encuentran dentro del rango promedio considerado para estas respuestas.

Estos valores proyectados fueron calculados a partir de los coeficientes de regresión obtenidos por el diseño experimental para cada VR considerada, i.e. coeficiente específico de crecimiento (μ , d^{-1}); concentración de ácido indol acético en el sobrenadante (Y_A , $nM L^{-1}$) y concentración de exopolisacáridos en el sobrenadante (Y_{ch} , $mg L^{-1}$). Las ecuaciones obtenidas y sus coeficientes se muestran a continuación para cada respuesta en las ecuaciones 10, 11 y 12.

$$\mu = 0.4075 + 0.07375 * I_a + 0.09875 * C^* + 0.00375 * R_f + 0.03625 * I_a * C^* + 0.01625 * I_a * R_f + 0.00625 * C^* * R_f$$

Ecuación 10

$$Y_{ch} = 15.1733 + 0.46875 * I_a + 2.31625 * CO_2 + 2.27625 * R_f + 1.25625 * I_a * C^* + 2.10125 * I_a * R_f + 0.81375 * C^* * R_f$$

Ecuación 11

$$Y_A = 5.7695 + 1.59237 * I_a - 0.752375 * CO_2 - 0.608125 * R_f - 0.054125 * I_a * C^* - 0.399375 * I_a * R_f + 0.460875 * C^* * R_f$$

Ecuación 12

Donde:

μ = coeficiente específico de crecimiento (d^{-1})

Y_{ch} = concentración de exopolisacáridos en el sobrenadante ($mg L^{-1}$)

Y_A = concentración de ácido indol acético en el extracto ($nM L^{-1}$)

I_a = flujo luminoso-iluminancia utilizada para el cultivo fotoautótrofo (lux)

C^* = concentración fuente de carbono suministrada al medio (mezcla aire- CO_2 % v/v)

R_f = régimen de flujo-agitación al que es sometido el medio (rpm)

El coeficiente específico de crecimiento, μ (d^{-1}), muestra un ajuste de su promedio para los ensayos bastante significativo con una desviación estándar (σ) de 0.00577 (anexo E) y una diferencia absoluta (d^{-1}) con relación al óptimo establecido en la tabla 4 prácticamente

nula. La concentración de exopolisacáridos (mg L^{-1}) mostró una media inferior al valor proyectado, sin embargo este valor promedio de 23.79 mg L^{-1} acorde con los límites inferior y superior de σ (1.592 mg L^{-1}) ubica el valor del óptimo proyectado dentro de su límite superior y considerando que el valor de asimetría para los resultados certifica que los datos provienen de una distribución normal con un valor del estadístico de -1.1935 , se puede asumir que la diferencia observada entre el promedio y el proyectado es adecuada. Al respecto también es importante considerar que la asimetría de los datos si bien muestra tendencia negativa es en gran parte influenciada por el resultado encontrado en el montaje de validación A que se muestra en el cuadro 6, este a su vez fue el que afectó de manera más relevante la media por debajo del proyectado al ser, estadísticamente hablando, un inferior bajo ya que se encuentra fuera del rango inferior mínimo de la desviación estándar del grupo de datos analizados.

Cuadro 6. Consolidado resultados ensayos de validación (montajes A, B, C) y respuesta óptima diseño experimental *Screening* para la microalga *Scenedesmus obliquus*. EPS = mg L^{-1} ; IAA = nM L^{-1} ; $\mu = \text{d}^{-1}$.

Respuesta ensayos		EPS mg L^{-1}	IAA nM L^{-1}	μ d^{-1}
Montaje validación	A	21.96	5.782	0.65
	B	24.83	4.641	0.64
	C	24.59	5.362	0.65
Promedio validación		23.79	5.262	0.65
Óptima modelo DE		24.41	6.008	0.64

Para la concentración de fitohormonas, IAA (nM L^{-1}), la respuesta esperada acorde con el diseño experimental no se corresponde con aquella que maximiza su producción sino con el esperado acorde con el montaje correspondiente que maximiza las otras dos variables experimentales consideradas. Esta concentración esperada al ser comparada con el promedio obtenido de 5.26 nM L^{-1} y considerando un valor de $\sigma = 0.577$ y una asimetría de -0.5365 , estaría dentro del rango superior de la media aunque dentro del intervalo límite estimado por los estadísticos de variabilidad.

En las figura 34 y 35 se muestra, respectivamente, el consolidado de los resultados obtenidos durante las pruebas realizadas por triplicado para cada uno de los montajes de validación y el comparativo entre el promedio obtenido y el valor predicho por el diseño experimental para cada VR. Gráficamente se puede validar la consistencia de las respuestas que certifica, cualitativamente, los valores cuantitativos descritos y soportados líneas arriba.

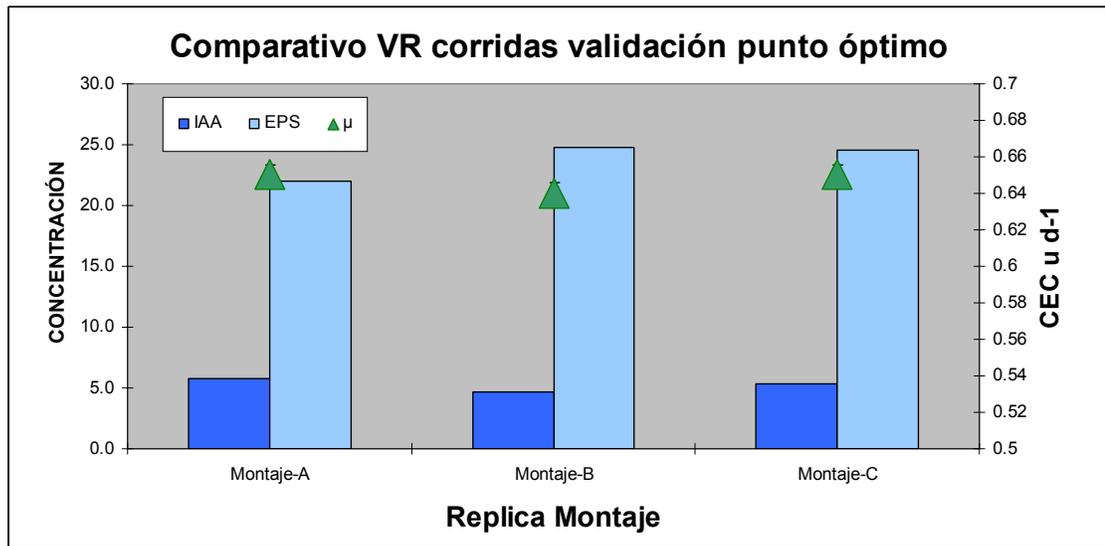


Figura 34. Comparativo concentración de biomoléculas durante los ensayos de validación del diseño experimental en la microalga *Scenedesmus obliquus* vs. coeficiente específico de crecimiento. En la figura: IAA = ácido indol acético (nM L⁻¹); EPS = exopolisacáridos (mg L⁻¹); μ = coeficiente específico de crecimiento (d⁻¹).

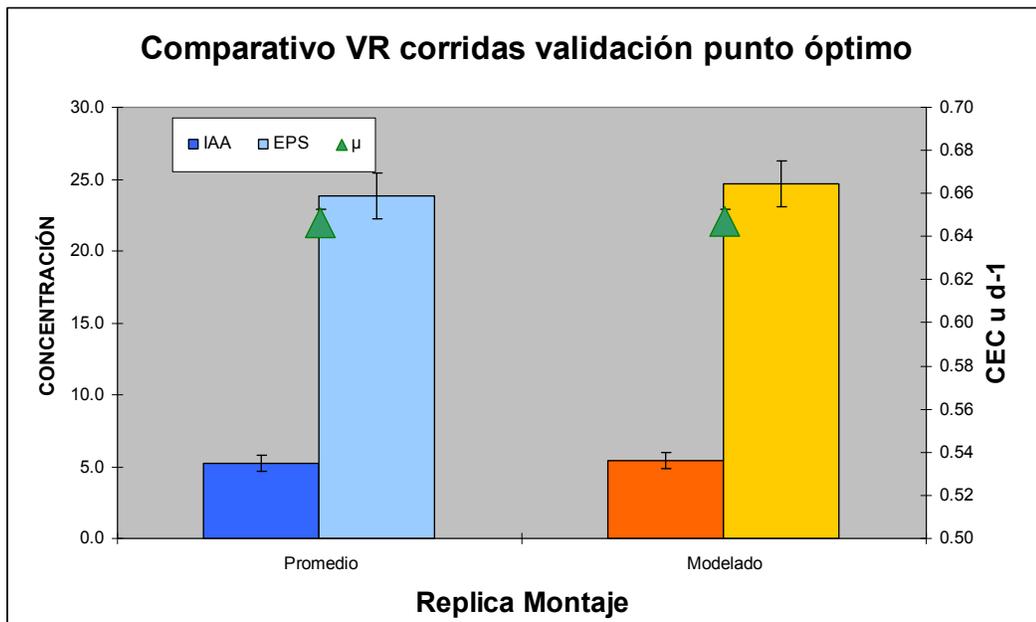


Figura 35. Comparativo VR promedio para los ensayos de validación del diseño experimental en la microalga *Scenedesmus obliquus* vs. valores predichos por modelo diseño experimental. En la figura: IAA = ácido indol acético (nM L⁻¹); EPS = exopolisacáridos (mg L⁻¹); μ = coeficiente específico de crecimiento (d⁻¹).

En la figura 36 se muestra una gráfica para la producción de EPS que representa los valores predichos por la ecuación 10, junto con sus límites de confianza al 95% calculado acorde con los coeficientes de regresión del diseño experimental, en relación a las

respuestas reales obtenidas. Los gráficos correspondientes a las variables de respuesta Y_A y μ se muestran en el anexo E.

Acorde con los resultados obtenidos en la validación se evidencia que los modelos de predicción para el cálculo de las respuestas en función de las variables experimentales consideradas en el diseño experimental cumplen satisfactoriamente con la confiabilidad esperada del modelo, al encontrar todos los resultados dentro de los límites de confianza establecidos.

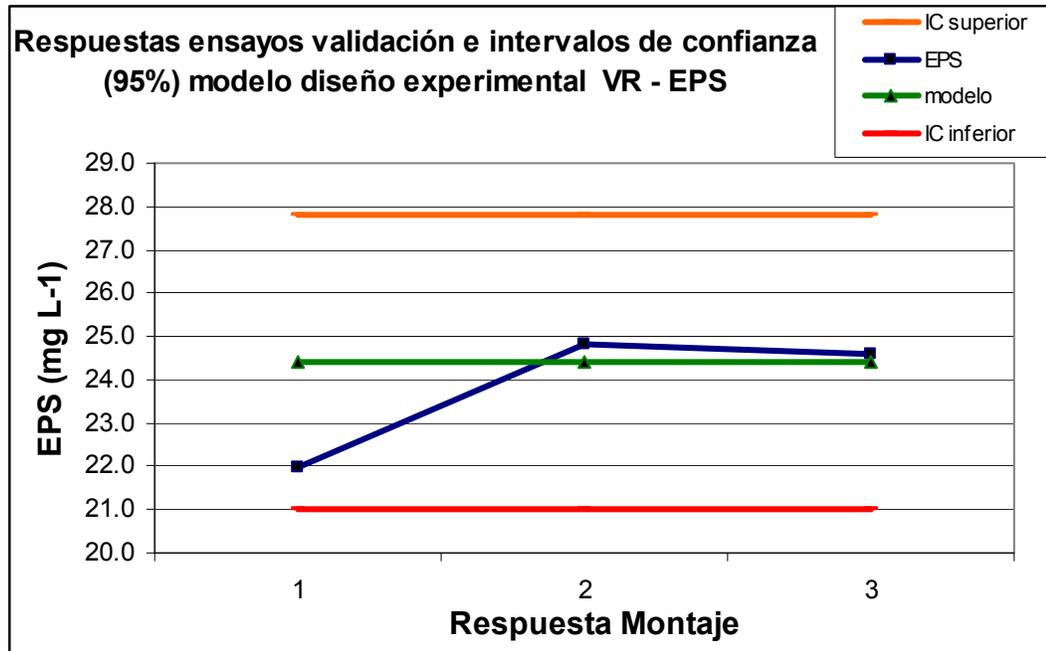


Figura 36. Comparativo valores reales montajes de validación vs. valores proyectados modelo diseño experimental con intervalos de confianza al 95% para la producción de EPS (mg L^{-1}) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

5.4. EXTRACCIÓN Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.

5.4.1. CENTRIFUGACIÓN: FRECUENCIA Y TIEMPO. En el cuadro 7 se muestra el consolidado de los resultados obtenidos para las dos respuestas consideradas en la evaluación de las variables tiempo (t , minutos) y frecuencia (F_R , rpm). Los resultados obtenidos muestran una clara incidencia del tiempo en la respuesta aunque como se muestra en la figura 37 su incidencia se hace más significativa en el nivel superior de esta variable. El efecto de F_R es claramente favorable, sin embargo, los niveles mínimos utilizados (4.000 rpm) no son adecuados o significativos y muestran una amplia diferencia con relación a los niveles medios y altos evaluados para esta variable experimental (ver figura 37). Considerando la homogeneidad de los resultados para las respuestas consideradas, remoción de células (Y_e) y reducción de la turbidez (T_e), se realizará la exposición de sus resultados de manera paralela para facilitar su análisis posterior dentro del documento.

