



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**TRANSFERENCIA INTERFACIAL DE DIÓXIDO DE
CARBONO DURANTE EL CULTIVO DE LA MICROALGA
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII EN UN
FOTOBIORREACTOR DE COLUMNA DE BURBUJEO**

TESIS

PRESENTADA POR

MANUEL JESÚS LUNA BRITO

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2018



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**“TRANSFERENCIA INTERFACIAL DE DIÓXIDO DE
CARBONO DURANTE EL CULTIVO DE LA
MICROALGA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* EN
UN FOTOBIORREACTOR DE COLUMNA DE
BURBUJEO”**

TESIS

PRESENTADA POR

MANUEL JESÚS LUNA BRITO

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2018



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

Mérida, Yuc., 12 de enero de 2018
Oficio Num.: PICQB/026/2018

Asunto: Autorización de digitalización de tesis

La tesis "Transferencia interfacial de dióxido de carbono durante el cultivo de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* en un fotobioreactor de columna de burbujeo" presentada por él IBA. Manuel Jesús Luna Brito, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

Directores de la tesis

Dr. Julio Cesar Sacramento Rivero

Dr. Sergio Antonio Baz Rodríguez

Sinodales:

Firmas

Dr. Ángel Zitlalpopoca Soriano

Dra. Leydi Maribel Carrillo Cocóm

Dr. José Enrique Botello Álvarez

ATENTAMENTE
"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"

DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS



c.c. Archivo
MRSC

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS
Y BIOQUÍMICAS

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Virginia Luna Brito por apoyarme en todas las decisiones que he tomado, por su amor incondicional, por sus consejos, regaños, por enseñarme con el ejemplo la importancia de la perseverancia y por su esfuerzo día con día para que yo pudiera tener una buena educación.

A mi tíos rosario y pablo por recibirme y apoyarme como uno más de sus hijos, por sus atenciones, consejos y cuidados.

A mis directores de tesis, el Dr. Sergio Antonio Baz Rodríguez y el Dr. Julio Cesar Sacramento Rivero por su invaluable apoyo, conocimientos, consejos y sobre todo paciencia durante la realización de este proyecto.

A mis revisores de tesis: La Dra. Leydi Maribel Carrillo Cocom, el Dr. Ángel Guillermo Zitlalpopoca Soriano, el Dr. Enrique Botello Álvarez y el Dr. Alejandro Zepeda Pedreguera por su valiosa atención, correcciones y observaciones las cuales enriquecieron este trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Rubén, Raúl, Andreína, Alejandra, Erik, Maritza, Martín y German por las vivencias, conocimientos y apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

A mis amigos Víctor y Sergio por los momentos de ocio y palabras de aliento en los momentos difíciles.

Un especial agradecimiento a mi amiga y compañera Gabriela Cuevas por sus consejos, paciencia, comprensión y apoyo incondicional a lo largo de esta aventura llamada maestría.

A mi novia Jasmín por escucharme, apoyarme, alentarme a seguir adelante y no desistir a pesar de las circunstancias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado.

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de Biotecnología e Ingeniería de Procesos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Sergio Antonio Baz Rodríguez y el Dr. Julio Cesar Sacramento Rivero y formó parte del proyecto “Análisis del efecto de la composición de medios acuosos sintéticos sobre la hidrodinámica y la transferencia interfacial de masa en biorreactores gas-líquido” financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México, Ref. 243423) y con el apoyo de una beca de maestría concedida por el mismo consejo con número 584676.

RESUMEN

Un aspecto fundamental para el cultivo fotoautotrófico de microalgas es la transferencia de CO_2 desde el aire o una mezcla gaseosa al medio de cultivo, ya que la disponibilidad de esta fuente de carbono puede afectar la productividad del cultivo. En el presente trabajo, se analizaron los efectos que la concentración dinámica de biomasa, nutrientes y metabolitos extracelulares (carbohidratos y proteínas totales) ejercen sobre la transferencia de CO_2 durante el cultivo fotoautotrófico de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* en un fotobiorreactor de columna de burbujeo. El cultivo se realizó en el medio Sueoka, a tres velocidades superficiales de gas (V-Aire, 0.012, 0.018 y 0.024 m/s) bajo un régimen de burbujeo homogéneo. También, se evaluaron dos fuerzas iónicas iniciales (FI): 0.085 y 0.17 M. Las corridas experimentales tuvieron una duración de 48 h. Cada seis o doce horas se monitorearon las concentraciones de los componentes arriba mencionados así como el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_La) y el área interfacial (a). La determinación del k_La se realizó con el método dinámico de absorción de CO_2 . El a se obtuvo mediante la adquisición y análisis digital de imágenes. La concentración de biomasa se monitoreó con la determinación de peso seco. La evolución de la FI se monitoreó a través de las concentraciones de nitrógeno y fósforo totales. Las concentraciones de carbohidratos y proteínas se monitorearon usando los métodos del fenol-sulfúrico y Lowry, respectivamente. Se realizó un análisis de covarianza para determinar la influencia de la variable controlada (V-Aire) y las cuatro covariables (fuerza iónica, biomasa, carbohidratos y proteínas) sobre el k_La y a . Se encontró que el k_La depende significativamente de V-Aire y la concentración de biomasa; entre los componentes químicos del medio, sólo la FI tuvo una ligera influencia. Se alcanzaron concentraciones de biomasa de entre 0.205 a 0.27 g/L después de 48 horas de cultivo. Este incremento ocasionó aumentos de hasta un 170% en el k_La en comparación al tiempo cero. Se concluye que para cultivos microalgales con exceso de nutrientes en el medio, principalmente la concentración de biomasa y la velocidad superficial son significativas para la transferencia de masa.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Generalidades sobre el cultivo de microalgas	3
Generalidades de transferencia de masa	6
Mecanismos de transporte de masa en el seno de una fase fluida	7
Transporte interfacial (gas-líquido).....	10
Métodos para determinar el coeficiente de transferencia de masa (k_La)	13
Transferencia de CO ₂ en reactores de columna gas-líquido.....	16
Efecto de las sales sobre la transferencia de masa en sistemas gas-líquido.....	18
Efecto de los microorganismos sobre la transferencia de masa	20
Efecto de los metabolitos sobre la transferencia de masa	22
Proteínas	23
Carbohidratos	24
JUSTIFICACIÓN.....	27
OBJETIVOS	29
Objetivo general	29
Objetivos particulares.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Equipamiento experimental	32
Cultivo madre	33
Preparación de semilleros	33
Cultivo en semilleros	34
Cultivo en fotobiorreactor	34
Determinación de la concentración celular	36
Determinación de la densidad óptica.....	36
Determinación del peso seco celular.....	36
Determinación de proteína total.....	36
Determinación de nitrógeno amoniacal y fósforo total	37
Determinación de carbohidratos totales	37
Determinación del k_La	38
Adquisición y análisis digital de imágenes.....	39

Determinación del diámetro promedio de Sauter (d_{32}), área interfacial (a) y k_L	40
Diseño experimental.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Evolución de las variables medidas a lo largo del cultivo microalgal	43
Variación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$) durante el cultivo celular.....	43
Variación de la concentración de biomasa con respecto al tiempo de cultivo	44
Variación de la concentración de nutrientes (FI) durante el cultivo celular	45
Variación de la concentración de proteínas durante el cultivo celular	46
Variación de la concentración de carbohidratos durante el cultivo celular.....	48
Variación del área interfacial (a) y el k_L durante el cultivo celular	49
Análisis de covarianza (ANCOVA)	51
Efecto de la velocidad superficial y las covariables sobre el $k_L a$	52
Efecto de la velocidad superficial y las covariables sobre el a	57
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	63
ANEXOS.....	69
1. Composición del medio Sueoka	69
2. Algoritmo de MATLAB para la adquisición de imágenes	70
3. Algoritmo de MATLAB para el análisis digital de imágenes	73
4. Abreviaturas	77
5. Recomendaciones.....	79

INTRODUCCIÓN

El cultivo de microorganismos, células o tejidos es de vital importancia para la generación de una gran cantidad de productos con aplicaciones potenciales en diversas áreas: alimentaria, química, médica, energética, tratamiento de aguas residuales, biorremediación, farmacéutica, entre otras.

Para el desarrollo adecuado de los cultivos microbianos se requiere una combinación de condiciones favorables, las cuales dependen del tipo de microorganismo con el que se trabaje y de los objetivos deseados. Algunos parámetros importantes son el suministro de oxígeno (casos aerobios) o dióxido de carbono (casos fotoautotróficos), la temperatura, el pH, la disponibilidad de nutrientes (fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y minerales) y la agitación, entre otros.¹⁻³ Una vez establecidas estas condiciones es necesario recurrir a la selección o diseño de un reactor biológico capaz de mantener las condiciones adecuadas de homogeneidad en la composición y temperatura del medio y cuya operación favorezca la transferencia de oxígeno (O_2) o dióxido de carbono (CO_2), según se requieran en cultivos aerobios o fotoautotróficos, respectivamente.^{4,5}

El coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_La) es un parámetro importante que afecta el diseño y operación de biorreactores en los cuales es necesaria la transferencia de un soluto desde una fase gaseosa hacia una líquida.⁶ Dicho parámetro es una medida de la facilidad con que se lleva a cabo la transferencia interfacial de masa, y depende de la composición del medio de cultivo (sustratos, sales, antiespumantes, microorganismos y metabolitos liberados por ellos), de sus propiedades fisicoquímicas y de transporte (viscosidad, densidad, difusividad molecular y tensión superficial) y de la hidrodinámica del sistema (diámetro promedio de las burbujas, área interfacial, y velocidad de deslizamiento entre fases). A su vez, el comportamiento hidrodinámico del sistema es en particular influenciado por el grado de coalescencia de las burbujas.^{6,7}

De particular interés para esta tesis de maestría fue el estudio de la transferencia interfacial de CO_2 durante el cultivo fotoautotrófico de una especie de microalga (*Chlamydomonas reinhardtii*) en un fotobiorreactor de columna de burbujeo. Se valoraron los efectos de los componentes generales de un medio de cultivo (sales, microorganismos y metabolitos) sobre la transferencia interfacial de masa y se buscó enriquecer el conocimiento limitado que actualmente existe sobre el efecto de la composición de los medios de cultivo sobre la transferencia de CO_2 .

ANTECEDENTES

Generalidades sobre el cultivo de microalgas

Los bioprocesos integran un conjunto de técnicas que emplean organismos vivos o sus partes para obtener o modificar diversos productos. Entre las múltiples aplicaciones de estos procesos destacan la obtención de biomasa y la producción controlada de sustancias de alto valor añadido.^{4,8-10} Las microalgas en particular pueden aprovecharse para la producción de colorantes, ácidos grasos y lípidos, principalmente. Estos últimos sirven de materia prima para la generación de biocombustibles que pueden contribuir a la mitigación del calentamiento global y los efectos adversos que conlleva.¹¹⁻¹⁴

Bajo el término de microalgas se incluyen microorganismos unicelulares capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. En esta categoría quedan agrupadas las cianobacterias (algas verdeazules) y las algas eucariotas (algas verdes, rojas y doradas). El cultivo de microalgas no es una actividad nueva: más de 60 años de investigación en ficología aplicada ha permitido su uso como alimento en la acuicultura de especies marinas, la depuración de aguas residuales, y la producción de compuestos para diversos sectores como la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.¹⁵⁻¹⁷

En el ámbito energético, la producción de bioenergía a partir de microalgas fue contemplada desde los años 50; sin embargo, fue a partir de la crisis energética de 1975 que el potencial económico de esta tecnología fue reconocido por varios países como EUA, Japón y Australia. Destaca el programa japonés dirigido al estudio de la fijación de CO₂ y a la optimización del crecimiento microalgal, el proyecto financiado por el Departamento de Energía de los EUA (*DOE, Department of Energy*) y el programa de especies acuáticas del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (*NREL, National Renewable Energy Lab*). Las aportaciones de estos programas en diversas áreas: aislamiento, caracterización, fisiología, bioquímica, escalamiento de cultivos en sistemas eficientes e ingeniería genética son las bases actuales del desarrollo de biocombustibles a través de microalgas.¹⁸

El biodiesel es uno de los biocombustibles más prometedores y el más conveniente como alternativa al uso del petrodiesel;^{1,16,19} puede obtenerse a partir de lípidos mediante procesos de esterificación y transesterificación. Estos lípidos pueden provenir de grasas animales o bien de aceites de diversos cultivos como la soya, colza, maíz, girasol, palma, remolacha, entre otros.¹⁶ El principal problema de dichas materias primas es la necesidad de grandes extensiones de terreno para su cultivo, y por tanto su competencia con los productos para alimentación: lo que ha generado en los últimos años un amplio debate sobre su sostenibilidad económica, medio ambiental y social.^{14,20} En contraste, se ha demostrado que las microalgas suponen una alternativa conveniente para la producción de triacilglicéridos y su conversión a biodiesel: algunas especies sólo

requieren energía solar, agua, CO₂ y algunas sales para producir rendimientos muy altos de biomasa rica en lípidos bajo ciertas condiciones de estrés (limitación de nitrógeno y/o fósforo).^{16,18,21}

Algunas microalgas estudiadas para la producción de biocombustibles son: *Botryococcus braunii*, *Dunaliella primolecta*, *Monallanthus salina*, *Heynigia sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Niractinium sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Auxenochlorella protothecoides* y *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*).^{21,22} Esta última presenta varias ventajas para la producción de biocombustibles debido a que puede ser aislada de diversos ambientes: agua dulce, salobre, suelo, chimeneas termales e incluso bajo la capa de hielo antártica.²³ Además, posee altas tasas de almacenamiento de lípidos que cumplen con las especificaciones de la Norma Europea (EN 14214) para la producción de biodiesel. De hecho, se han obtenido rendimientos de hasta 76% de peso seco celular en el rango de temperaturas comprendido entre 25 y 32 °C y bajo condiciones de estrés como agotamiento de nitrógeno.²⁴ Otros autores han reportado que el almacenamiento de lípidos se ve favorecido por la limitación de fósforo, al igual que en el caso del nitrógeno.²⁵ *Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga referida como la levadura verde debido a su alta tasa de crecimiento y fácil manipulación. Presenta una morfología ovoide de aproximadamente 10 µm de largo por 3 µm de ancho y posee dos flagelos que le proporcionan movilidad. La mayor parte de su espacio intracelular (40%) está ocupado por un único cloroplasto en forma de copa.^{26,27}

Con respecto a los requerimientos nutricionales de las microalgas, el C, N y P son considerados los tres nutrientes esenciales para su desarrollo. Aparte del carbono, que es obtenido del CO₂ y carbonatos disueltos en cultivos fotoautotróficos, las microalgas deben asimilar suficiente nitrógeno y fósforo para sus actividades metabólicas.¹ El nitrógeno puede ser tomado del medio generalmente en forma de urea, nitrato, nitrito y amonio.²⁸ Por otra parte, el fósforo es asimilado en forma de ortofosfatos (PO₄³⁻) y es indispensable para el proceso de fotosíntesis, metabolismo, formación de ADN, ATP y la membrana celular.¹ En la mayoría de los casos los cultivos pueden desarrollarse en ausencia de carbono orgánico. Sin embargo, muchas especies son capaces de utilizar sustratos orgánicos, y algunas incluso requieren cantidades traza de vitaminas u otras moléculas orgánicas para alcanzar un crecimiento normal y una efectiva actividad fotosintética.^{1,29} El hidrógeno y el oxígeno elemental son nutrientes no minerales que al igual que el P, N y C son indispensables para el desarrollo celular. Sin embargo, son muy abundantes en el medio de cultivo por lo que generalmente no representan una limitante para el crecimiento microalgal.³

Otros macronutrientes necesarios para el cultivo de microalgas son el S, K, Na, Fe, Mg y Ca. Algunos micronutrientes o elementos traza indispensables son el B, Cu, Mn, Mo, Zn, V y Se.³⁰ Además de los macronutrientes y micronutrientes deben de cuidarse otras condiciones indispensables (factores de crecimiento) para el cultivo como la

intensidad luminosa, pH, concentración de O₂, intensidad de mezclado y temperatura, ya que tales parámetros pueden afectar significativamente el desarrollo microalgal, y por consiguiente los rendimientos esperados o deseados de algún metabolito de interés.^{1,2,31}

Con respecto a *Chlamydomonas reinhardtii*, Harris²⁸ menciona que las fuentes de carbono que pueden ser empleadas para su cultivo son los acetatos, acetil metilo carabinol, monoacetin, acetato de acetilmetilo y CO₂. Por otra parte, las fuentes de nitrógeno bajo las que ha presentado un buen crecimiento celular son el amonio, urea o glutamina. Los elementos traza necesarios para su cultivo son añadidos a través de sales EDTA, las cuales proporcionan una alta concentración de metales requeridos para su crecimiento. Los medios empleados habitualmente para su cultivo son los medios de Sanger y Granick, de Kuhl, de Gorman y Levine (Tris-acetato-fosfato, TAP) y *Sueoka* (medio de alta salinidad, HSM). El medio desarrollado por Sanger y Granick es un medio mínimo cuya principal ventaja es su bajo costo, sin embargo, su capacidad amortiguadora de pH es pobre y su contenido de nitrógeno es reducido, por lo cual el crecimiento de *Chlamydomonas reinhardtii* puede verse limitado. En contraste, el medio TAP es un buen amortiguador de pH bajo en fosfatos; usado en muchos laboratorios como medio estándar. Su principal desventaja es su alto costo, de hecho es el más caro de los medios usados comúnmente para el cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*. Por otra parte, el medio *Sueoka* es un amortiguador adecuado de pH y puede ser empleado tanto para el crecimiento fototrófico como para el mixotrófico. Además destaca por ser de bajo costo, fácil preparación y presentar un mayor volumen de biomasa en comparación con otros medios de cultivo como el TAP.^{28,32}

