



**SEP**

SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

“2019 Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“DETERMINACIÓN DE PERFIL DE AMINOÁCIDOS Y  
FITOQUÍMICOS DE *Spirulina platensis* USANDO  
SUERO LÁCTEO COMO FUENTE DE CARBONO”.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS  
EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

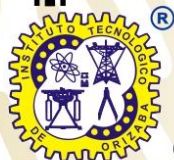
*I.Q. Celic Herrera Peralta*

DIRECTOR DE TESIS:

*Dr. Denis Cantú Lozano*

CODIRECTOR DE TESIS:

*Dra. Ilce Gabriela Medina Meza*



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

MARZO 2019



**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

FECHA : 23/01/2019

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

**C. DR. RUBEN POSADA GOMEZ**  
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACION.  
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C. :

**CELIC HERRERA PERALTA**

la cual lleva el título de:

**"DETERMINACION DE PERFIL DE AMINOACIDOS Y FITOQUIMICOS DE SPIRULINA PLATENSIS USANDO SUERO LACTEO COMO FUENTE DE CARBONO".**

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : DR. DENIS CANTU LOZANO

SECRETARIO : DRA. ILCE GABRIELA MEDINA MEZA

VOCAL : DRA. GUADALUPE LUNA SOLANO

VOCAL SUP. : M.I. ADRIAN REYES BENITEZ

*(Handwritten signatures and marks)*  
\_\_\_\_\_  
FIRMA  
\_\_\_\_\_  
FIRMA  
\_\_\_\_\_  
FIRMA  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

EGRESADO (A) DE LA MAESTRIA EN **CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA**

OPCION: I- **Tesis**



Avenida Oriente 9 Núm. 852, Colonia Emiliano Zapata, C.P. 94320 Orizaba, Veracruz, México

Tel. 01 (272) 7 24 40 96, Fax. 01 (272) 7 25 17 28 e-mail: orizaba@itorizaba.edu.mx

www.orizaba.tecnm.mx



Al Gran Arquitecto de Universo, a las diferentes formas y circunstancias en las que se ha manifestado en mi camino hasta este momento.

## RECONOCIMIENTOS

Mediante estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas e instituciones que con su apoyo y colaboración hicieron posible la realización de este proyecto.

El presente trabajo fue realizado en el Instituto Tecnológico de Orizaba en conjunto con la Michigan State University bajo la supervisión académica del Doctor Denis Cantú Lozano y la Doctora Ilce Gabriela Medina Meza, a quienes expreso mi más profunda gratitud por brindarme la oportunidad de trabajar y desarrollar esta tesis. Gracias a su apoyo, su dedicación, sus sugerencias y acertada orientación que permitieron que este trabajo llegara a buen término.

Quiero agradecer también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por el apoyo económico brindado mediante la Beca Nacional con número de apoyo 452029 y la Beca Mixta que hicieron posible la realización de una estancia en el extranjero.

Agradezco a demás a todos los profesores que tomaron parte en mi formación académica durante la maestría y al equipo de trabajo tanto en el Laboratorio de Procesos Químicos en el Instituto Tecnológico de Orizaba como del Food and Health Engineering Lab en Michigan State University, en especial a la estudiante de doctorado Lisaura Maldonado Pereira por su incondicional ayuda en los ensayos y uso de equipo de laboratorio y a B.S. Kathryn Wierenga por la asistencia brindada en diversos ensayos del laboratorio.

## **RESUMEN**

**Elaborada por: Ing. Celic Herrera Peralta**

**Dirigida por: Dr. Denis Cantú Lozano**

**Dra. Ilce Gabriela Medina Meza**

En el presente proyecto se realizó un análisis de la composición de aminoácidos, proteína, cenizas, producción de biomasa, clorofila a y b, carotenoides, actividad antioxidante, flavonoles, contenido fenólico total, lípidos y ácidos grasos de la cianobacteria *Spirulina platensis* cultivada con diferentes concentraciones de suero lácteo añadido a su medio de cultivo a modo de enriquecimiento. Obteniendo una mayor producción de biomasa en el experimento que con una concentración de 3% de suero de leche en el medio de cultivo. Algunos de los componentes analizados se vieron favorecidos por la adición del suero lácteo como el caso de las proteínas en donde dos de las diferentes concentraciones muestran un aumento en la concentración de proteínas totales. En esta tesis se discute que posibles beneficios se pueden obtener en la composición de la *Spirulina platensis* al usar estas condiciones de cultivo.

## **ABSTRACT**

**By: Ing. Celic Herrera Peralta**

**Advisor(s): Dr. Denis Cantú Lozano**

**Dr. Ilce Gabriela Medina Meza**

In the present project an analysis of the composition of amino acids, protein, ash, biomass production, chlorophyll a and b, carotenoids, antioxidant activity, flavonols, phenolic content, lipids and fatty acids of the cyanobacterium *Spirulina platensis* cultivated with different concentrations of whey added to its culture medium was made. Obtaining a greater production of biomass in the experiment with a concentration of 3% of whey in the culture medium. Some of the components analyzed were favored by the addition of milk whey as in the case of proteins where two of the different concentrations show an increase in the concentration of total proteins. In this thesis, it is discussed that possible benefits can be obtained in the composition of *Spirulina platensis* when using these culture conditions.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS.....	XI
NOMENCLATURA.....	XII
INTRODUCCIÓN .....	1
FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	3
1.1 Microalga .....	4
1.1.1 Cianobacterias .....	5
1.1.2 Taxonomía de las cianobacterias .....	5
1.2 <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> .....	5
1.2.1 Morfología del género <i>Arthrospira</i> y <i>Spirulina</i> .....	7
1.2.2 Historia de la taxonomía de los géneros <i>Arthrospira</i> y <i>Spirulina</i> .....	7
1.2.3 Usos históricos de <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> .....	9
1.2.4 Redescubrimiento de la <i>Spirulina</i> .....	9
1.2.5 Composición bioquímica .....	10
1.2.6 Producción natural de <i>Spirulina</i> .....	13
1.2.7 Cultivo de laboratorio.....	14
1.2.8 Producción comercial a pequeña escala .....	15
1.2.9 Cultivo comercial y en masa .....	15
1.2.10 Variables involucradas en la producción .....	16
1.2.11 Ejemplos de producción alrededor del mundo .....	20
1.2.12 Producción de <i>Spirulina</i> en nutrientes orgánicos, incluyendo efluentes residuales.....	21
1.3 Productos, usos y beneficios de la <i>Spirulina</i> .....	23
1.3.1 Producción de bioenergéticos .....	23
1.3.2 Tratamiento de residuos y mejoramiento ambiental. ....	24
1.3.3 Posible uso como complemento nutricional en emergencias humanitarias .....	26
1.3.4 Posibles efectos sobre la salud .....	26
1.4 Suero lácteo .....	30
1.4.1 Clasificación de tipos de suero de leche.....	32
1.4.2 Composición del suero de leche.....	32
1.4.3 Panorama de la leche en México.....	32

1.5 Aminoácidos .....	35
1.6 Fitoquímicos .....	36
1.6.1 Compuestos fenólicos .....	37
MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
2.1 Material biológico y condiciones de crecimiento inicial.....	41
2.2 Condiciones de crecimiento en el reactor .....	42
2.3 Análisis.....	44
2.3.1 pH .....	45
2.3.2 Crecimiento de biomasa.....	45
2.3.3 Determinación de contenido total de proteínas .....	45
2.3.4 Determinación de cenizas totales .....	46
2.3.5 Determinación del perfil de aminoácidos .....	46
2.3.6 Cuantificación de clorofila y carotenoides .....	47
2.3.7 Extracto en metanol de <i>Spirulina platensis</i> .....	47
2.3.8 Determinación de la cantidad antioxidante .....	47
2.3.9 Determinación del poder de reducción antioxidante del ion férrico (FRAP) .....	48
2.3.10 Determinación del contenido fenólico total .....	48
2.3.11 Determinación del contenido de flavonoles .....	49
2.3.12 Determinación del contenido total de lípidos.....	49
2.3.13 Determinación del contenido de ácidos grasos .....	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	51
3.1 Crecimiento de biomasa y cambio de pH.....	52
3.2 Contenido total de proteína .....	54
3.3 Contenido total de cenizas .....	55
3.4 Perfil de aminoácidos .....	56
3.5 Perfil de fitoquímicos.....	58
3.5.1 Clorofila y carotenoides.....	58
3.5.2 Contenido de antioxidantes totales y del poder de reducción antioxidante del ión férrico (FRAP) y poder de reducción antioxidante 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) .....	61
3.5.3 Contenido fenólico total.....	63
3.5.4 Contenido total de flavonoles .....	65
3.6 Contenido total de lípidos .....	65



3.6.1 Contenido de ácidos grasos.....	66
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pag.</b>
<b>1.1</b>	<i>Spirulina</i> ( <i>Arthrospira platensis</i> y <i>Arthrospira maxima</i> ). Fuente: Small (2011), citado por Wan et al. (2016).	6
<b>1.2</b>	Participación en la producción nacional de queso por tipo (enero-mayo 2017 <sup>p</sup> ) p: cifras preeliminares, fuente SIAP	34
<b>1.3</b>	Distribución de la producción y consumo global del suero de leche (Ganju et al, 2017)	35
<b>2.1</b>	<i>Spirulina platensis</i> UTEX 1926	41
<b>2.2</b>	Fase inicial del cultivo	42
<b>2.3</b>	Fotobiorreactor	44
<b>3.1</b>	Crecimiento de <i>Spirulina platensis</i> en cada uno de los experimentos	52
<b>3.2</b>	Cambio de pH contra el tiempo de crecimiento de la <i>Spirulina platensis</i>	53
<b>3.3</b>	Contenido total de proteínas en cada experimento.	55
<b>3.4</b>	Contenido total de cenizas	56
<b>3.5</b>	Comportamiento de concentración de clorofila a	59
<b>3.6</b>	Comportamiento de concentración de clorofila b	60
<b>3.7</b>	Comportamiento de la concentración de carotenoides	61
<b>3.8</b>	Poder de reducción antioxidante 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)	62
<b>3.9</b>	Poder de reducción antioxidante del ión férrico	63
<b>3.10</b>	Cinética de contenido total de fenoles	64
<b>3.11</b>	Contenido total de lípidos	66

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Pag.
1.1	Resultados aproximados de análisis de <i>Spirulina</i> (% peso seco).	11
1.2	Composición aproximada de aminoácidos de <i>Spirulina</i> (g100g)	12
1.3	Rendimiento de diferentes medios de cultivo.	14
1.4	Ventajas y limitaciones de estanque abierto y fotobiorreactor.	18
1.5	La inmunomodulación y propiedades antioxidantes de la <i>Spirulina</i> en estudios preclínicos	27
1.6	Propiedades antitóxicas de la <i>Spirulina</i> .	28
1.7	Propiedades Anticancerígenas de la <i>Spirulina</i> .	29
1.8	Leche de bovino. Comparativo del avance acumulado. Información a junio de 2017 (miles de litros).	33
1.9	Elaboración de derivados y fermentos lácteos, 2009-20017 (toneladas).	34
3.1	Concentración de aminoácidos esenciales por gramo de muestra.	57
3.2	Concentración de aminoácidos no esenciales por gramo de muestra.	58
3.3	Concentración del contenido total de fenoles	64
3.4	Concentración de flavonoles	65
3.5	Contenido de ácidos grasos	67

## NOMENCLATURA

mg	Miligramo
L	Litro
%	Por ciento
°C	Grados Celsius
M	Concentración molar
μg	Micro gramos
μL	Microlitros
mL	Mililitros
g	Gramos
mm	Milímetros
μm	Micrómetros
d	Días
nm	Nanómetros
Lux	Unidad derivada del Sistema Internacional de Unidades para la iluminancia o nivel de iluminación
Xmax	Concentración máxima
UTEX	The University of Texas

TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
FRAP	Poder de reducción antioxidante del ión férrico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
AlCl <sub>3</sub>	Cloruro de aluminio
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na	Acetato de sodio
KCl	Cloruro de potasio
NaOH	Hidróxido de sodio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
<i>H<sub>2</sub>O</i>	Agua

## INTRODUCCIÓN

Entre los microorganismos fotosintéticos con importancia comercial, la cianobacteria filamentosa (alga azul-verde) *Arthrospira (Spirulina) platensis* ha sido ampliamente estudiada, debido a que su biomasa tiene muchas aplicaciones industriales además de ser considerada un alimento de alto valor. Contiene proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, ficobiliproteínas, carotenoides, polisacáridos, vitaminas y minerales. Los efectos potenciales de *Spirulina* en la salud incluyen: inmunomodulación, actividad antioxidante, anticancerígena, antiviral y antibacteriana, así como efectos positivos contra la desnutrición, hiperlipidemia, diabetes, obesidad, reacciones alérgicas inflamatorias, intoxicación inducida por metales pesados o químicos, daño por radiación y anemia.

Una proporción significativa de los desechos generados por la industria láctea se encuentra en forma de suero de leche, lo que genera preocupación por el medio ambiente, especialmente en los países en desarrollo. El problema más importante es su contenido significativo de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) que puede variar de 35,000 a 55,000 mg / L. El interés práctico del uso de *Spirulina platensis* para este proyecto radica también en su alto contenido nutricional y la posibilidad de generar compuestos de alto valor que aprovechen la ventaja que brindan estas especies capaces de eliminar contaminantes del agua y utilizarlos como nutrientes para favorecer la formación de ciertos compuestos de interés en la *Spirulina platensis*, y, de esta forma no solo obtienen productos de mayor valor, sino que también se encuentran los efluentes altamente contaminantes como el suero láctico degradado.

Debido a que esta especie de microalga presenta un alto valor nutricional al igual que otros beneficios a la salud, se muestra interés en determinar el perfil de aminoácidos, fitoquímicos y péptidos que brinde información nutricional, y de cómo se ven afectados el contenido de aminoácidos por la manera en la que es obtenida la *Spirulina*, comparándolo con un aminograma existente en bibliografía de otras microalgas y las dosis recomendadas de consumo de estos aminoácidos reportados por la FAO.

El interés práctico del empleo de *Spirulina platensis* para este proyecto reside además de su alto contenido nutricional, en la ventaja que proporciona esta especie al ser capaz de remover contaminantes del agua y aprovecharlos como nutrientes, esto presenta una alternativa al medio de cultivo utilizado tradicionalmente puesto que estudios actuales señalan que al alterar el medio de cultivo se puede favorecer la formación de ciertos compuestos de interés en la *Spirulina platensis*, ya sea para la industria alimenticia, la farmacéutica, cosmética e incluso la formación de combustibles, de esta manera no sólo se obtienen productos de mayor valor sino que se degrada la carga de efluentes altamente contaminantes como el suero láctico y las vinaza, entre otros.

Es por estas razones el interés del cultivo de esta especie utilizando medio enriquecido con efluentes contaminantes. Este proyecto de investigación presenta de igual manera un beneficio a la salud humana puesto que permitirá la obtención de un alimento altamente nutritivo y de bajo costo que puede y está siendo utilizado en diferentes partes del mundo para complementar la alimentación en zonas de escasos recursos.

# **CAPÍTULO 1**

## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**



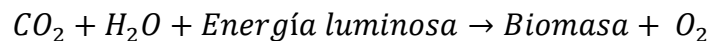
---

## CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 1.1 Microalga

El término microalgas se usa generalmente en su sentido más amplio para significar cianobacterias procariotas y algas microscópicas eucarióticas. La propagación de estos organismos es enorme, ya que habitan todos los ecosistemas, desde regiones frías y árticas, hasta hábitats extremadamente alcalinos o salinos, hasta fuentes termales y suelos áridos. Las cianobacterias, en particular, representan el grupo de organismos más antiguo que inició la creación de la atmósfera oxigenada de la Tierra hace más de 3 mil millones de años. Las microalgas también representan importantes consumidores de CO<sub>2</sub> y productores primarios, siendo la base de la cadena alimentaria en entornos acuáticos. Además, representan uno de los convertidores de energía solar más eficientes a la biomasa.

Las microalgas pertenecen a los organismos fotosintéticos de crecimiento más rápido, ya que su tiempo de duplicación celular puede ser tan sólo unas pocas horas. La producción de biomasa por microalgas (organismos fotosintéticos oxigenados) se basa en el esquema simple que se muestra a continuación, que determina todos los requisitos necesarios de este proceso biológico:



En biotecnología, en general, la producción de biomasa requiere condiciones bien definidas. Los requerimientos de cultivo necesarios para el crecimiento de cultivos de masas de microalgas son luz, una temperatura y pH adecuados y un suministro suficiente de carbono y nutrientes en el medio de crecimiento. Dado que los cultivos de masa de microalgas crecen en suspensiones densas, es necesario algún tipo de mezcla turbulenta para exponer las células a la luz y para permitir una transferencia de masa eficiente, citado por Masojídek y Torzillo (2008).

Algunas microalgas como *Spirulina* y *Chlorella* están certificadas como GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras) y pueden usarse como alimento sin ofrecer riesgo para la salud (Moraes *et al.*, 2013)

### **1.1.1 Cianobacterias**

Las cianobacterias o algas verde-azules son procariotas y fotosintéticas que poseen la habilidad de sintetizar clorofila a (Whitton y Potts, 2000). Aunque las cianobacterias son capaces de llevar a cabo una fotosíntesis antigénica usando ácido sulfhídrico en vez de agua, generalmente se utiliza el agua como donadora de electrones para la fotosíntesis, provocando así la liberación de oxígeno (Ho y Krogman, 1982), citado por Mühling (2000).

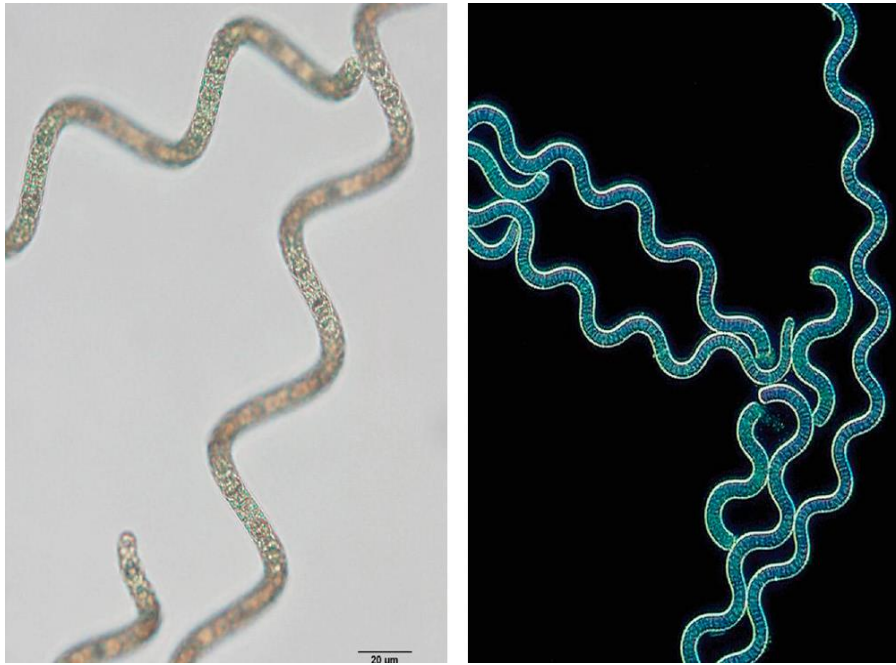
### **1.1.2 Taxonomía de las cianobacterias**

Las cianobacterias han sido clasificadas originalmente por su habilidad de sintetizar el pigmento azul llamado ficobilina de la ficocianina. El alto contenido de estos pigmentos en ciertas condiciones ambientales es responsable del color azulado de estos microorganismos, de este hecho proviene la denominación de algas verde-azules. Las cianobacterias han sido agrupadas por mucho tiempo junto con todas las demás algas eucariotas. Sin embargo, su relación taxonómica con las bacterias fue reconocida por Cohn (1853) y De Barry (1884). Finalmente, Stanier y Van Niel (1962) aclaró las diferencias fundamentales en la organización celular entre procariotas y eucariotas y Stainer (1974) proveyó un argumento convincente acerca de que las cianobacterias tienen la misma organización celular procariota que las bacterias. Este conocimiento llevó también a formar el ya aceptado término de cianobacteria, citado por Mühling (2000).

### **1.2 *Arthrospira (Spirulina) platensis***

*Arthrospira platensis* es una cianobacteria filamentosa planctónica compuesta de células individuales (de aproximadamente 8 mm de diámetro), que crece en lagos alcalinos subtropicales. En cultivos productivos, *Arthrospira* se cultiva en estanques mixtos superficiales o fotobiorreactores tubulares semi-cerrados. El medio de crecimiento contiene sales inorgánicas con una alta concentración de bicarbonato, manteniendo el valor de pH entre 9 y 10. Esta cianobacteria es la procariota fotosintética más cultivada ya que su biomasa es ampliamente utilizada como alimento saludable, suplemento alimenticio y como fuente de productos químicos finos.

Contiene proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, ficobiliproteínas, carotenoides, polisacáridos, vitaminas y minerales. (Masojídek y Tordillo, 2008).



**Figura 1.1.** *Spirulina* (*Arthrospira platensis* y *Arthrospira maxima*). Fuente: Small (2011), citado por Wan *et al.* (2016).

En su trabajo, Vonshak (1997) reporta que la *Spirulina platensis* parece ser la especie de este género más esparcida por todo el mundo, encontrándose principalmente en África, sin embargo, también puede ser encontrada en Asia y en Sudamérica, mientras que la *Spirulina máxima* parece estar esencialmente confinada a la región central del continente americano, siendo la especie principal encontrada en el lago de Texcoco. En la Figura 1.1 se muestran las imágenes de la *Arthrospira platensis* y la *Arthrospira máxima*.

La *Spirulina* es un organismo primitivo cuyo origen se remonta a hace aproximadamente 3.5 mil millones de años que ha desarrollado la habilidad de utilizar dióxido de carbono disuelto en agua de mar como fuente de nutrientes y para su reproducción.