El análisis de varianza en estos resultados muestra valores para el estadístico R-cuadrado de 92.9 % en Y_e y de 88.9 % en T_e (ver anexo F), cifras que generan una alta confiabilidad en los resultados obtenidos y los análisis que estos generen. La representatividad de estas respuestas tiene una relación primordial si se considera que la centrifugación se utiliza para separar materiales de diferente densidad mediante una fuerza superior a la de la gravedad, por lo que altas velocidades de giro o grandes radios de la centrifuga son ideales para maximizar el beneficio del proceso.

Cuadro 7. Consolidado resultados ensayos diseño experimental para extracción y obtención de extractos para la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Corrida	Tiempo	Frecuencia	Abs (560 nm)	Turbidez NTU	Células / ml	% Remoción células	% Reducción turbidez
1	10	4000	0.2047	20.1	3.17E+06	68.9%	88.1%
4	10	4000	0.1901	19.8	2.88E+06	71.8%	88.3%
2	10	6500	0.1658	16.2	2.40E+06	76.5%	90.4%
5	10	6500	0.1608	15.9	2.30E+06	77.5%	90.6%
3	10	9000	0.1576	15.5	2.23E+06	78.1%	90.8%
6	10	9000	0.1407	14.7	1.89E+06	81.4%	91.3%
7	15	4000	0.1892	19.5	2.86E+06	71.9%	88.5%
8	15	4000	0.1833	19.4	2.75E+06	73.1%	88.5%
9	15	6500	0.1516	15.6	2.11E+06	79.3%	90.8%
10	15	6500	0.1515	15.3	2.11E+06	79.3%	90.9%
11	15	6500	0.1496	15.1	2.07E+06	79.7%	91.1%
12	15	6500	0.1433	14.9	1.95E+06	80.9%	91.2%
15	15	6500	0.1733	19.2	2.55E+06	75.0%	88.6%
16	15	6500	0.1690	18.6	2.46E+06	75.9%	89.0%
17	15	6500	0.1589	15.9	2.26E+06	77.9%	90.6%
18	15	6500	0.1397	14.6	1.87E+06	81.6%	91.4%
13	15	9000	0.1311	14.4	1.70E+06	83.3%	91.5%
14	15	9000	0.1306	14.2	1.69E+06	83.4%	91.6%
22	20	4000	0.1679	18.0	2.44E+06	76.1%	89.3%
19	20	4000	0.1727	18.7	2.53E+06	75.2%	88.9%
20	20	6500	0.0683	12.7	4.45E+05	95.6%	92.5%
23	20	6500	0.0648	11.0	3.75E+05	96.3%	93.5%
21	20	9000	0.0334	8.4	0.00E+00	100.0%	95.0%
24	20	9000	0.0450	7.5	0.00E+00	100.0%	95.6%

En el diseño experimental se buscó identificar la mejor combinación de tiempo (t , minutos) y frecuencia (F_R , rpm) que proporcionara el mejor beneficio con el mínimo esfuerzo, ya que el principal problema que plantea la centrifugación industrial cuando se deben tratar grandes cantidades de material es que la capacidad y la velocidad de la centrífuga no se pueden aumentar indefinidamente, ya que la tensión mecánica en estos equipos aumenta en proporción al $(\text{radio})^2$ y la velocidad de operación también se ve restringida por la necesidad de una descarga continua de materiales.

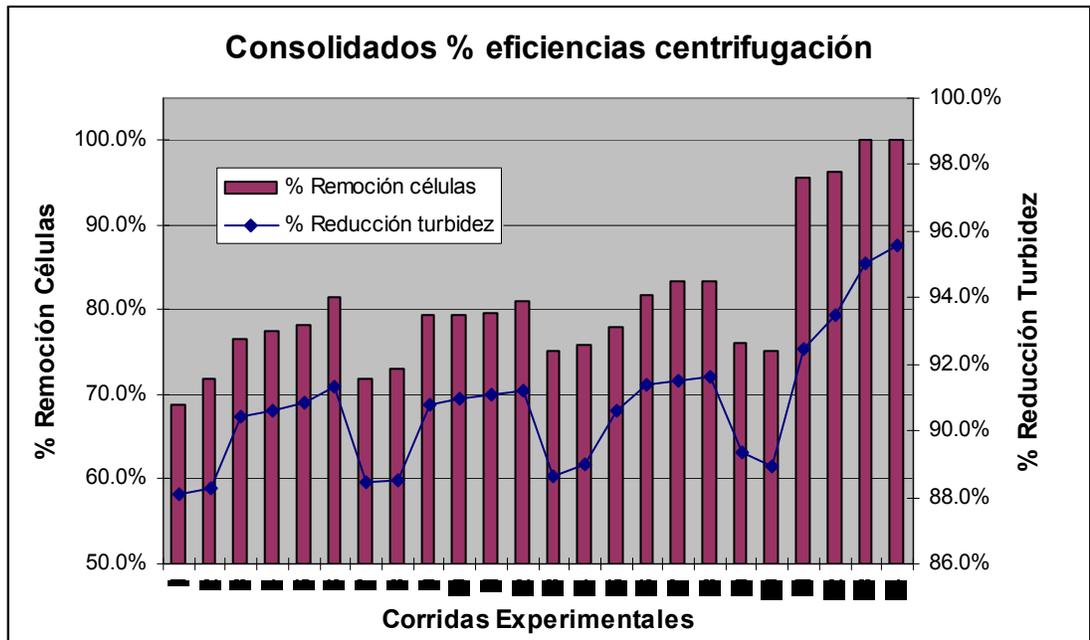


Figura 37. Gráfico VR consolidado diseño experimental centrifugación. El % de remoción de células se basa en una concentración inicial de 1.02×10^7 células mL^{-1} ; el % de reducción de turbidez se basa en una turbidez inicial de 169 NTU.

Partiendo de la consideración planteada, la frecuencia de la centrífuga será el factor predominante del proceso y esta representatividad de los efectos para las variables experimentales, acorde con el diagrama de Pareto para Y_e y T_e , es coherente con dicha afirmación tal como se puede observar en la figura 38 A y B. En la cual se evidencia para Y_e un claro efecto en la respuesta de las dos variables consideradas y de sus interacciones respectivas al presentar valores P por debajo de 0.05 (ver anexo X). Igual efecto se encontró para T_e , aunque se debe considerar que el efecto cuadrático de la frecuencia (BB en la figura 38-B) no fue significativo en la respuesta al mostrar un valor P superior a 0.05.

En función de estos resultados se deberá incluir dentro del análisis el hecho que la efectividad de la centrifugación, si bien accesoria para la magnitud de F_R , depende realmente de la velocidad que alcanzan las células o moléculas durante el proceso. Esta velocidad terminal dependerá de manera amplia y, acorde con la ley de Stoke, del tamaño de la partícula y de las propiedades físicas de la fase continua de la mezcla (viscosidad y densidad principalmente). Sin embargo, al considerar la trayectoria de las partículas se puede entender que estas se moverán en función del tiempo al que son expuestas a esta fuerza.

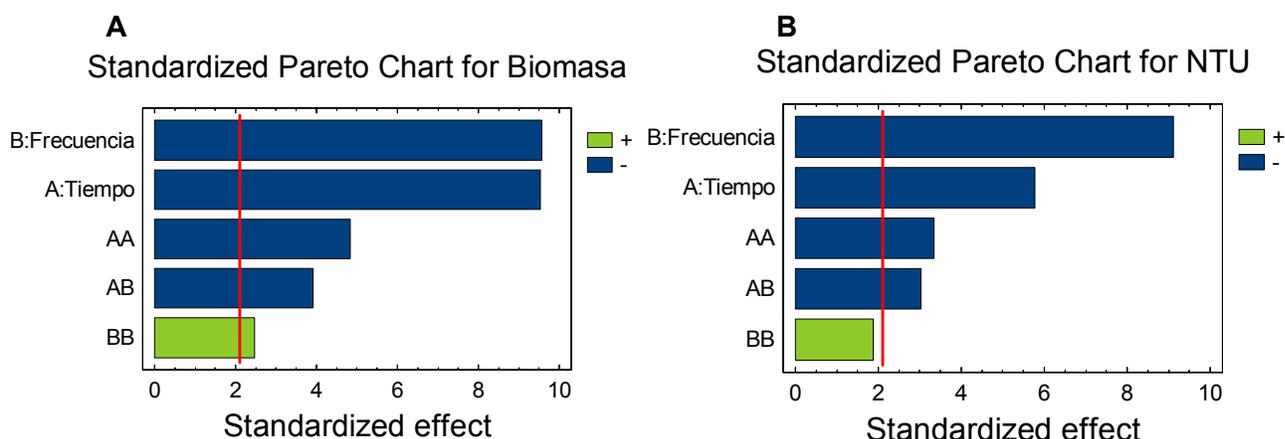


Figura 38. Diagramas de Pareto para el estudio de los factores experimentales, frecuencia (rpm) y tiempo (min), sobre la remoción de células (A, células mL^{-1}) a y la turbidez del extracto (B, NTU) en los extractos de la microalga *Scenedesmus obliquus*.

El efecto y representatividad de t y F_R , queda claramente elucidado al observar los diagramas de efectos principales para las correspondientes respuestas (Figura 39 A y B). Los diagramas muestran efectos más favorables en la respuesta (niveles inferiores en T_e y Y_e) para la variable tiempo que adicionalmente muestra un efecto cuadrático más representativo principalmente en los niveles inferiores para Y_e y T_e .

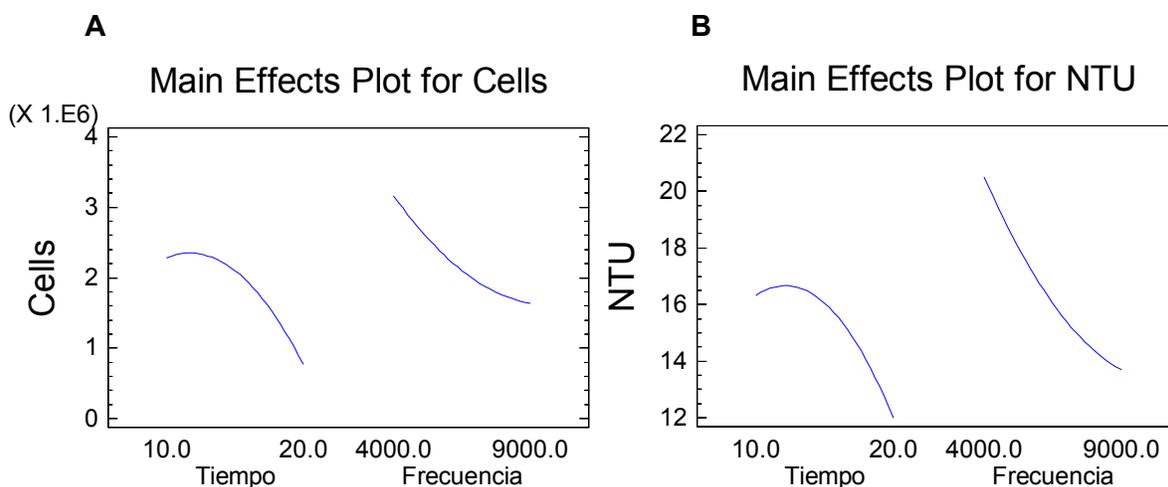


Figura 39. Diagrama de efectos principales para la concentración de células en el extracto (A, células mL^{-1}) y turbidez del extracto (B, NTU) en la microalga *Scenedesmus obliquus*, durante pruebas experimentales de centrifugación.