Además de los nutrientes requeridos para el crecimiento de microalgas, la temperatura juega un papel muy importante. La variación de este parámetro afecta el crecimiento celular, la calidad y contenido total de lípidos almacenados.²⁴ En particular, *Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga que se desarrolla a temperaturas comprendidas entre 20 y 25 °C. Las cepas silvestres y la mayoría de las cepas modificadas de esta microalga son capaces de tolerar temperaturas tan bajas y tan altas como 15 y 35 °C respectivamente.²⁸ Las intensidades luminosas a las que puede ser cultivada van desde 20 a 400 μmol fotones/m²s.^{24,25,28,32-34} Sin embargo, para cultivos sumergidos se recomienda emplear intensidades comprendidas entre 200 y 400 μmol fotones/m²s.²⁸ En algunos estudios se ha encontrado que la intensidad luminosa óptima para el cultivo corresponde a 160 μmol fotones/m²s independientemente de la temperatura ubicada entre 22 y 35 °C.³² En esta misma dirección, Vázquez y Robledo²³ encontraron que *Chlamydomonas reinhardtii* presenta un mayor crecimiento celular a una intensidad luminosa de 320 μmol fotones/m²s a una temperatura de 25 °C. El rango de pH óptimo para el cultivo es de 6.5 a 8.0 aproximadamente.^{25,28}

Por otra parte, los sistemas empleados para el cultivo de microalgas se clasifican en dos grandes grupos: sistemas abiertos y sistemas cerrados. Los primeros son los más

usados debido a que son más económicos, fáciles de operar y el costo de su mantenimiento es bajo. Sin embargo, las productividades que se obtienen con estos sistemas son bajas y las tasas de evaporación y los riesgos de contaminación son altos. Por su parte, los sistemas cerrados son más costosos pero el riesgo de contaminación al igual que los costos de mantenimiento son mínimos y las productividades altas.^{1,15,31}

En particular, los biorreactores de columna de burbujeo son sistemas cerrados usados ampliamente en la industria química, bioquímica, petroquímica y metalúrgica como contactores gas-líquido y reactores multifase.³⁵⁻³⁷ Son utilizados en diversas aplicaciones como hidrogenación, oxidación, cloración, alquilación, polimerización, fermentación, tratamiento de aguas residuales, pero también como fotobiorreactores tubulares para el cultivo de microalgas.^{35,37} Su aplicación en esta área se debe a las ventajas que exhiben en contraste con otros sistemas de cultivo al aire libre, entre las cuales destacan los altos rendimientos de transferencia de masa y calor, mezclado eficiente, moderados esfuerzos de corte, control de variables ambientales y bajos costos operación y mantenimiento debido a su constitución sencilla y ausencia de partes móviles.³⁶⁻³⁸ Por lo anterior, los biorreactores de columna de burbujeo son sistemas adecuados para el estudio de los fenómenos de transferencia de masa durante el cultivo de microorganismos como el caso de las microalgas.

Generalidades de transferencia de masa

Los fenómenos de transferencia de masa son fundamentales para muchos procesos químicos y biológicos, ya que subyacen los diferentes procesos de separación química donde uno o más componentes migran de una fase a la interfase que se encuentra entre las dos fases en contacto. Por ejemplo, en los procesos de adsorción o cristalización, los componentes permanecen en la interfase, mientras que en los procesos de absorción de gases y extracción líquido-líquido, los componentes penetran la interfase y se transfieren al seno de una segunda fase o componente.³⁹

Todos los mecanismos de transporte (flujo de fluidos, transferencia de calor y masa, corriente eléctrica, etc.) son el resultado de la falta de equilibrio entre los componentes de un sistema. En principio, todos obedecen una ley universal similar a la ley de Ohm, la cual expresa que la velocidad de transporte (cantidad transferida por unidad de tiempo) es proporcional a la fuerza conductora e inversamente proporcional a la resistencia del medio a la transferencia.⁴⁰ Aplicando esta ley al caso particular de transferencia de masa, se puede escribir:

$$m = \frac{dm}{dt} = \frac{F}{R} \quad [1]$$

Dónde:

$m = dm/dt$ = es la velocidad de transferencia de masa.

F = es la fuerza impulsora.

R = es la resistencia del medio a la transferencia de masa.

Los mecanismos de transferencia de masa dependen de la dinámica de los sistemas en los cuales tiene lugar. La masa puede ser transferida por el movimiento aleatorio de las moléculas en fluidos estáticos (difusión molecular), o por ejemplo, desde una superficie a un fluido en movimiento, ayudado por las características dinámicas de flujo (convección).^{39,40} En los siguientes apartados se tratarán con más detalle estos mecanismos de transporte.

Mecanismos de transporte de masa en el seno de una fase fluida

En 1815 un científico de nombre Parrot observó que cuando varían las concentraciones de las especies moleculares que conforman una mezcla gaseosa, ocurre un proceso natural que tiende a reducir tales fluctuaciones. Este fenómeno microscópico de transferencia de masa es denominado difusión molecular, y se define como el mecanismo de transporte debido a los desplazamientos individuales y desordenados de las moléculas.^{39,40} Una explicación lógica de este proceso puede ser proporcionada por la teoría cinética de los gases. A temperaturas superiores al cero absoluto, las moléculas de gas se encuentran en un estado aleatorio de movimiento continuo. En mezclas gaseosas diluidas, cada molécula de soluto se comporta de manera independiente. Las colisiones entre las moléculas de soluto y solvente ocurren continuamente. Como resultado de este fenómeno, las moléculas de soluto se mueven hacia las regiones de alta o baja concentración. Este comportamiento también es observado en mezclas líquido-líquido, sólido-líquido y gas-líquido.^{39,41}

El mecanismo de difusión molecular puede ser representado a través de dos gases (A y B) que se encuentran confinados en un sistema cerrado, separados por una membrana semi-permeable (ver Figura 1). Se asume que en ambos lados de la barrera se tiene el mismo número de moléculas. Aunque no es posible establecer la manera en que alguna molécula en particular se desplazará, en un intervalo de tiempo definido. Se sabe que un número finito de moléculas de cada gas cruzará la membrana hacia el lado opuesto. Con la existencia de un gradiente de concentración, hay más moléculas de soluto en un lado que en otro; en consecuencia, se producirá una transferencia global neta del lado de mayor al de menor concentración. El flujo neto de cada especie molecular se lleva a cabo en la dirección de un gradiente negativo de concentración.³⁹

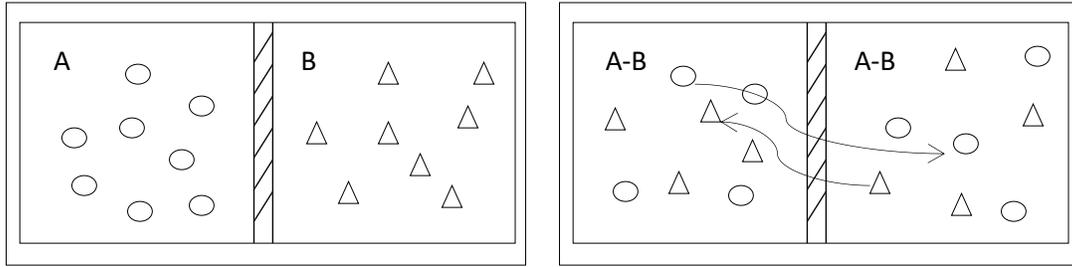


Figura 1. Mecanismo de transporte de materia por difusión de los gases A y B.

Los fenómenos de transferencia de masa por difusión en sistemas binarios o diluidos son gobernados por la ley de Fick. Ésta establece que la razón de difusión de una especie química en el espacio de una mezcla gaseosa (o de una solución líquida o sólida) es proporcional al gradiente de concentración de esa especie en ese lugar (ver Ecuación [2]). Aunque una concentración más elevada para una especie significa más moléculas de ella por unidad de volumen, la concentración de una especie puede expresarse de varias maneras como la densidad, la fracción masa, la concentración molar y la fracción molar. La concepción práctica del fenómeno difusivo define el flujo másico (flux) en relación a la velocidad promedio de transferencia de masa como J_A .^{39,42,43}

$$J_A = -D_{AB}\nabla_{CA} \quad [2]$$

Para el caso de un sistema isotérmico e isobárico en el que se tiene una mezcla fluida formada por los componentes A y B, ambos en reposo o en movimiento no turbulento, cuando el sistema está en estado estacionario y la difusión sucede en una sola dirección, la primera ley de Fick se escribe.^{39,44}

$$J_A = -D_{AB} \frac{dC_A}{dz} \quad [3]$$

Donde J_A es el flux molar en la dirección z con respecto a la velocidad promedio molar, $\frac{dC_A}{dz}$ es el gradiente de concentración molar en la dirección z, y D_{AB} representa la difusividad másica o coeficiente de difusión para el componente A en el componente B. Una expresión más general de flux, que no está restringida a condiciones isotérmicas o isobáricas, puede escribirse como:³⁹

$$J_A = -cD_{AB} \frac{dy_A}{dz} \quad [4]$$

Donde c representa la concentración molar total de la mezcla fluida, y y_A la fracción molar del componente A. La Ecuación [3] es una forma especial de la Ecuación

[4], ya que la concentración molar total, c , es constante bajo condiciones isotérmicas e isobáricas.³⁹

Hasta el momento las relaciones anteriores consideran que el fenómeno de difusión molecular es únicamente resultado de los gradientes de concentración. Sin embargo, este fenómeno también se ve afectado por la convección inducida por la velocidad de movimiento del fluido o por las diferencias de densidad que resultan de las variaciones en la concentración de los componentes de una mezcla. Para un sistema binario con una velocidad promedio constante en la dirección z , el flux molar puede ser expresado como:³⁹

$$J_A = C_A(v_{AZ} - V_Z) \quad [5]$$

Donde C_A es la concentración molar de A, y la expresión $(v_{AZ} - V_Z)$ denota la velocidad de difusión de la especie A, con respecto a la velocidad promedio molar de la mezcla en la dirección z . Igualando las expresiones [4] y [5] se obtiene:

$$J_A = C_A(v_{AZ} - V_Z) = -cD_{AB} \frac{dy_A}{dz} \quad [6]$$

Reordenando términos:

$$C_A v_{AZ} = -cD_{AB} \frac{dy_A}{dz} + C_A V_Z \quad [7]$$

El segundo término en la Ecuación [7] representa el flux convectivo del componente A en dirección z , y puede ser generalizado para un sistema en tres direcciones.

El término transferencia de masa por convección hace referencia al transporte de materia originado por el movimiento de un fluido; este mecanismo depende de las propiedades de transporte y las características dinámicas del fluido en cuestión.^{39,45} Como se mencionó en el apartado previo, la difusión molecular ocurrirá siempre y cuando exista un gradiente de concentración. Sin embargo, si el seno del fluido también se encuentra en movimiento; la velocidad global de transferencia de masa será más alta debido a la contribución de las corrientes convectivas.⁴⁵

Existen dos tipos de convección, la natural o libre y la forzada. En el primer caso, el movimiento del fluido es causado por las diferencias de concentración (densidad). Por su parte, la convección forzada es resultado de factores independientes a la transferencia de masa. Un ejemplo de este último sería la agitación mecánica de un reactor mediante una propela.^{39,40,42} El proceso de convección es complejo, se ve afectado por el régimen,

la velocidad de flujo, la composición del fluido y sus propiedades. El análisis del proceso de transferencia de masa es muy importante en sistemas multi-fase donde las películas adyacentes a la interfase presentan una resistencia a la transferencia de masa.

Transporte interfacial (gas-líquido)

Generalmente los fenómenos de transferencia de masa tienen interés desde un punto de vista industrial cuando ocurren entre dos fases (líquido-líquido, líquido-sólido y gas-líquido), ya que permiten llevar a cabo procesos de transporte de un componente situado en una fase hacia otra inmisible, con intención de formar una mezcla, extraer y purificar una especie química y/o producir una reacción.⁴⁴

La velocidad de transferencia de materia entre dos fases depende de la velocidad de transferencia de masa en el interior de cada fase o semejantemente, de la resistencia que cada fase opone al fenómeno. En general suele suponerse que las resistencias al fenómeno se dan en serie, que la propia interfase no ofrece resistencia y que las condiciones en la interfase cumplen las leyes de equilibrio.^{44,45} En base a esto para un sistema gas-líquido la velocidad de transferencia de masa de un componente (A) a través de la frontera de la fase gaseosa es igual a:

$$N_{AG} = k_G(C_{AG} - C_{AGi}) \quad [8]$$

Para el caso de la fase líquida, la velocidad de transferencia de masa de A puede escribirse como:

$$N_{AL} = k_L(C_{ALi} - C_{AL}) \quad [9]$$

Donde N_{AG} y N_{AL} representan la tasa de transferencia de masa del componente A, k_G y k_L son los coeficientes laterales de transferencia de masa, a es el área interfacial por unidad de volumen, C_{AGi} y C_{ALi} son las concentraciones en equilibrio del componente A, C_{AG} y C_{AL} son las concentraciones de A en el seno de las fases. Los subíndices G y L representan las fases gaseosa y líquida respectivamente. Si asumimos que el equilibrio existe en la interfase, C_{AGi} y C_{ALi} pueden relacionarse a través de la expresión:⁴⁵

$$m = \frac{C_{AGi}}{C_{ALi}} \quad [10]$$

Donde m se denomina coeficiente de distribución o partición y se puede definir como la razón entre las concentraciones de soluto, A, entre las fases. Reordenando la Ecuación [10] se tiene:

$$C_{AGi} = mC_{ALi} \quad [11]$$

y

$$C_{ALi} = \frac{C_{AGi}}{m} \quad [12]$$

Las expresiones [11] y [12] se emplean para eliminar las concentraciones interfaciales. El primer paso consiste en reordenar las relaciones [8] y [9]:

$$\frac{N_A}{k_G} = C_{AG} - C_{AGi} \quad [13]$$

y

$$\frac{N_A}{k_L} = C_{ALi} - C_{AL} \quad [14]$$

Ahora se sustituye [11] en [13] y [12] en [14] con lo cual se tiene:

$$\frac{N_A}{k_G} = C_{AG} - mC_{ALi} \quad [16]$$

y

$$\frac{N_A}{k_L} = \frac{C_{AGi}}{m} - C_{AL} \quad [16]$$

Ahora multiplicamos [14] por m :

$$\frac{mN_A}{k_L} = m(C_{ALi} - C_{AL}) \quad [17]$$

y dividimos [13] entre m :

$$\frac{N_A}{mk_G} = \frac{1}{m}(C_{AG} - C_{AGi}) \quad [18]$$

Por último sumamos [15] a [17], y [16] a [18]:

$$N_A \left(\frac{1}{k_G} + \frac{m}{k_L} \right) = C_{AG} - mC_{AL} \quad [19]$$

y

$$N_A \left(\frac{1}{k_L} + \frac{1}{mk_G} \right) = \frac{C_{AG}}{m} - C_{AL} \quad [20]$$

Las Ecuaciones [19] y [20] combinan las resistencias a la transferencia de masa por parte de las películas de líquido y gas adyacentes a la interface, y relacionan la tasa de transferencia de masa con las concentraciones del componente A en el seno de los fluidos. Los términos entre paréntesis son usados para definir los coeficientes globales de transferencia de masa. Dependiendo de la relación que se utilice, se pueden definir dos coeficientes.⁴⁵

$$\frac{1}{K_G} = \left(\frac{1}{k_G} + \frac{m}{k_L} \right) \quad [21]$$

y

$$\frac{1}{K_L} = \left(\frac{1}{mk_G} + \frac{1}{k_L} \right) \quad [22]$$

Donde K_G y K_L son los coeficientes globales de transferencia de masa por parte del gas y líquido respectivamente. Por lo tanto, la velocidad de transferencia de masa en sistemas gas-líquido puede ser expresa a través de cualquiera de las siguientes expresiones:

$$N_A = K_G(C_{AG} - mC_{AL}) \quad [23]$$

y

$$N_A = K_L \left(\frac{C_{AG}}{m} - C_{AL} \right) \quad [24]$$

Estas Ecuaciones a menudo son expresadas usando concentraciones de equilibrio: mC_{AL} es igual a C_{AG}^* , la concentración de A en la fase gaseosa en equilibrio con C_{AL} , y $\frac{C_{AG}}{m}$ es igual a C_{AL}^* , la concentración de A en la fase líquida en equilibrio con C_{AG} . Al sustituir estos términos en [23] y [24] se tiene.⁴⁵

$$N_A = K_G(C_{AG} - C_{AG}^*) \quad [25]$$

y

$$N_A = K_L(C_{AL}^* - C_{AL}) \quad [26]$$

Las Ecuaciones [25] y [26] pueden ser simplificadas para sistemas en los cuales la mayoría de la resistencia a la transferencia de masa recae sobre una de las fases. Por ejemplo, para un sistema gas-líquido en el que se quiere transferir un componente A de la fase gaseosa a la fase líquida. Si A es poco soluble en la fase líquida la resistencia a la transferencia de masa de esta fase es la dominante y k_G es mucho mayor que k_L . Por lo tanto, de la Ecuación [22] se tiene que K_L es aproximadamente igual a k_L . En base a esto la Ecuación [26] puede escribirse como:⁴⁵

$$N_A = k_L(C_{AL}^* - C_{AL}) \quad [27]$$

En caso de ser multiplicadas los fluxes de las Ecuaciones [26] y [27] por un área interfacial específica (a , m² de interface/m³ de medio) se obtiene un cambio de concentración con respecto al tiempo.