La *Arthrospira platensis* también conocida *Spirulina* es una de las microalgas más importantes, que es usada como alimento y, a excepción de las algas marinas (macro), es también la más antigua “alga vegetal”. Nativos del lago de Chad han recolectado y consumido esta especie por siglos. Su producción actual es mayor a 1000 toneladas por año, con un Mercado en constante expansión (Wan *et al.*, 2016).

### **1.2.1 Morfología del género *Arthrospira* y *Spirulina***

Los géneros *Arthrospira* y *Spirulina* pertenecen al orden Oscillatoriales que incluye a cianobacterias filamentosas no heterocitas que llevan a cabo fisión binaria en primer plano y no producen acinetos, que son un tipo especializado de células parecidas a las endosporas que producen algunas cianobacterias como respuesta a condiciones de vida desfavorables. La *Arthrospira* y la *Spirulina* se distinguen del resto de Oscillatoriales por la morfología helicoidal de su tricoma (Castenholz, 1989), citado por Mühling (2000).

### **1.2.2 Historia de la taxonomía de los géneros *Arthrospira* y *Spirulina***

Aunque la introducción de dos géneros separados es aceptada ahora de manera general, ha habido muchas disputas en el pasado y el resultado es una tremenda confusión taxonómica.

#### **Conceptos clásicos**

El género *Spirulina* fue establecido por Turpin (1827) para *Spirulina oscillarioides*. En 1852, Stizenberger introdujo el género *Arthrospira* para cianobacterias helicoidales de ambientes altamente alcalinos (pH 9-10), que se distinguen de la *Spirulina oscillarioides* de Turpin por sus paredes transversales y tricomas más grandes. Tiempo después, los taxonomistas siguieron estas descripciones, agrupando especies de mayores dimensiones con paredes transversales visibles bajo la luz del microscopio bajo el género de *Arthrospira* y las más pequeñas, observadas bajo el microscopio, con típicos tricomas “unicelulares” en el género de *Spirulina* Turpin. Gardner (1917) fue el primero que cuestionó la determinación taxonómica de *Spirulina* Turpin y la *Arthrospira* Stizenberger basados en la presencia de paredes transversales visibles bajo la luz del microscopio. En su gran tratado de cianobacterias, Geitler (1932) agrupó a los dos géneros como uno solo, *Spirulina*, constituyendo de dos secciones *Arthrospira*, las formas de mayor tamaño con paredes transversales visibles a la luz del microscopio y *Spirulina*, para las especies más pequeñas con paredes transversales no visibles, citado por Mühling (2000).

Sin embargo, después del desarrollo de técnicas más avanzadas, tales como la microscopía de contraste de fases, Welsh (1961) argumentó que la visualización de las paredes transversales en materia viva de cepas de *Spirulina* y *Arthrospira* depende de la técnica microscópica utilizada. Es por ello por lo que los indicadores morfológicos para distinguir a ambos géneros usados por Geitler (1932) no son sostenibles, citado por Mühling (2000).

## Acercamiento moderno

Rippka *et al.* (1979) no consideraron la *Arthrospira* como un género distinto a la *Spirulina*. Sin embargo, con base en la diferencia substancial en la composición principal del ADN entre la *Spirulina* y la *Arthrospira* descubierta por Herdman *et al.* (1979), Rippka sugirió que la taxonomía de *Arthrospira/Spirulina* debía ser revisada con tecnologías más avanzada, citados por Mühling (2000).

Investigaciones sobre la ultraestructura de cepas de *Arthrospira*, proveyeron evidencia sustancial para una distinción válida de ambas especies. Mientras que la *Arthrospira* tiene una sola fila de porosa alrededor del tricoma a cada lado de sus paredes transversales, la *Spirulina* tiene varias filas de poros en el sitio cóncavo de la espiral a cada lado de las paredes transversales (Guglielmi y Cohen-Bazire, 1982). Más aún, cuerpos cilíndricos fueron encontrados en la *Spirulina (Arthrospira) platensis* (van Eykelenburg, 1979); Tomaselli *et al.*, 1996) pero no en la *Spirulina subsala* (Tomaselli *et al.*, 1996), citados por Mühling (2000).

Se descubrió que el ácido  $\gamma$ -lineloico conforma la mayor parte de los ácidos grasos en la *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nichols y Wood, 1968). Cohen *et al.* (1987) investigaron la composición de ácidos grasos de 18 tipos de *Arthrospira* y una de *Spirulina*. Todos los tipos de *Arthrospira* que fueron analizados contenían ácido  $\gamma$ -lineloico, mientras que la *Spirulina subsala* no contenía este compuesto (Cohen *et al.* (1987), citado por Mühling (2000).

En conclusión, la evidencia científica justifica la separación de dos géneros y provee indicadores taxonómicos para la correcta identificación de cada uno. Sin embargo, la confusión sobre la denominación en la literatura se ve manifestada y es ahora complicado para el mercado del producto industrial de *Arthrospira* que es vendido bajo el nombre taxonómicamente incorrecto *Spirulina*. Para resolver esta confusión Tomaselli *et al.* (1996) sugirieron el uso del nombre adecuado en publicaciones científicas mientras que en los demás casos (formulaciones y productos comerciales) el uso del nombre común *Spirulina*, siempre que el nombre científico correcto del organismo cultivado (por ejemplo *A. platensis*, *A. máxima* o *A. fusiformis*), y de ser posible su origen (lago Chad o laguna de Texcoco) sea especificado, citado por Mühling (2000).

### **1.2.3 Usos históricos de *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis***

Según el reporte en el siglo XVI, cuando los españoles invadieron y conquistaron México, descubrieron que los aztecas que habitaban en el Valle de México en la capital Tenochtitlan recolectaban una “nueva comida” del lago. Las crónicas de los españoles describen a pescadores con finas redes recolectando “tecuitlatl” azul de las lagunas y haciendo pasteles de color verde azulados de este material. Otras leyendas dicen que los mensajeros de los aztecas llevaban consigo *Spirulina* en sus maratones. La tecuitlatl es mencionada por naturalistas hasta finales del siglo XVI, pero no después de ese periodo, probablemente debido a la pérdida de lagos que fueron secados para desarrollar ciudades y campos de cultivo. El único lago que en la actualidad cuenta con *Spirulina* viva es el lago de Texcoco.

La población Kanembu, que habita a las orillas del Lago Chad, recolecta algas en vasijas de barro, drenan el agua utilizando bolsas hechas de tela y colocan el alga en la arena de la orilla del lago para secarla con el sol. El alga semi-seca se corta en pequeños cuadros y es transportada a las aldeas, donde el secado se completa sobre esteras expuestas al sol (Addulqader, Barsantu y Tredici, 2000) y es consumido por la gente local, citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

### **1.2.4 Redescubrimiento de la *Spirulina***

Para 1967 la *Spirulina* se había establecido como una “maravillosa fuente de alimento en el futuro” en la Asociación Internacional de Microbiología Aplicada. El análisis de las propiedades nutricionales de la *Spirulina* mostró un contenido de proteínas excepcionalmente alto, del orden de 60-70 por ciento de su peso seco; también mostró la excelente calidad de sus proteínas (con un contenido equilibrado de aminoácidos esenciales). Estos primeros datos fueron suficientes para impulsar muchos proyectos de investigación para fines industriales en la década de 1970, debido a que los microorganismos (como levaduras, *Chlorella*, *Spirulina*, algunas bacterias y mohos) parecían en ese momento ser la ruta más directa para la producción de proteínas de bajo costo (“proteínas de una sola célula”). Al mismo tiempo en que Leonard redescubrió la *Spirulina* en África, el Instituto Francés del Petróleo, recibió una solicitud de una empresa llamada Sosa-Texcoco Ltd. para estudiar una floración de algas que ocurrían en los estanques de evaporación de su instalación de producción de bicarbonato de sodio en un lago cerca de la Ciudad de México. Como resultado, se realizó el primer estudio

sistemático y detallado de las necesidades de crecimiento y fisiología de la *Spirulina*. Este estudio, que fue una parte de la tesis de posgrado de Zarrouk (1966), fue la base para establecer la primera planta de producción a gran escala de *Spirulina*. Mientras que finalmente ningún microorganismo cumplió su promesa de proteína barata, la *Spirulina* siguió dando lugar a la investigación y al aumento de la producción, reflejando sus activos nutricionales percibidos (Falquet, 2000), citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

### **1.2.5 Composición bioquímica**

Proteína: La *Spirulina* contiene cantidades inusualmente altas de proteína, entre 55 y 70 por ciento en peso seco, dependiendo de la fuente (Phang *et al.*, 2000). Es una proteína completa, que contiene todos los aminoácidos esenciales, aunque con cantidades reducidas de metionina, cistina y lisina, en comparación con proteínas estándar como la de carne, huevos o leche; es, sin embargo, superior a todas las proteínas vegetales estándar, como la de las leguminosas, citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

Ácidos grasos esenciales: La *Spirulina* tiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), el 1,5-2,0 por ciento de 5-6 por ciento de lípidos totales. En particular, la *Spirulina* es rica en ácido  $\gamma$ -linolénico (36 por ciento de los PUFA totales), y también proporciona ácido  $\gamma$ -linolénico (ALA), ácido linoleico (LA, 36 por ciento del total), ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA), citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

Vitaminas: La *Spirulina* contiene vitamina B<sub>1</sub> (tiamina), B<sub>2</sub> (riboflavina), B<sub>3</sub> (nicotinamida), B<sub>6</sub> (piridoxina), B<sub>9</sub> (ácido fólico), B<sub>12</sub> (cianocobalamina), vitamina C, vitamina D y vitamina E, citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

Minerales: Es una fuente rica en potasio, y también contiene calcio, cromo, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, selenio, sodio y zinc, citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

Pigmentos fotosintéticos: La *Spirulina* contiene muchos pigmentos incluyendo clorofila a, xantofila, betacaroteno, equinenona, mixoxantofila, zeaxantina, cantaxantina, diatoxantina, 3-

hidroxiechinenona, beta-criptoxantina, oscilaxantina, además de las ficobiliproteínas c-ficocianina y aloficocyanina, citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

Se han realizado análisis detallados de la composición bioquímica de *Spirulina* cultivada en condiciones de laboratorio, recogida en condiciones naturales o en sistema de cultivo de masas utilizando diferentes efluentes de residuos agroindustriales. Esto se encontró que variaba en respuesta a la salinidad del medio de cultivo - Vonshak *et al.* (1997) informaron que las células adaptadas a la sal tenían una composición bioquímica modificada con un contenido reducido de proteína y clorofila, y un mayor contenido de carbohidratos. Sin embargo, lo siguiente proporciona una revisión de la literatura sobre la amplia composición de la *Spirulina*.

La *Spirulina* tiene un contenido de proteínas de alta calidad (59-65 %), que es más que otras fuentes de uso común como la soya seca (35%), el cacahuete (25%) o el grano (8-10%).

**Tabla 1.1.** Resultados aproximados de análisis de *Spirulina* (% peso seco).

Componente	FOI, Francia	SAC, Tailandia	IPGSR, Malasia	BAU, Bangladesh
Proteína cruda	65	55-70	61	60
Carbohidratos solubles	19	-	14	-
Lípidos crudos	4	5-7	6	7
Fibra cruda	3	5-7	-	-
Cenizas	3	3-6	9	11
Humedad	-	4-6	6	9
NFE	-	15-20	4	17

FOI=French Oil Institute; SAC=Siam Algae Co. Ltd; IPGSR= Institute of Post-graduate Studies and Research laboratory, University of Malaya; BUA=Bangladesh Agricultural University. Citado FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008)

Un valor especial de la *Spirulina* es que se digiere fácilmente debido a la ausencia de celulosa en sus paredes celulares (como es el caso de las microalgas verdes eucariotas como *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Selenastrum*, *Scenedesmus*): después de 18 horas más del 85 por ciento de su proteína es digerida y asimilada (Sasson, 1997), citado por FAO Fisheries and Aquaculture



Circular (2008). La Tabla 1.1 muestra los resultados de análisis de la composición bioquímica de la *Spirulina* realizados por diferentes universidades.

Amino ácidos: La proteína de la *Spirulina* tiene una composición equilibrada de aminoácidos, con concentraciones de metionina, triptófano y otros aminoácidos similares a los de la caseína, aunque esto depende del medio de cultivo utilizado, en la Tabla 1.2 se presentan las cantidades de aminoácidos contenidos que fueron el resultado de análisis realizados por varios centros de investigación.

**Tabla 1.2.** Composición aproximada de aminoácidos de *Spirulina* (g/100g)

Fuente	Lisina	Fenilalanina	Tirosina	Leucina	Metionina	Ácido Glutámico	Ácido aspártico	Triptófano	Cistina
Siam Algae Co. Ltd, Tailandia	2.6- 3.3	2.6-3.3	2.6-3.3	5.9-6.5	1.3-2.0	7.3-9.5	5.2-6.0	1.0-1.6	0.5-0.7
IPGSR, Malasia	4.63 ± 0.07	4.1 ± 0.08	3.42 ± 0.10	8.37 ± 0.13	2.75 ± 0.05	7.04 ± 0.14	5.73 ± 0.11	1.98 ± 0.05	0.6 ± 0.03
Fuente	Serina	Arginina	Histidina	Treonina	Prolina	Valina	Isoleucina	Alanina	Glicina
IPGSR, Malasia	3.84 ± 0.06	4.94 ± 0.07	2.81 ± 0.06	3.35 ± 0.06	4.11 ± 0.05	4.02 ± 0.05	3.85 ± 0.10	10.81 ± 0.14	6.66 ± 0.10

Citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

β-caroteno y vitaminas: El β-caroteno, vitaminas del grupo B, la vitamina E, el hierro, el potasio y la clorofila disponibles en la *Spirulina* pueden promover el metabolismo de los carbohidratos,

grasas, proteínas, alcohol y la reproducción de la piel, los músculos y la mucosa. La *Spirulina* contiene grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno natural y este  $\beta$ -caroteno se convierte en vitamina A. De acuerdo con los hallazgos del National Cancer Institute de los Estados Unidos de América, una ingesta de 6,0 mg de  $\beta$ -caroteno diario puede ser eficaz para minimizar el riesgo de cáncer. Si alguien toma 4,0 g de *Spirulina* diariamente, eso es suficiente para obtener 6 mg de  $\beta$ -caroteno. Al mismo tiempo, se obtendrá una cantidad suficiente de vitaminas del grupo B, hierro y calcio. Sin embargo, estos nutrientes obtenidos a partir de 4,0 g de *Spirulina* son equivalentes o superiores a los obtenidos al comer más de 100 g de verduras de colores vivos terrestres, citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

Sin embargo, los porcentajes de los valores presentados anteriormente pueden variar dependiendo el medio y las condiciones en que crezca.

### **1.2.6 Producción natural de *Spirulina***

La mayoría de los sistemas de producción comerciales se basan en raceways (canales) poco profundos en los que los cultivos de *Spirulina* se mezclan mediante una rueda de paletas. Sin embargo, todavía hay algunos ejemplos de *Spirulina* que se cosecha comercialmente de poblaciones naturales. En México, a raíz de la investigación realizada en 1967, en colaboración con el Instituto Francés del Petróleo, Sosa-Textcoco Ltd cosechaba *Spirulina maxima* en un área del Lago Texcoco, a 2200 metros sobre el nivel del mar, en un medio semi-tropical en el Valle de México, con una temperatura media anual de 18 °C. La misma empresa solía extraer bicarbonato de sodio de los depósitos del lago desde 1936. Esta es la planta más grande que se dedica únicamente a la producción de biomasa de *Spirulina*. La primera planta piloto que produjo 150 toneladas de biomasa seca de *Spirulina* al año comenzó su producción en 1973; su capacidad de producción se elevó posteriormente a 300 toneladas de producto de grado medio por año a partir de 12 hectáreas de estanques naturales. Sosa-Textcoco Ltd invirtió cerca de 5 millones de dólares desde 1977 para resolver los problemas de ingeniería derivados del aumento de la producción y ejecutar las pruebas toxicológicas indispensables antes de comercializar el producto (Oliguín, 1986). En 1995, Sosa-Textcoco cesó la producción de *Spirulina*. Se tienen informes sobre otro lago semi-natural de Myanmar que se utiliza como sitio de producción de *Spirulina*. La producción comenzó en el Lago Twin Taung en 1988, y en

1999 aumentó a 100 toneladas por año. Las virutas secas se llevan a una fábrica farmacéutica en Yangoon, se pasteurizan y se comprimen en tabletas, citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

### 1.2.7 Cultivo de laboratorio

Ocho factores ambientales principales influyen en la productividad de la *Spirulina*: luminosidad (foto-período 12/12, 4 luxes), temperatura (25 a 35 ° C), tamaño de inoculación, velocidad de agitación, sólidos disueltos (10-60 g / litro), pH (8,5-10,5), la calidad del agua y la presencia de macro y micronutrientes (C, N, P, K, S, Mg, Na, Cl, Ca y Fe, Zn, Cu, Ni, Co, Se).

Medio de cultivo: El medio Zarrouk es el único medio convencional usado para la producción de *Spirulina* a gran escala. Tanto el medio Zarrouk como el medio Schlösser modificado tienen una buena producción, y el costo para producir 1 gramo de biomasa en masa seca es mucho menor que con otros tipos de medios de cultivo, como se muestra en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3.** Rendimiento de diferentes medios de cultivo.

Media	Condiciones de luz	Masa seca (g/L)
Medio Zarrouk	200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$	3.2
Medio Schlösser modificado	2 kLux	3.497
Medio 6 revisado	5 kLux	1.3
Medio Oferr	5 kLux	1.2
Medio RAO	5 kLux	0.84
Medio CFTRI	5 kLux	0.72
Medio Bangladesh	5 kLux	0.112

Kin y Lee (2015). *Marine Bioenergy: Trends and Developments*.

Tamaño de la inoculación: En la investigación realizada por Pelizier *et al.* (2003) plantean que la mayor edad del inóculo de *Spirulina* debe estar en el rango entre 6 y 8 días de crecimiento, además, el inóculo utilizado tiene mejores resultados de crecimiento cuando se realiza con una concentración de 50 miligramos por litro de medio de cultivo.

Velocidad y tipo de agitación: Ravelonandro *et al.* (2011) estudiaron el efecto del tipo de mezclado en la producción de biomasa de *A. platensis*, evaluando el crecimiento utilizando agitador magnético, recirculación del medio con una bomba, y por último, introduciendo aire

por medio de una columna de burbujas. La columna de burbujas dio una tasa de crecimiento mayor, así como mayor rendimiento de biomasa obtenida ( $1.8 \pm 0.1$  gramos sobre litro). La agitación magnética y el uso de recirculación dieron como resultado valores similares entre sí. Por otra parte, Kim *et al.* (2014) llevaron a cabo una investigación para determinar el impacto del tamaño de burbuja para agitación de *A. platensis* sobre el crecimiento de ésta. Los resultados obtenidos demostraron que, el tamaño de burbuja tiene gran influencia en el consumo de dióxido de carbono, la tasa de conversión y acumulación de lípidos de *A. platensis*, siendo preferible el tamaño de diámetro de burbuja menor debido a que promueve la acumulación de lípidos en la cianobacteria (23.87%) comparado con burbujas más grandes y aireación sin dióxido de carbono (12.72% y 1.84% respectivamente).

### **1.2.8 Producción comercial a pequeña escala**

El cultivo de *Spirulina* tiene diversas ventajas sobre la agricultura convencional, las cuales son:

Alto rendimiento: Con un contenido de proteínas de aproximadamente 60%, el rápido crecimiento de la *Spirulina* significa que produce 20 veces más proteína por unidad de área que el frijol de soya, 40 veces más que el maíz, y más de 200 veces más que la carne de res.

Requerimientos de suelo: El cultivo de *Spirulina* no requiere el uso de suelo fértil.

Uso eficiente del agua: La producción de *Spirulina* usa menos agua por kilo e proteína que otros cultivos (aproximadamente 2100 litros/kg de proteína). El agua utilizada puede ser reciclada, por lo que la única pérdida significativa de agua es debida a la evaporación. El cultivo de *Spirulina* utiliza únicamente el 25% de la cantidad utilizada para cultivar soya, el 17% del agua para cultivo de maíz y 2% del agua requerida para producir un kilogramo de carne de res, citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

### **1.2.9 Cultivo comercial y en masa**

El mayor cultivo a gran escala de microalgas inició en la década de 1960 en Japón con el cultivo de *Chlorella*, seguido por el de *Spirulina* en los años 1970 en el Lago de Texcoco en México. La *Spirulina* se produce en al menos 22 países: Benín, Brasil, Burkina Faso, Chad, Chile, China, Costa Rica, Costa de Marfil, Cuba, Ecuador, Francia, India, Madagascar, México, Myanmar, Perú, Israel, España, Tailandia, Togo, Estados Unidos y Vietnam. Aunque no se cuenta con información veraz de la producción mundial de *Spirulina*, el reporte de FishStat de la FAO (2008) muestra que la producción en China para 2003 era de 19,080 toneladas,

alcanzando 41,570 toneladas en 2004, con un valor aproximado de 7.6 y 16.6 millones de dólares respectivamente. Otros países con producción significativa de *Spirulina* que no son tomados en cuenta en el reporte incluyen a Estados Unidos (California y Hawái) Taiwán, Provincia de China y Tailandia.

El cultivo a gran escala de *Spirulina* se lleva a cabo usualmente en estanques poco profundos, equipados con ruedas de paletas para mezclar el cultivo. Normalmente se utilizan dos tipos de estanques de canal abierto (raceway): el primero está revestido de hormigón y, por lo tanto, es caro; el segundo es un túnel de tierra poco profundo revestido con cloruro de polivinilo (PVC) u otro material plástico duradero. El revestimiento de los canales aumenta el costo de producción de biomasa de las microalgas, de ahí la búsqueda de materiales y procesos más baratos, como el sellado de arcilla de bajo costo.