Adicionalmente puede observarse para F_R que si bien su efecto tiende a estabilizarse en los niveles máximos su comportamiento es prácticamente lineal, razón por la cual se entendería la baja representatividad de su efecto cuadrático como quedó evidenciado en la tabla ANOVA y el diagrama de Pareto para esta respuesta.

La importancia y peso de los factores sobre la respuesta encontrada es bastante clara aunque debemos considerar que el efecto del tiempo de exposición a la fuerza tiene una

respuesta cuadrática, acentuada en los niveles mínimos y que se torna lineal al aumentar el tiempo del proceso. El efecto contrario se observa con relación a la frecuencia que muestra una tendencia lineal en los niveles mínimos y que tiende a estabilizarse sobre los niveles máximos. Esta relación de efectos entre niveles para t y F_R , se puede analizar de manera más clara al observar las interacciones entre variables para las respuestas Y_e y T_e que evidencia la linealidad de F_R en los niveles máximos (figura 40) y la transición cuadrática a lineal del efecto de t en función del incremento de la exposición a la fuerza centrífuga.

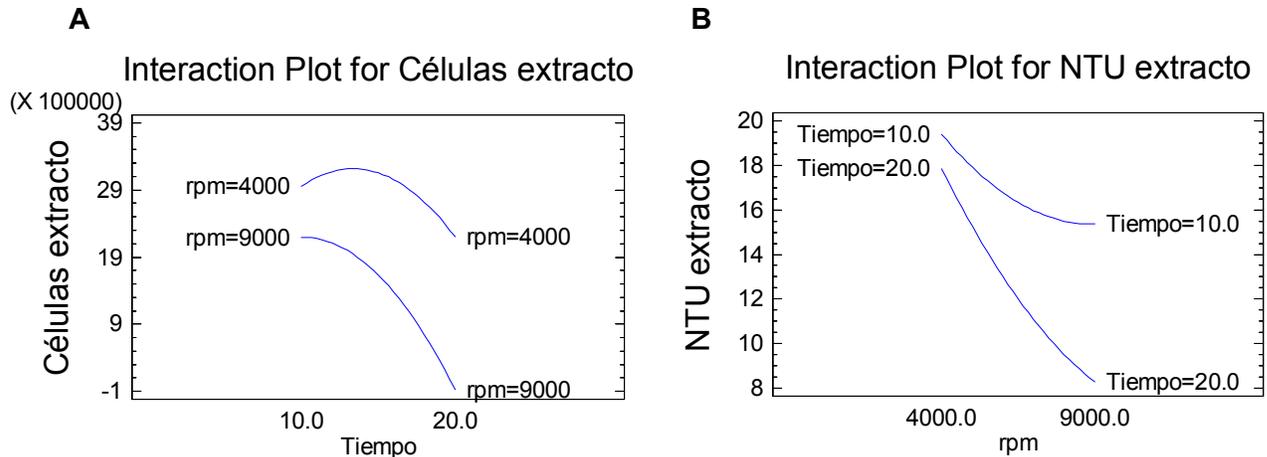


Figura 40. Diagrama de interacciones para las variables experimentales: A - tiempo (min) vs. frecuencia (rpm), B - frecuencia (rpm) vs. tiempo durante diseño experimental de centrifugación realizado con extractos de la microalga *Scenedesmus obliquus* para Y_e (A, células mL^{-1}) y T_e (B, NTU).

A pesar de la consistencia en los resultados obtenidos debe considerarse que la representatividad de las respuestas se hace altamente evidente solamente en los niveles superiores de t y F_R . Este efecto se puede ver claramente al analizar los contornos de la superficie de respuesta para Y_e y T_e , figuras 41 y 42 respectivamente, que muestran un efecto cuadrático bastante marcado para el tiempo caracterizado en las zonas grises y cafés de los contornos. Igualmente se observa una amplia zona de transición, en azul claro para la figura 41 y en amarillo para la figura 42, a partir de la cual se empieza a acentuar un efecto de proporcionalidad entre las variables experimentales que se mantiene constante al incrementar el nivel de las variables experimentales.

Estos efectos de transición respaldarían las observaciones previas al relacionar respuestas lineales en los óptimos de los factores y un comportamiento cuadrático sobre los niveles mínimos de estos. Claramente por lo tanto la respuesta óptima se encontraría en los niveles máximos de las variables experimentales, aunque debe considerarse la existencia de una pequeña zona de estabilización a partir de la cual se incrementa el efecto de los factores t y F_R sobre la respuesta.

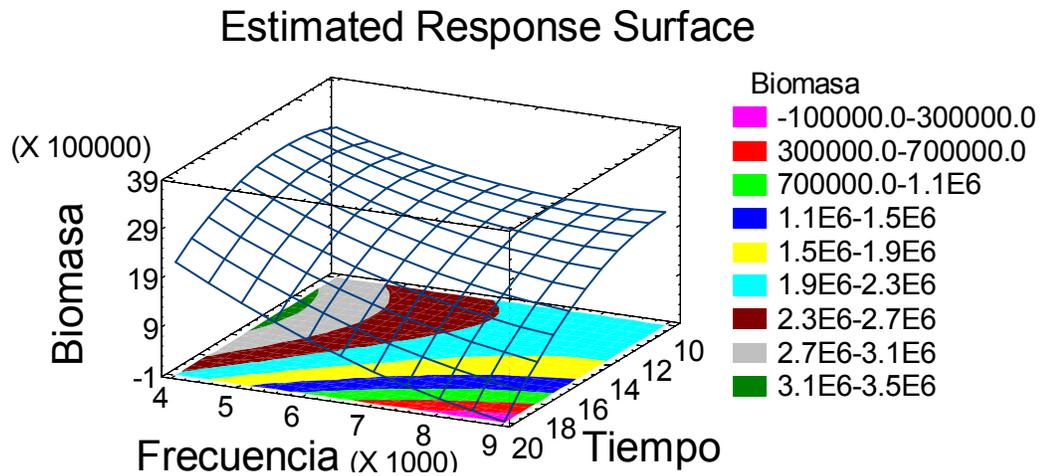


Figura 41. Superficie de respuesta para la VR número de células en sobrenadante (células ml^{-1}) obtenido durante los ensayos experimentales para definir los parámetros óptimos del proceso centrifugación, operación Downstream, a partir de los extractos de la microalga *Scenedesmus obliquus*.

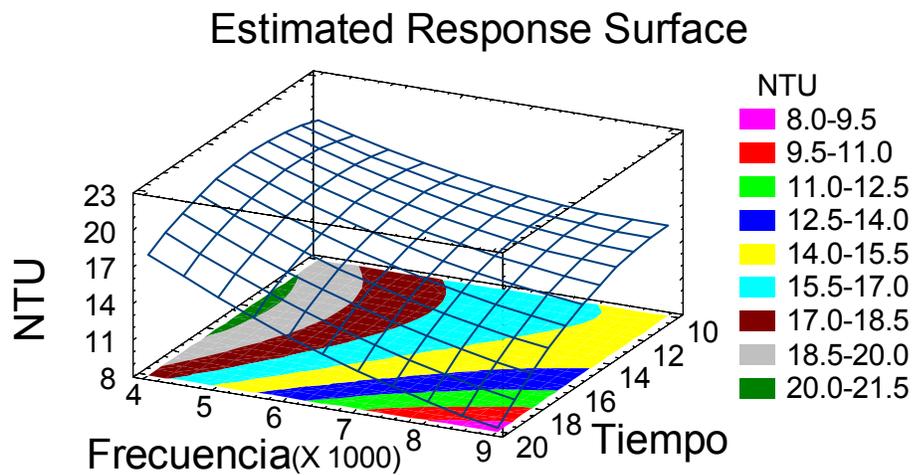


Figura 42. Superficie de respuesta para la VR Tórbidez (NTU) obtenido durante los ensayos experimentales para definir los parámetros óptimos del proceso centrifugación, operación Downstream, a partir de los extractos de la microalga *Scenedesmus obliquus*.

A partir de esto se definirá una respuesta óptima (ver anexo F) que se encontrará sobre los niveles máximos de las variables experimentales aunque teniendo consideración particular sobre una respuesta óptima que se puede ajustar acorde con los contornos de la superficie de respuesta elaboradas durante el análisis del diseño experimental.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el diseño experimental resultó evidente el efecto de los factores experimentales y sus distintas interacciones en la respuesta evaluada durante cada corrida. Estos cambios obtenidos ante estímulos ambientales, i.e. variaciones en niveles entre factores experimentales, pueden ser por tanto definidos sobre la base de la respuesta obtenida en las distintas corridas ante factores que podrían definirse como limitantes o estresantes para la célula.

Bajo este enfoque un factor limitante sería aquel que determinaría la tasa de cambio en el crecimiento de la microalga o en el desarrollo, favorable o desfavorable, de una reacción bioquímica específica. El estrés resultaría por tanto en un desbalance metabólico inducido en una célula o, en este caso microalga, por una condición ambiental que requiere un ajuste metabólico o bioquímico antes de que un nuevo estado estacionario de desarrollo pueda establecerse. Esta afirmación se representa de forma secuencial y para mayor claridad en la figura 43.



Figura 43. Mecanismo de respuesta ante estímulos medioambientales, factores de estrés o limitantes, de células u organismos vivos.

En los ensayos de estandarización la respuesta de las microalgas *S. obliquus* y *C. vulgaris* fue consistente en la respuesta obtenida más no en la proporción y magnitud del efecto de adaptación lo que permitió identificar con relativa claridad a *S. obliquus* por un rendimiento superior particularmente en la producción de EPS y biomasa, al presentar diferencias significativas estadísticamente para sus parámetros cinéticos (μ , K , T_2) y la concentración de carbohidratos (intra y extra celulares) y proteína, favorables a *Scenedesmus obliquus*.

Durante los ensayos de optimización la evidencia que respalda esta afirmación fue sólida, considerando los resultados de los diferentes estadísticos utilizados para la evaluación de las respuestas. La claridad sobre el efecto de las dos variables experimentales principales en los ensayos experimentales, i.e. fuente de energía y carbono, es concluyente acorde con los análisis y estadísticos considerados. Ya que se lograron incrementos en el valor de μ de hasta el 28% al comparar las mejores respuestas de los ensayos de estandarización contra los de optimización. En la fase de optimización se destaca que la diferencia entre máximos y mínimos para este parámetro fue cercana al 52%, evidenciando la preponderancia de las variables experimentales sobre las respuestas óptimas.

Sin embargo, es importante destacar a partir de un análisis comparativo de las respuestas que la producción de EPS y IAA se maximiza bajo condiciones ambientales diametralmente opuestas y que evidentemente obedece a adaptaciones disímiles ante efectos de estrés que condicionan el desarrollo de las células algales. En la figura 44 se muestra un consolidado de los resultados obtenidos para las biomoléculas objeto de estudio, ácido indol acético y exopolisacáridos, durante los ensayos experimentales de optimización y estandarización que evidencia como la producción de ambas biomoléculas se da bajo condiciones ambientales, niveles de los factores experimentales, diferentes si se observa que los niveles de mayor productividad de μ (d^{-1}) y EPS en M1 para la gráfica no se corresponden para IAA (montaje M1-1, en la figura 44).