Métodos para determinar el coeficiente de transferencia de masa ($k_L a$)

En general hay dos enfoques para evaluar el k_L y a . El primero consiste en utilizar correlaciones empíricas, y el segundo mediciones experimentales. En ambas situaciones, la determinación individual del k_L y a es laboriosa, y en algunos casos prácticamente imposible. Por lo tanto, resulta conveniente evaluar directamente el producto $k_L a$.⁴⁵ Actualmente existen diversos métodos (químicos y físicos) que han sido desarrollados con ese objetivo; muchos de ellos son específicos para la determinación de la transferencia de O₂.^{46,47}

Bajo condiciones hidrodinámicas idénticas (geometría interfacial, velocidades de deslizamiento entre fases, propiedades fisicoquímicas), el transporte de masa para distintas especies se diferenciará primordialmente por la difusividad molecular. Por tanto, bajo las diversas aproximaciones teóricas, el coeficiente de transferencia de masa de una sustancia puede calcularse a partir del coeficiente de otra mediante una corrección dependiente de la relación entre sus difusividades. Particularmente, la relación resultante de la teoría de penetración de Higbie ha demostrado ser aceptable para la predicción del coeficiente volumétrico del dióxido de carbono a partir del correspondiente al oxígeno en sistemas acuosos:⁴⁴

$$k_L a = \left(\frac{D_{CO_2}}{D_{O_2}} \right)^{0.5} (k_L a)_{O_2} \quad [28]$$

Donde D es el coeficiente de difusividad del soluto gaseoso en la mezcla acuosa (CO₂ u O₂, según indica el subíndice). Por supuesto, es preferible determinar directamente el valor experimental de dicho coeficiente para el CO₂, como se hace en este trabajo. Sin

embargo, en caso de que no se cuente con un sistema específico para medición de este soluto gaseoso, su valor puede estimarse razonablemente mediante la Ecuación [28] a partir de datos para el O_2 .

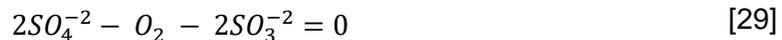
A continuación se describen brevemente algunos de los métodos empleados para determinación de $k_L a$.

Métodos químicos

En general, estos métodos no son recomendados para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa en el caso de biorreactores agitados neumáticamente; debido a los cambios en las propiedades fisicoquímicas de los líquidos, especialmente la coalescencia, producidos por la adición de sustancias químicas. Con estos métodos se pueden obtener valores más altos que los reales, debido al incremento de la tasa de absorción por las reacciones químicas que tienen lugar en la fase líquida.^{46,48}

Método de la oxidación del sulfito de sodio

Este método se basa en la reacción del sulfito de sodio con oxígeno disuelto en la presencia de un catalizador (Cu^{2+} o Co^{2+}) para producir sulfato. La reacción puede ser expresada cómo:



En el rango de concentraciones de 0.04 a 1 N para el sulfito de sodio, la reacción ocurre tan rápido que se asume que la concentración de O_2 es cero. La velocidad de reacción es mucho más rápida que la velocidad de transferencia de oxígeno; por lo tanto, la velocidad de oxidación es controlada por la velocidad de transferencia de masa, y midiendo la velocidad global, la velocidad de transporte de materia puede ser determinada. La velocidad de reacción está en función de la concentración del catalizador y las condiciones de operación.⁴⁶

El procedimiento experimental consiste en llenar el biorreactor con una solución de sulfito de sodio (1 N) que contiene iones cobre (Cu^{2+}). Se inyecta aire al sistema, para que la oxidación se produzca. Se detiene el flujo de aire, y se toman muestras de un volumen definido a intervalos regulares de tiempo. Se mezcla cada muestra con un exceso de yodo y finalmente se titulan las soluciones con un estándar de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$).⁴⁶

Una vez que se conoce la concentración de sulfito en función del tiempo, la velocidad de consumo de este reactivo puede ser estimada y el $k_L a$ calculado a través de la Ecuación [30].⁴⁶

$$-\frac{dC_{Na_2SO_3}}{dt} = 2k_L a C^* \quad [30]$$

Donde $\frac{dC_{Na_2SO_3}}{dt}$ es el cambio de la concentración de sulfito en función del tiempo, y C^* es la concentración de saturación de esta sustancia en el líquido. El $k_L a$ del CO_2 puede estimarse a partir de la Ecuación [28]

Método gráfico de Danckwerts

Éste es un método que permite la determinación simultánea del coeficiente lateral de transferencia de masa gas-líquido (k_L) y el área interfacial (a) a través del monitoreo de una reacción conocida del oxígeno. De las velocidades de absorción obtenidas experimentalmente para gases, R_A (moles/s), a diferentes constantes de velocidades de reacción (de primer orden), se pueden calcular el coeficiente de transferencia de masa y el área interfacial usando la Ecuación de Danckwerts:⁴⁷

$$\frac{R_A}{V_l} = a C_{A,e} (D_A k_{L,app} + k_l^2)^{0.5} \quad [31]$$

Sustituyendo $C_A = S_w C_{A,e}$ se tiene:

$$\left(\frac{R_A}{V_l C_A S_w} \right)^2 = D_A k_{L,app} a^2 + (k_L a)^2 \quad [32]$$

Donde R_A es la velocidad global de transferencia de masa, S_w es la solubilidad de A, V_l el volumen del reactor, C_A es la concentración del componente A, a el área interfacial, D_A es la difusividad de A, $k_{L,app}$ es el coeficiente de transferencia de masa por parte del líquido, y $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa.⁴⁷

Si se grafica el término $\left(\frac{R_A}{V_l C_A S_w} \right)^2$ contra $D_A k_{L,app}$ se obtiene una línea recta con una pendiente a^2 y una intercepción $(k_L a)^2$. Tanto el área interfacial como el coeficiente de transferencia de masa por parte del líquido pueden calcularse a partir de la pendiente y el intercepto, siempre que se conozcan la difusividad (D_A) y la concentración en equilibrio del componente A ($C_{A,e}$).⁴⁷

Métodos físicos

Estos métodos son los más usados actualmente, ya que están basados en la medición de la concentración de algún soluto gaseoso disuelto en el líquido durante los procesos de absorción o desorción.⁴⁶

Método dinámico

El Método dinámico de absorción o desorción de gas ha sido ampliamente usado debido a su simplicidad y confiabilidad. La aplicación de este método se basa en alternar los flujos de gas (aire-nitrógeno). El procedimiento experimental consiste en inyectar N₂ al reactor para remover, por ejemplo, el contenido inicial de CO₂ seguido de la inyección de aire, de CO₂ o de una mezcla aire-CO₂. La concentración de dióxido de carbono disuelto (CO_{2D}) puede ser monitoreada mediante un sensor. Sin embargo, estos dispositivos presentan un retraso en las mediciones, es decir, la concentración de CO_{2D} obtenida no refleja la concentración actual de CO_{2D} en el sistema. En general, es aceptable un retraso de entre 5 y 10 s para los electrodos comerciales.⁴⁵⁻⁴⁷

Para condiciones de operación en estado estacionario, considerando un mezclado homogéneo, la concentración de CO_{2D} en una columna de burbujeo puede ser descrita por el método de absorción como:⁴⁷

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) \quad [33]$$

Donde $\frac{dC_{AL}}{dt}$ es el cambio en la concentración del soluto gaseoso en el líquido en función del tiempo, $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa, C_{AL}^* es la concentración en equilibrio y C_{AL} es la concentración del gas en un tiempo dado. El término de interés ($k_L a$) puede ser calculado a través del ajuste de mínimos cuadrados del error entre los valores obtenidos con la Ecuación [33] y los datos experimentales.⁴⁷

Transferencia de CO₂ en reactores de columna gas-líquido

El CO₂ es un gas ubicuo producido por la oxidación de sustratos que contienen carbono orgánico. Es uno de los principales componentes de los gases de efecto invernadero que contribuyen al calentamiento global.^{34,49} Como una medida para mitigar este fenómeno, en los últimos años se han desarrollado fotobiorreactores que emplean CO₂ como única fuente de carbono. Una característica importante de diseño de cualquier fotobiorreactor es la transferencia de CO₂ de la fase gaseosa a la fase líquida, ya que los microorganismos fotosintéticos asimilan las moléculas de CO₂ disueltas.⁵⁰ Por consiguiente, la solubilidad baja a moderada de este gas en soluciones acuosas puede limitar el crecimiento microalgal.¹ A pesar de la importancia de este parámetro de diseño, existen pocos trabajos que evalúan de manera directa la transferencia de CO₂ de una fase gaseosa a una fase líquida.⁵⁰ Por lo tanto, es importante determinar los coeficientes de transferencia de masa ($k_L a$, y k_L) relacionados con la disponibilidad de este macronutriente en medios de cultivo empleados para el crecimiento microalgal (soluciones acuosas electrolíticas).

Actualmente se sabe que el $k_L a$ tanto para la absorción como desorción del CO_2 , en el agua, varía con la configuración del sistema y la hidrodinámica; es dependiente de las características del medio acuoso (pH, salinidad y contenido de bicarbonato), temperatura, naturaleza del gas de arrastre (aire o nitrógeno), velocidad del gas, sistema de suministro de gas (fino, grueso, difusor de microburbujas, placa, airlift, abierto), y donde sea aplicable, de la velocidad de líquido y velocidad de agitación/mezclado.⁵¹ Los resultados de algunas investigaciones dirigidas a evaluar el efecto de la velocidad del flujo de gas, la velocidad del flujo de líquido y la temperatura demuestran que la velocidad de mezclado es la variable que presenta el efecto más significativo sobre el $k_L a$, seguida de la velocidad de aireación y finalmente la temperatura.^{51,52}

En comparación con los valores experimentales del $k_L a$ del CO_2 que han sido publicados, una gran cantidad de trabajos han reportado velocidades de transferencia de masa para el oxígeno en reactores bien mezclados.⁵⁰ Robinson y Wilke⁵³ reportaron que en agua pura el $k_L a$ del O_2 incrementó tanto con la velocidad de mezclado como con la velocidad de aireación. Mientras que Hill⁵⁰ comunicó un comportamiento similar para el caso del CO_2 con las mismas variables. El efecto positivo que presenta la temperatura sobre el incremento del $k_L a$ se debe al aumento en el coeficiente de difusión de las moléculas en la fase líquida.⁵⁴

A diferencia del incremento del $k_L a$ del O_2 en presencia de electrolitos; Hill⁵⁰ empleando un reactor con agitación mecánica reportó que el $k_L a$ del CO_2 en presencia de sales se ve disminuido. Dicho comportamiento puede ser atribuido a que la carga de los iones altera la superficie de las burbujas reduciendo la capacidad de las moléculas de CO_2 de difundirse en el seno del líquido. Posiblemente este efecto se vea modificado por la naturaleza de los iones, como en el caso del oxígeno.⁵⁰ Otros agentes que de igual manera son responsables de la disminución del $k_L a$ son los surfactantes y los compuestos orgánicos. García *et al.*⁵⁵ encontraron que a bajas concentraciones de compuestos orgánicos el coeficiente de transferencia de masa se reduce rápidamente hasta alcanzar un valor constante. Por otra parte, Aoki *et al.*⁵⁶ encontraron que la presencia y el aumento en la concentración de surfactantes disminuye la velocidad de transferencia de masa del CO_2 en burbujas con diferentes configuraciones (esferoidal, bamboleo, gorra y burbujas de Taylor).

Otros investigadores han estudiado el comportamiento del área superficial de las burbujas con respecto a la velocidad superficial del líquido (V_l) y la velocidad del gas; encontraron que la turbulencia y el gas retenido del sistema incrementan con el aumento de la velocidad del gas, lo que a su vez favorece el incremento del $k_L a$ del CO_2 .⁵⁷ Por otra parte, en otros estudios se ha evaluado el efecto de las reacciones del CO_2 con los iones OH^- y el H_2O , en la fase líquida. Los resultados demuestran que estas interacciones

juegan un papel despreciable en el mecanismo de absorción del CO_2 al igual que la concentración de bicarbonato (H_2CO_3).⁵⁸

Efecto de las sales sobre la transferencia de masa en sistemas gas-líquido

Una particularidad de los cultivos de microalgas en modo fotoautotrófico es que para su crecimiento solo requieren un medio acuoso salino con acceso a CO_2 gaseoso. En este sentido, la composición de los medios es uno de los factores que impactan la transferencia de masa. Las sales afectan la transferencia de masa mediante la inhibición de la coalescencia de las burbujas, entre otras cosas. Este fenómeno afecta directamente el área superficial disponible para la transferencia de masa y a su vez el $k_L a$. La inhibición de la coalescencia está relacionada con las interacciones iónicas en la interface gas-líquido (fuerzas de repulsión, reducción de la atracción hidrofóbica y el efecto de Gibbs-Marangoni/elasticidad superficial); tales interacciones dependen de la naturaleza y concentración de los iones presentes en el medio de cultivo, así como también del reordenamiento de la estructura del agua.⁵⁹⁻⁶⁴

Actualmente se sabe que ciertos pares de cationes y aniones reducen la coalescencia de las burbujas (clasificados como $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ por Craig *et al.*⁶⁵) mientras que otros no tienen efecto aparente ($\alpha\beta$, $\beta\alpha$). Esto posiblemente es resultado de un efecto antagónico entre ellos. Cuando sin distinción aniones y cationes son atraídos a la superficie, las atracciones de Van der Waals facilitan el fenómeno de coalescencia.⁶⁶ No obstante, cuando sólo un tipo de ión (anión o catión) es atraído a la superficie se forma una doble capa dando como resultado interacciones repulsivas entre las superficies libres. Este comportamiento puede ser generalizado a sistemas multi-sales.^{65,67,68}

El proceso por el cual las sales inhiben la coalescencia de las burbujas es retardando el proceso de drenado de la película de líquido ubicada entre burbujas vecinas;⁶ fenómeno que tiene lugar alrededor de una determinada concentración de sal llamada concentración de transición.^{69,70} La concentración de transición se define como la concentración en solución acuosa a partir de la cual la frecuencia de coalescencia de las burbujas se reduce en más de un 50 % con respecto a la que correspondería en agua pura.^{59,60} Otras investigaciones, han desarrollado modelos matemáticos que muestran la dependencia del tamaño de las burbujas con respecto a la concentración crítica de electrolito (C_{tc}).⁷¹

En investigaciones recientes se ha encontrado que la concentración de transición para la inhibición de la coalescencia de las burbujas es específica de cada especie iónica y disminuye con la velocidad superficial del gas.⁷² Mientras que en otros estudios Baz-Rodríguez *et al.*⁶⁹ encontraron que los valores del $k_L a$ y el k_L fueron muy similares independientemente del tipo de electrolito, cuando trabajaron con una concentración de electrolito reducida ($C_r = C/C_{tc}$), definida como la razón entre una determinada concentración de sal (C) y la concentración crítica de coalescencia (C_{tc}).⁷³ Lo anterior

sugiere que Cr cuantifica los efectos estructurales que los solutos ejercen en la transferencia de masa y es útil para caracterizar el comportamiento hidrodinámico y de transferencia de masa en columnas de burbujeo, independientemente del tipo de electrolito. De igual manera, en el mismo estudio no se observaron variaciones significativas en la hidrodinámica y transferencia de masa, una vez que la concentración crítica fue alcanzada, lo cual refuerza la conclusión de que la inhibición de la coalescencia es el efecto gobernante de los cambios hidrodinámicos y de transferencia de masa, cuando los electrolitos están presentes a una concentración menor que la concentración crítica.