#### **1.2.10 Variables involucradas en la producción**

Luz: La calidad y cantidad de la luz suministrada al cultivo de *Spirulina platensis* tiene un impacto sobre el rendimiento de la biomasa producida, así como su composición final, esto se ha demostrado en varios trabajos como el de Ho *et al.* (2018) El uso de LED blanco dio como resultado una mayor eficiencia de producción de ficocianina (C-PC) en comparación con el uso de lámparas fluorescentes y LED monocromáticos. El ajuste adecuado de la eficiencia de la luz y la oscuridad aumentó aún más la eficiencia de producción de C-PC con un consumo de energía relativamente menor. Además, el uso de medio de cultivo reciclado en el medio libre resultó ser una estrategia ecológica y económica para la producción de C-PC con *S. platensis*.

Fotoinhibición: Cuando la aireación no es adecuada, la eficiencia de la utilización de energía y la producción de biomasa será baja. De forma similar, si el medio de crecimiento no está aireado, la célula en la superficie del medio flota hacia la superficie debido a la presencia de vacuolas llenas de aire. Estas células sufren fotoinhibición, lo que resulta en un bajo crecimiento o baja producción de biomasa. Las condiciones óptimas para la *Spirulina* se encontraron en una intensidad de luz inferior a  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , flujo de aire enriquecido en  $\text{CO}_2$  (0.5%), tasa de aireación superficial de  $0.0056 \text{ ms}^{-1}$  (Zhang *et al.*, 2015).

Temperatura: La temperatura es un factor climático importante que influye en la tasa de crecimiento de *Spirulina*. Por debajo de  $17^\circ \text{C}$ , el crecimiento es prácticamente nulo, pero la

*Spirulina* no muere. La temperatura óptima para el crecimiento es de 35 ° C, pero por encima de 38 ° C, el crecimiento de *Spirulina* se inhibe, se sabe que, cuando la *Spirulina* crece a temperaturas entre 29 y 35°C tiene mayor rendimiento. La luz es un factor importante, pero no se recomienda la luz solar directa, el 30% de la luz solar total es en realidad mejor, excepto que se puede requerir más para calentar rápidamente el cultivo por la mañana (Saeid y Chojnacka, 2015). El crecimiento solo tiene lugar a la luz, pero tampoco se recomienda la iluminación las 24 horas del día. Durante los períodos oscuros, las reacciones químicas tienen lugar dentro de *Spirulina*, como una síntesis de proteínas y respiración, citado por Soni *et al.* (2017).

Contaminación: La contaminación por diferentes especies de algas puede presentar un problema grave para los cultivos de microalgas en estanques abiertos al aire libre. Vonshak (1997) menciona que,

en la mayoría de los casos, los pasos que demostraron ser efectivos en la prevención de la contaminación por *Chlorella* fueron mantener una alta concentración de bicarbonato (por ejemplo 0.2 M), tomar precauciones para mantener la carga orgánica disuelta en el medio de cultivo lo más baja posible e incrementar la temperatura durante el invierno. La experiencia indica que los organismos contaminantes no presentan una dificultad grave siempre que se mantenga un buen crecimiento en un cultivo de con una sola especie de algas. Vale la pena señalar que hasta ahora no se han observado cianófagos que ataquen la *Spirulina*.

Sistemas de producción: en la actualidad existen diferentes sistemas de producción para microalgas, a continuación, se mencionan los más importantes:

- **Producción foto-autotrófica:** actualmente, es el único método que es técnica y económicamente factible para producción de biomasa a gran escala, este tipo de producción a su vez se divide en dos tipos de sistemas: de estanque abierto y fotobiorreactor cerrado. La viabilidad técnica de cada sistema se ve influenciada por propiedades intrínsecas del tipo de microalga seleccionado, las condiciones climáticas y los costos de suelo y agua. En la Tabla 1.4 se presentan las ventajas y limitaciones de cada uno de ellos.

**Tabla 1.4.** Ventajas y limitaciones de estanque abierto y fotobiorreactor.

Sistema de producción	Ventajas	Limitaciones
Estanque acanalado (Raceway)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relativamente barato</li> <li>• Fácil limpieza</li> <li>• No utiliza tierras agrícolas</li> <li>• Se necesita de poca energía</li> <li>• Fácil mantenimiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pobre producción de biomasa</li> <li>• Se requiere de gran área de suelo</li> <li>• Pobre mezclado y utilización de luz y dióxido de carbono</li> <li>• Fácil contaminación de los cultivos</li> </ul>
Fotobiorreactor tubular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gran área de superficie iluminada</li> <li>• Adecuado para cultivos al exterior</li> <li>• Relativamente barato</li> <li>• Buena producción de biomasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiene un grado de crecimiento de biomasa en paredes</li> <li>• Requiere de mucho espacio</li> <li>• Gradientes de pH, oxígeno disuelto y dióxido de carbono en los tubos.</li> </ul>
Fotobiorreactor de platos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción de biomasa alta</li> <li>• Fácil de esterilizar</li> <li>• Baja acumulación de oxígeno</li> <li>• Fácil templado</li> <li>• Gran superficie de iluminación</li> <li>• Adecuado para el exterior</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Difícil de realizar un scale-up</li> <li>• Difícil control de temperatura</li> <li>• Tiene un grado de crecimiento de biomasa en paredes</li> </ul>
Fotobiorreactor de columna	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compacto</li> <li>• Gran transferencia de masa</li> <li>• Bajo consumo de energía</li> <li>• Buen mezclado y baja tensión de corte</li> <li>• Fácil de esterilizar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Área de iluminación pequeña</li> <li>• Es caro comparado con estanques abiertos</li> <li>• Tensión de corte</li> <li>• Construcción sofisticada</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce fotoinhibición y foto-oxidación.</li> </ul>	
--	---	--

Citado por Brennan *et al.* (2010).

- **Producción heterotrófica:** se ha utilizado con éxito para la producción de biomasa microalgal y metabolitos. Brennan *et al.* (2010) describen que, en este proceso, las microalgas crecen en sustratos de carbón como glucosa en un tanque agitado o fermentador. El crecimiento de las algas es independiente de la energía luminosa, lo cual permite la simplificación de hacer scale-up. Estos sistemas proveen un alto grado de control de crecimiento y bajos costos de recolección debido a que se alcanza una densidad celular alta.
- **Producción mixotrófica:** muchos organismos son capaces de usar ambos procesos (autotrófico o heterotrófico) lo que significa que son capaces de llevar a cabo la fotosíntesis al mismo tiempo que consumir materia orgánica. Chojnacka y Noworyta compararon el crecimiento de *Spirulina sp* en cultivos foto-autotróficos, heterotróficos y mixotróficos, encontraron que en cultivos mixotróficos se reduce la fotoinhibición y se mejora la tasa de crecimiento por encima de los otros dos sistemas, citado por Brennan *et al.* (2010).

Dispositivos de mezclado: La agitación del cultivo es necesaria para homogeneizar y garantizar una buena distribución de la iluminación entre todos los filamentos de *Spirulina*. La mezcla juega un papel importante en la productividad de cultivos de densidad ultra alta. La aireación es muy necesaria para obtener buena calidad y mejores rendimientos de especies de *Spirulina*. Se puede lograr mediante rotadores, que mantienen las células en suspensión mediante una agitación suave de las células en crecimiento. La especie *Spirulina* produce un alto rendimiento de biomasa cuando el medio de crecimiento está aireado (por medio de burbujas de aire). La aireación proporciona una distribución homogénea de los filamentos de *Spirulina* en todo el sistema de crecimiento para una exposición adecuada a la iluminación. También ayuda a distribuir la concentración de dióxido de carbono de manera uniforme y elimina sustancias inhibitoras como el oxígeno (Dubey, 2006; Richmond & Vonshak, 1978), citado por Soni *et al.* (2017).



### 1.2.11 Ejemplos de producción alrededor del mundo

La producción comercial de *Spirulina* tiene dos enfoques amplios. La de los países industrializados que están interesados en producir el alga azul-verde para el mercado de alimentos naturales y alimentos saludables, así como para la extracción de bioquímicos de alto valor. Y la de los países en desarrollo que están en busca de una rica fuente de proteínas, producida en condiciones locales y utilizando tierra pobre y agua salina no apta para la agricultura, así como la oportunidad de tratar los desechos animales y humanos. Los Estados Unidos de América tienen algunas de las granjas intensivas más grandes del mundo, principalmente con sede en Hawái y California. Earthrise tiene un gran sitio de 43 hectáreas ubicado en el desierto de Sonora, en el sudeste de California, que utiliza agua del río Colorado rico en minerales que produjo unas 450 toneladas en 2002. Estos utilizan una combinación de agua dulce y agua de mar profunda suplementaria para llenar los estanques. Los principales insumos son el bicarbonato de sodio y el dióxido de carbono, así como los fertilizantes inorgánicos.

La FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008) reporta que en China, el cultivo de *Spirulina* ha sido patrocinada por la Comisión Estatal de Ciencia y Tecnología desde 1987. En Tailandia, un sistema integrado utiliza el efluente de una fábrica de producción de almidón que utiliza yuca, en el Instituto de Tecnología Thonburi de King Mongkut (KMITT por sus siglas en inglés). En esta planta, se utiliza un digestor de 160 metros cúbicos para producir biogás con estanques de algas de 4 por 200 m<sup>2</sup> que produce biomasa de *Spirulina* que se evalúa en cuanto a su valor nutricional. El sistema se ha ampliado a 14 estanques de 1 000 m<sup>2</sup> cada uno y una producción anual de 30-50 toneladas.

En el medio del Desierto de Atacama en Chile, el "Grupo de Biotecnología Apropriado para el Desarrollo del Desierto" del Solarium ha desarrollado un sistema de cultivo y procesamiento para producir *Spirulina*. La *Spirulina* se cultiva en estanques de canal revestidos de cloruro de polivinilo con agitación mediante una rueda de paletas que da un caudal de 20 a 25 centímetros por segundo. Los estanques están cubiertos con una película de polietileno translúcida resistente a los rayos UV de 0.15 milímetros de grosor. Dicha protección mantiene temperaturas adecuadas en el medio de cultivo la mayor parte del año, lo que resulta en un

---

crecimiento óptimo de la *Spirulina*. Los sistemas de filtración por gravedad cosechados de forma simple y fácil de operar permiten filtrar de 15 a 20 metros cúbicos por hora y obtener una biomasa preconcentrada con aproximadamente 5 por ciento de sólidos totales. La producción alcanzó casi 3 toneladas de *Spirulina* seca por año a partir de 2.4 hectáreas de estanques intensivos. Parte de esa producción se comercializa en polvo a granel y se encapsula en cápsulas de gelatina para el mercado local y nacional de alimentos saludables, así como para la exportación a países vecinos y Europa. Otra parte de la producción se entrega a las agencias humanitarias que usan *Spirulina* como suplemento nutricional para niños en África y América Latina.

### **1.2.12 Producción de *Spirulina* en nutrientes orgánicos, incluyendo efluentes residuales**

Una de las principales barreras para el cultivo a pequeña escala de la *Spirulina* es el costo y viabilidad de nutrientes inorgánicos. Sin embargo, una de las alternativas es el uso de fuentes de nutrientes orgánicas, especialmente de efluentes residuales.

Coca *et al.* (2015) llevaron a cabo un estudio donde se utilizó la vinaza del betabel (remolacha) que es un subproducto de las fábricas de fermentación de melaza, difícil de eliminar e implica una grave preocupación ambiental como medio de cultivo de la *Spirulina platensis*. El trabajo trató sobre la valorización de la vinaza de betabel mediante la producción de proteínas en la biomasa de *Spirulina platensis*. En primer lugar, se realizó un estudio preliminar en frascos discontinuos para analizar la influencia de factores ambientales en el contenido de proteínas de *S. platensis* y en la productividad de proteínas en medios de cultivo suplementados con vinazas de betabel. Se cultivó *S. platensis* en un fotobiorreactor tubular de transporte aéreo usando medio mineral suplementado con vinaza de remolacha (medio SVM). La concentración máxima de células y la productividad de proteínas alcanzadas en el fotobiorreactor tubular fueron de  $6.5 \pm 0.7 \text{ g L}^{-1}$  y  $168 \pm 18 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , respectivamente (con SVM  $1 \text{ g L}^{-1}$  de vinaza). La adición de una concentración más alta de vinaza (SVM  $2 \text{ g L}^{-1}$ ) condujo a valores de concentración de biomasa y productividad de la proteína ( $3.6 \pm 0.3 \text{ g L}^{-1}$  y  $86 \pm 6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente) Medio mineral sin suplemento. Las concentraciones estables de biomasa se mantuvieron durante la operación continua, demostrando así la capacidad de *S. platensis* para adaptarse a estos medios de cultivo. El cultivo continuo de *S. platensis* en un fotobiorreactor

tubular de transporte aéreo vertical es en medio Schlösser diluido al 75% y suplementado con 1 o 2 g L<sup>-1</sup> de vinaza de remolacha. La adición de 1 g L<sup>-1</sup> de vinaza aumentó considerablemente la productividad de la biomasa y de las proteínas en comparación con el medio mineral no suplementado. La fermentación o cultivo en estado sólido (SSF) implica el uso de un medio de cultivo compuesto de material sólido con un contenido de humedad dado. Aunque el bagazo de caña de azúcar se utiliza como fuente de energía en destilerías de alcohol en Brasil, el exceso podría ser un soporte para el crecimiento de microorganismos fotosintéticos. Pelizer, *et al.*, (2014), llevaron a cabo una metodología que se utilizó para evaluar la producción de proteína de *Arthrospira platensis* bajo SSF utilizando como soporte el bagazo de caña de azúcar, teniendo en cuenta el contenido de humedad del medio, la intensidad de luz y la concentración de inóculo. Se encontró que la humedad tenía una fuerte influencia en el rendimiento del proceso. Las mejores condiciones fueron: humedad del 98.8%; Concentración de inóculo de 0.15 kg de biomasa / medio de cultivo húmedo<sup>-1</sup> y una intensidad de luminosa de 6.0 lux.

La producción de biomasa de microalgas a partir de efluentes de confitería es una posible solución para la necesidad urgente de un alimento vivo en acuicultura. El-Kassas *et al.* (2015) reportaron que, *Arthrospira (Spirulina) platensis* fue el alga dominante en el efluente de "Biscomisr una fábrica de confitería", en Alejandría-Egipto. Por lo tanto, se aisló de las muestras de efluentes y se utilizó a lo largo del estudio. La cianobacteria, *A. platensis* se cultivó en el efluente usando 22 Central Composite Design (22 CCD). Este trabajo aborda la mejor dilución de efluente (WC, %) así como la concentración de bicarbonato sódico (SBC) en el crecimiento de alga y composición bioquímica. Los contenidos totales de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos de la biomasa de algas producida fueron altamente mejorados. Los análisis estadísticos sugieren que el efecto principal de (WC, %) es influencias negativas significativas en el contenido de algas de proteínas, lípidos e hidratos de carbono ( $p > 0.01$ ) aunque tuvo una influencia positiva significativa sobre la clorofila ( $p > 0.01$ ), no se ha informado ningún efecto significativo sobre los  $\beta$ -carotenos de las algas ( $p > 0.05$ ). El efecto de la interacción de SBC junto con WC, % ejerció una influencia negativa significativa en las proteínas de algas ( $p > 0.01$ ) y ningún efecto significativo en las otras respuestas ( $p > 0.05$ )

## 1.3 Productos, usos y beneficios de la *Spirulina*

### 1.3.1 Producción de bioenergéticos

La biomasa de algas es una excelente fuente de recursos y energía. Una vez que la extracción de petróleo se vuelva económicamente insostenible, una de las opciones más prometedoras para reemplazarlos es el uso de las bio-refinerías de algas para la producción de recursos y energía. Los investigadores han utilizado ampliamente la biomasa de algas para la generación de energía en forma de biodiesel. El biodiesel, que es un éster alquílico de ácidos grasos, se produce a partir de recursos renovables como el aceite vegetal, grasa animal, microalgas, entre otras opciones. En su trabajo, Sumprassit *et al.* (2017) establece que, dado que el biodiesel puede reemplazar fácilmente a los combustibles fósiles actuales, se espera que su demanda aumente en el futuro cercano. Sin embargo, una mayor demanda de biodiesel afectará el suministro de aceite vegetal en el sector alimentario. Bajo tales circunstancias, es preferible el uso de algas para la producción de biodiesel ya que la productividad de biomasa de las microalgas es 30 veces mayor en comparación con las plantas terrestres lo que resulta en una reducción significativa de la tierra requisito. Además, la biomasa de algas está libre de lignocelulosa; como resultado, su disrupción celular requiere un menor aporte de energía. Por otro lado, el uso de algas para la producción de biodiesel no afecta la seguridad alimentaria ya que la materia prima de microalgas no es la principal fuente de alimento humano. El biodiésel de algas se considera neutral en carbono, ya que el CO<sub>2</sub> producido al quemar biogás de algas es el mismo que se consume durante la fotosíntesis. En contraste, las emisiones de CO<sub>2</sub> de las plantas de energía y los procesos industriales pueden ser fuente de carbono para el cultivo de microalgas, lo que resulta en una captura neta de carbono. Entre las especies que se han investigado para la producción del biodiesel se encuentre la *Spirulina platensis*. La producción de biodiesel a partir de microalgas involucra cuatro etapas diferentes, a saber, el cultivo y cosecha de microalgas, la disrupción celular, la extracción de lípidos y la transesterificación. Sin embargo, la producción a escala comercial de biodiesel a partir de microalgas aún no se practica, ya que no es económico. Se necesita más investigación para aumentar el rendimiento del producto de biodiesel a fin de reducir el costo de producción. El rendimiento de biodiesel podría aumentarse optimizando el cultivo celular, la disrupción, la extracción de lípidos y la

transesterificación. Hay tres factores clave que influyen en el rendimiento del producto de biodiesel. El contenido de lípidos de las microalgas es el primer factor que puede aumentarse mediante el proceso de cultivo bajo la concentración adecuada de nutrientes y la intensidad de luz adecuada. El segundo factor es el rendimiento de recuperación de lípidos, que puede verse influenciado por la aplicación de una técnica adecuada de disrupción celular y el uso de un solvente orgánico adecuado en el proceso de extracción de lípidos. Sumprasit *et al.* (2017) establece la viabilidad de la recuperación de energía de las ubicuas microalgas *Spirulina platensis* en forma de biodiesel y biogás. En base a consideraciones energéticas, el choque osmótico fue la técnica de disrupción celular más adecuada que registró un rendimiento de recuperación de lípidos más alto de 8.9% cuando se usó cloroformo / metanol (1: 2 v / v) como disolvente. El ácido sulfúrico como catalizador para la reacción de transesterificación, a una concentración de 1 g / g de lípidos, produjo la mejor conversión de lípidos hasta en un 79.5% en ésteres de metilo grasos. Con choque osmótico como técnica de disrupción celular, cloroformo / metanol como disolvente para la extracción de lípidos y ácido sulfúrico como catalizador para la reacción de transesterificación, se registró un rendimiento de biodiesel del 7.1%.

### **1.3.2 Tratamiento de residuos y mejoramiento ambiental.**

Otro beneficio medioambiental que se puede acreditar a las microalgas es, como ya se ha mencionado anteriormente, el tratamiento de aguas residuales tanto caseras como de diferentes industrias que abarcan desde la alimenticia hasta la textil.

En la investigación realizada por Chang *et al.* (2013) se cultivó *Spirulina platensis* en agua residual con contenido de orina humana para acoplar el tratamiento de aguas residuales con el de producción de biomasa. Se examinaron las características del crecimiento de las microalgas bajo condiciones autotróficas y mixotróficas (añadiendo glucosa o acetato de sodio a la orina), la remoción de nutrientes del agua residual y la calidad de la biomasa. Después de 7 días, 97% del  $\text{nh}_4\text{-N}$ , 96.5% del fósforo total y del 85 al 98% de urea contenida en la orina fueron removidos por las microalgas en cultivo autotrófico (30°C). la biomasa que creció en cultivo mixotrófico mostró un incremento en el contenido de proteínas, que puede convertirse en biocrudo mediante licuefacción térmica.

Salla *et al.* (2016) realizaron un trabajo cuyo objetivo fue aumentar el contenido de carbohidratos en la microalga *Spirulina* con las adiciones de residuos de ultra y nanofiltración de proteína de suero. El déficit de nutrientes en el medio de Zarrouk diluido al 20% y la adición de 2.5% de ambos tipos de residuos condujo a una alta productividad en carbohidratos ( $60 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ). Con estas condiciones de cultivo, el aumento en la producción de carbohidratos en *Spirulina* indicó que las condiciones eran apropiadas para su uso con microalgas como materia prima en la producción de bioetanol. La dilución del medio nutritivo Zarrouk al 20% y la adición de residuos del proceso de concentración de proteína de suero, con altos contenidos de lactosa y bajos niveles de fósforo, potasio y hierro, aumentaron la productividad de carbohidratos en la biomasa de las microalgas a  $60 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ .

Debido a que la *Spirulina platensis* puede mitigar las emisiones de  $\text{CO}_2$  y producir simultáneamente un antioxidante llamado *C-ficocianina* (C-PC), que es un producto nutracéutico de alto valor, Chen *et al.* (2016), Utilizaron un sistema de control del pH innovador para cultivar *S. platensis*, en el que se utilizó la alimentación de  $\text{CO}_2$ , en lugar de la titulación ácido / alcalina, para controlar el pH del cultivo. El pH óptimo del cultivo fue 9.5. En comparación con el sistema continuo de alimentación de  $\text{CO}_2$ , el sistema de control del pH mejoró la eficiencia de eliminación de  $\text{CO}_2$  de 13.6% a 62.3%. El contenido de C-PC y la productividad también se incrementó a 16.8% y  $0.17 \text{ g / L / d}$ , respectivamente. Por lo tanto, el sistema de control de pH propuesto resultó económico y sostenible ya que evita el uso de ácido / alcalino y reduce las emisiones globales de  $\text{CO}_2$ .