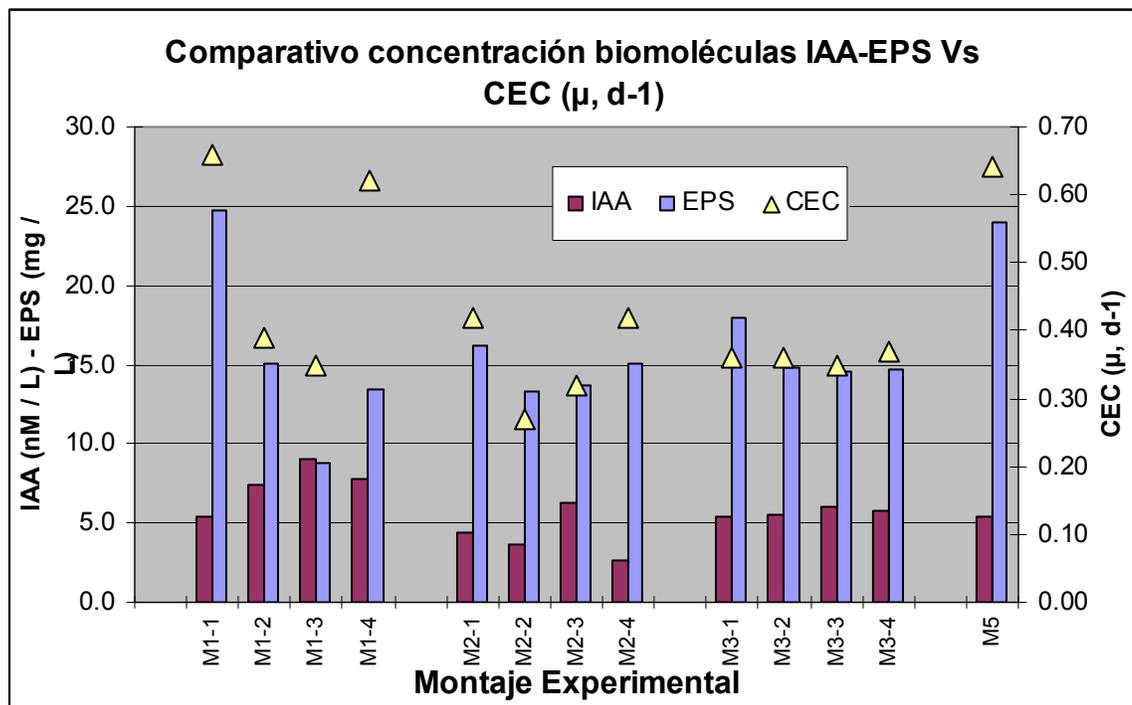


Figura 44. Consolidado comparativo de VR promotores de crecimiento (IAA, $nM L^{-1}$) y exopolisacáridos (EPS, $mg L^{-1}$) vs. coeficiente específico de crecimiento (μ, d^{-1}), obtenido durante los ensayos experimentales de optimización (M1-M3) y estandarización (M5) en la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Adicionalmente al observar la respuestas consolidadas para la validación en el cuadro 4 el montaje 1, que presenta los niveles máximos para las tres variables experimentales, presenta un rendimiento en IAA (nM L⁻¹) inferior en aproximadamente un 60% si se compara con la concentración de esta sustancia encontrada en el montaje 3 (máxima iluminación pero con supresión de carbono y agitación).

A partir de los factores del diseño o variables de proceso, la productividad en biomasa para cualquier sistema de producción dependerá del grado en el que las condiciones del cultivo se ajustan con los requerimientos de la especie bajo estudio, en los ensayos *Scenedesmus obliquus*, es decir la variación de una o más variables condicionará el nivel y el tipo de respuesta (productividad o concentración de un metabolito particular) que la microalga genere.

En nuestro caso considerando que estas condiciones óptimas para maximizar la producción de biomoléculas no son correspondientes para nuestro caso (niveles óptimos de IAA no son equivalentes a niveles óptimos de EPS y μ), se deberá suponer que la productividad está claramente determinada por el coeficiente específico de crecimiento, el cuál para una dinámica de flujo y temperatura relativamente definida, es una función del perfil de luz en el interior del reactor y del régimen de iluminación al que las células son sometidas, parámetros que se constituyen en la conclusión base de los resultados obtenidos.

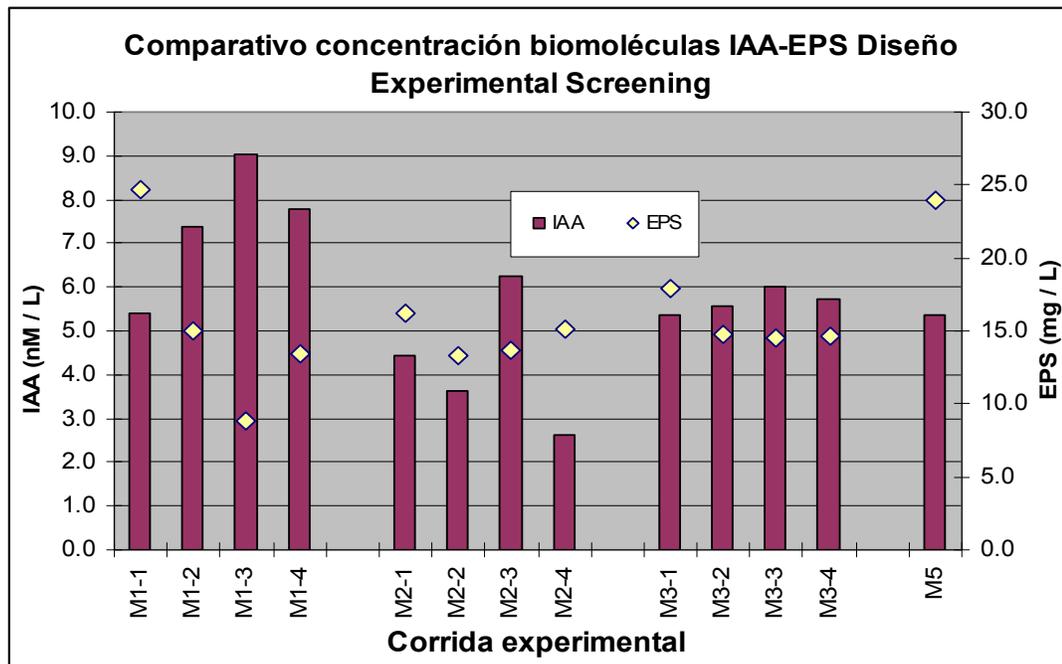


Figura 45. Coeficiente específico de crecimiento (μ , d⁻¹) en función de la concentración de biomoléculas, fitohormonas (IAA, nM L⁻¹) y exopolisacáridos (EPS, mg L⁻¹) obtenido durante los ensayos de optimización con la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Teniendo esto en consideración y, a partir de los resultados en las respuestas consideradas durante el diseño experimental de optimización que se muestran en la figura 45, las interacciones entre estas variables (I_a , R_f y C^*), tienen una incidencia altamente representativa en la productividad asociada a esta. Para efectos prácticos consideraremos por tanto que la cantidad de luz suministrada, la eficiencia en la distribución y por tanto la capacidad de fijación de carbono dependiente de esta eficiencia, se deberán tener como prioridad en el desarrollo de bioprocesos con organismos fotótrofos.

No obstante la alta representatividad de los factores en los ensayos, fueron sus interacciones las que evidenciaron de manera más clara durante el análisis aquellas condiciones ambientales del proceso que incidían de manera preferencial en el proceso de producción del sistema de cultivo. Teniendo en mente los elementos para el desarrollo de procesos descritos en la figura 46 se tiene un panorama más claro relacionado con los parámetros de procesos que podrán ser considerados como relevantes para el diseño y escalamiento de fotobioprocesos.

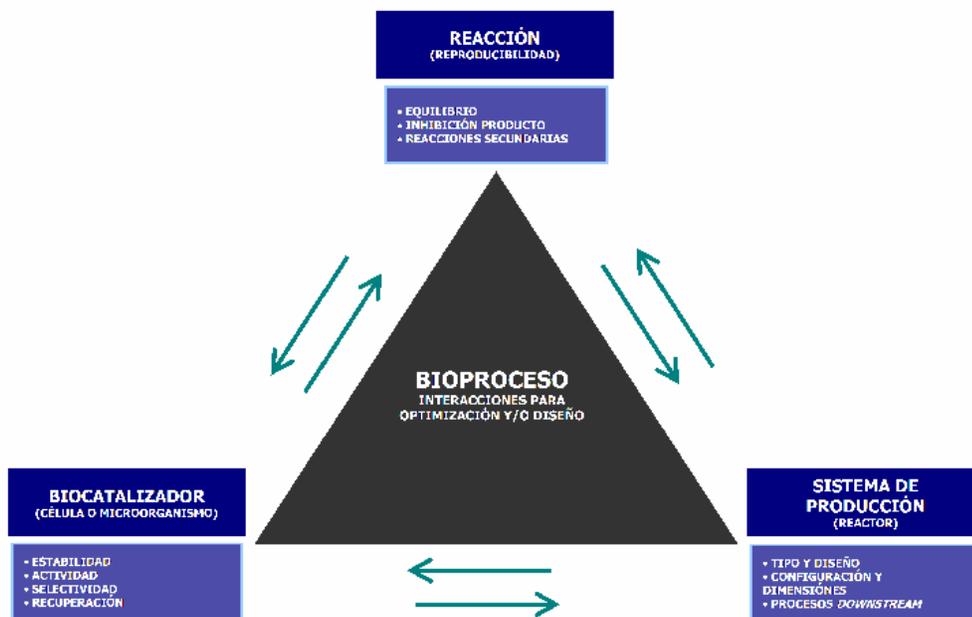


Figura 46. Elementos del desarrollo de procesos considerados para la obtención de los parámetros de proceso para el escalamiento de un fotobioproceso.

Las interacciones entre la microalga y el sistema de producción, enfocado en la obtención de un ambiente específico para el desarrollo de reacciones específicas, será por tanto el objetivo y orientación final del sistema de producción. Durante la fase de estandarización se seleccionó el *biocatalizador* a partir del análisis comparativo de dos especies de microalgas que finalmente favoreció a *S. obliquus*. En las fases de optimización y validación se profundizó en los factores de proceso que condicionarán la reacción fotobiológica y que determinarán las principales características del diseño de producción.

Los parámetros funcionarán por tanto como componentes del *envirome* que me determinarán condiciones de proceso específicas para maximizar la productividad y reproducibilidad del sistema. Acorde con los resultados encontrados se distinguen tres parámetros principales con interacciones específicas que generarán respuestas puntuales sobre la microalga del medio y que a su vez establecerán las condiciones de estabilidad del proceso. Sin embargo, se debe considerar con mucho cuidado la interacción de estos parámetros y sus variables, ya que dependiendo de los niveles en los que estas interactúen y del objetivo del sistema de producción, los parámetros deberán ajustarse de manera adecuada para maximizar el resultado final esperado.

Los parámetros y sus interacciones, representadas en la figura 47, tendrán como principal fenómeno a considerar la dinámica de flujo, que tal como quedó evidenciado se constituye en aspecto determinante del proceso debido a que el régimen de flujo ideal para la producción condiciona la disponibilidad de luz y esto a su vez repercutirá en el desarrollo de los procesos de fijación de carbono y síntesis de macromoléculas en la microalga. Los ciclos luz/oscuridad serán acorde con la interacción del régimen de flujo y el flujo luminoso, la principal interacción a considerar dentro del proceso ya que en función estos ciclos se establece la eficiencia del proceso en el aprovechamiento de una disponibilidad de luz/energía dada, que a su vez define criterios de diseño para el PBR que maximicen de forma constante en el equipo la distribución homogénea de la luz y por tanto la reproducibilidad de las reacciones.

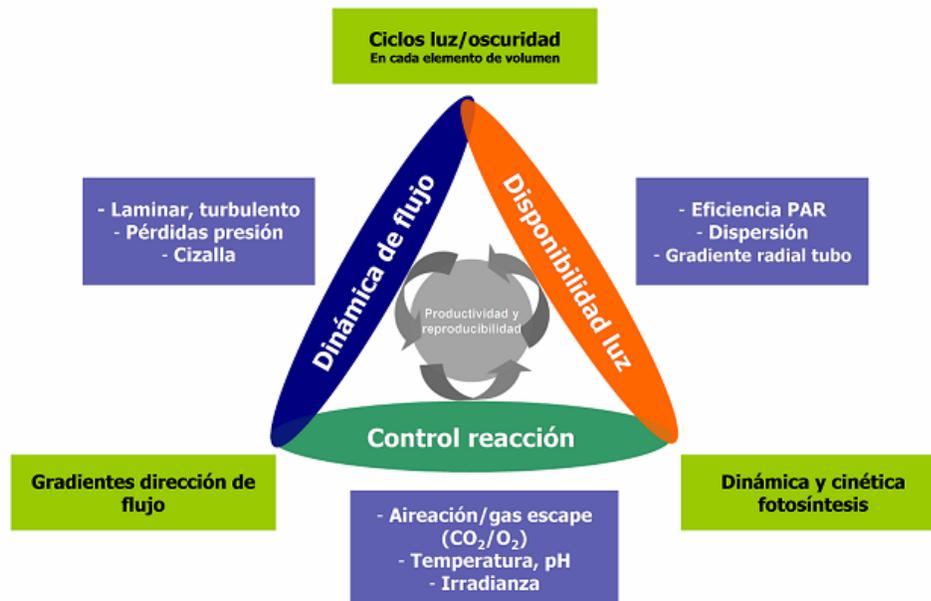


Figura 47. Parámetros de procesos y sus interacciones considerados como fundamentales durante el cultivo de organismos fotoautótrofos.