El aumento en la concentración de electrolitos favorece en gran medida el incremento del área interfacial (a) y la fracción volumétrica de gas retenido (ϵ_g) a diferencia del agua pura.^{69,74} Por otra parte, el coeficiente de transferencia de masa del lado del líquido (k_L) disminuye con el incremento en la concentración de electrolitos. Pero, este comportamiento se ve compensado por la disminución del diámetro de las burbujas, lo cual aumenta la razón entre el área interfacial y el volumen de gas retenido dando como resultado un incremento neto en el coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$).^{69,74} Además, otras investigaciones han determinado que el $k_L a$ incrementa con la velocidad superficial del gas, la concentración de electrolito y disminuye con la concentración de partículas suspendidas. En cambio, el k_L incrementa con la velocidad del gas y el aumento en el diámetro de las burbujas.⁷⁵

La velocidad de aproximación es otro factor que influye en la coalescencia de las burbujas. Kirkpatrick y Lockett⁷⁶ han encontrado que a bajas velocidades de aproximación el proceso de coalescencia es rápido, sin embargo, a velocidades altas el proceso se vuelve lento. Por otra parte, Castillo *et al.*⁷⁷ encontraron que el tiempo de coalescencia es dependiente de la velocidad de aproximación y el tamaño de las burbujas. Mientras que Orvalho *et al.*⁷⁸ empleando tres rangos de viscosidad (baja, intermedia y alta), encontraron que el tiempo de coalescencia, en el primer caso, tiende a incrementar con la viscosidad del líquido, no depende mucho del tamaño de la burbuja y disminuye con la velocidad de aproximación. Con una viscosidad intermedia, a bajas y altas velocidades de aproximación observaron el mismo comportamiento descrito por Kirkpatrick y Lockett⁷⁶ mientras que a una viscosidad alta, no se observó coalescencia: el tiempo de contacto fue casi independiente de la viscosidad del líquido, era más grande para las pequeñas burbujas y disminuyó con el aumento de la velocidad de aproximación.⁷⁸

La gran mayoría de las investigaciones se han enfocado en evaluar el efecto de los electrolitos sobre la transferencia de masa del O_2 en tanto que no hay suficiente información sobre el efecto que podrían tener sobre la transferencia de CO_2 . Sin embargo, debido a la relevancia actual de los procesos fotoautótrofos en diversas áreas industriales es necesaria mayor investigación sobre los fenómenos de transporte de masa de CO_2 en soluciones electrolíticas.

Efecto de los microorganismos sobre la transferencia de masa

Aunque existen algunos trabajos que han relacionado el efecto de la composición de medios de cultivo con el comportamiento de coalescencia de las burbujas, tal comportamiento en suspensión de microalgas no ha sido bien entendido. De igual manera no existe mucha información relacionada al efecto que estos microorganismos ejercen sobre el fenómeno de transferencia de masa. La mayoría de las investigaciones que buscan caracterizar u optimizar la hidrodinámica y transferencia de masa en fotobiorreactores, se centran en mejorar parámetros de diseño, pero no consideran el efecto que los microorganismos y sus metabolitos pueden ejercer sobre estas variables.⁷⁹⁻⁸²

La hidrodinámica de los cultivos de microalgas puede ser caracterizada por sus propiedades fisicoquímicas: densidad, tensión superficial y viscosidad a la temperatura de operación.⁸³⁻⁸⁵ Khoo *et al.*⁸³ monitorearon el comportamiento del $k_L a$, la hidrodinámica (diámetro de las burbujas y velocidad de ascenso), las propiedades fisicoquímicas del medio de cultivo (densidad, tensión superficial y viscosidad) y el efecto de la velocidad de suministro de gas sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris*. En relación a las propiedades del medio de cultivo, el promedio obtenido para cada una de estas variables permaneció constante a una determinada velocidad de suministro de aire, a pesar del incremento en la densidad celular. Sin embargo, se observó que la microalga *C. vulgaris* presenta propiedades dilatantes de fluido, bajo las cuales la viscosidad incrementa conforme se incrementa el esfuerzo de corte aplicado al cultivo (velocidad de suministro de aire).

Por su parte, los trabajos de Ding *et al.*⁸⁶ han evaluado la distribución de células microalgales (*Chlorella pyrenoidosa*) en diferentes etapas de crecimiento a diferentes alturas en fotobiorreactores. Los resultados de estas investigaciones han demostrado que existe una variación en la concentración celular en la dirección vertical (altura) de los fotobiorreactores. Este comportamiento es atribuido a que un mayor número de células microalgales son adsorbidas en la superficie de las burbujas por quimiotaxis (desplazamiento de un organismo debido a la presencia de un gradiente de concentración), y son transportadas a la parte superior de los reactores.⁸⁴

El movimiento y distribución de las microalgas en la interfase gas-líquido puede afectar la coalescencia de las burbujas y la transferencia de masa. De hecho, Zhao *et al.*⁸⁴ mencionan que se requiere más tiempo para que el fenómeno de coalescencia tenga lugar en suspensión de microalgas que en agua pura. Esto se debe a que las microalgas se desplazan en la interface gas-líquido donde la concentración de CO₂ es más alta, y se adsorben en la interface de las burbujas debido a la fuerza capilar y a la carga superficial característica que poseen.^{84,87} Como resultado de este comportamiento, la tensión superficial se reduce, mientras que la elasticidad de Gibbs se ve incrementada, lo cual

dificulta la coalescencia de las burbujas.^{84,88} Por otra parte, la adsorción de microalgas en la interface gas-líquido también puede prevenir el drenado de la película de líquido ubicada entre burbujas adyacentes mediante la formación de una barrera estérica, la cual impide que la coalescencia tenga lugar.^{84,89} Además, las microalgas adheridas a la interface pueden utilizar las moléculas de CO₂ de las burbujas: reduciendo su velocidad de crecimiento y prolongando el tiempo de coalescencia. También se ha apreciado que un mayor número de microalgas se concentra en la parte central e inferior de las burbujas. Este comportamiento es atribuido al proceso de convección local cerca de la burbuja. Cuando estos elementos coalescen; un mayor número de microalgas se distribuyen y adsorben en la superficie de contacto.⁸⁴

Una vez que las burbujas alcanzan la superficie libre, se rompen originando el enriquecimiento de células microalgales y la variación de la concentración celular en la dirección vertical de los fotobiorreactores. Ding *et al.*⁸⁶ observaron que conforme la densidad celular incrementa más células microalgales son transportadas por las burbujas debido al incremento en la frecuencia de las colisiones entre estos elementos y las microalgas. Durante los ensayos, estos investigadores también monitorearon el diámetro promedio de las burbujas; observaron que durante la presencia de microalgas, la magnitud de este parámetro es menor que el presentado en agua pura. Burbujas más pequeñas son caracterizadas por bajas velocidades de deslizamiento entre fases; comportamiento que no favorece la separación de las microalgas de la interfase gas-líquido. Pero favorece el transporte de células microalgales por las burbujas y origina heterogeneidades en la concentración celular. A diferencia de estos resultados, en los trabajos de Khoo *et al.*⁸³ se observó que durante el cultivo de *Chlorella vulgaris* el diámetro de las burbujas permanece constante a diferentes velocidades de suministro de gas.

En relación a la distribución de los coeficientes de transferencia de masa, se ha observado que éstos siguen la misma tendencia que los efectos de la aireación ejercen sobre la densidad celular.⁸³ Además, en el trabajo de Khoo *et al.*⁸³ se ha identificado una concentración celular y un k_La óptimo a la velocidad de 0.16 vvm. En contraparte, a velocidades superiores (0.18 y 0.19 vvm) la densidad celular y el k_La disminuyeron conforme incrementaba la tasa de aireación. Lo anterior prueba la relación de proporcionalidad que existe entre la concentración celular y el k_La .

Otro aspecto que también ha sido reportado, es una mayor velocidad de ascenso de las burbujas coalescidas en agua pura que en suspensión de microalgas. Esto se debe a que la velocidad de ascenso es influenciada por la flotabilidad y la resistencia viscosa. La flotabilidad de las burbujas coalescidas en agua pura es mucho mayor que en suspensión de microalgas debido al mayor volumen que presentan y a la densidad del líquido. Por otra parte, su resistencia viscosa es mucho más pequeña. Por lo tanto, la

aceleración de las burbujas coalescidas bajo esta condición es mucho mayor que en cultivos microalgales.⁸⁴

También se ha observado, durante la coalescencia, que el rompimiento de la película de líquido ubicada entre las burbujas provee la energía cinética necesaria para desencadenar la oscilación de la burbuja coalescida. Este fenómeno se debe al incremento del área de contacto entre las burbujas. En suspensión de microalgas esta área de contacto es mucho mayor que la presentada en agua pura debido a la disminución de la tensión superficial. Por lo tanto, se puede esperar que las oscilaciones de las burbujas sean más intensas. Este fenómeno es propicio para la transferencia de masa de CO₂, ya que incrementa la velocidad de deslizamiento entre las fases. Por lo tanto el k_L puede verse influenciado de manera positiva, y junto con el incremento en el área disponible para la transferencia de masa el $k_L a$ puede ser favorecido.⁸⁴

Es de interés para la presente propuesta de tesis evaluar el efecto de una microalga sobre la transferencia de masa. En particular se seleccionó la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* por ser un microorganismo modelo usado para estudiar el metabolismo y bioenergética de organismos fotosintéticos. Además, puede crecer de forma mixotrófica, adaptarse a diversas condiciones ambientales y su manipulación genética es más sencilla en comparación a otras microalgas.^{23,24,90-92} Estas características la hacen un organismo con gran aplicabilidad en la producción de diversos tipos de metabolitos.

Efecto de los metabolitos sobre la transferencia de masa

Las microalgas en vez de vivir como cultivos puros de células individuales siempre asumen la forma de agregados polimicrobianos (flóculos, lodos, gránulos o biopelículas) en la interfase. Los materiales que mantienen unidas las células para formar una matriz heterogénea son excretados por ellas mismas en su ambiente inmediato.⁹³ Estas excreciones son conocidas como sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y están compuestas por una mezcla compleja de biopolímeros de alto peso molecular. Las EPS son sustancias naturales muy versátiles que pueden funcionar como anticoagulantes que protegen las células contra la deshidratación y el efecto adverso de sustancias tóxicas, sirven como fuentes de carbono y energía bajo condiciones de estrés; además pueden modificar significativamente las propiedades fisicoquímicas de los agregados algales, particularmente la carga superficial, viscosidad, floculación, estructura y propiedades de sedimentación.^{93,94}

Las sustancias extracelulares son un conjunto de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, sustancias húmicas, ácido urónico y componentes inorgánicos. El rango y las fracciones de sus constituyentes están influenciados por varios factores, incluyendo la especie, cepa, tipo de sustrato, disponibilidad de nutrientes, condiciones de

operación, fisiología y edad del cultivo.⁹³⁻⁹⁶ De acuerdo con algunos autores, los EPS de mayor importancia durante el cultivo de microalgas son los exopolisacáridos y exoproteínas debido a su abundancia y el gran potencial de aplicaciones que poseen, tales como: inmunomoduladores, anticoagulantes, antivirales, antioxidantes, aditivos alimenticios, adhesivos y tratamiento de aguas residuales.^{93,94,96,97} El efecto que en particular pueden tener estos dos tipos de sustancias sobre la transferencia de masa debe analizarse si se desea conocer el comportamiento de transporte de CO₂ en cultivos microalgales.

Proteínas

Las proteínas son sustancias aplicadas en áreas industriales como la farmacéutica, terapéutica, alimenticia, entre otras. Se han realizado muchos estudios sobre las propiedades fisicoquímicas de proteínas como Lactoferrinas bovinas, proteínas globulares (BSA), L-fenilalanina, β -caseína, β -lactoglobulina, globulinas de avena, anticuerpos, etc., así como su variación en función de su concentración y otras variables como el pH y la temperatura en solución acuosa.⁹⁸⁻¹⁰² Los resultados de estas investigaciones han arrojado que la viscosidad incrementa con el aumento en la concentración de aminoácidos y proteínas.¹⁰⁰⁻¹⁰² Este comportamiento es atribuido a las interacciones entre partículas. Se sabe que cuando un soluto es disuelto en un solvente (soluciones diluidas) algunas de las moléculas del solvente se ligan a los iones generados por las interacciones ión-solvente, lo cual conduce a un incremento en la viscosidad.¹⁰⁰ Por su parte, en soluciones concentradas, las distancias entre las moléculas de soluto se reducen dando como resultado interacciones significativas entre ellas (interacciones proteína-proteína, PPI), las cuales son las principales responsables de este fenómeno.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Es de esperarse que ante un incremento de la concentración de proteínas y de la viscosidad el transporte local de masa se vea disminuido.

En relación a la tensión superficial, diversas investigaciones han demostrado que la tensión superficial de soluciones proteicas disminuye con el incremento en la concentración de proteínas.¹⁰⁰⁻¹⁰² El grado en que esta variable se ve afectada está en función del tipo de proteína, su plegamiento, contenido y disposición de residuos hidrofóbicos, así como del grado y naturaleza de sus interacciones moleculares.^{98,106,107}

La cinética de adsorción también juega un papel muy importante en las propiedades interfaciales de las proteínas. Ulaganathan *et al.*¹⁰⁷ estudiaron el efecto de la concentración de NaCl y CaCl₂ sobre este parámetro. Sus resultados sugieren que la cinética de adsorción interfacial de las proteínas es mejorada en la presencia de ambas sales. No obstante, la influencia del CaCl₂ es mucho más significativa en comparación a la del NaCl. Esto podría estar relacionado a un mayor efecto del ión divalente Ca²⁺ sobre la reducción de las cargas negativas de las proteínas en comparación al ion Na⁺, lo cual favorece su adsorción en la interfase.

Las sustancias que minimizan la tensión superficial como las proteínas son denominadas tensoactivas o surfactantes y entre sus características destacan su capacidad emulsificante y estabilizadora de espumas. Estas propiedades han sido muy estudiadas en la industria alimentaria ya que se relacionan con las propiedades estructurales y texturales de los alimentos.^{106,108,109}

Por otra parte, no hay información disponible acerca del efecto que las proteínas y sus propiedades fisicoquímicas ejercen sobre los fenómenos de transferencia de masa. No obstante, Asgharpour *et al.*¹¹⁰ y Kim *et al.*¹¹¹ han realizado estudios con tensoactivos orgánicos e inorgánicos como alcanos, bromuro de hexiltrimetilamonio (HTAB), bromuro de octiltrimetilamonio (OTAB), bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTAB) y sodio dodecilo benceno sulfonato (SDBS). Los resultados de estos investigadores han demostrado que este tipo de sustancias mejoran la transferencia de masa en sistemas gas-líquido.

El efecto positivo de los surfactantes sobre el $k_L a$ se debe al efecto inhibitorio de la coalescencia de las burbujas. De hecho, Jia *et al.*¹¹² al comparar el comportamiento de soluciones de sodio dodecilo benceno sulfonato (SDBS) y *Tween* 80 con agua pura observaron que estas sustancias tienden a disminuir el diámetro promedio de las burbujas; al producirse burbujas más pequeñas el área interfacial incrementa hasta alcanzar un valor constante. Este comportamiento mejora la tasa de transferencia de masa ($k_L a$) como ha sido observado por Kim *et al.*¹¹¹ en un sistema gas-líquido (metano-agua) empleando surfactantes catiónicos.

Carbohidratos

Los polisacáridos son compuestos ampliamente estudiados debido a su versatilidad y posible utilidad en aplicaciones industriales como la farmacéutica, terapéutica, medicina regenerativa, mecánica e industria alimentaria.¹¹³ Como parte de las EPS este tipo de sustancias desempeñan funciones adhesivas, cohesivas, agregativas, gelificantes, estructurales y texturales, entre otras, que pueden afectar las propiedades fisicoquímicas como la viscosidad y la tensión superficial de las soluciones en las que se encuentran.^{109,113} Tales propiedades son significativas para la operación de los biorreactores y pueden afectar los fenómenos interfaciales de transferencia de masa.^{113,114}

Actualmente se sabe, por las investigaciones de Jamnongwong *et al.*¹¹³ que el coeficiente de transferencia de masa lateral líquido (k_L) del O_2 se ve reducido por el incremento en la concentración de carbohidratos (glucosa). Este comportamiento se atribuye a la disminución de la capacidad difusiva del O_2 a causa del incremento en la viscosidad de la solución. La tasa de cambio del k_L con respecto a la difusividad depende de la naturaleza de los carbohidratos presentes en la solución.

Otro aspecto observado en el trabajo de Jamnongwong *et al.*¹¹³ es una reducción significativa en el diámetro promedio de las burbujas cuando la concentración de glucosa supera los 20 g/L. A concentraciones por debajo de este valor no se observa diferencia alguna en la magnitud de este parámetro. Este comportamiento se debe a las variaciones en la tensión superficial y/o viscosidad de las soluciones bajo estudio. La reducción en el diámetro de las burbujas está directamente relacionada con el área interfacial; teóricamente una mayor área se traduce en un incremento de la tasa volumétrica de transferencia de masa.^{73,74} No obstante, este comportamiento aún no ha sido evaluado en soluciones de carbohidratos.

Como parte de este proyecto se monitoreó la concentración de biomasa, carbohidratos y proteínas totales, así como la variación de la concentración de nutrientes (FI) en el medio de cultivo. Lo anterior con el objetivo de evaluar el efecto que estas variables ejercen sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$), el coeficiente local de transferencia de masa (k_L) y el área interfacial por unidad de volumen disponible para la transferencia de masa (a).

JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los trabajos de investigación relacionados con los fenómenos de transporte de masa en biorreactores han sido dirigidos a evaluar el efecto de los electrolitos sobre la transferencia de O_2 en soluciones acuosas electrolíticas. Sin embargo, existe poca información respecto al efecto de la combinación de sales, microalgas y metabolitos extracelulares sobre tal proceso, y menos aún sobre la transferencia de CO_2 en medios de cultivo en los cuales la disponibilidad de una fuente de carbono puede comprometer la viabilidad del proceso. Lo anterior motiva la realización del presente trabajo de investigación con el que se pretende evaluar el efecto de las sales que componen el medio de cultivo *Sueoka*, a diferentes concentraciones y velocidades superficiales de gas, y la presencia de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* sobre la hidrodinámica y transferencia de masa del CO_2 en columnas de burbujeo. Esto contribuirá a la generación de conocimiento que a mediano o largo plazo puede ser útil para la implementación y optimización de procesos de obtención de metabolitos de interés industrial a través de microalgas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Investigar los efectos de la composición del medio de cultivo sobre la transferencia de dióxido de carbono durante el desarrollo del cultivo fotoautotrófico de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* en un fotobiorreactor de columna de burbujeo.

Objetivos particulares

1. Monitorear la composición dinámica de la biomasa, sales minerales y metabolitos extracelulares (carbohidratos y proteínas totales) durante el cultivo fotoautotrófico de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* en un fotobiorreactor de columna de burbujeo, a diferentes velocidades superficiales de suministro de aire.

2. Monitorear la evolución del k_La y a durante el cultivo fotoautotrófico de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* en un fotobiorreactor de columna de burbujeo, a diferentes velocidades superficiales de suministro de aire.

3. Analizar y explicar la relación de las variables independientes (concentración de componentes y velocidad superficial de aire) con las variables de respuesta (k_La y a).

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental del proyecto consistió en la preparación del cultivo semilla; una vez que se caracterizó el crecimiento celular se procedió a inocular el fotobiorreactor. Posteriormente, se monitoreó la concentración de nutrientes, biomasa y metabolitos extracelulares. Al mismo tiempo, se realizó la determinación de las variables hidrodinámicas (d_{32} , ϵ_g y a) y los coeficientes de transferencia de masa (k_L y $k_L a$). Por último se realizó el análisis de los resultados con un análisis de covarianza (ver Figura 2).

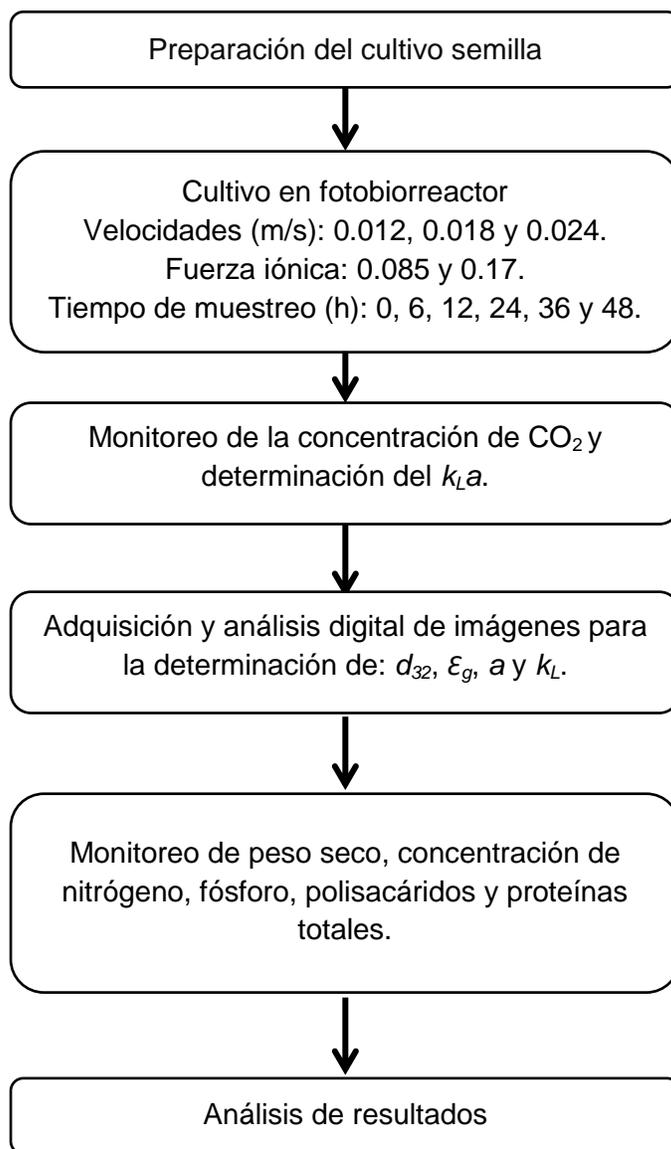


Figura 2. Actividades realizadas durante el desarrollo experimental.

Equipamiento experimental

Se empleó una columna de burbujeo con un diámetro interno de 9.5 cm y 95 cm de altura, la cual cuenta con chaqueta para la recirculación de agua, un difusor de vidrio poroso desmontable y un cubo de vidrio concéntrico para evitar la distorsión de la curvatura de la columna al realizar la adquisición de imágenes. Esto último fue realizado con una cámara Nikon modelo *J5* de alta velocidad. Para el monitoreo de la concentración de CO_2 en la corriente gaseosa a la salida del biorreactor se utilizó un sensor Vaisala CARBOCAP® *Hand-Held Carbon Dioxide Meter*. La iluminación necesaria para el cultivo fue suministrada por 4 lámparas fluorescentes blancas frías T5. La temperatura de operación fue de 25 °C y se reguló con un criotermostato de circulación de agua *Julabo F12*. El montaje experimental se presenta en la Figura 3. La adquisición y tratamiento de datos se llevó a cabo con un ordenador portátil.

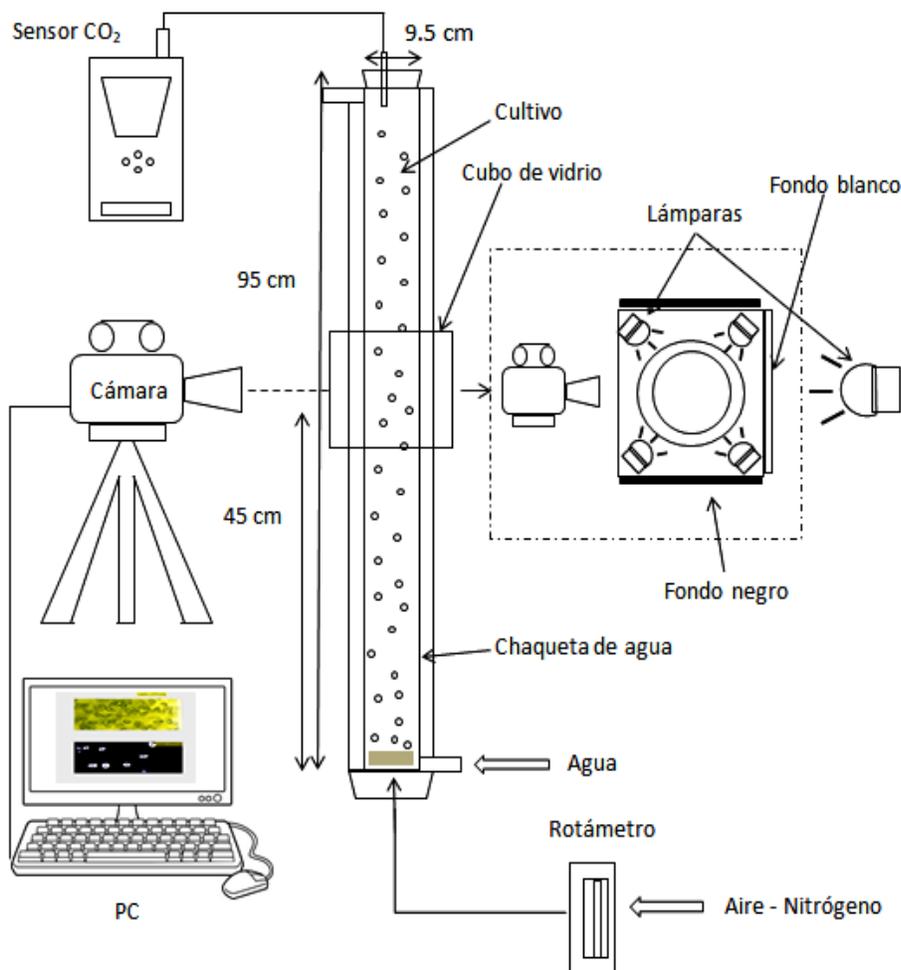


Figura 3. Montaje experimental del sistema bajo estudio.

Cultivo madre

Se utilizó la cepa CC-124 de *C. reinhardtii*; proporcionada por *Chlamydomonas center* (USA). Inóculos de 200 mL de *C. reinhardtii* fueron añadidos a 500 mL de medio de cultivo *Sueoka* (HSM) en matraces Erlenmeyer de 1 L y mantenidos bajo iluminación continua a 162 μmol fotones/ m^2s . Los matraces se agitaron diariamente de forma manual para favorecer el crecimiento retardado de las microalgas.¹¹⁵ El 70% del volumen de cada cultivo batch fue remplazado cada 30 días con medio fresco. La concentración del cultivo al momento de realizar el cambio fue de 11.66×10^4 cel/mL.

Preparación de semilleros

Para el armado de los semilleros se utilizaron 2 botellas pet de 2L de capacidad como fotobiorreactores, 2 de 600 mL como humidificadores para evitar la pérdida de medio por el arrastre del aire y 2 más de la misma capacidad como trampas de cloro para evitar la liberación de microalgas al ambiente. Se emplearon conexiones T, tapas horadadas, filtros de nylon con un tamaño de poro de 0.45 μm y diámetro de 25 mm, mangueras de plástico de $\frac{1}{4}$ ", portafiltros Swinnex de 25 mm de diámetro, lámparas fluorescentes blancas frías T5 y jeringas de 20 mL. Todo el material fue previamente esterilizado en un baño de cloro al 5% durante una hora, enjugado y posteriormente expuesto a luz ultravioleta (UV) por el mismo periodo de tiempo en una campana de flujo laminar. La preparación de los semilleros se realizó de la siguiente manera:

- a) Fotobiorreactor: A cada recipiente de 2 L se agregaron 1350 mL del medio de cultivo *Sueoka* y 150 mL de un cultivo madre con una concentración de 11.66×10^4 cel/mL.
- b) Humidificador: A cada recipiente de 600 mL se agregaron 450 mL de agua desionizada estéril.
- c) Trampa de cloro: A cada recipiente de 600 mL se agregaron 450 mL de solución de cloro al 5%.

Cada recipiente se cerró con una tapa horadada y se procedió al armado de los semilleros como se describe en el siguiente párrafo y en la Figura 4.

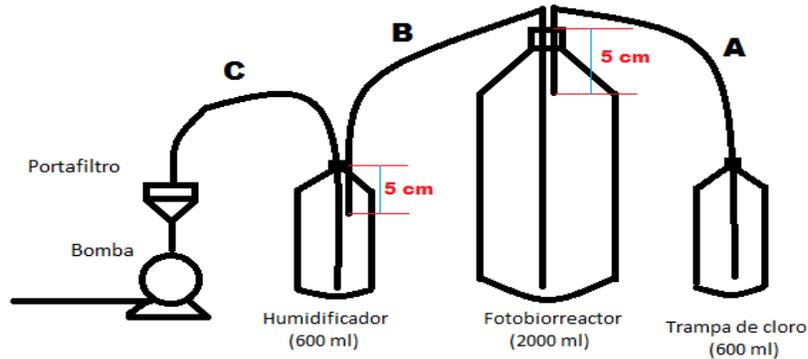


Figura 4. Conexiones y armado de los semilleros.

El primer paso consistió en introducir un extremo de la manguera “A” hasta el fondo de la trampa de cloro por uno de los orificios de la tapa horadada; el otro extremo de la manguera se introdujo 5 cm en el semillero (orificio derecho). Posteriormente se tomó la manguera “B” se introdujo hasta el fondo del fotobiorreactor (orificio izquierdo) y el otro extremo se introdujo 5 cm en el humidificador (orificio derecho), el cual se conectó al portafiltro a través de la manguera “C”. Por último el portafiltro se conectó a la bomba de suministro de aire.

Cultivo en semilleros

Para el cultivo de *C. reinhardtii* se empleó el medio de cultivo *Sueoka* (HSM) elaborado en base al procedimiento de *Sueoka*.¹¹⁶ Los semilleros fueron colocados en una habitación a una temperatura de 25 ± 1 °C y una intensidad luminosa de $100 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (7400 luxes) ajustados en función de la distancia de la fuente luminosa (lámparas fluorescentes blancas frías) a la pared de cada semillero con un luxómetro Sper Scientific. El pH de los cultivos fue monitoreado cada 24 h con un potenciómetro. El aire suministrado se hizo pasar por un filtro de nylon con un tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ para mantener el cultivo en condiciones axénicas. La tasa de aireación se fijó en 1 vvm empleando un rotámetro Cole-Palmer. La densidad celular se monitoreó cada 24 horas a través del conteo celular y medición de la densidad óptica como se describe más adelante.

Cultivo en fotobiorreactor

El fotobiorreactor a escala piloto con un volumen de operación de 5.5 L fue inoculado al 10% cuando la concentración celular de los semilleros alcanzó entre 3 y 4×10^6 cel/mL (48 h). Las condiciones de iluminación y temperatura se mantuvieron igual a las descritas en el apartado anterior. Los parámetros que fueron modificados son la concentración de macronutrientes (fuentes de nitrógeno y fósforo) y el flujo volumétrico de

aire. La modificación de los macronutrientes se realizó con el objetivo de incrementar la fuerza iónica del medio de 0.085 (normal) a 0.17. Este proceso fue realizado duplicando los volúmenes necesarios de las soluciones de fosfatos y Beijerinck's para preparar 1 L de medio *Sueoka* con una fuerza iónica inherente de 0.085 (ver composición en el Anexo 1). La fuerza iónica de la solución se calculó a través de la Ecuación [34].

$$I = \frac{1}{2} \sum \frac{m_i}{m^0} z_i^2 \quad [34]$$

Donde I representa la fuerza iónica de la solución y es adimensional; z_i es la carga iónica; m_i es la concentración iónica: moles de iones por kilogramo de solución (mol/kg); y m^0 es una constante igual a 1 mol/kg.¹¹⁷

Una vez realizado el inóculo se procedió a la realización de las corridas experimentales. Se monitoreo la concentración de biomasa, nitrógeno amoniacal, fósforo total, polisacáridos y proteínas totales. Estas mediciones permitieron tener un estimado de la evolución con respecto al tiempo de la composición del medio de cultivo: concentración de biomasa (peso seco celular), concentración de sales (nitrógeno amoniacal y fósforo total, asumiendo un consumo proporcional de las demás sales), y concentración de metabolitos mayoritarios secretados por las microalgas (polisacáridos y proteínas).

Al mismo tiempo la concentración de CO₂ fue monitoreada mediante un sensor Vaisala CARBOCAP® para la determinación del k_La mediante el método dinámico. Por su parte, las variables hidrodinámicas (diámetro de sauter y área interfacial) fueron calculadas a partir del análisis digital de imágenes con el programa MATLAB. El k_L fue calculado a partir de los datos de k_La y a . Por último se analizaron los resultados empleando un análisis de covarianza (ANCOVA) con un factor (velocidad de suministro de aire) y 4 covariables (proteínas, carbohidratos, biomasa y fuerza iónica) y se discutió el efecto de las variables de interés sobre las variables de respuesta (k_La , a y k_L).

Los procedimientos realizados para el monitoreo y determinación de los parámetros mencionados anteriormente se describen en los siguientes apartados. Cada corrida experimental tuvo una duración de 2 días (48h). El monitoreo de la concentración de biomasa, carbohidratos, nitrógeno amoniacal y proteínas se realizó cada 12 horas, sólo durante el primer día se realizó un monitoreo intermedio a las 6 horas. En esos mismos tiempos se llevaron a cabo pruebas para determinar k_La y se obtuvieron imágenes y datos para la estimación de las variables hidrodinámicas. La medición de fósforo total se llevó a cabo a las 24 y 48 h para complementar las mediciones de nitrógeno total. En todas las pruebas, excepto para la determinación de biomasa, se utilizó el sobrenadante obtenido de la centrifugación de 15 mL de cultivo. El proceso de separación se llevó a cabo en una centrífuga Termo Fisher SL16R a una temperatura de 4°C y una aceleración de 6000xg durante 5 minutos.¹¹⁸

Determinación de la concentración celular

Para la determinación de la densidad celular se tomó 1 mL de muestra de cada semillero y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se le añadieron 10 μ L de lugol para inmovilizar las células y se procedió a homogenizar la muestra por 10 s en un agitador mecánico. Se tomaron muestras de 10 μ L de la solución y se colocaron en los cuadrantes de la cámara de Neubauer. Por último se procedió a realizar el conteo celular con un Microscopio Leica CME.¹¹⁹

Determinación de la densidad óptica

Para la determinación de la densidad óptica se empleó un espectrofotómetro GENESYS 20. Se tomaron 3 muestras (de 3 mL cada una) de cada semillero. Se ajustó la longitud de onda del espectrofotómetro a 750 nm y se procedió a la determinación de la densidad óptica.¹¹⁹ Por último se relacionó la densidad celular con la densidad óptica de cada muestra a través de una curva de calibración concentración/absorbancia.