Villegas-Rodríguez (2017) trabajó en la remoción de carga orgánica en suero lácteo mediante *Spirulina platensis*. Para cargas orgánicas de  $1000 \text{ mg/L}$  en método de cultivo raceway y el Fotobio-reactor (FBR) vertical presentaron remociones de 95.23% y 97.76% en un periodo de 8 días con una producción de biomasa de 0.99 y  $1.08 \text{ g/L}$ . Para cargas superiores el FBR presenta mayor eficiencia removiendo 98.2% con  $X_{\text{max}}$  de  $1.91 \text{ g/L}$ . El crecimiento se puede prolongar al añadir (remoción más lenta pero más eficiente, 99.2% y  $X_{\text{máx}}$  de  $2.143 \text{ g/L}$ . La mayor producción de biomasa fue en medio Schlösser modificado con adición de y con  $X_{\text{máx}}=6.33 \text{ g/L}$ .

Como una alternativa importante para aliviar la presión de la escasez de agua dulce, la aplicación de agua de mar enfrenta un gran desafío en el tratamiento de aguas residuales debido a la salinidad proveniente del agua de mar. Zhou *et al.* (2017) proponen el uso de *Spirulina platensis* originada en lago salado se usó para tratar las aguas residuales de lavado de excusados de agua salada junto con aguas residuales del lavado de excusados de agua dulce. Se demostró que el 90.02% de la demanda química de oxígeno (DQO-Cr) (a 90.24 mg / L) y 79.96% de nitrógeno total (a 15.69 mg / L) se eliminaron, teniendo 0.76 g / L de producción de biomasa en la relación óptima 7: 3 de mezcla de ambas aguas residuales.

### **1.3.3 Posible uso como complemento nutricional en emergencias humanitarias**

Después de las emergencias humanitarias, es importante que los suministros de alimentos de socorro sean culturalmente aceptables, ricos en proteínas y vitaminas, digeribles, mezclables con cereales y que puedan almacenarse en condiciones ambientales durante largos períodos.

Una ventaja adicional importante de la *Spirulina* sobre la mayoría de los otros alimentos es que a menudo se puede cultivar in situ y, por lo tanto, proporciona una solución a largo plazo para el desarrollo de la estrategia nutricional.

Una ventaja adicional importante de la *Spirulina* sobre la mayoría de los otros alimentos es que a menudo se puede cultivar in situ y, por lo tanto, proporciona una solución a largo plazo para el desarrollo de la estrategia nutricional, citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

### **1.3.4 Posibles efectos sobre la salud**

**Efectos contra la anemia.** Los suplementos alimenticios de *Spirulina* han ayudado mitigando la incidencia de anemia presentada durante el embarazo, la lactancia la lactancia, el envejecimiento o la nosotoxicosis (estado mórbido causado por una toxina). Según lo informado por Simsek *et al.* (2009), el consumo de *Spirulina* moduló la disminución de glóbulos rojos, glóbulos blancos y linfocitos T- $\alpha$ -naftil-esterasa-positivos-positivos, y los valores de hemoglobina, (MCHC) causados por plomo y cromo. Durante el período de estudio de 12 semanas, hubo un aumento constante en los valores promedio de MCHC en sujetos de ambos sexos. Las mujeres mayores parecen beneficiarse más rápidamente de los suplementos de *Spirulina*, citado por Wan *et al.* (2016).

**Efectos proinflamatorios, antioxidantes y del sistema inmunológico.** La inflamación y el estrés oxidativo contribuyen a la patogénesis de diversas enfermedades, como la aterosclerosis, la hipertrofia cardíaca, la insuficiencia cardíaca y la hipertensión. En estas enfermedades cardiovasculares se ha observado una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que indica estrés oxidativo, y la inflamación excesiva dentro de la pared arterial es un factor de riesgo para enfermedades como la aterogénesis. Sin embargo, tanto los estudios *in vivo* como *in vitro* indican que el suplemento de *Spirulina* es principalmente un agente proinflamatorio. Mejora la actividad antioxidante y promueve la producción de anticuerpos y citocinas tanto en modelos animales sanos como en modelos enfermos (Bolanho *et al.*, 2014; Deng y Chow, 2010), citado por Wan *et al.* (2016). En la Tabla 1.5, se muestran diferentes estudios preclínicos y los resultados obtenidos de éstos:

**Tabla 1.5.** La inmunomodulación y propiedades antioxidantes de la *Spirulina* en estudios preclínicos.

Objeto de estudio	Efectos específicos	Componente	Referencia
Humanos (~50 años de edad)	Aumento de la actividad de la enzima 2,3-dioxigenasa indoleamina y el recuento de glóbulos blancos	<i>Spirulina</i>	Selmi <i>et al.</i> (2011)
Humanos	Mejora la actividad de las células NK (del inglés: natural killer cell. Son componentes importantes en la defensa inmunitaria innata).	Immulina (extracto comercial de <i>A. platensis</i> )	Nielsen <i>et al.</i> (2010)
Ratones	Induce la secreción de TNF- $\alpha$ (factor de necrosis tumoral) y INF- $\gamma$ (interferón gamma, cuya función más importante es la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitaria innatas como las respuestas celulares adaptativas)	Suplemento de <i>Spirulina</i>	Soltani <i>et al.</i> (2012)
Ratones	Mejora la respuesta inmune primaria en términos de producción de anticuerpos IgG (inmunoglobulina G)	<i>Spirulina</i> (50 y 150 mg/kg de peso corporal)	Chu <i>et al.</i> (2013)
Ratones con cáncer de mama	Disminuir la secreción de IL-4 ( <b>interleucina-4</b> ) (45.1pg / mL) e IL-10 (208.4pg / mL) en ratones portadores de tumores infectados con <i>Candida albicans</i> ; aumentar la	<i>A. platensis</i>	Shokri <i>et al.</i> (2014)



	secreción de IL-17, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ a 93.4, 316.2 y 137.1pg / mL, respectivamente		
--	---	--	--

Citado por Wan *et al.* (2016)

**Efectos contra metales pesados / toxicidad inducida por productos químicos.** Además de su importancia como aditivo alimentario para la proteína dietética suplementaria y la inmunidad innata mejorada, existe un gran potencial para aplicaciones médicas y terapéuticas. Se ha demostrado que la *Spirulina* protege a los animales de los niveles sub-letales de algunos productos químicos. Podría reducir la toxicidad de metales pesados o químicos como Cd (cadmio), aflatoxinas, CCl<sub>4</sub> (tetracloruro de carbono), entre otros. Los estudios sobre las propiedades antitóxicas de *Spirulina* se resumen en la Tabla 1.6.

**Tabla1.6.** Propiedades antitóxicas de la *Spirulina*.

Objeto de estudio	Agente inductor	Efectos específicos	Componente	Referencia
Ratas	Ácido acético	Aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes, inhibe la peroxidación lipídica y los marcadores de inflamación.	<i>Spirulina</i> (500mg/kg de peso corporal)	Abdel-Daim <i>et al.</i> (2015)
Ratas	Cisplatino (CP) (medicamento utilizado para quimioterapia)	Reducir la urea plasmática, la creatinina, la N-Acetilglucosamina (NAG) urinaria, disminuir la tenamfetamina (MDA) del tejido renal y plasmático, prevenir los cambios histomorfológicos	<i>Spirulina</i> (1000mg/kg)	Mohan <i>et al.</i> (2006)
Ratas	CCl <sub>4</sub>	Disminuye el nivel total de colesterol y triacilgliceroles en el hígado.	<i>Spirulina</i>	Torres-Durán <i>et al.</i> (1999)
Ratas	CCl <sub>4</sub>	Incrementa la concentración de enzimas antioxidantes, previene el daño hepático.	<i>A. laxissima</i> (extracto en etanol); <i>Spirulina</i>	Gad <i>et al.</i> (2011)
Rato-nes hembra	Cadmio	Disminuye la frecuencia de fetos con exencefalia (malformación en la cual el cerebro está situado fuera del cráneo), micrognatia (mandíbula muy pequeña) y anomalías en el esqueleto, disminuye la	<i>Spirulina</i> (62.5, 125, 250, o 500 g/kg de peso corporal)	Banji <i>et al.</i> (2013)

		peroxidación lipídica, los productos finales de la peroxidación lipídica pueden ser mutágenos y carcinogénicos (Marnett <i>et al.</i> , 1999).		
--	--	--	--	--

Citado por Wan *et al.* (2016).

**Efectos anticancerígenos.** Una fuerte evidencia ha demostrado que *A. platensis* está vinculada con actividades antitumorales y anticancerígenas. La evidencia de las aplicaciones multidimensionales del contenido de c-ficocianina (C-FC), *A. platensis* se resume en la Tabla 1.7.

**Tabla 1.7.** Propiedades Anticancerígenas de la *Spirulina*.

Objeto de estudio	Efectos específicos	Componente bioactivo	Referencias
Ratones con cáncer de mama	Disminuye la secreción de IL-4 e IL-10, aumenta la secreción de IL-17, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$	<i>A. platensis</i>	Shokri <i>et al.</i> (2014)
Ratas con tumores mamarios inducidos por DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene, poderoso carcinógeno)	Revierte de la progresión del cáncer y la proliferación celular; Depura de tumores mamarios inducidos por DMBA en ratas; reduce la incidencia de tumores de mama del 87% al 13%.	<i>A. platensis</i>	Grawish <i>et al.</i> (2010)
Ratas con tumores implantados genéticamente idénticos (glioma)	Suprime el crecimiento del glioma (masa anormal de tejido) mediante la regulación descendente de la angiogénesis a través de un signatario Toll-like 4	Polisacáridos complejos de <i>Spirulina</i>	Kawanishi <i>et al.</i> (2013)

Citado por Wan *et al.* (2016).

La c-ficocianina principal biliproteína de esta cianobacteria, según Llopiz-Arzuaga (2015), entre las propiedades antioxidantes descritas para esta proteína se encuentran su potente capacidad secuestradora de radicales alcoxilos, hidroxilos y peroxilos, además de reaccionar con el peroxinitrito, es un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2. *A. platensis* tiene efectos que inhiben la proliferación de células tumorales, citado por Wan *et al.* (2016).

**Propiedades antivirales y antibacterianas.** Esta actividad antiviral, en gran parte, es atribuible a la riqueza de *A. platensis* en proteínas vitales, ácidos grasos, minerales y otros

constituyentes importantes. Anteriormente Hayashi *et al.*, (1993) habían encontrado que los extractos acuosos de *A. platensis* inhibían el virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Posteriormente, Ayehunie *et al.* (1998) determinaron que un extracto acuoso de *A. platensis* en concentraciones que no eran tóxicas para las células humanas inhibía la replicación del VIH-1 en líneas de células T. Anteriormente, Los cultivos de microalgas de *A. platensis* han mostrado actividad antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Candida albicans* (Ozdemir *et al.*, 2004; Mendiola *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Sarada *et al.*, 2011; Najdenski *et al.*, 2013), citado por Wan *et al.* (2016).

**Quelación de minerales tóxicos (neutralización de minerales tóxicos).** La *Spirulina* tiene una cualidad única para desintoxicar (neutralizar) o quelar los minerales tóxicos, una característica que aún no está confirmada en ninguna otra microalga (Maeda y Sakaguchi, 1990, Okamura y Aoyama, 1994). La *Spirulina* puede usarse para desintoxicar el arsénico del agua y los alimentos. También puede utilizarse para quelatizar o desintoxicar el efecto venenoso de los metales pesados (minerales) del agua, los alimentos y el medio ambiente. La Universidad de Beijing ha extraído moléculas bioactivas de la *Spirulina* que podrían neutralizar o desintoxicar el efecto tóxico y venenoso de los metales pesados, y que mostró actividad antitumoral. Varias instituciones en China se centran en biomoléculas que muestran propiedades antitumorales, anti-edad y anti-radiación (Liu, Guo y Ruan, 1991; Li y Qi, 1997), citado por FAO Fisheries and Aquaculture Circular (2008).

#### **1.4 Suero lácteo**

Por cientos de años los humanos han hecho uso de la leche y de los derivados de ésta. La industria láctea procesa la leche bronca para convertirla en crema, mantequilla, leche descremada, caseína, queso, yogurt, leche en polvo, entre otros productos.

El suero de leche, suero lácteo o lactosuero es un subproducto del proceso de elaboración de queso y obtención de caseína. Es un líquido acuoso y ligero obtenido después de que la caseína cuajada se separa de la leche. El color del suero de leche depende de la calidad de

la leche utilizada y varía desde un tono amarillo y verde claro a uno azulado. La fuente principal de suero de leche es propiamente de la leche de vaca, sin embargo, muchas industrias lácteas lo obtienen también de leche de cabra, de oveja o de camello. Debido al enorme volumen de producción de la industria láctea, enfrenta en la actualidad un problema sobre el manejo y disposición de los residuos que de ella provienen.

El suero lácteo es la fracción líquida obtenida durante la coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso y de la caseína, después de la separación del coágulo o fase micelar. García-Garibaldy *et al.* (1993) indican que constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles de ésta. Su composición varía dependiendo de las características de la leche y de las condiciones de elaboración del queso de que proceda, pero en términos generales, podemos decir que el suero contiene 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína cruda, 0.6% de cenizas, 0.3% de grasa, 0.2% de ácido láctico y 93.1% de agua. Aproximadamente el 70% del nitrógeno total (proteína cruda), corresponde a proteína verdadera, la cual tiene un valor nutritivo superior a la caseína, y está compuesta por la  $\beta$ -lactoglobulina, la  $\alpha$ -lactoalbúmina, las inmunoglobulinas, la proteosa-peptona y las enzimas nativas; el resto forman aminoácidos, urea, creatina, amoníaco y ácidos nucleicos. Además, el suero contiene las vitaminas hidrosolubles de la leche.

Es un subproducto rico en proteínas globulares hidrosolubles, lactosa, grasas y minerales por lo que constituye una importante fuente de nutrientes para la salud humana y animal. Debido a ello es una de las principales fuentes de contaminación ambiental,<sup>3</sup> de ahí proviene la importancia de su valorización. La mayor parte del suero de leche se deriva de la fabricación de queso y es por ello que contiene pequeñas cantidades de partículas crudas y grasa que debe ser recuperada por razones económicas. Estas partículas son usualmente recuperadas usando tamizadores o filtros rotatorios y pueden ser reprocesados como queso o tratados por separado para producir queso de menor calidad. La separación de grasas se lleva a cabo en separadores por centrifuga similares a los utilizados para separar la crema de la leche. La crema del suero de leche puede ser vendida o batida para producir mantequilla de suero de leche.

### **1.4.1 Clasificación de tipos de suero de leche**

De acuerdo con Ranken *et al.* (1997), el suero lácteo es producido en la fabricación de diferentes tipos de queso y caseína, por lo que para identificar el tipo de suero obtenido pueden clasificarse de la siguiente manera:

- a) Suero lácteo de queso dulce: de la fabricación de quesos coagulados con cuajo con pH de 6.0 a 6.4, por ejemplo, el queso Cheddar.
- b) Suero lácteo ácido de queso: de la fabricación de quesos coagulados a un pH de 4.5 como resultado del ácido láctico producido por bacterias añadidas, por ejemplo, el queso cottage.
- c) Suero ácido de caseína: de la producción de caseína ácida (con un pH de 4.5).
- d) Suero de caseína de cuajo: de la fabricación de caseína a partir de cuajo (con un pH de 6.6).

En vista de las similitudes existentes entre los diferentes tipos de suero, una clasificación más simple únicamente diferencia el suero de leche ácido (suero de leche de queso y suero de leche ácido de caseína) y el suero de leche dulce (suero de leche dulce de queso y suero de caseína de cuajo).

### **1.4.2 Composición del suero de leche**

Por lo reportado por Ranken *et al.* (1997), se sabe que el suero de leche muestra variaciones en su composición dependiendo de la fuente de donde sea obtenido, pero en general se puede considerar que contiene alrededor de 6.5% de sólidos de los cuales 4.8% es lactosa, 0.6% de proteína, 0.6% minerales, 0.15% de ácido láctico, 0.25% de nitrógeno (no procedente de proteínas) y 0.1% de grasa (después de hacer una separación). Por lo tanto, el suero de leche contiene aproximadamente el 50% del total de sólidos de la leche entera.

### **1.4.3 Panorama de la leche en México**

Según el reporte que se presenta en el Panorama de la leche en México, emitido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y el Servicio de Información Alimentaria y Pesquera (SIAP), al segundo trimestre de 2017, la producción de leche de bovino alcanzó 5 mil 670 millones de litros, es decir, 2.1% más que en el mismo periodo de 2016.

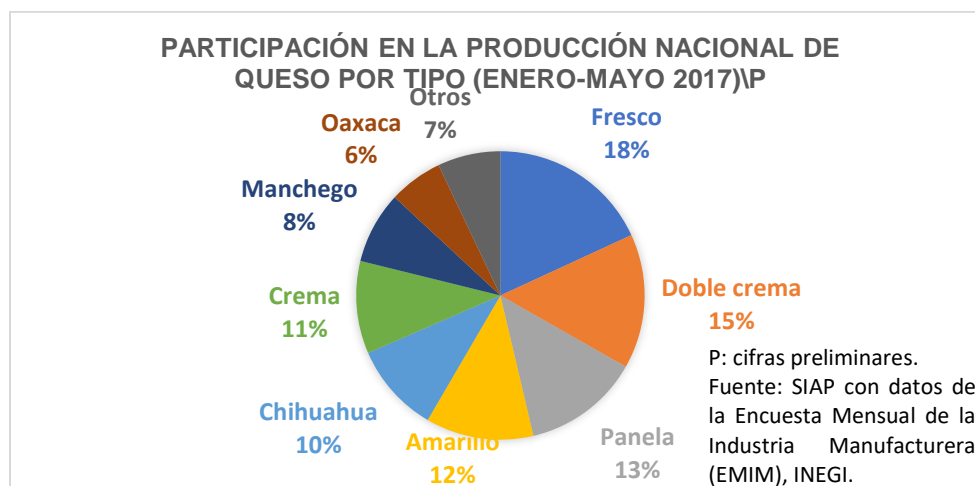
Así mismo, como mes muestra en la Tabla 1.8, el estado de Veracruz ocupa el sexto lugar de producción de leche bovina a nivel nacional. Para el 2017, se estima que la producción de leche sea de 11,730 millones de litros, lo que significa un incremento de 1.1% respecto al año anterior. A junio de 2017, se han obtenido 650,000 litros más por día, que en el mismo trimestre del año pasado.

**Tabla 1.8.** Leche de bovino. Comparativo del avance acumulado. Información a junio de 2017 (miles de litros).

Estado	Junio	
	2016	2017 <sup>p</sup>
Nacional	5,553,151	5,670,086
Jalisco	1,036,918	1,100,438
Coahuila	706,397	648,008
Durango	562,582	589,218
Chihuahua	509,696	522,840
Guanajuato	388,107	393,358
Veracruz	328,207	329,241
Puebla	221,372	222,455
Aguascalientes	199,485	210,605
Hidalgo	204,195	203,172
Chiapas	188,105	198,290
Resto	1,208,086	1,216,461

p: cifras preeliminares, fuente SIAP

Por su parte, la industria de quesos produjo 164,504 toneladas con un valor en el mercado de 8,058 millones de pesos (MDP). Al concluir mayo de 2017, la elaboración de derivados y fermentos lácteos como quesos, crema y yogurt alcanzó un volumen de 469,000 toneladas, con un valor de 19,657 MDP. En la Figura 1.2 se puede observar el tipo de queso producido en el primer trimestre de 2017 y el porcentaje que representa del total de la producción.



**Figura 1.2.** Participación en la producción nacional de queso por tipo (enero-mayo 2017<sup>P</sup>)  
p: cifras preelminares, fuente SIAP

**Tabla 1.9.** Elaboración de derivados y fermentos lácteos, 2009-2017 (toneladas).

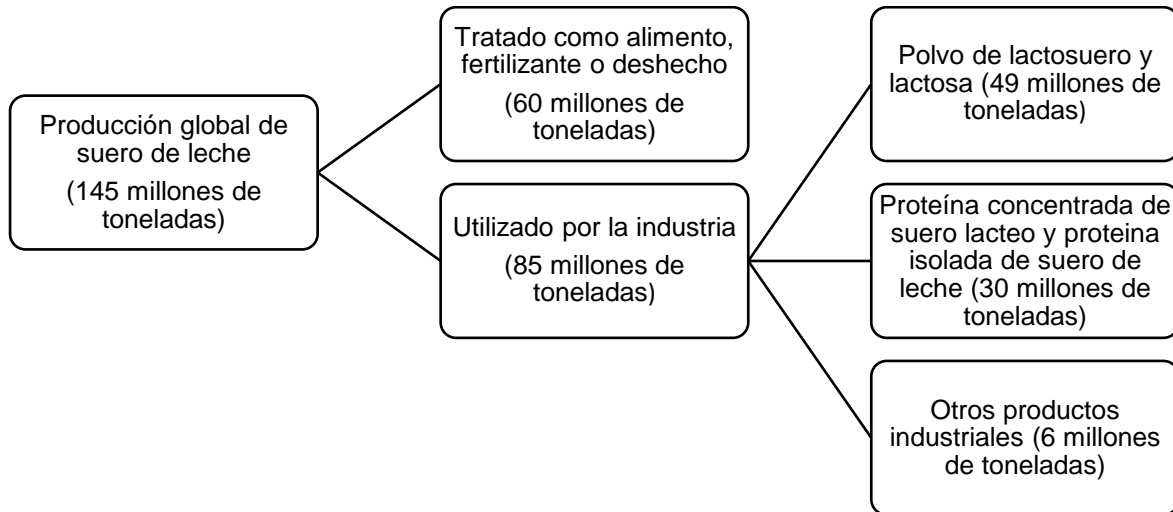
AÑO/MES	QUESO									Total
	Amarillo	Chihuahua	Crema	Doble crema	Fresco	Manchego	Oaxaca	Panela	Otros	
2017 <sup>P/</sup>	7829	6896	6730	8988	11003	5089	4096	8199	4670	63500
Enero	4120	3502	3336	4587	5504	2595	2116	4133	2409	32302
Febrero	3709	3394	3394	4401	5499	2494	1980	4066	2261	31198
2016 <sup>1/</sup>	48675	38772	33384	50559	64826	34393	24366	51239	28967	375181
2015	48201	38394	32761	47837	62345	31504	22513	52632	27084	363271
2014	48049	39712	18778	46056	60913	27627	22061	53315	26359	342870
2013	45750	36939	18586	45420	56096	29940	20961	53799	8065	315555
2012 <sup>2/</sup>	45460	34510	19339	43553	47250	28992	21796	43234	8417	292007
2011	45656	33070	19581	34853	41292	22641	24788	41740	11790	275411
2010	45598	29996	20543	24015	46820	26045	26706	40851	14719	275293
2009	43872	27449	16907	22950	41625	13232	17087	26688	11066	220876

Boletín de la leche en México Enero-Marzo 2017. Nota: Los establecimientos seleccionados realizan actividades económicas cuya cobertura en ingresos fue mayor al 80%.