La entrada de gases, fuente de carbono del cultivo, será dentro del control de la reacción un aspecto vital a considerar y que para cualquier tipo o configuración del sistema de producción deberá presentarse como vital si se quiere lograr un aprovechamiento eficiente y eficaz de la fuente de energía/luz en el cultivo. Este gas de entrada deberá proveerse de manera preferencial en exceso a lo largo de cada elemento de volumen del

PBR buscando con esto el uso total de la luz disponible para su fijación en la biomasa algal.

Los parámetros considerados, acorde con las respuestas de validación en la sección 4.3 que respaldan su selección, se podrán agrupar para el escalamiento de fotobioprocesos en un conjunto de variables, i.e. operacionales, ambientales y de diseño (ver figura 48), que permitan el diseño, desarrollo y optimización de sistemas de producción a partir de microalgas u otros organismos fotosintéticos unicelulares con escalas ajustadas a las necesidades y limitaciones de desarrollo que sean correspondientes.

Básicamente se puede concluir que el éxito del sistema de producción y su escalamiento dependerá de la capacidad para maximizar la distribución de luz de manera homogénea dentro del PBR y de lograr regímenes de flujo adecuados a la intensidad luminosa media, irradianza o iluminancia, que impacta la superficie de las células. Por último se deberá tener los sistemas de control adecuados que permitan registrar y regular la concentración de gases de entrada y de salida que aseguren una reacción homogénea en el sistema.

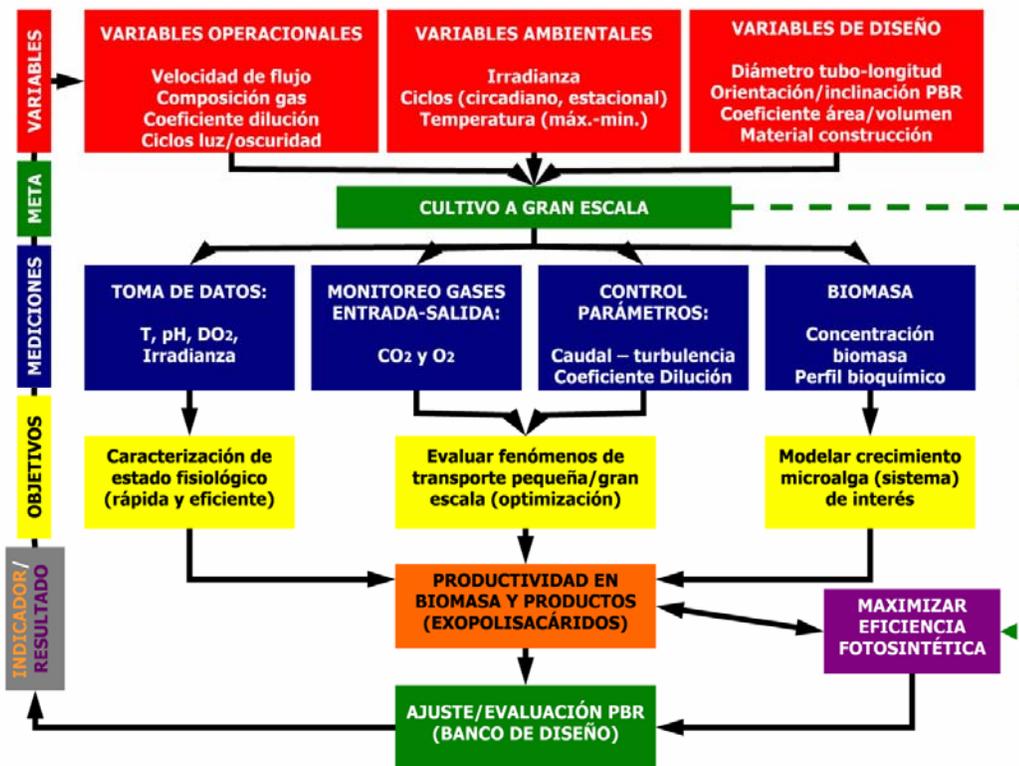


Figura 48. Variables de proceso a considerar en el diseño y desarrollo de sistemas de producción para organismos fotótrofos a escala industrial.

Adicional a estas variables se deberá considerar para los procesos *downstream* que la recuperación de sólidos o moléculas de medios de cultivo de microalgas exige, para

óptimos resultados, altos valores fuerza centrífuga relativa (RCF) con tiempos de retención en el rango medio y alto para extractos sin tratar. Considerando que el aumento del tamaño de partículas del extracto incrementará la eficiencia general del proceso el uso de floculantes o coagulantes en el proceso podrá ser una alternativa altamente viable para maximizar este proceso sin tener que recurrir a valores RCF excesivamente altos que pueden incrementar los costos de recuperación ostensiblemente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pimentel D, Harman R, Pacenza M, Pecarsky J, Pimentel M. Natural resources and an optimum human population. *Population and Environment*. (1994); 15 (5): 347-369
2. FAO Statistical División. Statistical data. *FAO Quarterly Bulletin of Statistics* (1992); 5: 1
3. Colombia. Departamento Nacional de Planeación. Plan 2019: Visión Colombia II Centenario. Bogotá: El Departamento; 2006
4. Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Apuesta Exportadora Agropecuaria 2006-2019. Bogotá: El Ministerio; 2006
5. Pimentel D, Harvey C, Resosudarmo P, Sinclair K, Kurz D, McNair M et al. Environmental Cost of soil erosion and conservation benefits. *Science* (1995); 267 (5201): 1117-1223
6. Barclay WR, Lewin RA. Microalgal polysaccharide production for the conditioning of agricultural soils. *Plant Soil* (1985); 88 (2): 159-169
7. Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM. Human domination of Earth's ecosystems. *Science* (1997); 277 (5323): 494-499
8. Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä, van der Putten W, Wall DH. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* (2004); 304 (5677): 1629-1633
9. McNeill JR, Winiwarter V. Breaking the sod: Humankind, history, and soil. *Science* (2004); 304 (5677): 1627-1629
10. McNeill JR. Something new under the sun: an environmental history of the 20th – century World. New York: Norton; 2000.
11. Barrow JC. Land Degradation. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.
12. Mann ChC. El futuro está en la tierra que yace a nuestros pies. *National Geographic en Español* (2008); 23 (3): 2-27
13. Sanchez PA, Buol SW. Soils of the tropics and the World food crisis. *Science* (1975); 188 (4188): 598-603
14. Larson WE, Pierce FJ, Dowdy RH. The treat of soil erosion to long-term crop production. *Science* (1983); 219 (4584): 458-465
15. Chaney K, Swift SR, The influence of organic matter on agrégate stability in some British soils. *Journal of Soil Science* (1984); 45 (): 273-283

16. Allison FE. Soil organic Matter and Its role in crop production. New York: Elsevier; 1973.
17. Grant WD, Long PE. Microbiología ambiental. Zaragoza: Acribia; 1989.
18. Pimentel D, Garnick E, Berkowitz A, Jacobson S, Napolitano S, Black P et al. Environmental quality and natural biota. *BioScience* (1980); 30: 750-755
19. Lewin RA. The use of algae as soil conditioners. *Centros Invest. Baja Calif. Scripps. Inst. Oceanogr*, 3 (1977), 33-35.
20. Foster RC. Polysaccharides in soil fabrics. *Science* (1981); 214 (4521): 665-667
21. Metting B. The systematics and ecology of soil algae. *The Botanical Review* (1981); 47 (2): 195-312
22. Mazor G, Kidron GJ, Vonshak A, Abeliovich A. The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbiol crusts. *FEMS Microb Ecol* (1996); 21: 121-130
23. Apte SK, Thomas J. Possible reclamation of coastal soil salinity using halotolerant nitrógeno-fixing cyanobacteria. *Planta and Soil* (1997); 189: 205-211
24. Kaushik BD, Venkataraman GS. Reclamative capacity of blue-green algae in saline and sodic soils. En: *Proceedings of the National Symposium on Biological Nitrogen Fixation*, Department of Atomic Energy. Bombay. p. 378-389
25. Ashraf M, Hasnain S, Berge O. Effecto of exo-polysaccharides producing bacterial inoculation on growth of roots of wheat (*Triticum aestivum*) plants grown in a salt-affected soil. *IJEST* (2006); 3: 43-51
26. Cohen Z. Products from microalgae. En: Richmond A, editor. *Handbook of microalgae mass culture*. Florida: CRC Press, 1986. p. 421-454
27. Ördög V, Stirk WA, Lenobel R, Bancírová M, Strnad M, van Staden J, Szigeti J, Németh L. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *Journal of Applied Phycology* (2004); 16 (4): 309-314
28. Roeselers G, van Loosdrecht MCM, Muyzer G. Phototrophic biofilms and their potencial applications. *Journal of Applied Phycology* (2008); 20 (3): 227-235
29. Borowitzka MA. Microalgae as sources of fine chemicals. *Current Microbiology* (1986); 3: 372-375
30. Bubrik P. Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Bioresource Technology* (1991); 38 (2-3): 237-239

31. Pulz O. Photobioreactors: production Systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2001); 57 (3): 287-293
32. Banerjee A, Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. *Botryococcus braunii*; a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology* (2002); 22: 245-279
33. Spolaore P, Joanniss-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2006); 101 (2): 87-96
34. Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcao VR, Tonon AP, Lopes NP et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology* (2007); C146 (1-2): 60-78
35. Dos Santos MD, Guarantini T, Lopes JLC, Colepicolo P, Lopes NP. Plant cell and microalgae culture. En: *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry* (2005). Research signpost, Kerala, India
36. Stirk WA, Ördög V, Van Staden J, Jäger K. Cytokinin- and auxina-like activity in Cyanophyta and microalgae. *Journal of Applied Phycology* (2002); 14 (3): 215-221
37. Augier, H. Les hormones des algues. Etat actuel des connaissances. VII-Applications, conclusión, bibliographie. *Bot. Mar.* 21: 175-197.
38. Buggeln RG. Morphogenesis and growth regulators. En: Lobban CS y Winne MJ, editors. *The biology of seaweeds*. Berkeley: University of California Press; 1981. p. 627-660
39. Jacobs WP. Are angiosperm hormones present in, and used as hormones by, algae? En: Bopp M, editor. *Plant growth substances 1983*. Berlín: Springer-Verlag; 1986. p. 249-256
40. Evans LV, Trewavas AJ. Is algal development controlled by plant growth substances? *Journal of Phycology* (1991); 27: 322-326
41. Bradley PM. Plant hormones do have a role in controlling growth and development of algae. *Journal of Phycology* (1991); 27: 317-321
42. Kefeli VI, Dashek WV. Non-hormonal stimulators and inhibitors of plant growth and development. *Biol. Rev.* (1984); 59: 273-288
43. Martínez Sancho M^aE, Jiménez Castillo JM, El Yousfi F. Photoautotrophic consumption of phosphorus by *Scenedesmus obliquus* in a continuous culture – Influence of light intensity. *Process Biochemistry* (1999); 34: 811-818
44. Sánchez JF, Fernández JM, Acién FG, Rueda A, Pérez-Parra J, Molina E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry* (2008); 43: 398-405

45. Stirk WA, Ördög V, van Staden J, Jäger K. Cytokinin-and-auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *Journal of Applied Phycology* (2002); 14: 215-221
46. Bailey D, Mazurak AP, Rosowski JR. Aggregation of soil particles by algae. *Journal of Phycology* (1973); 9: 99-101
47. Masojídek J, Koblížek M, Torzillo G. Photosynthesis in microalgae. En: Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, Oxford: Blackwell Science; 2004. p. 20-39
48. Tomaselli L. The microalgal cell. En: Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, Oxford: Blackwell Science; 2004. p. 3-19
49. Lombardi AT, Hidalgo MR, Vieira AAH. Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere* (2005); 60: 453-459
50. Becker EW. Biotechnology and exploitation of the green alga *Scenedesmus obliquus* in India. *Biomass* (1984); 4: 1-19
51. Ördög V, Stirk WA, Lenobel R, Bancírová M, Strnad M, van Staden J, Szigeti J, Németh L. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *Journal of Applied Phycology* (2004); 16 (4): 309-314
52. Roeselers G, van Loosdrecht MCM, Muyzer G. Phototrophic biofilms and their potencial applications. *Journal of Applied Phycology* (2008); 20 (3): 227-235
53. Mandal S, Mallick N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2009); 84 (2): 281-291
54. Burja AM, Banaigs B, Abou-Mansour E, Burgess JG, Wright PC. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. *Tetrahedron* (2001); 57: 9347-9377
55. Fogg GE. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. Madison: University of Wisconsin Press; 1966.
56. Grobbelaar JU. Availability to algae of N and P adsorbed on suspended solids in turbid waters of the Amazon River. *Arch. Hydrobiol* (1983); 96 (3): 302-316
57. Richmond A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. *Journal of Applied Phycology* (2000); 12: 441-451
58. Grobbelaar JU. Carbon flow in the pelagic zone of a shallow turbid impoundment, Wuras Dam. *Arch. Hydrobiol* (1985); 103 (1): 1-24