Determinación del peso seco celular

Se tomaron 2 muestras (de 5 mL cada una) del cultivo y se filtraron utilizando un equipo de filtración Milipore de 15 ml con filtros de membrana a peso constante de 2.5 cm de diámetro y un tamaño de poro de 0.45 μ m. Posteriormente las membranas fueron colocadas en cajas de aluminio y se dispusieron en una estufa (FELISA) a 95 °C por 24 h. Después del periodo de secado, se sacaron los filtros y se colocaron en un desecador por 30 minutos. Por último, se pesaron las membranas con una balanza analítica (OHAUS) y por diferencia de pesos se determinó la cantidad de biomasa por mL de cultivo.¹²⁰

Determinación de proteína total

Para la determinación de proteína total presente en el cultivo se usó el método de Lowry con precipitación de proteínas (*Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification*). Se tomaron 2 muestras (de 1 mL cada una) del sobrenadante en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se les agregó 0.1 mL de desoxicolato, se mezclaron y dejaron reposar por 10 minutos. Posteriormente se les añadió 0.1 mL de ácido tricloroacético, se homogenizaron y centrifugaron a 16000xg durante 10 minutos a una temperatura de 4°C en una centrifuga Thermo Fisher SL16R. El sobrenadante fue desechado y el pellet obtenido se disolvió en 1 mL del reactivo de Lowry. Las soluciones se transfirieron a tubos Eppendorf de 5 mL. Los tubos de 1.5 mL se enjuagaron con 1 mL de agua desionizada. Las soluciones de enjuague se agregaron a los tubos de 5 mL, se homogenizaron y dejaron reposar por 20 minutos. Pasado ese tiempo se añadió 0.5 mL del reactivo Folin & Ciocalteu a cada muestra, se mezclaron y dejaron reposar por 30 minutos más. Por último se procedió a la medición de la densidad óptica y cálculo de la concentración de proteína,

por interpolación de los valores de absorbancia obtenidos, en una curva patrón.¹²¹ Las absorbancias fueron medidas a través del espectrofotómetro Lambda 25 a una longitud de onda (λ) de 750 nm.

Determinación de nitrógeno amoniacal y fósforo total

Para la determinación de nitrógeno total se empleó el kit *Nitrogen-Ammonia Reagent Set, TNT, AmVer (Salicylate), High Range*, basado en el método del salicilato. Se tomaron dos muestras del sobrenadante (de 25 μ L para una fuerza iónica inicial de 0.085 y de 10 μ L para 0.17), se llevaron a un volumen final de 100 μ L con agua desionizada y se añadieron en viales previamente preparados. A cada vial se le agregó salicilato y cianurato de amoníaco. Los viales fueron agitados suavemente para homogenizar la mezcla y posteriormente se dejaron reposar por 20 minutos. Por último se realizó la determinación de amoníaco con un colorímetro Hach DR 900 en base al procedimiento especificado por el fabricante del kit.

La determinación de fósforo total se llevó a cabo con el kit *Phosphorus, Total, Molybdovanadate TNT Method*, basado en el método de la digestión del molibdovanadato con persulfato ácido. Se tomaron dos muestras (de 300 μ L para una fuerza iónica de 0.085 y 150 μ L para 0.17), se llevaron a un volumen final de 5000 μ L con agua desionizada y se añadieron en viales previamente preparados. A cada vial se le agregó persulfato de potasio. Se homogenizaron y colocaron durante 30 minutos en un reactor DRB200 precalentado a 150 °C. Transcurrido ese tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les añadió 2 mL de hidróxido de sodio 1.54 N. Se homogenizaron de nuevo y se les agregó 0.5 mL de molibdovanadato. Se mezcló el contenido y dejó reposar por 7 minutos. Por último se midió el contenido de fósforo con un colorímetro Hach DR 900 en base al procedimiento especificado por el fabricante del kit.

Determinación de carbohidratos totales

Para determinar la cantidad de carbohidratos presentes en el cultivo se elaboró una curva de calibración con los valores de absorbancia obtenidos de la dilución de una solución patrón. Estos valores se ajustaron a una línea recta usando el modelo de regresión lineal. Se tomaron 2 muestras (de 1 mL cada una) del sobrenadante y se colocaron en tubos de ensaye de 10 mL de capacidad. A cada muestra se le añadieron 0.5 mL de fenol al 5% y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado al 95%, posteriormente se mantuvieron en reposo durante exactamente 10 min. Transcurrido ese tiempo se homogenizaron en un vórtex y se colocaron en agua fría por 15 minutos. Por último se mezcló el contenido de cada muestra y se midió la densidad óptica a una longitud de onda (λ) de 490 nm en un espectrofotómetro Lambda 25. La concentración de carbohidratos totales se determinó por interpolación de los valores de absorbancia obtenidos, en la curva de calibración.^{122,123}

La determinación de carbohidratos y proteínas totales presentes en el medio se llevó a cabo debido a que las microalgas excretan estos compuestos durante su cultivo.¹²⁴ La acumulación de estas sustancias afecta la viscosidad y densidad de la fase líquida; lo cual, modifica la hidrodinámica del sistema pudiendo afectar significativamente la transferencia de CO₂.¹¹⁴

Determinación del k_La

Para la transferencia de dióxido de carbono, se empleó el método dinámico. Se inyectó nitrógeno al reactor (degasificación) hasta que la concentración de CO₂ en la corriente gaseosa a la salida del biorreactor alcanzó un mínimo (aproximadamente 20 ppm). Posteriormente se inyectó aire al sistema (gasificación) a una velocidad de 0.012, 0.018 o 0.024 m/s (dependiendo de la condición bajo estudio). La concentración de CO₂ en la fase líquida se estimó mediante la relación entre la concentración de CO₂ en la fase gaseosa y la constante de Henry (1.205) a una presión de 1 atm y una temperatura de 25°C. La concentración de saturación de CO₂ en el sistema se determinó de forma análoga. Sólo que en este caso, se trabajó con el promedio de la concentración de CO₂ en equilibrio. La concentración de CO₂ se monitoreó con un sensor Vaisala CARBOCAP®. El k_La se calculó como un parámetro de ajuste de un modelo de transferencia de masa:

$$\frac{d\rho_{CO_2L}}{dt} = k_La(\rho_{CO_2L}^* - \rho_{CO_2L}) - b\mu\rho_{XL} \quad [35]$$

Esta ecuación considera que la variación de la concentración de dióxido de carbono en el líquido se debe tanto al transporte desde la fase gaseosa como al consumo por parte de las microalgas. Una vez integrada la Ecuación [35] se obtiene la siguiente expresión:

$$\rho_{CO_2L} = \frac{(k_La * \rho_{CO_2L}^* - b * \mu * \rho_{XL})(1 - \exp(-k_La * t))}{k_La} \quad [36]$$

Donde k_La es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (h⁻¹); μ es la tasa específica de crecimiento (h⁻¹); $\rho_{CO_2L}^*$ es la concentración de saturación de CO₂ (g/L), ρ_{CO_2L} la concentración de CO₂ presente en el medio (g/L); ρ_{XL} la concentración de biomasa (gBiomasa/L) y b es el rendimiento sustrato disponible/Biomasa (gCO₂/gBiomasa). El parámetro ρ_{XL} se determinó a partir de un polinomio de segundo grado en función del tiempo (R²=0.95). La tasa específica de crecimiento se calculó con la Ecuación [37]. Donde $\frac{d\rho_{XL}}{dt}$ es la primera derivada de la concentración de biomasa con respecto al tiempo. El valor del parámetro b se obtuvo dividiendo la concentración de

saturación de CO₂ en el líquido en un tiempo dado entre la concentración de biomasa (ρ_{XL}) en ese mismo tiempo, Ecuación [38].

$$\mu = \frac{1}{\rho_{XL}} * \frac{d\rho_{XL}}{dt} \quad [37]$$

$$b = \frac{\rho^*_{CO_2,L}}{\rho_{XL}} \quad [38]$$

El parámetro b representa un rendimiento que indica la masa de dióxido de carbono consumida por masa de biomasa producida. Sin embargo, por tratarse de un rendimiento instantáneo y no uno global, este valor se aproximó como una relación entre un cambio de concentración representativa de dióxido de carbono en el medio (carbono disponible) y el orden de magnitud promedio del cambio de concentración de la biomasa, ambos representados en la división dada por la Ecuación [38].

El ajuste del k_La se realizó planteando la minimización de la suma de errores (mínimos cuadrados) usando la herramienta Solver de Excel. El algoritmo usado para la resolución del problema es el *Gradiente Reducido Generalizado (GRG)*. Este algoritmo parte de una solución conocida (valor inicial) para realizar una serie de aproximaciones (derivadas) dentro de una región factible (límites) con la finalidad de mejorar el valor de la función objetivo (k_La). El proceso de optimización se detiene hasta que el algoritmo alcanza un punto en el cual no se puede mejorar dicho valor o el potencial de mejora es muy pequeño. El valor inicial del k_La empleado para realizar el ajuste es la pendiente de la Ecuación [35] integrada sin considerar el término de consumo ($b\mu\rho_{XL}$).

Adquisición y análisis digital de imágenes

Un cubo de vidrio de aproximadamente 15 cm de altura se colocó concéntricamente a la columna a una distancia de 45 cm de la base del reactor. El cubo se llenó con agua para evitar la distorsión óptica de las imágenes debido a la curvatura de la columna. La adquisición de imágenes se llevó a cabo con una videocámara Nikon modelo *J5* ajustada de forma manual para lograr un buen enfoque. Una lámpara incandescente de 60 W se colocó en la parte posterior del cubo de vidrio para mejorar la claridad y destacar el contorno de las burbujas. En la pared, dentro de la columna se colocó una banda graduada con una escala milimétrica para determinar la relación pixel-distancia.

Se tomaron clips de video con una duración de 3 s y se enviaron a una computadora personal donde fueron tratados mediante la caja de procesamiento de

imágenes de Matlab 2015a. El tratamiento consistió en la obtención de 25 cuadros (1 de cada 150) de los 3600 que conforman un clip de video. Cada imagen fue transformada a escala de grises; se invirtieron sus colores blanco y negro, y se mejoró su contraste. Posteriormente, se delimitaron los bordes de las burbujas y éstas se rellenaron de color blanco. Por último, se obtuvieron los ejes superior e inferior de las burbujas (200 elementos) y mediante la relación pixel-distancia se calcularon las variables hidrodinámicas y el k_L a través de las relaciones presentadas en el siguiente apartado.

Determinación del diámetro promedio de Sauter (d_{32}), área interfacial (a) y k_L

Para la determinación de las variables hidrodinámicas y el k_L primero se debe calcular el diámetro equivalente de las burbujas a través de la Ecuación [39].⁷³

$$d_{bi} = \sqrt[3]{dH^2 dL} \quad [39]$$

Donde d_{bi} es el diámetro asociado con una esfera equivalente, dH y dL son los ejes mayor y menor de cada burbuja, respectivamente. Una vez que se tiene este parámetro se puede calcular el diámetro promedio de Sauter con la Ecuación [40].⁵⁵

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_{bi}^3}{\sum n_i d_{bi}^2} \quad [40]$$

Donde d_{32} es el diámetro promedio de Sauter y n_i es el número de burbujas con un mismo diámetro equivalente. El área interfacial se calculó a partir de la Ecuación [41].^{69,73}

$$a = \frac{6 * \varepsilon_G}{d_{32} * (1 - \varepsilon_G)} \quad [41]$$

Donde ε_G es la fracción de gas retenido dentro del sistema y se calcula como la razón entre el incremento del volumen del cultivo debido al suministro de aire (ΔV) y el volumen total ($\Delta V + V_L$) mediante la Ecuación [42].⁵⁵

$$\varepsilon_G = \frac{\Delta V}{V_L + \Delta V} \quad [42]$$

Por último el k_L se determinó como la razón entre el $k_L a$ y a ; Ecuación [43].⁶⁹

$$k_L = \frac{k_L a}{a}$$

[43]

Diseño experimental

Por la naturaleza de las variables consideradas en el experimento, los resultados fueron tratados mediante un análisis de covarianza (ANCOVA) con un solo factor (velocidad de suministro de aire) y 4 variables concomitantes (proteínas, carbohidratos, fuerza iónica y biomasa). El diseño estadístico y análisis de los resultados se llevó a cabo con el software Minitab 17.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evolución de las variables medidas a lo largo del cultivo microalgal

Con la finalidad de relacionar los valores de las variables hidrodinámicas y las concentraciones con el avance temporal del cultivo, a continuación se presentan los resultados obtenidos con respecto al tiempo. Este aspecto es importante pues permite relacionar cualitativamente las variables de entrada, de salida y las covariables en una misma escala de referencia (tiempo), antes de analizar la funcionalidad entre ellas.

Variación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_La) durante el cultivo celular

Se puede apreciar un aumento del k_La a lo largo del tiempo experimental (ver Figura 5). Es claro el efecto que presenta la velocidad superficial sobre la transferencia de masa, ya que conforme este parámetro incrementa el k_La aumenta alcanzando valores máximos a la velocidad de 0.024 m/s para ambas condiciones iniciales de fuerza iónica (FI). Los valores más altos registrados para k_La corresponden a $29.19 \pm 0.57 \text{ h}^{-1}$ para una FI inicial de 0.085 (a) y $28.49 \pm 1.83 \text{ h}^{-1}$ para una FI inicial de 0.17 (b); ambos obtenidos a las 48 h. No hay diferencia estadística entre estos valores. De hecho, entre FI iniciales no se distingue una variación considerable en el k_La para una velocidad en particular durante el desarrollo experimental.

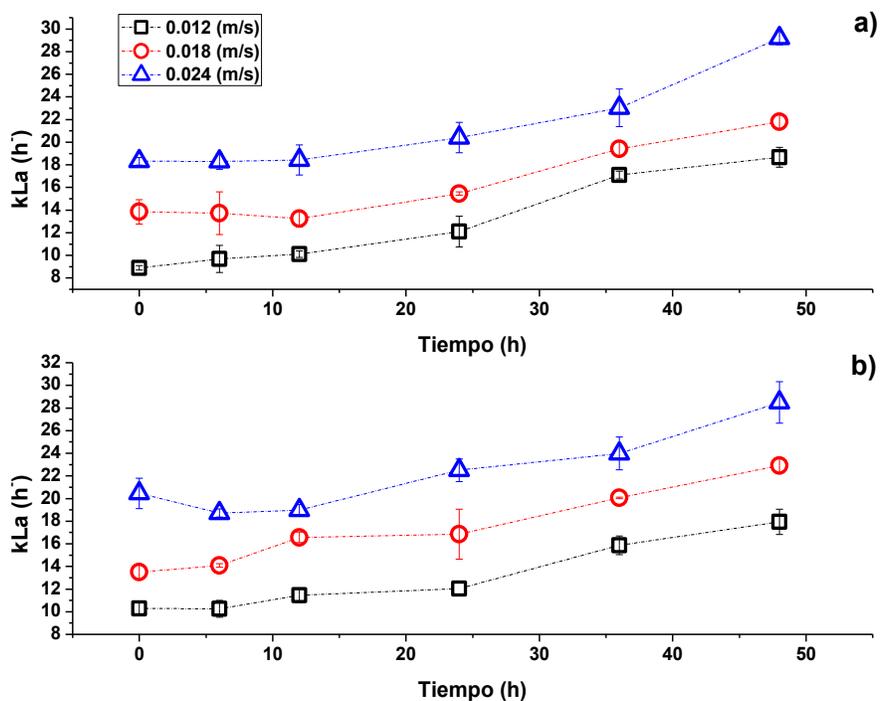


Figura 5. Evolución del k_La con respecto al tiempo de cultivo: a) para una fuerza iónica inicial de 0.085 y b) 0.17.

Los resultados presentados en la Figura 5 dejan claro que el $k_L a$ depende de la velocidad superficial del aire. La dependencia observada con respecto al tiempo puede interpretarse en términos de la evolución de la concentración de biomasa y la FI, como se discutirá más adelante. Los valores de $k_L a$ presentados fueron obtenidos con un intervalo de confianza del 95% alcanzando un grado de ajuste (R^2) del 99.03%.