P/ Cifras revisadas y actualizadas de ene - jul 2016 pero que aún permanecen con carácter de preliminares, y con cifras preliminares a partir de agosto.

1/ Cifras preliminares. 2/ Datos corregidos para el período enero-diciembre de 2012. Fuente: SIAP con datos de la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera (EMIM), INEGI.

### 1.4.5 Riesgo ecológico



**Figura 1.3.** Distribución de la producción y consumo global del suero de leche (Ganju et al, 2017).

Una proporción significativa de los residuos generados por la industria láctea es en forma de suero de leche, lo que crea preocupación por el medio ambiente, especialmente en los países en desarrollo. El problema más importante es su contenido significativo de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), que Ganju et al. (2017) reporta que varía de 35,000-55,000 mg/L. Teniendo en cuenta la gran cantidad de suero producida en todo el mundo (alrededor de 145 millones de toneladas por año), es imprescindible proponer enfoques adecuados que puedan utilizarse para recuperar productos valiosos como lactosa o proteínas y también ayudar a reducir las preocupaciones ambientales. La Figura 1.3 esquematiza las cantidades de suero de leche producidas anualmente a nivel global y los usos que finalmente tiene este subproducto de la elaboración de queso.

Típicamente, las fábricas de quesos pequeñas y medianas están aisladas de las instalaciones centralizadas de tratamiento de aguas residuales, y en algunos casos, están ubicadas al lado de áreas ecológicamente sensibles, lo que aumenta los riesgos ambientales.

### 1.5 Aminoácidos

Los aminoácidos son las unidades más simples de la estructura química común de todas las proteínas. Los aminoácidos se definen como las sustancias orgánicas que contienen grupos



amino y ácido. A excepción de la *glicina*, todos los aminoácidos tienen un carbón asimétrico y exhiben actividad óptica (Wu, 2009).

Los aminoácidos esenciales son aquellos que deben ser provistos por la dieta diaria puesto que el organismo no los sintetiza, o la velocidad en que son sintetizados es muy baja si se compara con la velocidad con que se necesitan. Los aminoácidos esenciales son: *isoleucina*, *leucina*, *lisina*, *metionina*, *fenilalanina*, *treonina*, *triptófano*, *arginina*, *valina* e *histidina*. El organismo no los puede sintetizar y tiene que recibirlos de su alimentación diaria. La función primordial de los aminoácidos que forman a las proteínas es servir de material para la construcción (crecimiento) y el reemplazo (mantenimiento) continuo de las proteínas celulares durante toda la vida. Cuando un alimento contiene proteínas con todos los aminoácidos esenciales, se dice que son de alta o de buena calidad (Hernández *et al.*, 1999).

### **1.6 Fitoquímicos**

Los fitoquímicos son metabolitos secundarios biológicamente activos, no nutritivos que proporcionan a las plantas color, sabor y toxicidad natural a las plagas (Williamson *et al*, 2003). Es bien sabido que las plantas con colores intensificados tienen los más altos niveles de fitoquímicos y nutrientes, como fenoles vegetales, terpenos, alicina, flavonoides, carotenos, pirimidinas, ácidos nucleicos y esteroides que poseen gran potencia en actividades biológicas. En general, las plantas son una fuente de energía barata y al mismo tiempo colosal de diferentes tipos de compuestos químicos naturales con exhaustivos valores medicinales y dietéticos. La compleja mezcla natural de compuestos químicos que se encuentran en las plantas es esencial para los sistemas fisiológicos e inmunológicos humanos con el fin de reducir el riesgo contra una plétora de dolencias y enfermedades comunes (Jeevanandam *et al.*, 2017).

La clasificación de esta enorme gama de compuestos sigue siendo un tema de debate, pero se dividen en tres grupos principales:

- Compuestos fenólicos (incluyendo flavonoides y fitoestrógenos);
- Glucosinolatos;
- Carotenoides.

### 1.6.1 Compuestos fenólicos

Se han identificado muchos miles de compuestos fenólicos. Incluyen monofenoles, el grupo de ácido hidroxicinámico que contiene ácido cafeico y ferúlico, flavonoides y sus glicósidos, fitoestrógenos y taninos. Los flavonoides están ampliamente distribuidos en plantas donde tienen un papel en el color de la planta, el sabor y el olfato.

Algunos tienen propiedades antioxidantes, mientras que otros son fitoestrógenos. Los fitoestrógenos son compuestos difenólicos que ejercen una débil actividad de estrógenos. (Williamson, 2003).

**Flavonoides:** Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos que normalmente se une a uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo. Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular con una estructura genérica, que se combinan con dos anillos aromáticos (anillos A y B), que están conectados con tres átomos de carbono. Debido a la variación en sus estructuras, los flavonoides se han clasificado en otros sustituyentes tales como flavonoles, antocianidinas, flavonas, flavanonas y chalconas. La formación de varios surtidos depende de la presencia de un doble enlace en la posición 4 y entre el segundo y el tercer anillo de carbono. Hasta la fecha, se han identificado y estudiado casi 4000 tipos diferentes de flavonoides. Los flavonoides son ampliamente conocidos por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antialérgicas, actividades hepatoprotectoras y antivirales; y sus acciones protectoras contra los trastornos hepáticos. Además, estos compuestos tienen la capacidad de inhibir ciertas enzimas con el fin de mantener una buena salud mediante la protección contra dolencias crónicas, especialmente enfermedades cardiovasculares (Jeevanandam *et al.*, 2017).

**Glucosinolatos:** Los glucosinolatos se producen ampliamente en las verduras, impartiendo, por ejemplo, el olor acre en la mostaza y el rábano picante.

**Carotenoides:** Los carotenoides comprenden una amplia variedad de compuestos rojos y amarillos, químicamente relacionados con el caroteno, que se encuentran en las plantas. Se han identificado alrededor de 500 carotenoides en frutas y verduras. Incluyen  $\beta$ -caroteno, un precursor de la vitamina A, pero también compuestos no nutritivos como el licopeno y la luteína, citado por Johnson y Williamson (2003).

Los carotenoides, que poseen diferentes estructuras, juegan un papel importante en las plantas y los animales. En las plantas, por ejemplo, las propiedades de absorción de energía de la luz de los carotenoides se han asociado con la promoción de la fotosíntesis, la atracción de polinizadores y la foto-protección. Los estudios epidemiológicos han informado que el consumo mejorado de carotenoides puede reducir los riesgos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, degeneración macular relacionada con la edad y formación de cataratas, citado por Jeevanandam *et al.* 2017.

**Alicina:** Las plantas correspondientes al género *Allium* (como el ajo y la cebolla) se conocen desde hace más de unos miles de años por su olor acre y sus actividades farmacológicas. Las actividades farmacológicas de las especies *Allium*, que rastrean sus raíces hasta los compuestos que contienen azufre biológicamente activo, incluyen actividades antimicrobianas y antiprotozoarias, efectos sobre el metabolismo lipídico (efecto hipolipemiante), hipocolesterémico, lipoxigenasa e inhibición tumoral, efecto antitrombótico, acción de inhibición de la agregación plaquetaria, acción hipoglucémica y efectos olfatorios. Por otro lado, el ajo se ha asociado con propiedades antibacterianas para la prevención de la infección por trauma y el deterioro de los alimentos en la India; tratamiento de la infección pulmonar de combate en Irlanda; y aliviando la infección intestinal en soldados en los estados de los Balcanes, citado por Jeevanandam *et al.* (2017).

**Terpenos:** Los terpenos, en general, son responsables de los fuertes olores de las plantas, que pueden encontrar aplicación en las industrias de perfumería y cosmética. Los terpenos, en general, son responsables de los fuertes olores de las plantas, que pueden encontrar aplicación en las industrias de perfumería y cosmética. a la fecha se conocen alrededor de 36,000 estructuras de terpenos, aunque solo unas pocas han sido estudiadas a fondo. Algunos terpenos (monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, triterpenoides) están asociados con actividades antihelmínticas (antiparasitarias) y proporcionan protección contra el estrés oxidativo, un fenómeno común tanto en las plantas como en los seres humanos, mediante la realización de actividades antioxidantes. También reciben una atención considerable como parte de la dieta humana debido a sus propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antimaláricas, antivirales y antibacterianas, como la prevención de la síntesis del colesterol, citado por Jeevanandam *et al.* (2017).

Existe ahora creciente evidencia que sugiere que los fitoquímicos pueden tener un papel protector contra una variedad de enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares.

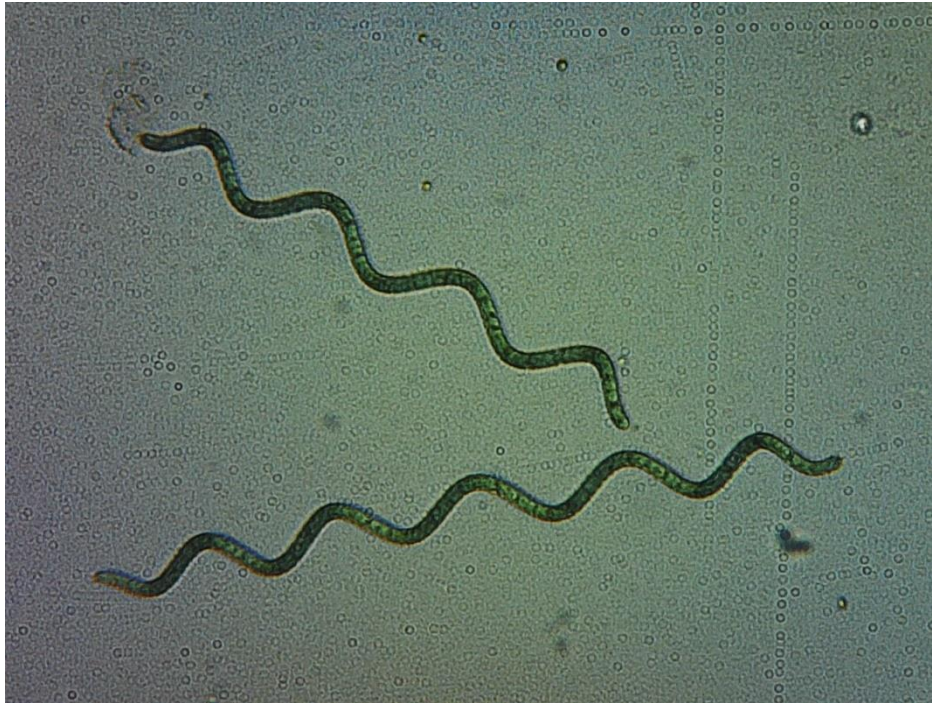
# **CAPÍTULO 2**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material biológico y condiciones de crecimiento inicial

Se utilizó la cepa de cianobacteria *Spirulina platensis* obtenida en UTEX Culture Collection of Algae, de la Universidad de Texas en Austin, con número de identificación UTEX 1926, originaria de San Diego California, aislada por R.A. Lewin en 1969 que puede apreciarse en la Figura 2.1.



**Figura 2.1** *Spirulina platensis* UTEX 1926

El cultivo inicial se mantuvo a temperatura ambiente de  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ , a 1600lux con lámpara de luz de día de 6500K con fotoperiodos de 12 horas controlados por un temporizador electrónico en medio Schlösser modificado basado en el utilizado por Schlösser (1994) y el reportado por Kim *et al.* (2013) con un pH de  $9.35\pm 2$  en un frasco de volumen efectivo de 700mL siendo agitada por una columna de burbujas de aire suministrada por una bomba de aire a una velocidad de 0.5 L/min como se muestra en la Figura 2.2.

El medio de cultivo se preparó con agua desionizada por el sistema de agua ultra-pura de Thermo Scientific Barnstead MicroPure UV/UF; posteriormente el medio fue esterilizado utilizando autoclave a  $150^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos, para después agregarse vitamina B<sub>12</sub> y los

micronutrientes y metales correspondientes (6mL/L de solución de solución de metales y 1mL/L de solución de solución de micronutrientes).



**Figura 2.2** Fase inicial del cultivo

La cepa de *Spirulina platensis* creció en estas condiciones como reserva y utilización como inóculo de la producción en el fotobiorreactor, cambiando el medio de cultivo por cada 15 días para mantener las microalgas en fase de crecimiento.

## **2.2 Condiciones de crecimiento en el reactor**

Se utilizó un inóculo de 50mg/L de *Spirulina platensis* al inicio de cada batch (experimento) de producción de biomasa según lo reportado por Pelizer *et al.* (2003).

El inóculo fue colocado en un fotobiorreactor tubular adaptado que se muestra en la Figura 2.3, con tres orificios de entrada; el primero para permitir la entrada de aire circulado por medio de una bomba para llevar a cabo la agitación, el segundo para permitir la salida de éste,

colocando un arilock para evitar contaminación del cultivo, en la tercera entrada se colocó un termómetro digital para monitorear la temperatura del cultivo, dicha entrada también servía como medio de toma de muestras.

El reactor cuenta con un volumen efectivo de 1500mL. La iluminación del cultivo se consiguió utilizando dos lámparas fluorescentes de 18 pulgadas de la marca GE Lighting, de luz natural 6500K a 1600lux; dicho tipo de lámparas es similar al utilizado por Revolenandro *et al.* (2011), con fotoperiodos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad regulados por un temporizador electrónico. La temperatura del reactor se mantuvo a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

La agitación del medio se llevó a cabo con burbujeo de aire mediante una bomba con flujo de 0.5L/min de aire.

Se tomaron muestras de 20mL en los días 1, 3, 5, y 12 del crecimiento de las microalgas, el día uno se empezó a contar luego de pasadas 24 horas de agregar el inóculo en el medio para dar tiempo a la cianobacteria de adaptarse al nuevo medio.

Se corrieron 4 experimentos en total.

En el primer experimento se utilizó únicamente medio Schlösser como medio de cultivo y será referido como el control.

El segundo experimento utilizó medio Schlösser con un contenido de 2.5% en volumen de suero de leche siguiendo las condiciones utilizadas por Salla *et al.* (2003); en los experimentos 3 y 4 se utilizaron concentraciones de 3% y 5% de volumen de suero en el medio de cultivo respectivamente; el suero utilizado se obtuvo de la producción de queso por lo que se considera ácido y fue donado por la Michigan State University Dairy Store. Antes de ser agregado al medio de cultivo, el suero de leche fue previamente esterilizado en autoclave a  $150^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos.

Una vez pasados los 12 días de crecimiento de las cianobacterias, fueron separadas del medio con el filtro estéril Millipore Express pluss con tamaño de poro de  $0.22\mu\text{m}$  Stericup, para posteriormente ser lavadas con agua desionizada y centrifugadas a 10000rpm.





**Figura 2.3** Fotobiorreactor.

La biomasa seca fue almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización en las diferentes determinaciones descritas a continuación.

### **2.3 Análisis**

Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado utilizando reactivos principalmente obtenidos en el catálogo de SIGMA-ALDRICH y los equipos listados a continuación.

- Espectrofotómetro UV-6300 PC UV-VIS de VWR.

- Medidor de pH Thermo Scientific Orion Star A211.
- Mezclador Analog Vortex Mixer de VWR.
- Ultrasound cleaner de VWR.
- Evaporador de nitrógeno N-EVAP III Organomation Associates Inc.
- Cromatógrafo de gas Shimadzu Gas Chromatograph GC-2010.
- Cromatógrafo de gases/espectrometría de masas Shimadzu [Gas Chromatograph-Mass Spectrometry GCMS-QP210SE](#)
- [Centrífuga Eppendorf Centrifuge 5810R 15 amp](#)

### **2.3.1 pH**

El pH del cultivo se midió en los días en que las muestras fueron tomadas utilizando el medidor de pH de Thermo Scientific Orion Star A211.

### **2.3.2 Crecimiento de biomasa**

El crecimiento de la biomasa se determinó midiendo la densidad óptica (OD) del cultivo los días seleccionados de muestreo en espectrofotómetro a 565nm, utilizando medio Schlösser como blanco.

### **2.3.3 Determinación de contenido total de proteínas**

La determinación del contenido de proteínas se realizó utilizando el kit de determinación de proteínas de la marca Cayman que se basa en el método colorimétrico de Bradford para cuantificar el contenido de proteínas de una muestra.

Previo al uso del kit, se realizó una extracción de proteínas utilizando un método basado en el de Jones *et al.* (1989) y Parimi *et al.* (2015), agregando 1mL de NaOH 0.1N por cada 10mg de masa de *Spirulina platensis*, se mezcló la solución en Vortex durante 2 minutos y centrifugadas a 3985 rpm durante 10 minutos a 20°C. El sobrenadante se utilizó para llevar a cabo la prueba de contenido de proteínas.

Una vez que se llevó a cabo la extracción de proteínas en las muestras, se preparó al mismo tiempo la curva de calibración usando como estándar albúmina sérica bovina (BSA) previamente diluídas en diferentes concentraciones.

Se midió la absorbancia de muestras y el estándar a 595nm en un espectrofotómetro de platos. Los resultados obtenidos fueron cuantificados utilizando la curva de calibración.

#### **2.3.4 Determinación de cenizas totales**

La cantidad total de cenizas fue determinada mediante el método AOAC Official Method 942.05 Ash of Animal Feed.

#### **2.3.5 Determinación del perfil de aminoácidos**

Se realizó un análisis de 19 diferentes aminoácidos incluyendo los 10 considerados como esenciales para el ser humano.

Las muestras de cada experimento se prepararon para poder realizar el análisis de aminoácidos diluyendo 50mg de muestra en 5mL de solvente de extracción (muestra estándar y agua desionizada) para luego ser introducidas en el ultrasound cleaner por media hora y calentadas a 90°C por 30 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente nuevamente y fueron centrifugadas por 5 minutos a 10000rpm para posteriormente ser filtradas en filtros de jeringa Whatman Puradisc de 25 mm.

El análisis de aminoácidos se realizó en un sistema Waters Acquity UPLC interconectado con un espectrómetro de masas cuadrupolo en tándem Waters Quattro Micro. Se inyectaron 10 µl de muestra en una columna Waters HSS-T3 UPLC (2,1 x 100 mm, tamaño de partícula de 1.7 µm) y se separó usando un programa de gradiente de la siguiente manera: comienzo con 100% de solvente A (ácido pefluoroheptanoico 10 mM en agua) y 0 % B (acetonitrilo), mantener a 100% A durante 1.75 min, rampa lineal a 75% B a 8 min, rampa a 90% B a 8.01 min y mantener a 90% B a 9 min, regresar a 100% A a 9.01 min y mantener hasta 13 min. La velocidad de flujo fue de 0,3 mL/min y la temperatura de la columna fue de 40°C. Los aminoácidos fueron ionizados por electrospray operando en modo de iones positivos. El voltaje capilar fue de 3.0 kV, la temperatura de la fuente fue de 120 ° C, la temperatura del gas de desolvatación fue de 350 ° C, el flujo de gas de desolvatación fue de 800 L/h y el flujo de gas de cono fue de 45 L / h. Las áreas pico se obtuvieron usando la función Quanlynx en el software Mass lynx (Waters Corp, Milford, MA). Los estándares internos con etiquetado 13C y 15N fueron de Sigma Aldrich.

### **2.3.6 Cuantificación de clorofila y carotenoides**

La cuantificación de clorofila y carotenoides se realizó en muestras por triplicado de 100mg con 75% de peso de agua. La extracción de estos componentes se realizó agregando 4mL de acetona pura a 4°C. Estas mezclas fueron agitadas por el mezclador Vortex y puesta en el ultrasound cleaner durante 15 minutos para después ser centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 385rpm. El sobrenadante se recuperó se midió su absorbancia en espectrofotómetro a 663, 646 y 470 nm para clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides respectivamente, utilizando acetona pura como blanco de acuerdo con el método descrito por Lichtenthaler *et al.* (2001).

### **2.3.7 Extracto en metanol de *Spirulina platensis***

Se llevó a cabo una extracción en metanol de muestras por triplicado de *Spirulina platensis*, contenido total de flavonoles y contenido fenólico total. Se pesaron muestras de 25mg de masa seca de muestra (100mg de muestra con 75% de contenido de agua); se agregaron 5mL de metanol para posteriormente ser mezcladas en el mezclador Vortex de VWR, y ser puestas durante 30 minutos en el Ultrasonic cleaner de VWR. Por último, las muestras fueron centrifugadas a 385rpm durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante de cada muestra en un tubo Eppendorf limpio de 15mL y se almacenaron a -20°C hasta que se realizaron los análisis mencionados anteriormente.

### **2.3.8 Determinación de la cantidad antioxidante**

Se disolvieron 13.01 mg de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) en 100mL de metanol, se guardó la solución en partes iguales (tubos Eppendorf con 10mL de solución cada uno) a temperatura de -20°C hasta que se llevaron a cabo las determinaciones.

Una vez que el análisis estuvo listo para realizarse, se descongeló un tubo y se añadieron 20mL de metanol, esta solución recibió el nombre de solución de trabajo. Se confirmó que la absorbancia fuera de  $1.1 \pm 0.02$  unidades a 515nm en el espectrofotómetro.