59. Grobbelaar JU. Algal nutrition: mineral nutrition. En: Richmond A, editor. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, Oxford: Blackwell Science; 2004. p. 97-115
60. Richmond A. Biological principles of mass cultivation. En: Richmond A, editor. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, Oxford: Blackwell Science; 2004. p. 125-177
61. Tredici MR. Mass production of microalgae: photobioreactors. En: Richmond A, editor. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, Oxford: Blackwell Science; 2004. p. 178-214
62. Janssen M, Janssen M, de Winter M, Tramper J, Mur LR, Snel J, Wijffels RH. Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light/dark cycles. Journal of Biotechnology (2000); 78: 123-137
63. Rosello Sastre R, Fleck-Schneider P, Posten C. Die function der polysaccharide der mickroalge *P. purpureum* in ihrer produktionskinetik. Chemie Ingenieur Technik (2006); 78 (9): 1393.
64. Yang Ch, Hua Q, Shimizu K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. Biochemical Engineering Journal (2000); 6: 87-102
65. Sánchez JF, Fernández JM, Ación FG, Rueda A, Pérez-Parra J, Molina E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. Process Biochemistry (2008); 43: 398-405
66. Greque de Moraes M, Viera Costa JA. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* in a three-stage serial tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology (2007); 129: 439-445
67. Vunjak-Novanovic G, Kim Y, Wu X, Berzin I, Merchuk JC. Air-lift bioreactors for algal growth on flue gas: mathematical modeling and pilot-plant studies. Ind. Eng. Chem. Res. (2005); 44: 6154-6163
68. Lidén G. Understanding the bioreactor. Bioprocess and Biosystems Engineering (2002); 24: 273-279
69. Muffler K, Ulber R. Downstream processing in marine biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (2005); 97: 63-103
70. Gudín C, Therpenier C. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. Adv Biotechnol Proc (1986); 6 (): 73-110
71. Wood AM, Everroad RC, Wingard LM. Measuring growth rates in microalgal cultures. En: Robert A. Andersen, editor. Algal Culturing Techniques. USA: Academic Press; 2005. p. 269 – 285.

72. STATGRAPHICS PLUS 5.0 [CD-ROM]. Copyright by statistical graphics coporation. Estados Unidos. 2000.
73. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building. New York: John Wiley & Sons; 1978. (Series in probability and mathematical statistics)
74. Sharma SK, Mulvaney SJ, Rizvi SSH. Food processing engineering: theory and laboratory experiments. New York: John Wiley & Sons; 1999.
75. Pruvost J, Cornet J-F, Legrand J. Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: an energetically consistent analysis. *Chemical Engineering Science* (2008); 63 (14): 3679-3694
76. Mohn FH. Experiencies and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgae. En: Sheler G. Soeder CJ, editors. *Algae biomass*. Amsterdam: Elsevier; 1980. p. 547-571.
77. Molina Grima E, Belarbi E-H, Acién Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process, options and economics. *Biotechnology Advances* (2003); 20 (7-8): 491-515
78. Hansman E. Pigment analysis. En: Stain JR, editor. *Hanbook of phycological methods, culture metods, and growth measurements*. Cambridge: Cambridge University Press, 1973. p. 359-368.
79. Acién Fernández FG, García Camacho F, Sánchez Pérez JA, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E. Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering* (1998); 58 (6): 605-616
80. Meijer EA, Wijffels RH. Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae. *Biotechnology Techniques* (1998); 12 (5): 353-358
81. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976); 72: 248-254
82. Gordon S, Weber R. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiology* (1950); 26: 192-195
83. Yemm EW, Willis JA. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Journal of Biochemistry* (1954); 57 (3): 508-514
84. Band CJ. Efecto de la composición bioquímica de micralgas sobre el valor nutritivo de dos cepas de Artemia. [Tesis de Maestría]. La Paz: Centro Interdisciplinario de Ciencias Nacional, Instituto Politécnico Nacional; 1999.

85. Lewin RA. Extracellular polysaccharides of green algae. *Canadian Journal of Microbiology* (1956); 2: 665-672
86. Moore BG, Tischer RG. Extracellular polysaccharides of algae: effects on life-support systems. *Science* (1964); 145 (3632): 586-587
87. Mazur H, Konop A, Synak R. Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. *Journal of Applied Phycology* (2001); 13 (1): 35-42
88. Wazer JR Van, Lyons JW, Kim KY, Colewell RE. *Viscosity and flow measurements: a laboratory handbook of rheology*. New York: John Wiley & Sons; 1963.
89. Doran PM. *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press; 1995.
90. Csögör Z, Herrenbauer M, Perner I, Schmidt K, Posten C. Design of a photo-bioreactor for modeling purposes. *Chemical Engineering and Processing* (1999); 38: 517-523
91. Tredici MR. Bioreactors, Photo. En: Flickinger MC, Drew SW, editors. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparations*. New York: John Wiley & Sons; 1999
92. Ación Fernández FG, García Camacho F, Sánchez Pérez JA, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E. A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnology and Bioengineering* (1997); 55 (5): 701-714
93. Burguess G, Fernández-Velasco JG, Lovegrove K. Materials, geometry, and net energy ratio of tubular photobioreactors for microalgal hydrogen production. En: *Memories of the 16th World Hydrogen Energy Congress*. Lyon, France 13-16 June. pp. 12.
94. Qiang H, Faiman D, Richmond AE. Optimal tilt angles of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors. *Journal of Fermentation and Bioengineering* (1998); 85 (2): 230-236
95. Osborne BA, Raven JA. Growth light level and photon absorption by cells of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae, Volvocales), *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae, Chlorococcales) and *Euglena viridis* (Euglenophyceae, Euglenales). *European Journal of Phycology* (1986); 21: 303-313
96. Molina Grima E, Fernández Sevilla JM, Sánchez Pérez JA, García Camacho F. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology* (1996); 45: 59-69
97. Janssen M, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering* (2003); 81 (2): 193-210

98. Pirt SJ. The thermodynamic efficiency (quantum demand) and dynamics of photosynthetic growth. *The New Phytologist* (1986); 102: 3-37
99. Bonardi V, Pesaresi P, Becker T, Wagner R, Pfannschmidt T, Jahns P, Leister D. Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature Letters* (2005); 437: 1179-1182
100. Renaud SM, Thinh L-V, Lambrinidis G, Parry DV. Effecto of temperatura on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* (2002); 211 (1-4): 195-214
101. Guil-Guerrero JL, Reboloso-Fuentes MM. Nutrient composition of *Chlorella* spp. And *Monodus subterraneus* cultured in a bubble column bioreactor. *Food Biotechnology* (2008); 22 (): 218-233
102. Tarackhovskaya ER, Maslov Yul, Shishova MF. Phytohormones in algae. *Russian Journal of Plant Physiology* (2007); 54 (2): 163-170
103. Ogbonna JC, Tanaka H. Light requirements and photosynthetic cell cultivation: development of process for efficient light utilization in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology* (2000); 12: 207-218
104. Roselers, 2008. Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: an energetically consistent analysis. *Chemical Engineering Science* (2008); 20: 3679-3694
105. Singh S, Arad S, Richmond A. Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp. in flat plate glass reactors. *Journal of Applied Phycology* (2000); 12: 269-275
106. Lee Y-K, Pirt SJ. Energetics of photosynthetic algal growth: influence of intermittent illumination in short (40 s) cycles. *Journal of General Microbiology* (1981); 124: 926-935
107. Wu X, Merchuk JC. A model integrating fluid dynamics in the photosynthesis and photoinhibition process. *Chemical Engineering Science* (2001); 56: 3527-3538
108. Merchuk JC, García-Camacho F, Molina-Grima E. Photobioreactor design and fluid dynamics. *Chemical and Biochemical Engineering* (2007); 21 (4): 354-355
109. Märkl et al. 1991, Bronnenmeier, Wittek B. The resistance of microorganism to hydrodynamic stress. *Int Chem Eng* (1991); 31: 185-197
110. Grobbelaar JU. Turbulence in mass algal cultures and the role of light/dark fluctuations. *Journal of Applied Phycology* (1994); 6: 331-335
111. Dayananda C, Sarada R, Usha Rani M, Shamala TR, Ravishankar GA. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass and Bioenergy* (2007); 31: 87-93

112. Reboloso Fuentes MM, García Sánchez JL, Fernández Sevilla JM, Acién Fernández FG, Sánchez Pérez JA, Molina Grima E. Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative análisis of the daily cyclic variation of culture parameters. *Journal of Biotechnology* (1999); 70 (): 271-288
113. Miller RL, Fredrickson AG, Brown AH, Tsuchiya HM. Hydromechanical method to increase efficiency of algal photosynthesis. *I&C Process Design and Development* (1964); 3 (2): 134-143
114. Bentley-Mowat JA. Do plant growth substances affect development and ecology of unicellular algae? *Wiss. Z. Univ. Rostock, math. Naturwiss* (1967). Reihe 16: 445-449
115. Mazur H, Konop A, Synak R. Indole-3-acetic acid in the culture médium of two axenic green microalgae. *Journal of Applied Phycology* (2001); 13: 35-42

ANEXOS

ANEXO A. Consolidado análisis estadísticos comparativos grupo de datos cinéticos fase estandarización entre las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*.

Analysis Summary

Sample 1: CEC Chlorella vulgaris (Cv)
 Sample 2: CEC Scenedesmus obliquus (So)

Sample 1: 3 values ranging from 0,29 to 0,35
 Sample 2: 3 values ranging from 0,47 to 0,5

Summary Statistics

	CEC Cv	CEC So
Count	3	3
Average	0,316667	0,483333
Median	0,31	0,48
Geometric mean	0,315701	0,483173
Variance	0,000933333	0,000233333
Standard deviation	0,0305505	0,0152753
Standard error	0,0176383	0,00881917
Minimum	0,29	0,47
Maximum	0,35	0,5
Range	0,06	0,03
Lower quartile	0,29	0,47
Upper quartile	0,35	0,5
Interquartile range	0,06	0,03
Skewness	0,93522	0,93522
Stnd. skewness	0,6613	0,6613
Coeff. of variation	9,64753%	3,1604%
Sum	0,95	1,45

Comparison of Means

95,0% confidence interval for mean of CEC Cv: 0,316667 +/- 0,0758917
[0,240775,0,392558]

95,0% confidence interval for mean of CEC So: 0,483333 +/- 0,0379458
[0,445388,0,521279]

95,0% confidence interval for the difference between the means
assuming equal variances: -0,166667 +/- 0,0547524 [-0,221419,-0,111914]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances: t = -8,45154 P-value = 0,00107379

Comparison of Standard Deviations

	CEC Cv	CEC So
Standard deviation	0,0305505	0,0152753
Variance	0,000933333	0,000233333
Df	2	2

Ratio of Variances = 4,0

95,0% Confidence Intervals

Standard deviation of CEC Cv: [0,0159064,0,192002]

Standard deviation of CEC So: [0,00795319,0,0960009]

Ratio of Variances: [0,102564,156,0]

F-test to Compare Standard Deviations

Null hypothesis: sigma1 = sigma2

Alt. hypothesis: sigma1 NE sigma2

F = 4,0 P-value = 0,4

Kolmogorov-Smirnov Test

Estimated overall statistic DN = 1,0

Two-sided large sample K-S statistic = 1,22474

Approximate P value = 0,0995803

ANEXO B. Consolidado análisis comparativos grupo de datos concentración de biomoléculas fase de estandarización entre las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*.