Variación de la concentración de biomasa con respecto al tiempo de cultivo

La concentración de biomasa aumenta con respecto al tiempo, y sigue una tendencia similar al comportamiento del $k_L a$, lo cual es indicativo de la relación entre estas variables. Para una FI inicial de 0.085 (Figura 6a) aparentemente la concentración de biomasa se ve afectada por la velocidad superficial, sin embargo la variabilidad de los resultados en función de las barras de error muestra que no hay diferencia estadística entre las concentraciones monitoreadas en un tiempo dado. El mismo comportamiento, es apreciado con mayor claridad a la FI inicial de 0.17 (Figura 6b). Estos resultados entran en conflicto con lo reportado en la literatura, donde se menciona que el crecimiento microalgal se ve afectado por el aumento en el esfuerzo de corte aplicado al cultivo a causa del incremento en la velocidad de suministro de aire.^{82,83}

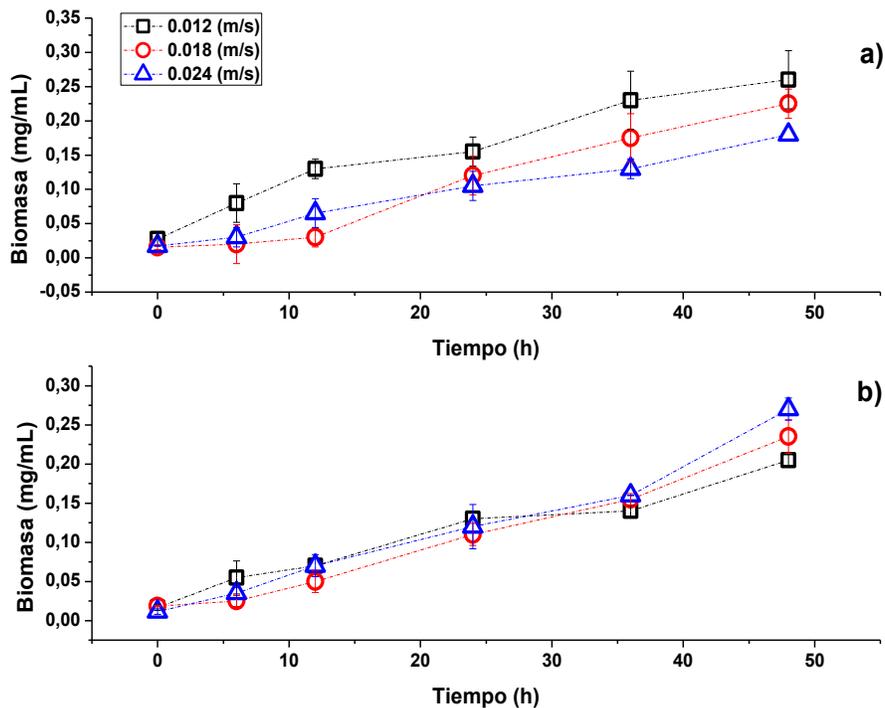


Figura 6. Evolución de la concentración de biomasa con respecto al tiempo de cultivo: a) para una fuerza iónica inicial de 0.085 y b) 0.17.

No obstante, Barbosa *et al.*¹²⁵ evaluaron el efecto de altas velocidades superficiales de suministro de gas sobre el crecimiento celular durante el cultivo continuo y batch de cepas de *Dunaliella tertiolecta* y *Chlamydomonas reinhardtii* (cepa silvestre y modificada: sin pared celular). Sus resultados arrojaron que las cepas de *Dunaliella tertiolecta* y *Chlamydomonas reinhardtii* (modificada) son sensibles al incremento del esfuerzo de corte como ha sido reportado previamente para otras microalgas como *Chlorella vulgaris*.^{82,83,125} Sin embargo, en el caso de la cepa silvestre de *Chlamydomonas reinhardtii* no se observó daño celular a ninguna de las velocidades evaluadas (<0.085 m/s), ya que el porcentaje de células viables se mantuvo constante ($\approx 94\%$) durante el desarrollo experimental. Esto sugiere que la velocidad superficial de gas, y consecuentemente, la ruptura de las burbujas no pueden ser consideradas las únicas causas de daño y muerte celular. Por lo tanto, la sensibilidad al esfuerzo de corte depende del tipo de cepa y en cierto grado de la presencia o ausencia de pared celular.¹²⁵ Cabe destacar que la cepa de *Chlamydomonas reinhardtii* empleada en este trabajo también es de tipo silvestre y que las velocidades estudiadas (0.012, 0.018 y 0.024 m/s) caen dentro del rango evaluado por Barbosa *et al.*¹²⁵ por lo cual aparentemente no son suficientemente altas para afectar el crecimiento celular.

Variación de la concentración de nutrientes (FI) durante el cultivo celular

Para una condición inicial de $FI=0.085$ se puede apreciar una disminución aparente de este parámetro con respecto al tiempo (ver Figura 7a). Este comportamiento debe esperarse debido al consumo de los nutrientes por parte de las microalgas. En contraparte, para una FI inicial de 0.17 el comportamiento observado parece ser diferente, ya que, en lugar de disminuir, se aprecia un incremento de esta variable con el paso del tiempo (ver Figura 7b). El contraste observado en ambas gráficas probablemente es resultado del error experimental ocasionado por los volúmenes de muestra empleados durante la determinación de esta variable, siendo estos de 25 y 10 μL para una FI inicial de 0.085 y 0.17, respectivamente. De hecho, esta explicación es respaldada por la variabilidad observada en ambas gráficas. También es necesario subrayar que la concentración de nutrientes siempre se encuentra en exceso a lo requerido por las microalgas, por lo que prácticamente permanece sin cambios significativos al final del cultivo. Este comportamiento ha sido reportado previamente por Kamalanathan *et al.*²⁵ para cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* en un periodo de tiempo similar al considerado en este trabajo.

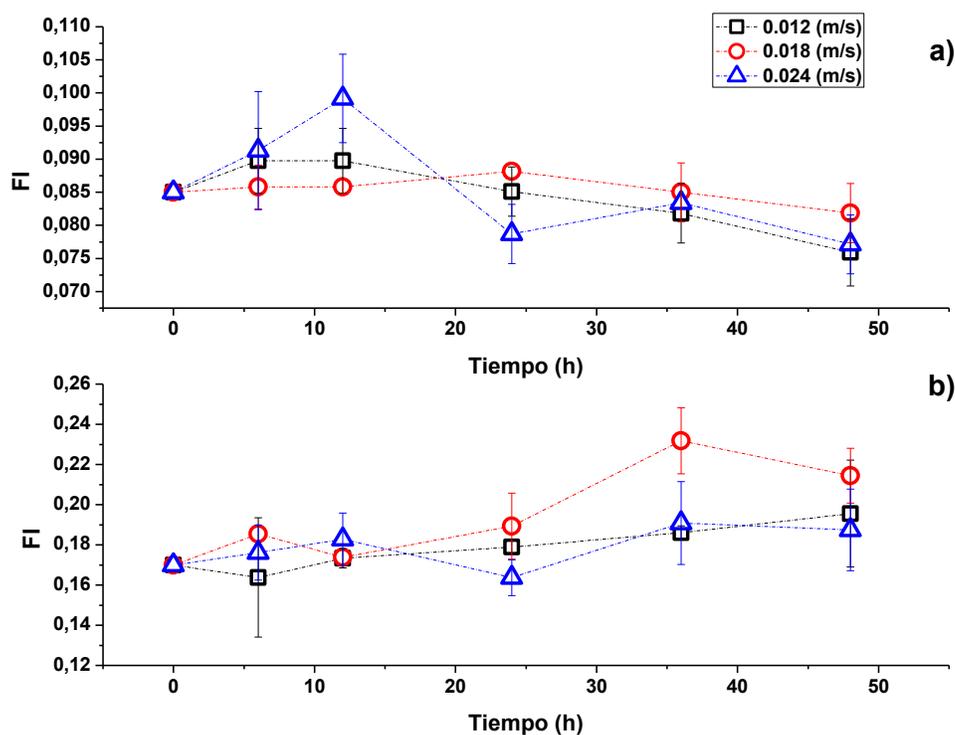


Figura 7. Evolución de la FI con respecto al tiempo de cultivo: a) para una fuerza iónica inicial de 0.085 y b) 0.17.

Variación de la concentración de proteínas durante el cultivo celular

La velocidad superficial tiene un efecto sobre la concentración de proteínas totales para una condición inicial de $FI=0.085$. La máxima concentración de estos metabolitos oscila entre $34.6 \pm 4.7 \mu\text{g/mL}$ y fue registrada a la velocidad de 0.024 m/s entre las 24 y 36 h. Antes y después de este periodo no se observan cambios significativos en la magnitud de esta variable con respecto a las velocidades bajo estudio (ver Figura 8a). A diferencia de este comportamiento, para una FI inicial de 0.17 después de las 6 h la concentración de proteínas permanece constante durante todo el periodo experimental independientemente de la velocidad. Las grandes desviaciones que se observan son resultado de las diferencias significativas en la concentración de proteínas entre las réplicas. La máxima concentración registrada para esta FI oscila entre $20.81 \pm 13.6 \mu\text{g/mL}$ a una velocidad de 0.018 m/s (Figura 8b). Entre las proteínas extracelulares que han sido identificadas en cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* se encuentran la anhidrasa carbónica (CAH) y la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAP3). La primera de ellas se encarga de catalizar la conversión de dióxido de carbono y agua a bicarbonato y protones mientras que GAP3 está relacionada con la movilidad celular (actividad flagelar). Otro tipo de proteínas identificadas en este tipo de cultivos son las feroforinas. Algunas de ellas son fuertemente inducidas por glicoproteínas, compuestos relacionados con la reproducción celular de microalgas.¹²⁴

Los diferentes comportamientos que exhiben las proteínas entre velocidades y condiciones iniciales de fuerza iónica podrían estar relacionados con su transporte por parte de las burbujas, como ha sido observado en el caso de microalgas.⁸⁶ Las proteínas presentan cierta tendencia por adsorberse en la interfase y su grado de actividad superficial está en función de su estructura molecular (composición) y el plegamiento que poseen en solución acuosa.^{98,106,107} En este sentido se ha observado que sus propiedades interfaciales se ven afectadas por la variación en la fuerza iónica.¹⁰⁷ Un incremento de este parámetro mejora la cinética de adsorción de las proteínas en la interfase, lo cual podría desencadenar heterogeneidades marcadas en su concentración en función de la altura.

De igual manera, se ha observado que iones divalentes (Ca^{2+}) mejoran la tasa de adsorción en comparación a los monovalentes (Na^+).¹⁰⁷ En base a esto la adhesión de microalgas en la interfase, el mejoramiento de su cinética de adsorción por parte de los iones que componen el medio de cultivo *Sueoka* y la velocidad superficial podrían ser los responsables de los comportamientos observados por las proteínas en la Figura 8. De igual forma no debe ser descartado el posible efecto antagónico de ciertos iones presentes en el cultivo.

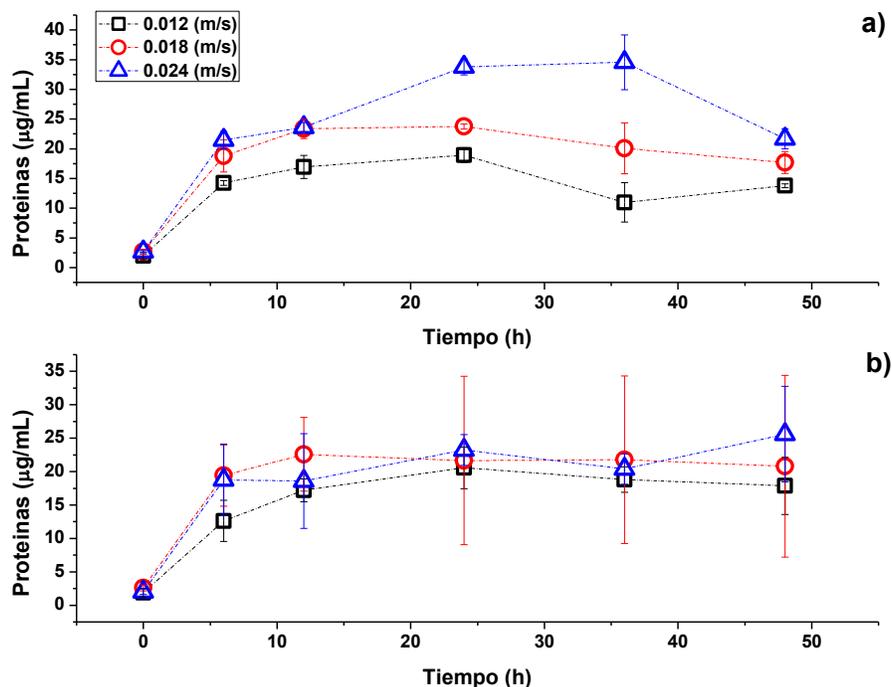


Figura 8. Evolución de la concentración de proteínas con respecto al tiempo de cultivo: a) para una fuerza iónica inicial de a) 0.085 y b) 0.17.

Con respecto a la evolución de la concentración de proteína con respecto al tiempo, a ambas fuerzas iónicas iniciales se observa un aumento seguido de una estabilización del valor (ver Figura 8). Los cambios se concentran entre las 0 y 24 horas; éstos pueden atribuirse al aumento de la biomasa y el consecuente incremento en su producción de proteínas extracelulares.

Variación de la concentración de carbohidratos durante el cultivo celular

Para una condición inicial de $FI=0.085$ los promedios de las concentraciones de carbohidratos parecen indicar un ligero incremento de esta variable con respecto al tiempo. Sin embargo el análisis de la variabilidad presentada por los datos (desviación estándar) revela que no hay diferencia estadística entre los resultados obtenidos para los diferentes tiempos y velocidades de interés (Figura 9a). Por otra parte, para una condición inicial de $FI=0.17$ parece haber una disminución gradual de la concentración con el transcurso del tiempo. Al analizar las desviaciones se puede apreciar que sólo existe una ligera reducción en la concentración de carbohidratos entre las 6 y 48 h para las velocidades superficiales de 0.018 y 0.024 m/s. De hecho, las concentraciones registradas entre estas condiciones son prácticamente las mismas (Figura 9b). En contra parte, a la velocidad de 0.012 m/s la concentración de carbohidratos se mantiene constante durante el desarrollo experimental.

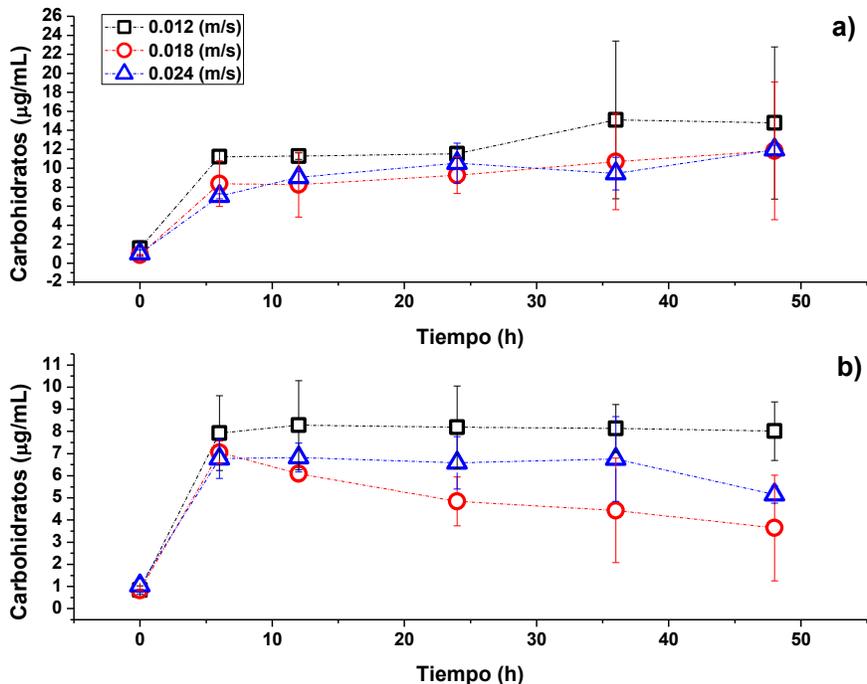


Figura 9. Evolución de la concentración de carbohidratos con respecto al tiempo de cultivo: a) para una fuerza iónica inicial de 0.085 y b) 0.17.

Al comparar los resultados obtenidos entre ambas fuerzas iónicas y entre velocidades, se puede notar que las concentraciones de carbohidratos son muy similares, lo cual sugiere que ni la fuerza iónica ni la velocidad impactan de alguna manera esta variable. A diferencia de estas observaciones, Bafana⁹⁴ ha encontrado que al modificar la concentración de sales como CaCl_2 , NaNO_3 , K_2HPO_4 y MgSO_4 la producción de carbohidratos por parte de *Chlamydomonas reinhardtii* se ve optimizada de una concentración de 382 a 628 mg/L. El contraste con los resultados presentados aquí, se explica debido a que los rendimientos esperados de los EPS son dependientes del tipo de medio empleado, condiciones de cultivo y el tipo de cepa.

Los polisacáridos secretados por el género *Chlamydomonas* en el medio de cultivo han sido caracterizados principalmente como polímeros de galactosa y arabinosa.^{95,122} Estos azúcares son constituyentes de las glucoproteínas presentes en la pared celular de estas microalgas, y son liberados debido al incremento en la densidad celular. Hecho que ha sido corroborado al observar fragmentos de pared celular durante el cultivo de *Chlamydomonas moewusii*.¹²² La composición y productividad de exopolisacáridos varía con la especie, el régimen de nutrientes y la fase de crecimiento.⁹⁵ En relación a los posibles constituyentes de los exopolisacáridos secretados por *Chlamydomonas reinhardtii*, se ha encontrado la presencia de sustancias como ácido galacturónico, ribosa, xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa y azúcares de ramnosa.⁹⁴

Variación del área interfacial (a) y el k_L durante el cultivo celular

A continuación se presenta el comportamiento del área interfacial y el k_L con respecto a las 0, 24 y 48 h de cultivo. En relación al área interfacial, se puede observar cierta tendencia a la disminución de esta variable en las primeras 24 h a las velocidades de 0.018 y 0.024 m/s para una condición inicial de $FI=0.085$ (ver Figura 10a). Pasado este tiempo, la magnitud de este parámetro permanece constante. En contraste a una velocidad de 0.012 m/s no se observa ninguna variación en el a con respecto al tiempo. Éste mismo comportamiento es observado a una condición inicial de $FI=0.17$ para todas las velocidades evaluadas (ver Figura 10b), lo cual parece indicar que la tasa de consumo de nutrientes por parte de las microalgas es muy pequeña como para originar cambios significativos en la FI (ver Figura 7b) y por consiguiente en el área interfacial disponible para la transferencia de CO_2 .