Se mezclaron 100 $\mu$ L de extracto metanólico de *Spirulina* y 1400 $\mu$ L de solución de trabajo por triplicado, se incubaron en un baño de agua a 37°C por 30 minutos. Se determinó la absorbancia de la muestra a 515nm en el espectrofotómetro usando metanol como blanco.

Se utilizó la ecuación 2, para determinar el porcentaje de la actividad antioxidante.

$$\text{Porcentaje de actividad de búsqueda de radicales DPPH} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (2)$$

Los resultados se describieron como mg/L de equivalentes de Trolox, usando una curva de calibración de DPPH en metanol.

### 2.3.9 Determinación del poder de reducción antioxidante del ion férrico (FRAP)

El poder de reducción antioxidante del ion férrico o capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP) se determinó basado en el método utilizado por Wootton-Beard *et al.* (2011).

La solución de reserva necesaria para este análisis se preparó utilizando 10 mL de solución de acetato de sodio ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ) 0.3M. y 90 mL solución de ácido acético 0.3M.

Se disolvieron 15.62 mg de TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine para determinación en espectrofotómetro (of Fe),  $\geq 98\%$ ) en 5mL de ácido clorhídrico 40 $\mu\text{m}$ .

Se mezclaron 25 mL del buffer de acetato pH 3.6, 2.5 mL de solución ácida de TPTZ, 2.5 mL de solución 2 $\mu\text{m}$  de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  para hacer la solución FRAP. Posteriormente, se calentó esta solución y un poco de agua a 37°C.

Se tomaron muestras por triplicado de 100 $\mu\text{l}$  del extracto de *Spirulina platensis* en metanol, se agregaron 700 $\mu\text{l}$  de solución FRAP a 37°C, se incubaron las muestras a 37°C por 4 minutos y se leyeron las absorbancias a 593 nm en el espectrofotómetro utilizando como blanco solución FRAP a 37°C. Las lecturas se tomaron por duplicado y los resultados se reportaron en nm de Fe(III) utilizando una curva de calibración.

### 2.3.10 Determinación del contenido fenólico total

El contenido fenólico de las muestras de *Spirulina platensis* se determinó usando un método basado en el utilizado por Chaovanalikit *et al.* (2004) y Abderrahim *et al.* (2011) utilizando 100 $\mu\text{L}$  del extracto metanólico de *Spirulina platensis*, y se agregaron 500 $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 10 veces (1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 9mL de agua). La muestra se mezcló durante dos minutos en mezclador Vortex y se agregaron 400 $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.7M. se volvieron a mezclar las muestras en vortex y posteriormente se calentaron por 30 minutos a 40°C.

Una vez que las muestras alcanzaron la temperatura ambiente se leyó la absorbancia de las mismas en el espectrofotómetro a 765nm usando como blanco metanol. Los resultados se reportaron mg equivalentes de ácido gálico utilizando una curva de calibración obtenida utilizando diferentes concentraciones de ácido gálico diluido en metanol en lugar de extracto de *Spirulina*.

### **2.3.11 Determinación del contenido de flavonoles**

La técnica utilizada para esta determinación se basó en la descrita por Kumara *et al.* (2007); se mezclaron 435 $\mu$ L de muestra (extracto de metanol) con 435 $\mu$ L de solución AlCl<sub>3</sub> al 2% peso/volumen y 645 $\mu$ L de solución CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na 0.6M. la mezcla se dejó reposar por 150 minutos a 20°C y pos $\mu$ L de solución AlCl<sub>3</sub> al 2% peso/volumen y 645 $\mu$ L de solución CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na 0.6M.

Los resultados se reportaron en equivalentes de quercentin (mg/mL).

### **2.3.12 Determinación del contenido total de lípidos**

Se utilizaron 100mg de muestra con 75% de contenido de agua, se agregaron 5mL de hexano y se mezclaron usando el Vortex, se colocaron las muestras durante 30 minuto en el ultrasound cleaner. Posteriormente, se agregó 1mL de agua desionizada y se volvió a mezclar en el Vortex. Se agregaron 5mL de hexano para luego poner las muestras en el ultrasound cleaner por 30 minutos. Se recuperó la fase no polar de esta mezcla, y de ella se tomaron 2mL de muestra que fueron colocados en tubos de vidrio previamente puestos a peso constante. Dichas muestras se secaron con el evaporador de nitrógeno.

Una vez seca la muestra, fue pesada para determinar la cantidad de lípidos contenidos en la muestra.

### **2.3.13 Determinación del contenido de ácidos grasos**

El siguiente paso fue realizar una metilación como la propuesta por Ryan *et al.* (2007) agregando 1 mL de solución metanólica de NaOH 1M, las muestras fueron calentadas a 100°C durante 15 minutos. Se agregaron 2 mL de trifluoruro de boro, los tubos con la muestra se calentados a 100°C por 15 minutos. Al cabo de este tiempo, las muestras fueron enfriadas con hielo. Se agregó 1 mL de hexano y 1 mL de solución saturada de KCl 1M.

La fase no polar fue recuperada y 300 $\mu$ L de muestra fueron puestos en insertos para ser analizados en el cromatógrafo de gases.

# **CAPÍTULO 3**

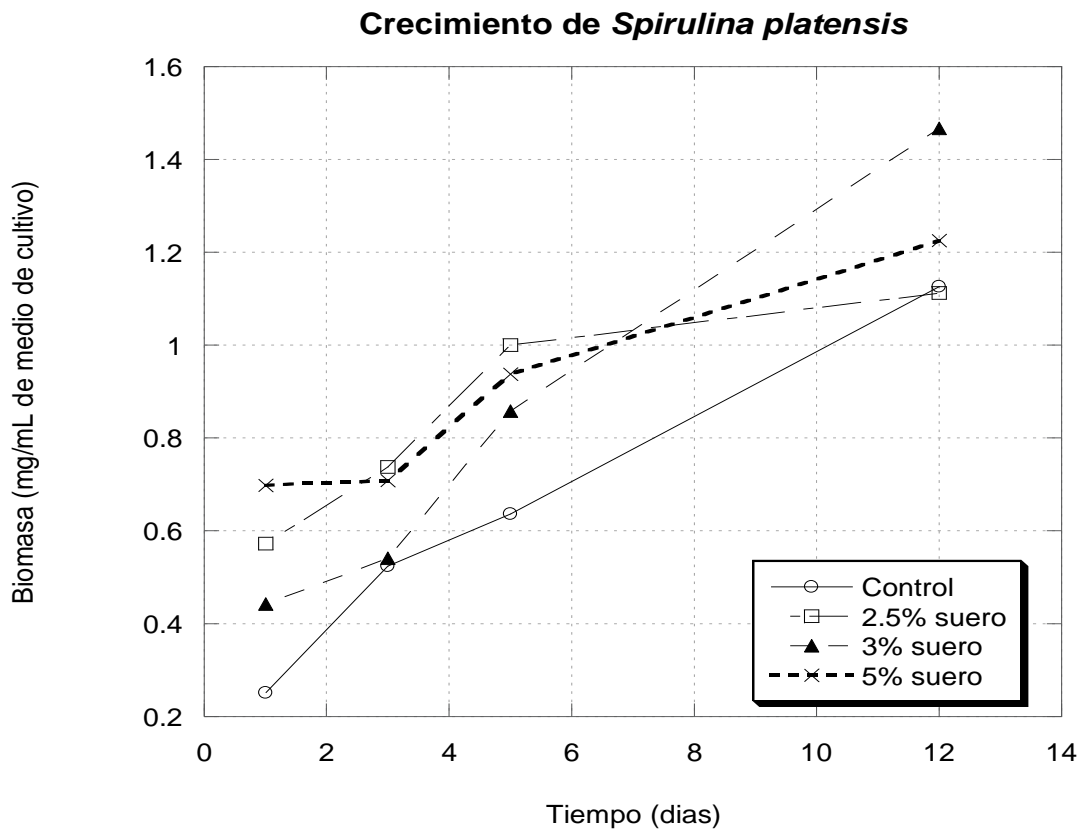
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

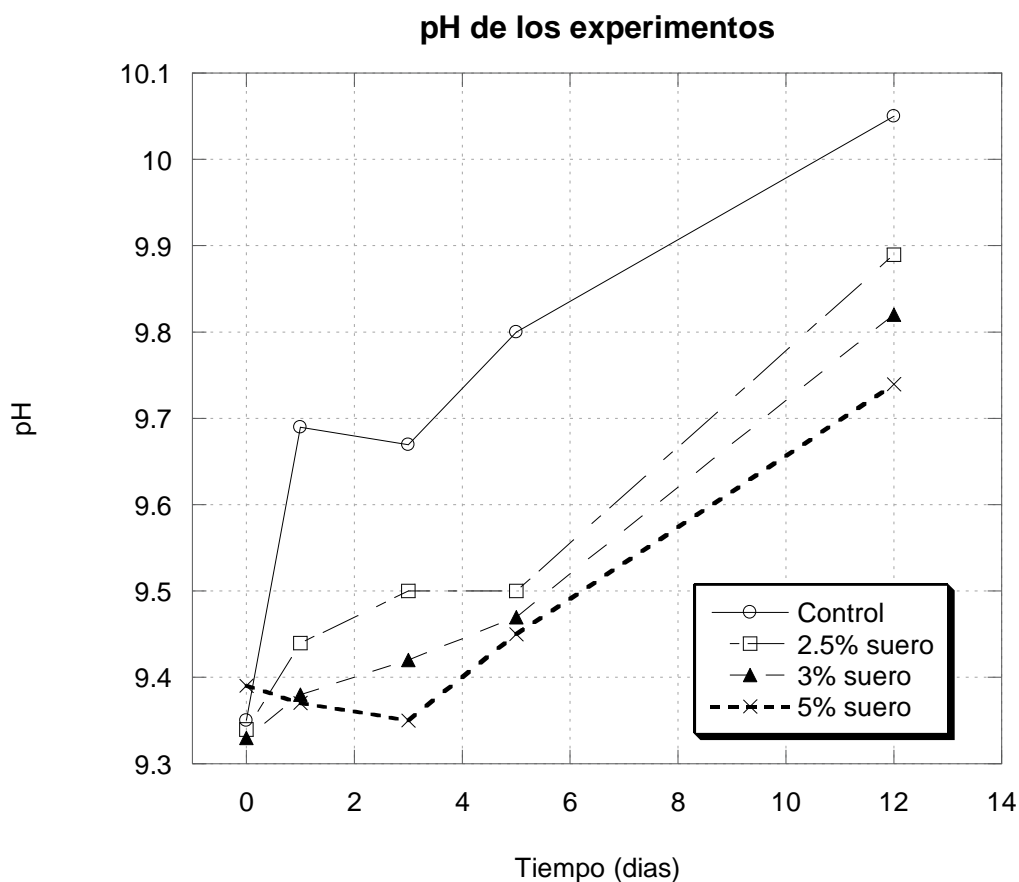
### 3.1 Crecimiento de biomasa y cambio de pH

El crecimiento de la *Spirulina* se muestra en la figura 3.1, ésta fue calculada como se explicó en el capítulo anterior, y se puede apreciar que en el experimento con un contenido de 3% de suero de leche en el medio se observó un mayor crecimiento de la biomasa, contando con un valor al final del día 12 de 1.467mg de biomasa por mL de medio de cultivo, comparado con el control, en el que *Spirulina platensis* creció únicamente en medio Schlösser modificado, alcanzó un valor de  $1.1264 \pm 0.0095$  mg/mL, muy similar al alcanzado en el segundo experimento con 2.5% de suero de leche en el medio de cultivo, cuyo máximo valor fue de  $1.1128 \pm 0.0199$ mg/mL.



**Figura 3.1.** Crecimiento de *Spirulina platensis* en cada uno de los experimentos

Por otra parte, se puede apreciar que si bien, tanto el control como el segundo experimento tuvieron valores similares al final, el crecimiento a lo largo de los 12 días fue más rápido en todos los experimentos donde se añadió suero de leche al medio de cultivo. Así mismo, se observa que hubo un crecimiento menor en la biomasa del primer día de crecimiento que podría deberse a que la cianobacteria tuvo algunas complicaciones para adaptarse a las nuevas condiciones del reactor, sobre todo en el experimento con 5% de contenido de suero en el medio de cultivo, ya que éste era el menos traslúcido, dificultando la exposición a la luz de la cianobacteria.



**Figura 3.2** Cambio de pH contra el tiempo de crecimiento de la *Spirulina platensis*

El aditamento de suero de leche hace que el medio en el que se cultivan las microalgas sea más opaco por lo que su capacidad para estar en contacto con la luz y de esta forma llevar a cabo su función fotosintética podría verse afectada, pudiendo provocar la muerte de la

cianobacteria, sin embargo con los resultados obtenidos mediante los cuatro experimentos, se puede concluir que éste no es el caso, al menos para las concentraciones estudiadas.

En cuanto al cambio de pH que experimentó el medio se muestra en la Figura 3.2, se observa que fue mayor en el control, sin embargo esta diferencia no es significativa, por otra parte, es importante que este parámetro sea controlado debido a que esta alga crece únicamente en pH alcalino y esto a su vez evitará que el cultivo se contamine de otras microalgas debido a que la mayoría crece en pH con valores más bajos y la adición del suero de leche disminuye el valor del pH inicial.

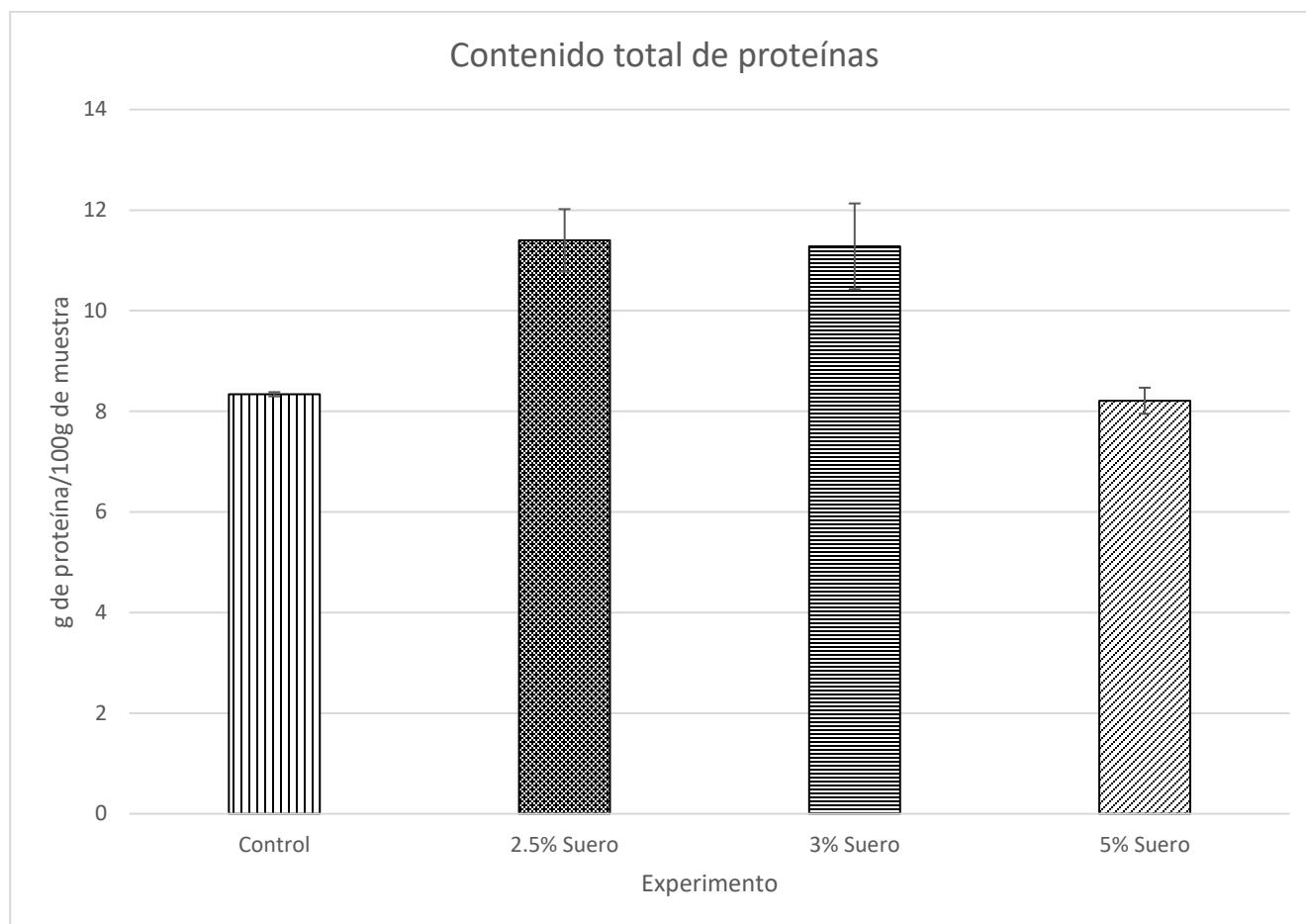
El análisis estadístico mostró que la diferencia de pH no es significativa, sin embargo el crecimiento de biomasa si demostró ser significativamente diferente.

### **3.2 Contenido total de proteína**

El contenido de la proteína aumentó al agregarse concentraciones bajas de suero de leche, en este caso 2.5% y 3% de suero en volúmen total del medio, sin embargo, al aumentar el contenido de suero en el medio a 5%, las proteínas totales de las muestras bajan nuevamente a concentraciones similares al control.

La Figura 3.3 muestra claramente este comportamiento, no teniendo diferencias significativas entre experimentos 2 y 3.

Al realizar el secado de las muestras para realizar este análisis se observó la aparición de una sustancia azul, que por lo encontrado por Glazer (1989) se trata de ficocianina, el pigmento natural que da la coloración característica de la *Spirulina platensis*.



**Figura 3.3.** Contenido total de proteínas en cada experimento.

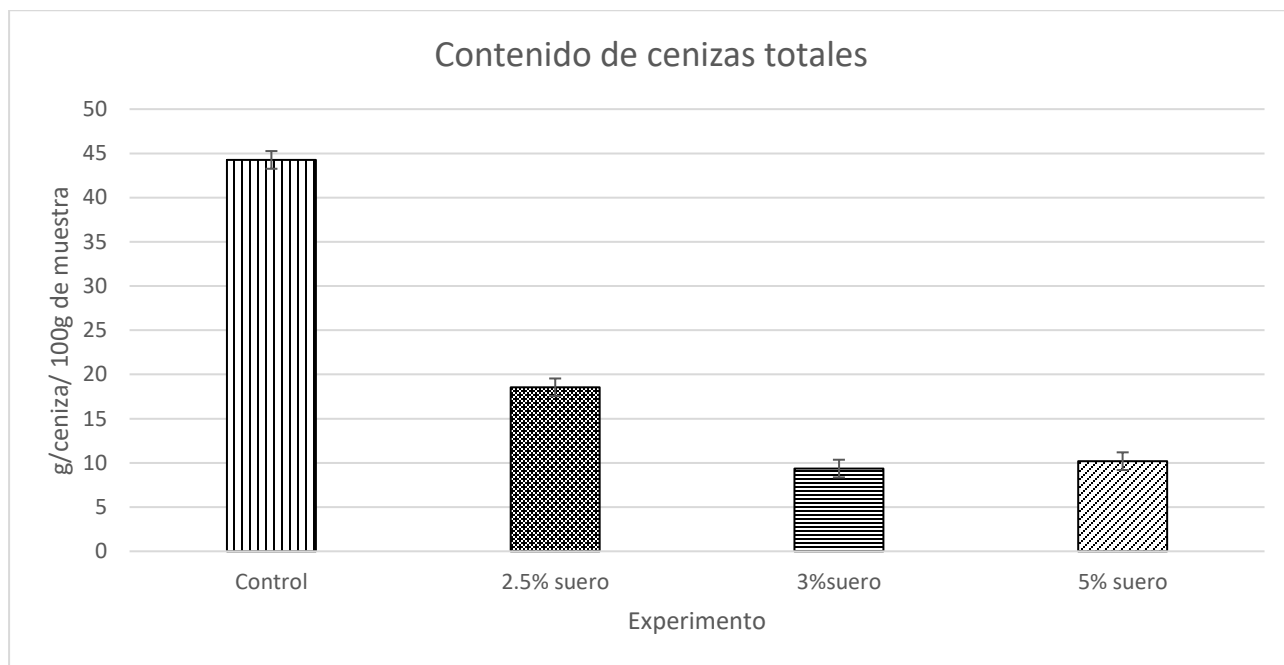
### 3.3 Contenido total de cenizas

Ceniza se refiere a cualquier material inorgánico, como minerales, presentes en los alimentos, pueden incluir tanto compuestos con minerales esenciales como el calcio y el potasio, como materiales tóxicos como el mercurio.

Los resultados del control de las cenizas totales son similares a las reportadas por Vidal *et al.* (2006) para la macro-alga *Bryothamnion triquetrum* (43%), sin embargo, los resultados de los experimentos a los que fue agregado suero son más similares a los encontrados para vegetales en general.

La Figura 3.4 muestra los resultados de cenizas totales de los cuatro experimentos, la alta concentración del control puede deberse a la alta cantidad de metales y micronutrientes

inorgánicos que pueden haber quedado de residuo del medio de cultivo Schlösser, mismo que fue utilizado en menor concentración en los demás experimentos.



**Figura 3.4.** Contenido total de cenizas

### 3.4 Perfil de aminoácidos

Los aminoácidos son la unidad principal que forman las proteínas, en la determinación del perfil de aminoácidos se determinaron los 10 aminoácidos esenciales y 9 no esenciales. Son considerados aminoácidos esenciales aquellos que el cuerpo humano no puede sintetizar o que no lo hace suficientemente rápido para poder cumplir con los requerimientos diarios.

Las concentraciones de aminoácidos no tienen variaciones significativas comparando los tres primeros experimentos, sin embargo el experimento 4 con 5% de suero presenta concentraciones más bajas en todos los casos.

En el caso particular de la leucina, que es un aminoácido usado en el hígado, tejido adiposo, y tejido muscular (en los dos últimos casos para la formación de esteroides), se puede observar que es más elevado que el resto de los demás aminoácidos. En el experimento con 3% de contenido de suero se aprecia que la concentración es superior a la de los otros experimentos, que coincide con el aumento en la cantidad de proteína total en este experimento.