Auxinas en biomasa

Analysis Summary

Sample 1: Auxinas Chlorella vulgaris Biomasa (Aux Cv B)
 Sample 2: Auxinas Scenedesmus obliquus Biomasa (Aux So B)

Sample 1: 3 values ranging from 5,0 to 11,2
 Sample 2: 3 values ranging from 6,2 to 11,8

Summary Statistics

	Aux Cv B	Aux So B
Count	3	3
Average	8,73333	9,66667
Variance	10,8133	9,17333
Standard deviation	3,28836	3,02875
Minimum	5,0	6,2
Maximum	11,2	11,8
Range	6,2	5,6
Std. skewness	-1,04383	-1,12932

Comparison of Means

95,0% confidence interval for mean of Aux Cv B: 8,73333 +/- 8,16875
 [0,564586,16,9021]

95,0% confidence interval for mean of Aux So B: 9,66667 +/- 7,52383 [2,14283,17,1905]

95,0% confidence interval for the difference between the means
 assuming equal variances: -0,933333 +/- 7,16638 [-8,09972,6,23305]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances: t = -0,361599 P-value = 0,735943

Comparison of Standard Deviations

	Aux Cv B	Aux So B
Standard deviation	3,28836	3,02875
Variance	10,8133	9,17333
Df	2	2

Ratio of Variances = 1,17878

95,0% Confidence Intervals

Standard deviation of Aux Cv B: [1,71211,20,6665]

Standard deviation of Aux So B: [1,57694,19,0349]

Ratio of Variances: [0,0302251,45,9724]

F-test to Compare Standard Deviations

Null hypothesis: $\sigma_1 = \sigma_2$

Alt. hypothesis: $\sigma_1 \neq \sigma_2$

F = 1,17878 P-value = 0,917945

Kolmogorov-Smirnov Test

Estimated overall statistic DN = 0,333333

Two-sided large sample K-S statistic = 0,408248

Approximate P value = 0,996255

Auxinas en sobrenadante

Analysis Summary

Sample 1: Auxinas Chlorella vulgaris Sobrenadante (Aux Cv S)

Sample 2: Auxinas Scenedesmus obliquus Sobrenadante (Aux So S)

Sample 1: 3 values ranging from 2,5 to 3,3

Sample 2: 3 values ranging from 3,5 to 5,2

Summary Statistics

	Aux Cv S	Aux So S
Count	3	3
Average	3,0	4,4
Variance	0,19	0,73
Standard deviation	0,43589	0,8544
Minimum	2,5	3,5
Maximum	3,3	5,2
Range	0,8	1,7
Std. skewness	-1,15263	-0,367321

Comparison of Means

95,0% confidence interval for mean of Aux Cv S: 3,0 +/- 1,08281 [1,91719,4,08281]
95,0% confidence interval for mean of Aux So S: 4,4 +/- 2,12245 [2,27755,6,52245]
95,0% confidence interval for the difference between the means
assuming equal variances: -1,4 +/- 1,53753 [-2,93753,0,13753]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances: t = -2,5281 P-value = 0,0647945

Comparison of Standard Deviations

	Aux Cv S	Aux So S
Standard deviation	0,43589	0,8544
Variance	0,19	0,73
Df	2	2

Ratio of Variances = 0,260274

95,0% Confidence Intervals

Standard deviation of Aux Cv S: [0,22695,2,73945]

Standard deviation of Aux So S: [0,444851,5,36968]

Ratio of Variances: [0,00667369,10,1507]

F-test to Compare Standard Deviations

Null hypothesis: $\sigma_1 = \sigma_2$
Alt. hypothesis: $\sigma_1 \neq \sigma_2$
F = 0,260274 P-value = 0,413043

Kolmogorov-Smirnov Test

Estimated overall statistic DN = 1,0
Two-sided large sample K-S statistic = 1,22474
Approximate P value = 0,0995803

Proteina en biomasa

Analysis Summary

Sample 1: Proteina Chlorela vulgaris Biomasa (Prot Cv B)
Sample 2: Proteina Scenedesmus obliquus Biomasa (Prot So B)

Sample 1: 3 values ranging from 10,2 to 12,6
Sample 2: 3 values ranging from 19,2 to 20,7

Summary Statistics

	Prot Cv B	Prot So B
Count	3	3
Average	11,6667	19,8667
Variance	1,65333	0,583333
Standard deviation	1,28582	0,763763
Minimum	10,2	19,2
Maximum	12,6	20,7
Range	2,4	1,5
Std. skewness	-1,09276	0,6613

Comparison of Means

95,0% confidence interval for mean of Prot Cv B: 11,6667 +/- 3,19415 [8,47251,14,8608]
95,0% confidence interval for mean of Prot So B: 19,8667 +/- 1,89729 [17,9694,21,764]
95,0% confidence interval for the difference between the means
assuming equal variances: -8,2 +/- 2,39734 [-10,5973,-5,80266]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2
Alt. hypothesis: mean1 NE mean2
assuming equal variances: t = -9,49672 P-value = 0,000686137

Comparison of Standard Deviations

	Prot Cv B	Prot So B
Standard deviation	1,28582	0,763763
Variance	1,65333	0,583333
Df	2	2

Ratio of Variances = 2,83429

95,0% Confidence Intervals
Standard deviation of Prot Cv B: [0,669473,8,08104]
Standard deviation of Prot So B: [0,397659,4,80005]
Ratio of Variances: [0,072674,110,537]

F-test to Compare Standard Deviations

Null hypothesis: sigma1 = sigma2
Alt. hypothesis: sigma1 NE sigma2
F = 2,83429 P-value = 0,52161

Kolmogorov-Smirnov Test

Estimated overall statistic DN = 1,0
Two-sided large sample K-S statistic = 1,22474
Approximate P value = 0,0995803

ANEXO C. Estadísticos y tablas complementarias diseño experimental de optimización

VR Exopolisacáridos

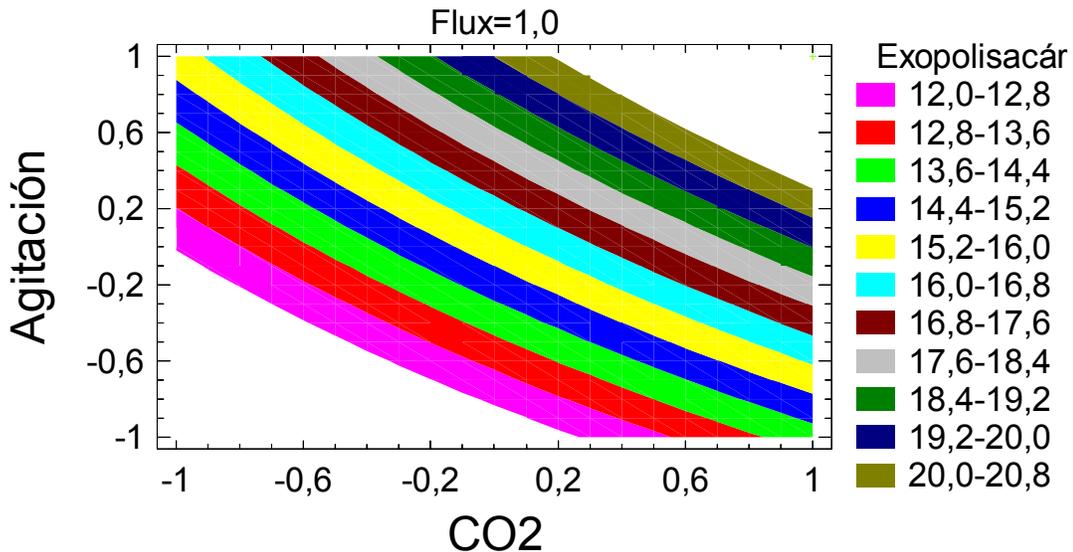
Estimation Results for Exopolisacáridos

Row	Observed Value	Fitted Value	Lower 95,0% CL for Mean	Upper 95,0% CL for Mean
1	24,7	24,4058	21,0228	27,7889
2	15,05	15,6333	12,2503	19,0164
3	8,8	8,50583	5,12277	11,8889
4	16,17	16,7533	13,3703	20,1364
5	13,3	13,0058	9,62277	16,3889
6	17,96	15,1733	14,1035	16,2432
7	13,44	14,0233	10,6403	17,4064
8	13,7	14,2833	10,9003	17,6664
9	15,07	14,7758	11,3928	18,1589
10	14,76	15,1733	14,1035	16,2432
11	14,5	15,1733	14,1035	16,2432
12	14,63	15,1733	14,1035	16,2432

Average of 4 centerpoints = 15,4625

Average of model predictions at center = 15,1733

Contours of Estimated Response Surface



Path of Steepest Ascent for Exopolisacáridos

Flux	CO2	Predicted	
		Agitación	Exopolisacáridos
0,0	0,0	0,0	15,1733
1,0	1,36123	1,44725	28,4436
2,0	2,21452	2,45866	47,1639
3,0	3,00629	3,43084	72,7025
4,0	3,77153	4,38837	105,078
5,0	4,52214	5,33873	144,284

VR Coeficiente Específico de Crecimiento

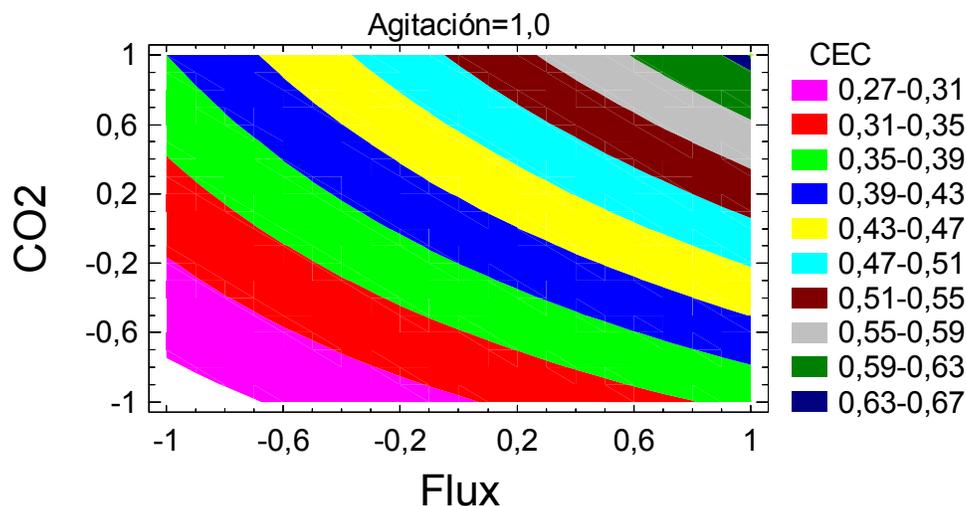
Estimation Results for CEC

Row	Observed Value	Fitted Value	Lower 95,0% CL for Mean	Upper 95,0% CL for Mean
1	0,66	0,6425	0,518107	0,766893
2	0,39	0,36	0,235607	0,484393
3	0,35	0,3325	0,208107	0,456893
4	0,42	0,39	0,265607	0,514393
5	0,27	0,2525	0,128107	0,376893
6	0,36	0,4075	0,368164	0,446836
7	0,62	0,59	0,465607	0,714393
8	0,32	0,29	0,165607	0,414393
9	0,42	0,4025	0,278107	0,526893
10	0,36	0,4075	0,368164	0,446836
11	0,35	0,4075	0,368164	0,446836
12	0,37	0,4075	0,368164	0,446836

Average of 4 centerpoints = 0,36

Average of model predictions at center = 0,4075

Contours of Estimated Response Surface



Path of Steepest Ascent for CEC

Flux	CO2	Predicted Agitación CEC	
0,0	0,0	0,0	0,4075
1,0	1,21691	0,15063	0,649691
2,0	2,30809	0,421757	0,971634
3,0	3,34817	0,753684	1,37884
4,0	4,36093	1,12287	1,87328
5,0	5,35689	1,51732	2,45595

VR Coeficiente Específico de Crecimiento

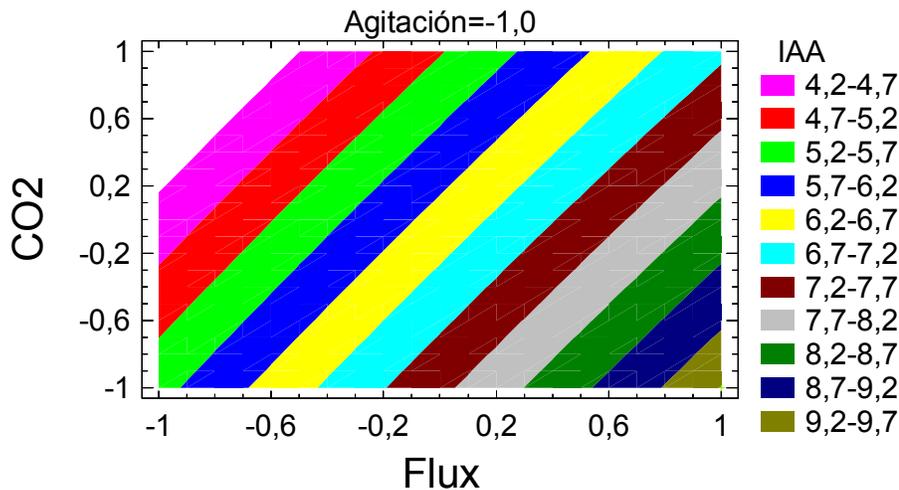
Estimation Results for IAA

Row	Observed Value	Fitted Value	Lower 95,0% CL for Mean	Upper 95,0% CL for Mean
1	5,418	6,00875	4,02629	7,99121
2	7,392	6,7	4,71754	8,68246
3	9,046	9,63675	7,65429	11,6192
4	4,423	3,731	1,74854	5,71346
5	3,615	4,20575	2,22329	6,18821
6	5,369	5,7695	5,14259	6,39641
7	7,794	7,102	5,11954	9,08446
8	6,237	5,545	3,56254	7,52746
9	2,636	3,22675	1,24429	5,20921
10	5,567	5,7695	5,14259	6,39641
11	5,734	5,7695	5,14259	6,39641
12	6,003	5,7695	5,14259	6,39641

Average of 4 centerpoints = 5,66825

Average of model predictions at center = 5,7695

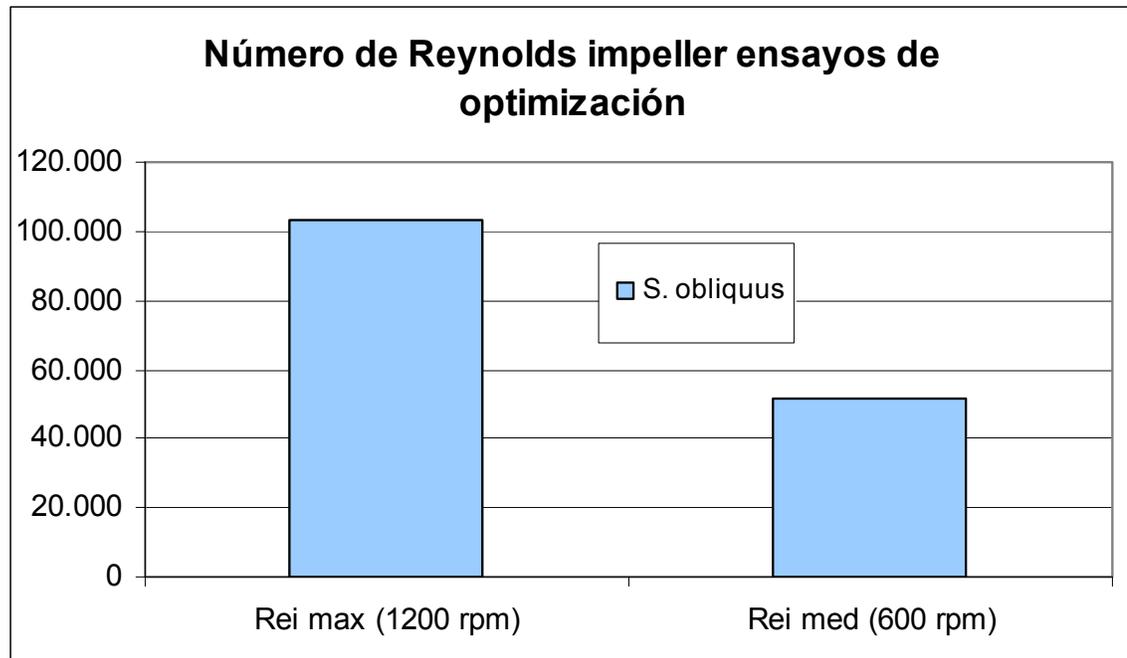
Contours of Estimated Response Surface



Path of Steepest Ascent for IAA

Flux	CO2	Predicted	
		Agitación	IAA
0,0	0,0	0,0	5,7695
1,0	-0,519373	-0,531622	8,44361
2,0	-1,1415	-1,31687	12,4821
3,0	-1,85499	-2,2731	18,2926
4,0	-2,64079	-3,34277	26,1389
5,0	-3,48192	-4,48939	36,1925

ANEXO D. Números de Reynolds impulsor (Re_i) calculados para los montajes de optimización en función de la velocidad de agitación.



ANEXO E. Estadísticos complementarios análisis diseños experimentales de validación.

Summary Statistics

	CEC	EPS	IAA
Count	3	3	3
Average	0,646667	21,5033	5,26167
Variance	0,0000333333	5,84693	0,33302
Standard deviation	0,0057735	2,41804	0,577079
Minimum	0,64	19,37	4,641
Maximum	0,65	24,13	5,782
Range	0,01	4,76	1,141
Std. skewness	-1,22474	0,622171	-0,536509

95,0 percent confidence intervals

	Mean	Std. error	Lower limit	Upper limit
CEC	0,646667	0,00333333	0,632324	0,661009
EPS	21,5033	1,39606	15,4966	27,5101
IAA	5,26167	0,333177	3,82812	6,69521

	Sigma	Lower limit	Upper limit
CEC	0,0057735	0,00300602	0,0362849
EPS	2,41804	1,25897	15,1968
IAA	0,577079	0,300461	3,62679

ANEXO F. Descripción y análisis estadísticos complementarios diseño experimental de centrifugación.

VR NTU Extracto

Analysis of Variance for NTU extracto

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Tiempo	55,9008	1	55,9008	33,42	0,0000
B:Frecuencia	138,72	1	138,72	82,92	0,0000
AA	18,6252	1	18,6252	11,13	0,0039
AB	15,4012	1	15,4012	9,21	0,0075
BB	5,95021	1	5,95021	3,56	0,0765
blocks	0,24	1	0,24	0,14	0,7096
Total error	28,4394	17	1,6729		
Total (corr.)	258,453	23			

R-squared = 88,9963 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 85,9397 percent
Standard Error of Est. = 1,29341
Mean absolute error = 0,837847
Durbin-Watson statistic = 1,13035 (P=0,0083)

Path of Steepest Ascent for NTU extracto

Tiempo (min)	Predicted	
	Frecuencia (rpm)	NTU extracto
15,0	6500,0	16,0396
16,0	7111,18	14,6972
17,0	7529,64	13,4275
18,0	7858,11	12,0843
19,0	8134,6	10,6196
20,0	8377,47	9,01285

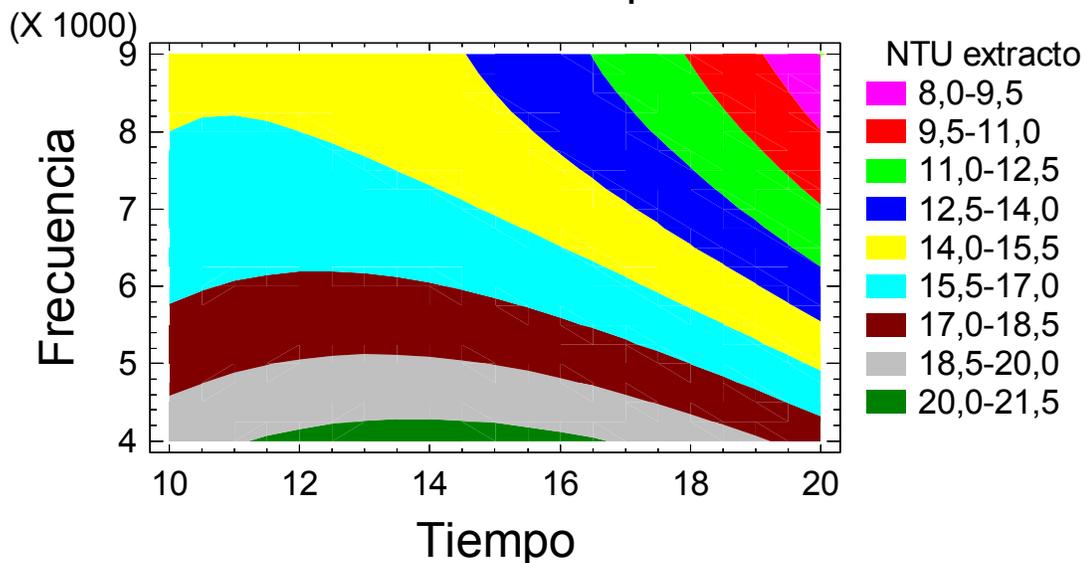
Optimize Response

Goal: minimize NTU extracto

Optimum value = 8,28125

Factor	Low	High	Optimum
Tiempo	10,0	20,0	20,0
Frecuencia	4000,0	9000,0	9000,0

Contours of Estimated Response Surface



Regression coeffs. for NTU extracto

constant = 10,8536
A:Tiempo = 2,53233
B:Frecuencia = -0,001892
AA = -0,07475
AB = -0,000111
BB = 1,69E-7

The equation of the fitted model is

$$\text{NTU extracto} = 10,8536 + 2,53233 \cdot \text{Tiempo} - 0,001892 \cdot \text{Frecuencia} - 0,07475 \cdot \text{Tiempo}^2 - 0,000111 \cdot \text{Tiempo} \cdot \text{Frecuencia} + 1,69\text{E-}7 \cdot \text{Frecuencia}^2$$

VR Células Extracto

Analysis of Variance for Células extracto

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Tiempo	6,87053E12	1	6,87053E12	90,78	0,0000
B:Frecuencia	6,9312E12	1	6,9312E12	91,58	0,0000
AA	1,76333E12	1	1,76333E12	23,30	0,0002
AB	1,1552E12	1	1,1552E12	15,26	0,0011
BB	4,64133E11	1	4,64133E11	6,13	0,0241
blocks	5,04167E8	1	5,04167E8	0,01	0,9359
Total error	1,28661E12	17	7,56831E10		
Total (corr.)	1,80715E13	23			

R-squared = 92,8804 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 90,9028 percent

Standard Error of Est. = 275106,0

Mean absolute error = 183785,0

Durbin-Watson statistic = 1,46121 (P=0,0627)

Lag 1 residual autocorrelation = 0,268006

Path of Steepest Ascent for Células extracto

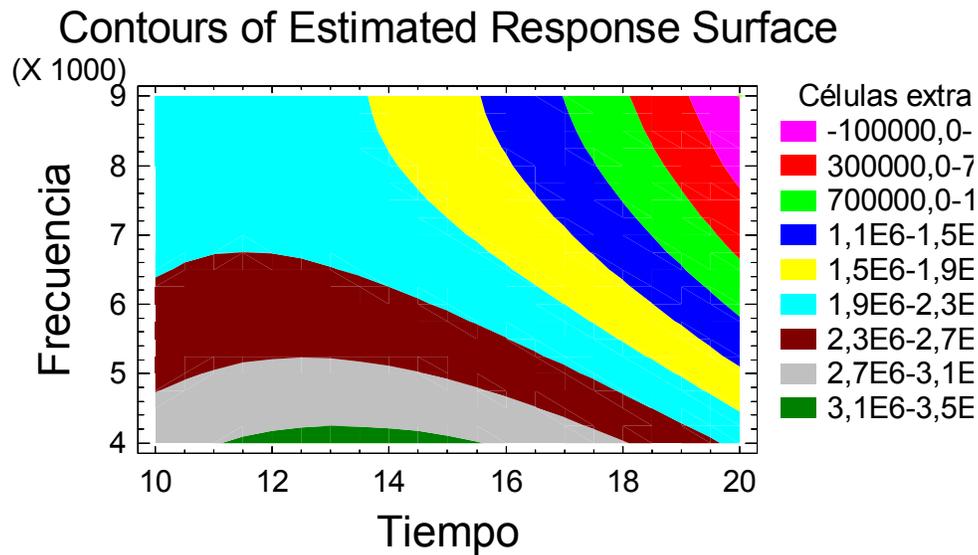
	Predicted	
Tiempo (min)	Frecuencia (rpm)	Células extracto
15,0	6500,0	2,1E6
16,0	6915,54	1,79486E6
17,0	7226,17	1,46532E6
18,0	7481,54	1,09657E6
19,0	7703,09	682949,0
20,0	7902,01	221793,0

Optimize Response

Goal: minimize Células extracto

Optimum value = -76666,7

Factor	Low	High	Optimum
Tiempo	10,0	20,0	20,0
Frecuencia	4000,0	9000,0	9000,0



Regression coeffs. for Células extracto

constant = 201200,0
A:Tiempo = 736267,0
B:Frecuencia = -461,6
AA = -23000,0
AB = -30,4
BB = 0,0472

The StatAdvisor

The equation of the fitted model is

Células extracto = 201200,0 + 736267,0*Tiempo - 461,6*Frecuencia - 23000,0*Tiempo^2 - 30,4*Tiempo*Frecuencia + 0,0472*Frecuencia^2