Por otra parte, los aminoácidos encontrados en menor concentración fueron el Triptófano y la Histidina; el primero es esencial para promover la liberación de la serotonina, involucrado en la regulación del sueño y el placer, por su parte la histidina consiste en un aminoácido que encontramos de forma abundante en la hemoglobina.

**Tabla 3.1.** Concentración de aminoácidos esenciales por gramo de muestra.

Aminoácidos (mg/g)					
Experimento	Treonina	Metionina	Arginina	Histidina	Lisina
Control	1.48 ± 0.2727	1.087 ± .0436	2.04 ± 0.0294	0.57 ± 0.0145	2.42 ± 0.059
2.5% Suero	1.538 ± 0.0722	1.09 ± 0.0497	1.99 ± 0.0624	0.5 ± 0.008	1.54 ± 0.044
3% Suero	1.52 ± 0.2032	0.742 ± 0.205	2.13 ± 0.781	0.4 ± 0.102	2.3 ± 0.459
5% Suero	0.36 ± 0.0393	0.22 ± 0.0106	0.95 ± 0.081	0.184 ± 0.0042	0.9 ± 0.018
	Triptófano	Valina	Fenilalanina	Isoleucina	Leucina
Control	0.578 ± 0.0376	2.32 ± 0.049	2.43 ± 0.029	1.72 ± 0.233	6.63 ± 0.266
2.5% Suero	0.585 ± 0.0483	2.66 ± 0.024	2.82 ± 0.0045	1.75 ± 0.1258	6.6 ± 0.2006
3% Suero	0.41 ± 0.0505	3.47 ± 1.52	3.57 ± 1.922	2.044 ± 0.7386	9.8 ± 5.9
5% Suero	0.147 ± 0.0057	0.62 ± 0.041	0.589 ± 0.017	0.41 ± 0.083	1.31 ± 0.044

Los aminoácidos no esenciales, que son aquellos que el cuerpo humano es capaz de sintetizar por sí mismo, se encuentran expresados en la Tabla 3.2 y se observa un considerable aumento de ácido glutámico que es uno de los aminoácidos más activos metabólicamente. El ácido glutámico es uno de los aminoácidos más abundantes del organismo y un comodín para el intercambio de energía entre los tejidos. Se considera un aminoácido no esencial porque se puede sintetizar en muchos tejidos, teniendo un papel fundamental en el mantenimiento y el crecimiento celular.

El aminoácido que se encuentra en menor concentración en las muestras es la prolina que está involucrada en la producción del colágeno. Está también relacionada con la reparación y mantenimiento de los músculos y los huesos. Los resultados obtenidos se muestran similares a los mostrados en la Tabla 1.2 en aminoácidos como la Lisina, Fenilalanina y Metionina, en casos como la Prolina, la Seina, Arginina e Histidina se ve una disminución en la concentración en todos los casos.

**Tabla 3.2** Concentración de aminoácidos no esenciales por gramo de muestra.

Aminoácido (mg/g)					
Experimento	Asparagina	Ácido aspártico	Ácido glutámico	Glutamina	Glicina
Control	0.7288 ± 0.052	0.768 ± 0.053	6.041 ± 0.135	1.16 ± 0.0717	1.33 ± 0.081
2.5% Suero	0.7765 ± 0.031	1.0049 ± 0.0415	11.0258 ± 1.460	1.06 ± 0.057	1.96 ± 0.279
3% Suero	0.4398 ± 0.097	0.505 ± 0.1268	41.077 ± 17.25	1.42 ± 1	2.77 ± 0.598
5% Suero	0.2179 ± 0.001	0.2518 ± 0.0208	1.4964 ± 0.020	0.21 ± 0.0208	0.4 ± 0.0536
	Serina	Alanina	Tirosina	Prolina	
Control	1.132 ± 0.0724	5.5 ± 0.0844	1.72 ± 0.371	0.59 ± 0.0007	
2.5% Suero	0.898 ± 0.0629	5.96 ± 0.091	1.71 ± 0.0004	0.6 ± 0.0412	
3% Suero	1.013 ± 0.3899	16.53 ± 5.77	1.81 ± 0.6905	0.7 ± 0.2	
5% Suero	0.270 ± 0.0619	2.08 ± 0.665	0.34 ± 0.0393	0.18 ± 0.12	

### 3.5 Perfil de fitoquímicos

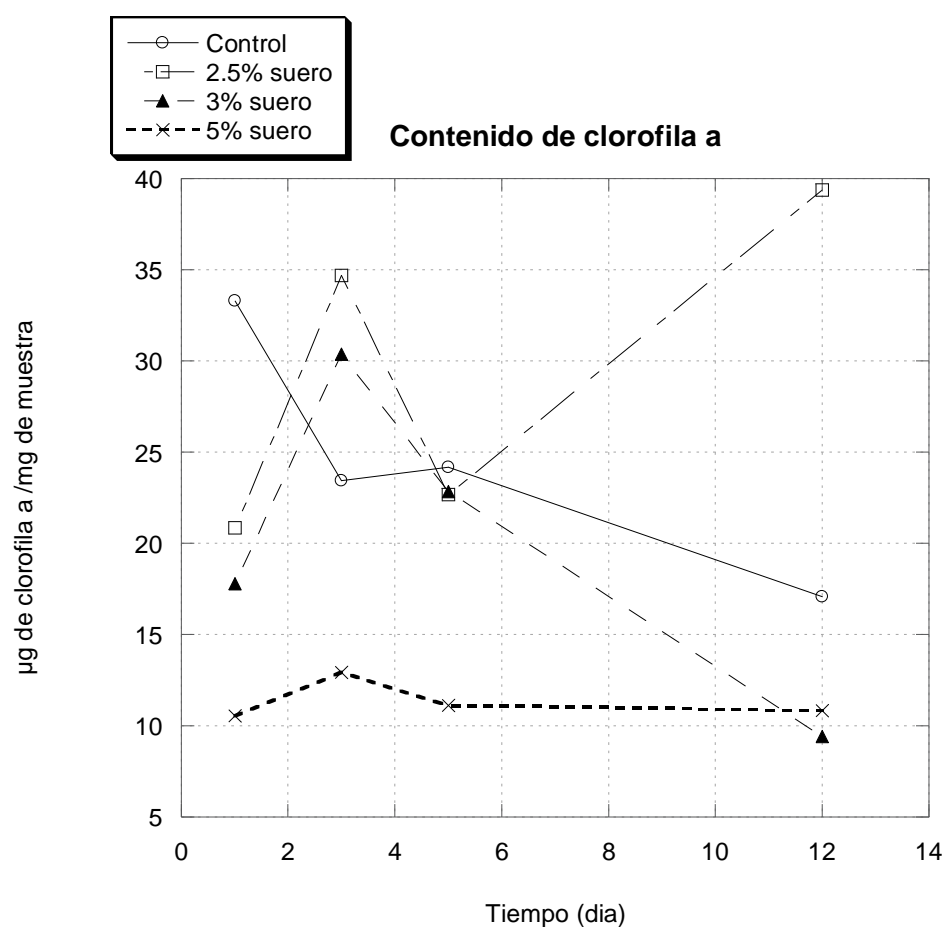
#### 3.5.1 Clorofila y carotenoides

La clorofila es el pigmento verde se encuentra en plantas que les permite convertir la luz solar en energía utilizable a través de un proceso llamado fotosíntesis. Más específicamente, las moléculas de clorofila se describen como fotorreceptores, debido a sus propiedades de absorción de la luz. Hay dos tipos principales de la clorofila, llamados clorofila a y la clorofila b. Estas dos moléculas de clorofila diferentes se caracterizan por su estructura química variable y la luz infrarroja específica que absorben.

La clorofila a es el pigmento fotosintético más utilizada y absorbe las longitudes de onda azul, rojo y violeta en el espectro visible. Participa principalmente en la fotosíntesis oxigénica en el que el oxígeno es el principal subproducto del proceso. Todos los organismos fotosintéticos

oxigénicas contienen este tipo de clorofila e incluyen casi todas las plantas y la mayoría de las bacterias. La clorofila b absorbe principalmente luz azul y se utiliza para complementar el espectro de absorción de la clorofila a, ampliando el rango de longitudes de onda de la luz de un organismo fotosintético es capaz de absorber.

La concentración de la producción de clorofila a en todos los casos es mucho mayor que el de la clorofila b, esto se debe a que la segunda está más relacionada a algas verdes y algunas cianobacterias específicas conocidas como cloroxibacterias.



**Figura 3.5** Comportamiento de concentración de clorofila a

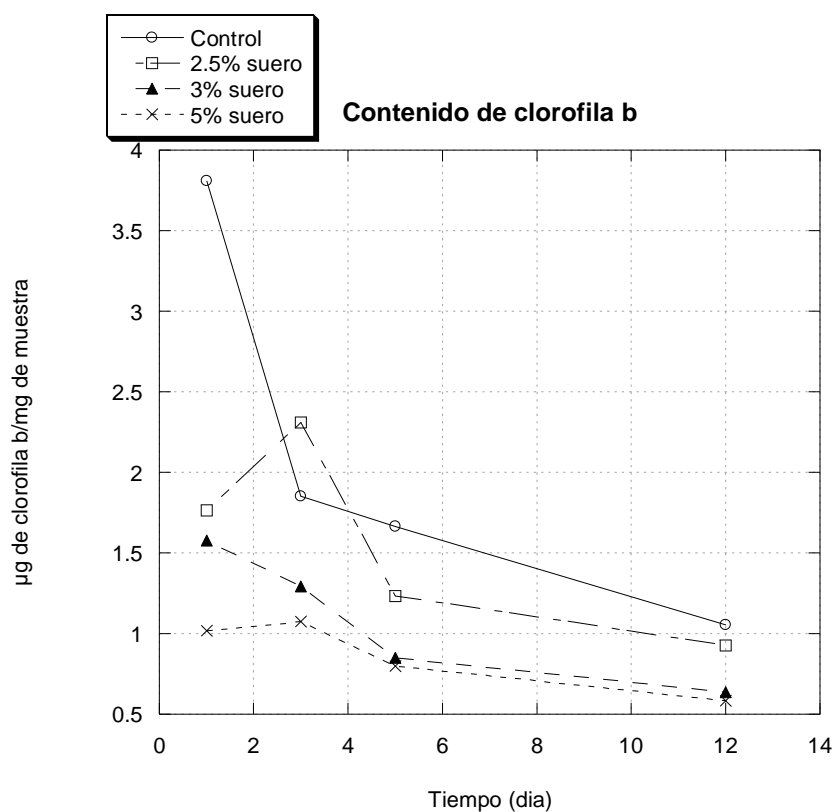
Desde el inicio del crecimiento de la *Spirulina platensis* se observa en las Figuras 3.5 y 3.6 que la concentración de clorofila a supera a la de clorofila b, con el paso de los días se observa que la clorofila b tiende a descender en cuanto mientras que la clorofila a aumente para el



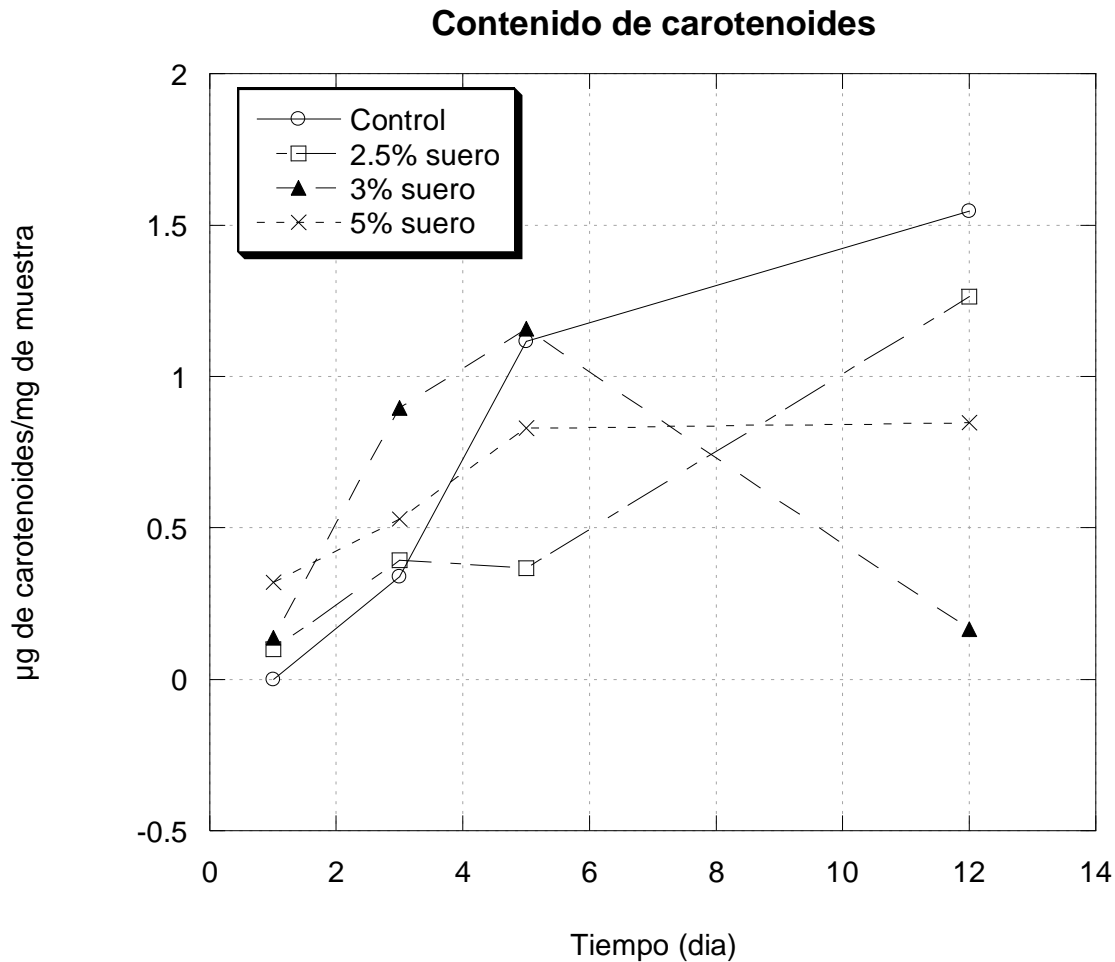
experimento 2 (2.5% suero) y se mantiene estable para el experimento 4 (5% de suero), sin embargo tanto en el control como en el experimento 3 (3% suero) la concentración de este componente tiende a decender. El cálculo del crecimiento de la *Spirulina platensis* tiende a relacionarse con la concentración de este tipo de clorofila.

Por su parte, la clorofila b, pese a la relativamente alta concentración que mostró al inicio del experimento control, en los demás casos se muestra sin cambios significativos.

La concentración de carotenoides (Figura 3.7) tiende a aumentar con el paso del tiempo en el control y el experimento 2, teniendo mayor concentración el día 12 del control. En el caso del experimento 3, se muestra un descenso de estos compuestos al acercarse el día 12, que coincide con el comportamiento observado en la clorofila a, por otra parte, en el experimento 4 (5% suero) se observa que la concentración se estabiliza y mantiene a partir del día 5 del experimento.



**Figura 3.6** Comportamiento de concentración de clorofila b



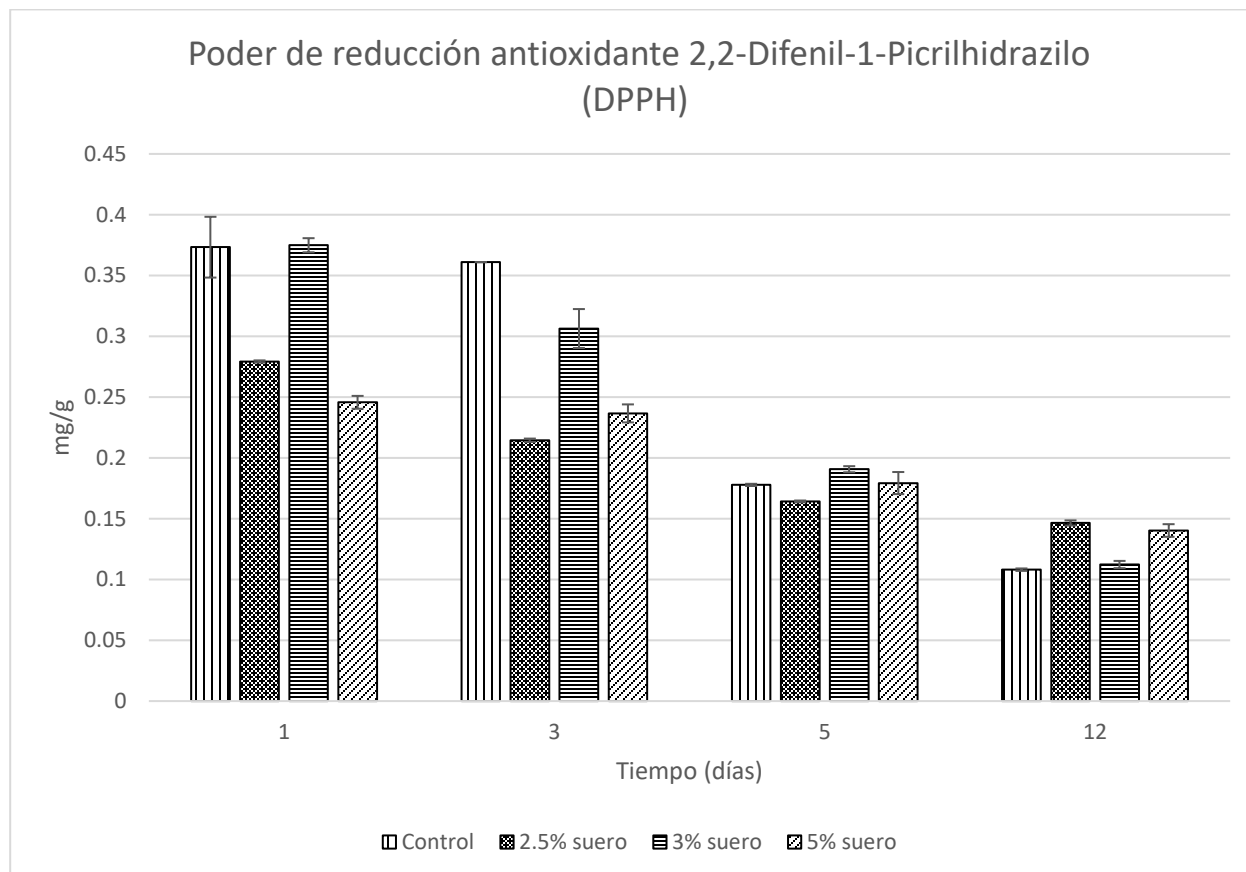
**Figura 3.7** Comportamiento de la concentración de carotenoides

### 3.5.2 Contenido de antioxidantes totales y del poder de reducción antioxidante del ión férrico (FRAP) y poder de reducción antioxidante 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. Según Clarkson, (1995), la medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante. Usualmente los ensayos antioxidantes in vitro utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de

captación de radicales libres, el método 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo DPPH es el más rápido y simple.

En la Figura 3.8 se observa que no hay diferencias significativas entre los experimentos en la concentración de radicales libres en cada día, sin embargo, se observa una disminución en los mismos al transcurrir el tiempo.

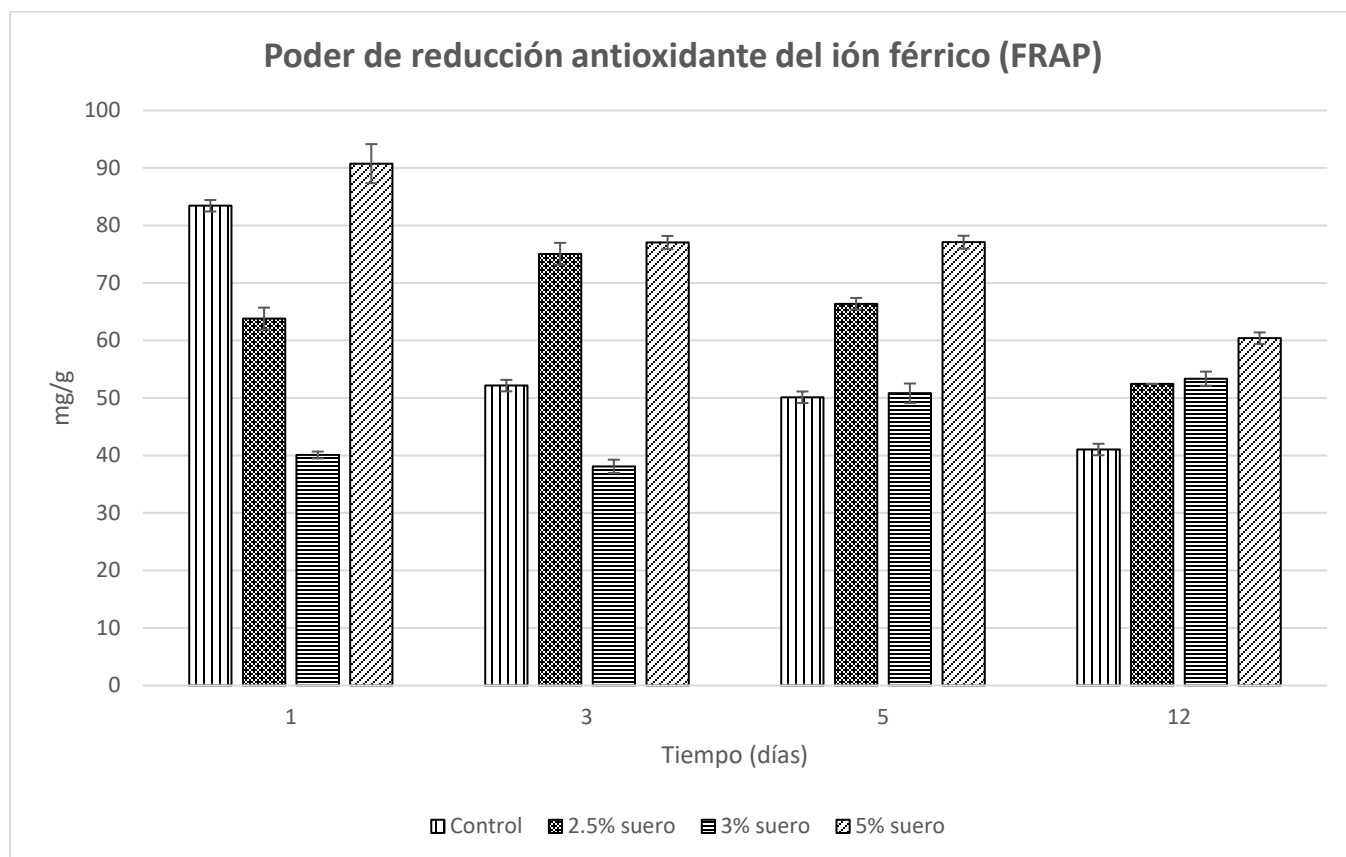


**Figura 3.8** Poder de reducción antioxidante 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

El poder antioxidante mediante la prueba FRAP se mantiene estable con el paso del tiempo, la concentración de este punto se calcula utilizando como estándar Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) que es un análogo de la vitamina E soluble en agua.

La determinación de la actividad antioxidante lleva gran importancia debido a los muchos beneficios que se han descubierto en esta especie. En la Figura 3.9 se puede observar que

los valores cuantificados entre 50 y 80 mg/g de muestra. Sin embargo para el experimento 3 (3% suero) se tienen los valores más bajos de dicha actividad.



**Figura 3.9** Poder de reducción antioxidante del ión férrico

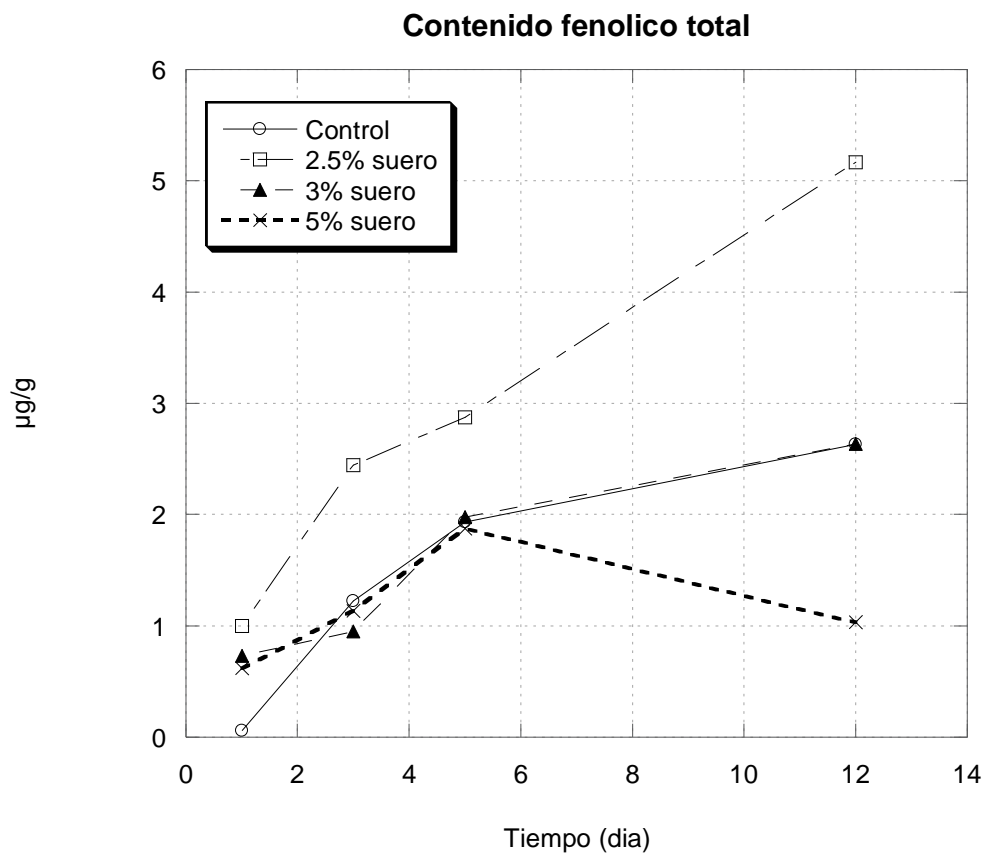
### 3.5.3 Contenido fenólico total

Las concentraciones más altas de contenido de fenoles totales se alcanzaron en el segundo experimento (tabla 3.3), siendo similares los resultados del experimento 1 y 3, sin embargo, el experimento 4 muestra un valor menor al final de la cinética de éste.

Se puede observar en la figura 3.10 que el comportamiento de crecimiento cinético de este tipo de compuestos fue muy similar en todos los experimentos únicamente difiriendo en el último día en el experimento 2 (2.5%) y en el experimento 4 (5% suero).

**Tabla 3.3** Concentración del contenido total de fenoles

$\mu\text{g}$ de fenoles por g de muestra de <i>Spirulina</i>				
Tiempo (días)	Experimento			
	Control	2.5% suero	3% suero	5% suero
1	0.0598± 7E-05	1.0016± 0.805	0.732± 0.009	0.6176± 0.004
3	1.222 ± 1E-05	2.447± 0.0299	0.9505± 0.154	1.134± 0.088
5	1.937± 9.2E-06	2.874± 0.242	1.979 ± 0	1.874± 0.082
12	2.632± 7E-05	5.168± 0.066	2.6369 ± 0	1.0326± 0.026

**Figura 3.10** Cinética de contenido total de fenoles

### 3.5.4 Contenido total de flavonoles

Los flavonoles, que son un tipo de compuesto fenólico, presentan un comportamiento estable a lo largo de la cinética de estos experimentos (Tabla 3.4), sin embargo se observa que tienen valores mayores para el experimento 3, a pesar de no haber sido el que presentaba mayor cantidad de compuestos fenólicos totales.

**Tabla 3.4** Concentración de flavonoles

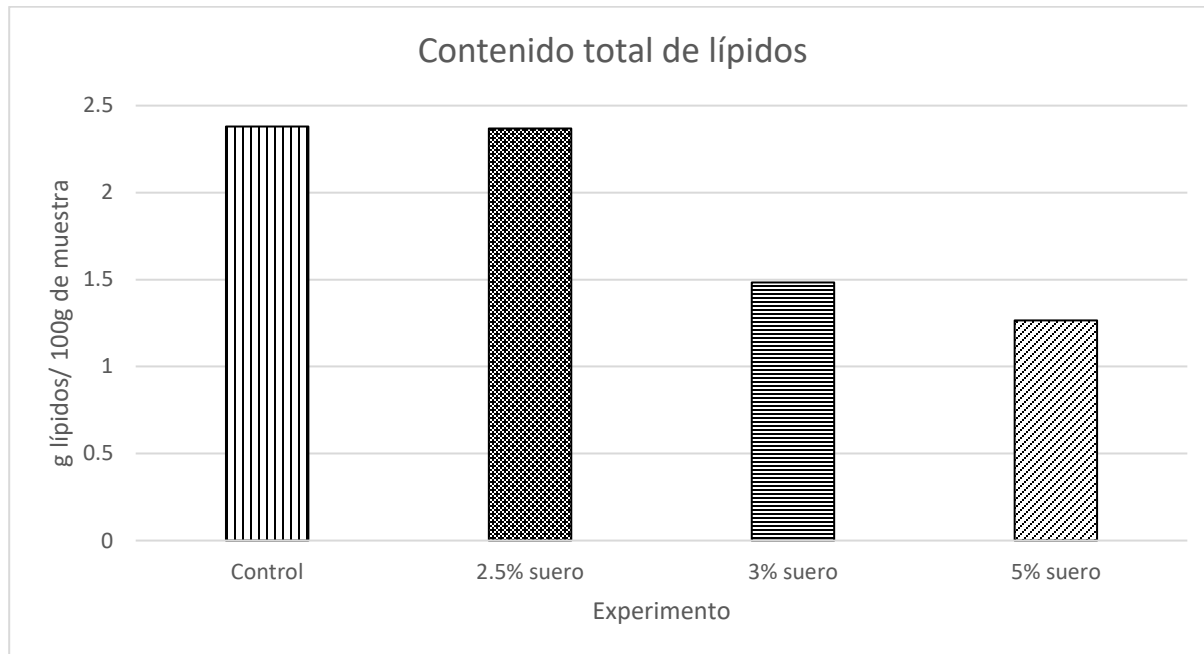
µg de flavonoles por g de muestra de <i>Spirulina</i>				
Tiempo (días)	Experimento			
	Control	2.5% suero	3% suero	5% suero
1	0.0227± 0.0002	0.0137± 0.0007	0.0308± 0.0008	0.0182± 0
3	0.0203± 0.0009	0.0226± 0.00015	0.0407± 0.0007	0.0212± 0.00014
5	0.0203± 0.0015	0.0212± 5 E-05	0.0321± 0.0024	0.0273± 0.0004
12	0.0233± 0.0007	0.0228± 3.8E-05	0.0237± 0.0008	0.01509± 0.0007

### 3.6 Contenido total de lípidos

La cantidad de lípidos que muestra la literatura es de alrededor de 7g/100g, en este caso, cantidad calculada dio resultados menores, y mientras más aumentaba la concentración de suero utilizada en el medio de cultivo, se observa que la cantidad de lípido desciende (Figura 3.11) por lo que este tipo de cultivo no favorece la producción de lípidos con los valores más altos de suero de leche agregado en el medio de cultivo. No hay diferencia significativas entre el control y el experimento con 2.5% de suero de leche, así como entre los experimentos con 3% y 5% de suero de leche añadido al medio de cultivo.

La concentración de lípidos encontrada en las muestras y la cantidad de muestra disponible hizo que no fuera posible que se pudiera realizar la cuantificación de lípidos totales en cada

uno de los diferentes días en los que se tomaron las muestras sin que esto comprometiera la veracidad de los resultados por lo que se utilizaron únicamente las muestras al final de cada experimento (después de 12 días)



**Figura 3.11** Contenido total de lípidos

### 3.6.1 Contenido de ácidos grasos

El contenido de ácidos grasos fue cuantificado mediante cromatografía de gas. Del contenido total de ácidos grasos se desglosa en tres diferentes categorías: ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados los cuales están cuantificados en cuanto a cantidad total de éstos, mismo que se muestra en la Tabla 3.5.

El experimento de control mostró una concentración de ácidos grasos saturados significativamente mayor comparado con el experimento 2 (con 2.5% de suero). Por otra parte, el experimento 2 muestra una proporción mayor de ácidos grasos poliinsaturados. En todos los experimentos donde fue agregado el suero de leche al medio de cultivo la proporción de ácidos grasos monoinsaturados aumentó. A pesar de que los ácidos grasos monoinsaturados son más comúnmente encontrados en alimentos de origen animal, también pueden ser

encontrados en altas concentraciones en aceites vegetales como lo demostró *Abdullah et al. (2017)* teniendo un 75% de ácidos grasos monoinsaturados.

**Tabla 3.5** Contenido de ácidos grasos

Experimento	Ácidos grasos saturados (%)	Ácidos grasos monoinsaturados (%)	Ácidos grasos poliinsaturados (%)
Control	61.3 ± 2.3	7.1 ± 0.1	29.8 ± 3.1
2.5% Suero	32 ± 3.3	24.9 ± 1.1	43.1 ± 2.2
3% Suero	50.2 ± 1.8	20.2 ± 2.2	29.5 ± 0.4
5% Suero	42.9 ± 0.2	38.1 ± 0.2	19.1 ± 0.0



# **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las condiciones de cultivo óptimas para la cianobacteria *Spirulina platensis* obtenidas en esta investigación fueron a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ , a 1600lux con lámpara de luz de día de 6500K con fotoperiodos de 12 horas, con una agitación de burbujeo con flujo de aire de 0.5L/min, lo cual dio una concentración máxima de 1.46709 mg de alga seca por mL de medio de cultivo utilizando 3% de suero de leche en el medio de cultivo después de 12 días.

Sin embargo, *Spirulina platensis* puede crecer exitosamente en medio de cultivo Schlösser adicionado con diferentes concentraciones de suero de leche, aumentando su concentración de proteínas al agregar 2.5% o 3% de contenido de suero al medio de cultivo.

En cuanto al perfil de aminoácidos, se observa una concentración mayor en el experimento con 3% de suero de leche sin embargo esta diferencia no es significativa con respecto al resto de estos.

La producción de clorofila a se vio beneficiada con la concentración de 2.5% de suero de leche en el medio de cultivo, sin embargo, no se encontraron cambios ni en la producción de clorofila b ni en la de carotenoides.

Por otra parte, la producción de lípidos no se ve favorecida en los experimentos con 3% y 5% de suero de leche en el medio de cultivo, por lo que habría que ponderar las concentraciones que debe tener esta especie de microalga para poder ser factible su uso en la producción de biocombustibles como el biodiesel.

Los resultados obtenidos muestran que el agregar concentraciones bajas de suero de leche al medio de cultivo pueden propiciar la producción de ciertos químicos finos que se recomienda investigar más profundamente en una investigación futura ya que esto puede dar un valor agregado al cultivo de esta cianobacteria.

Así mismo, se recomienda que en futuras investigaciones se utilice ya sea un mayor volumen de trabajo o mayor concentración de inóculo al iniciar el experimento para que sea posible obtener resultados leíbles de ciertos análisis tales como la concentración de

proteína en cada día que se tomaron muestras ya que la baja concentración de biomasa en las muestras de los primeros días hacía imposible que los equipos dieran una lectura veraz de estos análisis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abderrahim F., Estrella S., Susi C., Arribas SM, González MC, Condenzo-Hoyos., / (2011). The antioxidant activity and thermal stability of Lemon Verbena Infusion. *J. Med Food*. **14** (5): 517-27.
- Abdullah MM, Jew S, Jones PJ (2017). "Health benefits and evaluation of healthcare cost savings if oils rich in monounsaturated fatty acids were substituted for conventional dietary oils in the United States". *Nutrition Reviews* **75**(3) 163-174*
- Badui-Dergal S. (2012) Química de los alimentos. 5ª ed. Grupo Hernández S.A. de C.V. México.
- Brennan L. and Owende P. (2010) Biofuels from microalgae– A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14** (2): 557-5577.
- Chen Y., Kao P., Chung Hong Tan, Pau Loke Show, Wai Yan Cheah, Wen-Lung Lee, Tau Chuan Ling and Jo-Shu Chang (2016) Using an innovative pH-stat CO<sup>2</sup> feeding strategy to enhance cell growth and C-phycoyanin production from *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal* **112** 78-85.
- Coca M., Barrocal V.M., Lucas., González-Benito G., García-Cubero M.T., (2015). Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and Byproducts Processing*, **94**: 306-312.
- CONAGUA (2016) Estadística del agua en México, Edición 2016 [http:201.116.60.25/publicaciones/EAM\\_2016.pdf](http:201.116.60.25/publicaciones/EAM_2016.pdf) (consultada en Octubre, 2017)

- Chaovanalikit A., Wrolstad R.E. (2004) Total Anthocyanins and Total Phenolics on Fresh and Processed Cherries and their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science* **69** (1): FCT67-FCT72.
- El-Kassas H.Y., A.M.M. Heneash, N.R. Hussein. (2015). Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using confectionary wastes for aquaculture feeding. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **13**: 145–155.
- FAO. Ahsam M., Habib., Parvin M., Huntintong T., Hasam M. (2008) A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. FAO. Fisheries and Aquaculture Circular No. 1034, Rome, Italy.
- Ganju S., Gogate P.R. (2017) A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. *Journal of Food Engineering*, **215**: 84-96.
- Glazer AN (1989). "Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna". *The Journal of Biological Chemistry*. **264** (1): 1–4
- Hernández-Ledezma I., Hesei Chia-Chien. (2013) Bioactive food peptides in health and disease. In Tech: Rijeka, Croacia.
- Hernández-Rodríguez M., Sastre-Gallego A. (1999). Tratados de nutrición. Ediciones Díaz de Santos S.A. Madrid.
- Ho Shih-Hsin, Jing-Fu Liao, Chu-Yen Chen, Jo-Shu Chang (2018) Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, **247**: 669-675.
- Jeevanadam J., Yii S. Aing, Yen S. Chan, Sharadwata P. and Danquah K.M. (2017) Chapter 3 – Nanoformulation and Application of Phytochemicals as Antimicrobial

- Agents in Antimicrobial Nanoarchitectonics, edited by Alexandru Mihai Grumezescu, Elsevier, Pages 61-82.
- Johnson I. y Williamson G. (2003). Phytochemical functional foods. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, England.
- Jones C.G., Hare D., Comton J. (1989) Measuring plant protein with the Bradford assay. *Journal of Chemical Ecology*. **15** (3): 979-992.
- Kim K., Hoh D., Ji Y., Do H., Lee B., Holzapfel W. (2013) Impact of light intensity, CO<sup>2</sup> concentration and bubble size on growth and fatty acid composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* KMMCC CY-007. *Biomass and Bioenergy*, **49**: 181-187.
- Kumaran A., Karunakaran R.J. (2007) In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five species from India. *LWT- Food Society and Technology*. **40** (2): 344-352.
- Lichtenthaler, Hartmut, Buschmann, Claus. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1-F4.3.8
- Medina-Meza I.G., Barbosa-Cánocas G.V. (2015) Assisted extraction of bioactive compounds from plum and grape peels by ultrasonic and pulse electric fields, *Journal of Food Engineering*. **166**: 268-275.
- Masojidek J. y Torzillo G. (2008). Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, *Encyclopedia of Ecology*, 2226-2235.
- Moraes I.O., Arruda R., Maresca N.R., Antunes A.O. (2013). *Spirulina platensis*: process optimization to obtain biomass. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, **33** (Supl. 1): 179-183.

- Muhling M., (2000) Characterization of *Arthrospira (Spirulina)* strains. Tesis de doctorado, Durham University.
- Parimi, N.S., Manjider S., Kastner J.R., Das K.C., Forsberg L.S. and Azadi P. (2015) Optimization of Protein Extraction from *Spirulina platensis* to Generate a Potential Co-Product and a Biofuel Feedstock with Reduced Nitrogen Content. *Frontiers in Energy Research*. **3** Article 30.
- Pelizer L.H., Danesi E.G.D., Rangel C.O., Sassano C.E.N., Carvalho J.C.M., Sato S., Moraes I.O. (2003) Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of Food Engineering*, **56** (4): 371-375.
- Pelizer L.H., M. Carvahlos, Moraes I.O. (2014) Protein production by *Arthrospira (Spirulina) platensis* in solid state cultivation using sugarcane bagasse as support. *Biotechnology Reports*, **5**: 70-76.
- Ranken M.D., Baker C., Kill R.C. (1997) Food Industries Manual. Springer Science & Business Media.
- Ravelonandro P., Ratianarivo D., Joannis-Cassan C., Isambert A., Raherimandimby M. (2011) Improvement of the growth of *Arthrospira(Spirulina) platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO<sup>2</sup> addition. *Food and Bioproducts processing*. **89**(3): 209-216.
- Ryan E., K. Galvin, T.P. O'Connor, A.R. Maguire & N.M. O'Brien (2007) Phytosterol, Squalene, Tocopherol Content and Fatty Acid Profile of Selected Seed, Grains and Legumes. *Plant Food Engineering*, **62**: 85-91.
- SAGARPA, SIAP. (2017) Panorama de la leche en México (junio 2017) <https://www.gob.mx/siap/documentos/boletin-de-leche?state=draft> (consultada Septiembre, 2017).

- Salla A.C.V., Margarites A.C., Seibel F.I., Holz L.C., Brião V.B., Bertolin, T.E., Colla L.M., Costa J.A.V. (2016) Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource Technology*. **209**: 133-141.
- Schlösser U.G. 1994. SAG-SammLung von Algekulturen at the University of Göttingen Catalogue of Strains 1994. *Bot. Acta* **107**: 11-186.
- Se-Kwon Kim, Choul-Gyul Lee. 2015. Marine Bioenergy: Trends and Developments. Taylor and Francis Group.
- SIAP, SAGARPA. Boletín de la leche enero-marzo 2017 <http://www.gob.mx/siap/documentos/boletin-de-leche?state=draft> (consultada en septiembre, 2017).
- Soni R.A., Sudhakar K., Rana, R.S. (2017) *Spirulina* – From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology*. **69** (Part A): 157-171.
- Sumprasit N., Wagle N., Glanpracha N., Glanpracha N., Ajit P., Annachhatre. (2017). Biodiesel and biogas recovery from *Spirulina platensis*, *International Biodeterioration & Biodegradation* **119**: 196-204.
- Thainpong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrne D.H. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food and Analyssis*. **19**: 669-675.
- Vidal A.H., Fallarero A., Silva de Andrade-Wartha, de Oliveira e Silva A.M., de Lima A., Pavan Torres R. , Pia Vuorela , Mancini-Filho J. (2006) Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **42** (4) 589-600



Villegas-Rodriguez (2017) Tesis en proceso de redacción. Datos obtenidos directamente del autor.

Vonshak A. (1997) Physiology, CellBiology and Biotechnology, Taylor and Francis, London

Wan D., Wu Q., Kuca K. (2016). Chapter 42 Spirulina. Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity 569-583. Elsevier, Edited by Ramesh C. Gupta.

Wootton-Beard P.C., Morgan A., Ryan L. (2011) Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Research International*. **4**(1): 217-224.

Wu G.,(2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. Springer-Verlag. **37**: 1-17.

Zhang Lanlan, Chen Lin, Wang Junfeng, Ghen Yu, Gao Xin, Zhang Zhaohui, Liu Tianzhong (2015). Attached cultivation for improving the biomass productivity of *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, **181**: 136-142.

Zhou W., Li Y., Zhao H. (2017) Nutrients removal and recovery from saline wastewater by *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*. **245**: 10-17.