Las ligeras disminuciones en el área interfacial están relacionadas con un mayor volumen por parte de las burbujas, lo cual conlleva un incremento en la velocidad de deslizamiento de las fases.⁸⁶ Este fenómeno puede favorecer la transferencia local de CO_2 como puede ser observado en las tendencias positivas del k_L presentadas en la Figura 11 para ambas fuerzas iónicas iniciales. Sin embargo, es probable que la poca variación observada en el área interfacial pueda deberse a que las especies que se sabe que la afectan no variaron significativamente (sales) o tuvieron concentraciones muy bajas (carbohidratos y proteínas).

Otro aspecto que puede ser apreciado claramente en la Figura 10 es el efecto positivo que tiene la velocidad superficial sobre el área interfacial. A mayor flujo de aire mayor área disponible para la transferencia de masa. Este comportamiento es atribuido a un incremento en el número de burbujas por unidad de tiempo dentro del reactor, a la generación de microburbujas y al aumento en la fracción de gas retenido dentro del sistema.^{20,82,86,126}

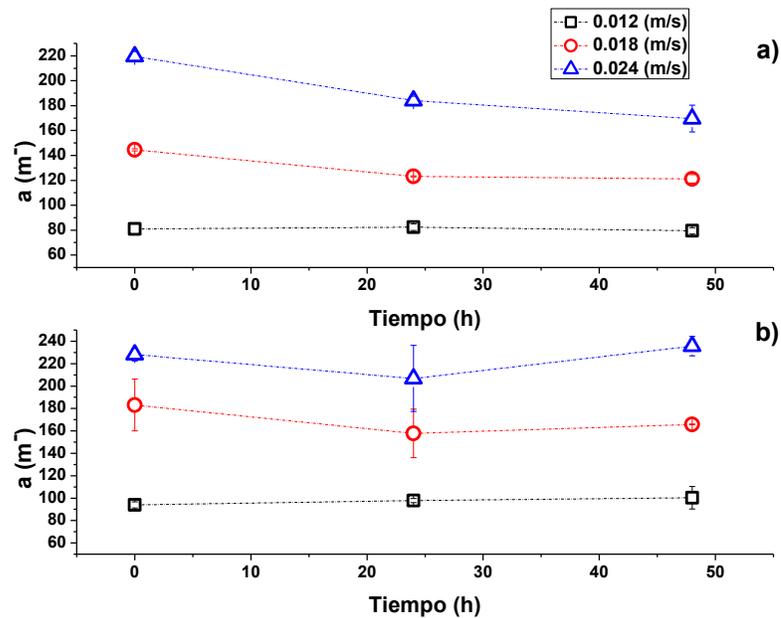


Figura 10. Evolución del área interfacial con respecto al tiempo de cultivo: a) para una fuerza iónica inicial de 0.085 y b) 0.17

Con respecto a la relación entre la velocidad superficial y el k_L , no se observa diferencia en los valores de k_L obtenidos entre las diferentes velocidades superficiales evaluadas dentro de las primeras 24 h para ambas condiciones iniciales de FI (ver Figura 11). Solamente se puede observar una diferencia clara entre los valores de k_L registrados a la velocidad de 0.012 m/s y las velocidades más altas a partir de las 48 h. No obstante, esta diferencia no es tan grande como para apreciar un cambio en el área interfacial (ver Figura 10). La diferencia del k_L a las 48 h no parece tener una relación directa con la variación de biomasa en el tiempo, ya que no hay diferencia estadística significativa entre los valores de peso seco registrados durante el desarrollo experimental (ver Figura 6).

Por otra parte, es importante notar que el comportamiento que exhibe el k_L no concuerda del todo con el comportamiento que presenta el área interfacial. Teóricamente y como ha sido reportado en suspensión de microalgas; valores más bajos del k_L están asociados con una disminución en el diámetro promedio de las burbujas y viceversa.⁸⁶ Sin

embargo, los resultados obtenidos a las 48 h indican cierta tendencia al incremento del k_L para todas las condiciones evaluadas. Un mayor valor de este parámetro significaría un incremento en el diámetro de las burbujas y por ende una disminución en el área interfacial, sin embargo esta se mantiene invariable entre las 24 y 48 h. Es probable entonces que el aumento del k_L se deba a la acción de las células como vectores de dióxido de carbono.¹²⁷

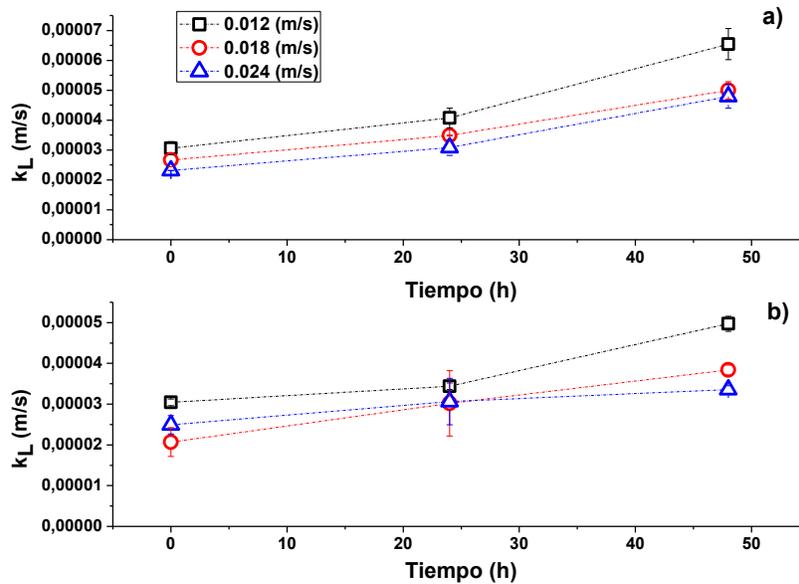


Figura 11. Evolución del k_L con respecto al tiempo de cultivo: a) para una fuerza iónica inicial de 0.085 y b) 0.17

Análisis de covarianza (ANCOVA)

Para poder realizar un análisis formal de los resultados y determinar el efecto que cada variable ejerce sobre el $k_L a$; se realizó el análisis de covarianza presentado en la Tabla 1. Los resultados obtenidos demuestran que las variables que tienen un impacto significativo ($P < 0.05$) sobre el $k_L a$ son la velocidad de suministro de aire, la concentración de biomasa y la fuerza iónica. Por su parte, las concentraciones registradas de carbohidratos y proteínas no influyeron sobre esta variable ($P > 0.05$). Con lo anterior, se quiere decir que las variaciones en estos parámetros no fueron suficientemente significativas en los sistemas bajo estudio, de modo que su efecto se mantuvo fijo.

Tabla 1. Análisis de covarianza (ANCOVA) para el k_La vs Covariables y V-Aire.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Proteínas	1	7.65	7.652	2.71	0.104
Carbohidratos	1	0.00	0.004	0.00	0.970
Fuerza iónica	1	12.24	12.238	4.34	0.041
Biomasa	1	535.84	535.838	189.84	0.000
V-Aire	2	927.35	463.676	164.27	0.000
Error	65	183.47	2.823		
Total	71	1841.71			

De igual manera se analizó el efecto que cada variable ejerce sobre el a . Los resultados obtenidos en este caso indican que las variables que tienen un impacto significativo ($P < 0.05$) sobre el área interfacial son la velocidad de suministro de aire y la fuerza iónica (ver Tabla 2). Por su parte, las concentraciones de biomasa, carbohidratos y proteínas no influyeron sobre esta variable ($P > 0.05$). El efecto de la biomasa sobre el k_La y el área interfacial parece contrastar la relación reportada en la literatura entre ambas variables, lo cual es indicativo que quizá la inhibición de la coalescencia no es el principal mecanismo responsable del mejoramiento del k_La durante el cultivo de microalgas como será discutido más adelante.

Tabla 2. Análisis de covarianza (ANCOVA) para el a vs Covariables y V-Aire.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Proteínas	1	117.5	117.5	0.54	0.468
Carbohidratos	1	713.1	713.1	3.28	0.080
Fuerza iónica	1	3162.3	3162.3	14.55	0.001
Biomasa	1	34	34	0.16	0.695
V-Aire	2	70152.3	35076.1	161.42	0.000
Error	29	6301.5	217.3		
Total	35	99521.4			

Efecto de la velocidad superficial y las covariables sobre el k_La

Se puede apreciar una relación lineal durante todo el periodo experimental entre el k_La y la velocidad superficial para ambas condiciones iniciales de fuerza iónica (Figura 12), lo cual indica el efecto positivo de la velocidad sobre el k_La .⁷⁹⁻⁸¹ Por otra parte, para una velocidad de 0.012 m/s, los valores de k_La pueden ser agrupados dentro de dos intervalos de tiempo (0-24 h y 36-48 h). No se observa una diferencia significativa de este parámetro dentro del primer intervalo de tiempo. Sólo entre las 24 y 36 h se puede apreciar un incremento significativo de esta variable alcanzando un valor máximo aproximado de 18.5 h⁻¹ para una FI de 0.085 (Figura 12a) y de 18 h⁻¹ para una FI de 0.17

(Figura 12b). Por su parte, a la velocidad de 0.018 m/s se aprecia una diferencia significativa en el k_La después de las 24 h. El incremento obtenido de las 24 a las 36 h es mucho mayor que el presentado de las 36 a 48 h. El valor máximo obtenido bajo esta condición fue de 21 h⁻¹ para una FI de 0.085 y 22 h⁻¹ para una FI de 0.17. A la velocidad de 0.024 m/s se puede apreciar una diferencia significativa en el k_La a las 0, 36 y 48 h, alcanzando un máximo de 29 y 28 h⁻¹ para una FI de 0.085 y 0.17 respectivamente.

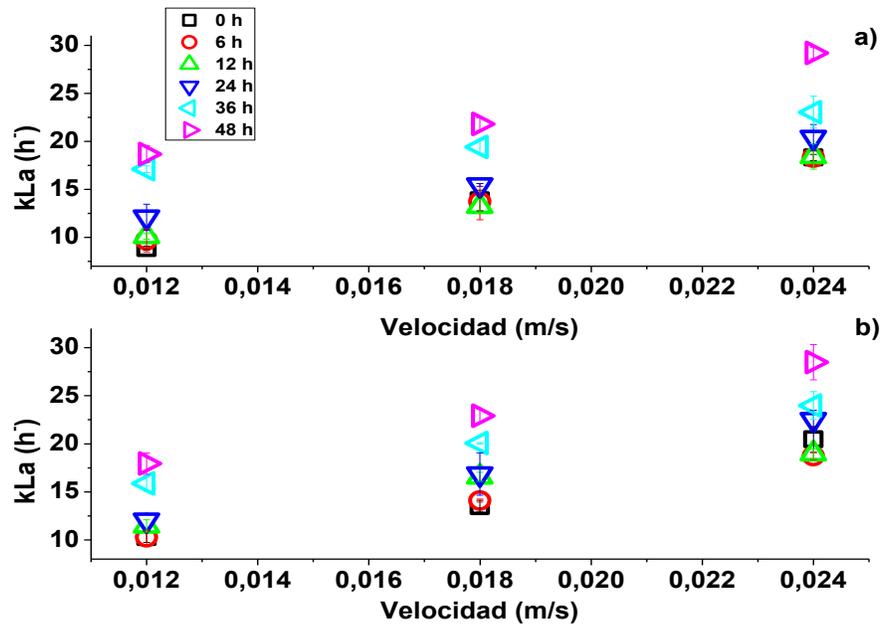


Figura 12. Efecto de la velocidad de suministro de aire sobre el k_La : a) para una fuerza iónica inicial de 0.085 y b) 0.17.

El comportamiento positivo del k_La con la velocidad superficial se debe a un mayor número de burbujas dentro del sistema por unidad de tiempo; lo cual se traduce en un incremento en la fracción de gas retenido y área interfacial disponible para la transferencia de masa.^{20,82,86,126} Además, siendo mayor la velocidad superficial, la velocidad de deslizamiento entre fases debe aumentar y con ello se reduce el espesor de la capa límite en las interfaces y aumenta la transferencia local de masa. Los resultados presentados aquí, difieren de los reportados por Khoo *et al.*⁸³ Estos investigadores han expuesto que el k_La disminuye conforme el flujo de gas incrementa por arriba de 0.16 vvm (el flujo mínimo de gas empleado aquí es de 0.9 vvm). El comportamiento observado en ese trabajo es atribuido a una disminución en la densidad microalgal originada por la muerte celular a causa del esfuerzo de corte.^{82,83,126} Sin embargo, para las condiciones evaluadas en este trabajo, tal comportamiento no es observado.

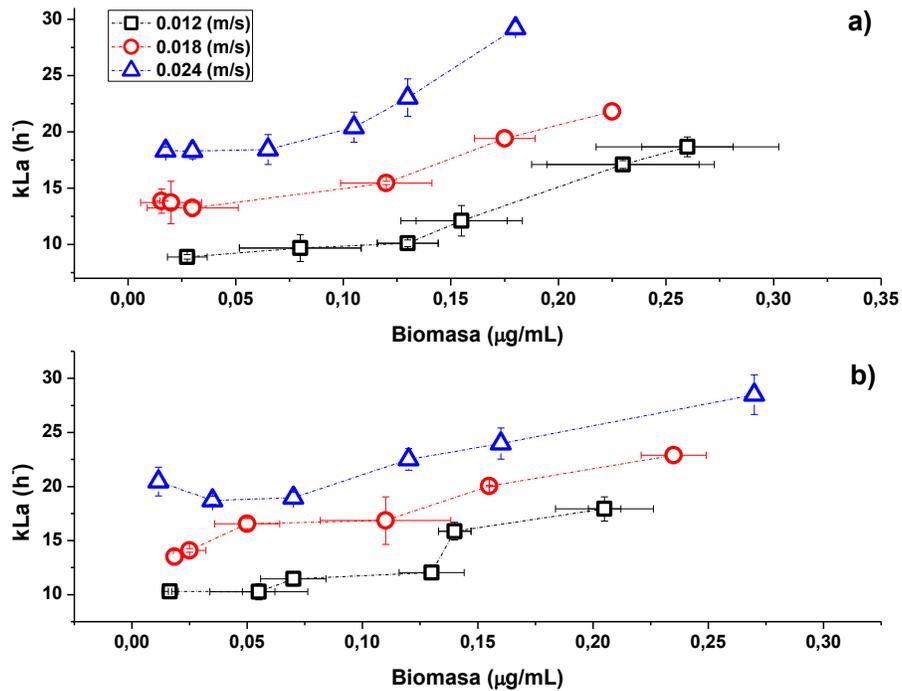


Figura 13. Efecto de la concentración de biomasa sobre el k_La : a) para una fuerza iónica inicial de 0.085 y b) 0.17.

Otro de los factores que tiene un efecto importante sobre el k_La es la concentración de microalgas. Para una velocidad en particular, conforme la concentración de biomasa aumenta el coeficiente volumétrico de transferencia de masa incrementa, lo cual muestra la relación de proporcionalidad entre ambas variables. Aunque en la Figura 13, aparentemente existe una diferencia en la concentración de biomasa a las diferentes velocidades superficiales evaluadas, tal diferencia no existe estadísticamente como puede ser corroborado en la Figura 6. Los valores de k_La más altos se registraron a una velocidad de 0.024 m/s. No hay diferencia estadística entre estos valores para las fuerzas iónicas bajo estudio: $29.19 \pm 0.58 \text{ h}^{-1}$ para una FI inicial de 0.085 y $28.49 \pm 1.83 \text{ h}^{-1}$ para una FI inicial de 0.17.

El efecto positivo que presenta esta variable podría atribuirse a la inhibición de la coalescencia de las burbujas o al incremento en el tiempo necesario para que el proceso tenga lugar. Sin embargo, la poca variación del área interfacial descarta esta explicación. Se sabe que las microalgas se desplazan en la interface gas-líquido donde la concentración de CO_2 es más alta, y se adsorben en la interface de las burbujas debido a la fuerza capilar y a la carga superficial característica de las microalgas.^{84,87} Ésto podría reducir la coalescencia entre burbujas,^{84,88} pero es más probable que la adsorción de microalgas en la interface gas-líquido sirva como facilitador del transporte, y que las células actúen como vectores de dióxido de carbono. Inclusive, una mayor cantidad de

biomasa implicaría más células adheridas a la interface. El consumo de dióxido de carbono por parte de ellas mantendría el gradiente de concentración interfacial alto, favoreciendo un mayor valor para el $k_L a$.¹²⁷ Esto básicamente se debería a un aumento en el k_L .

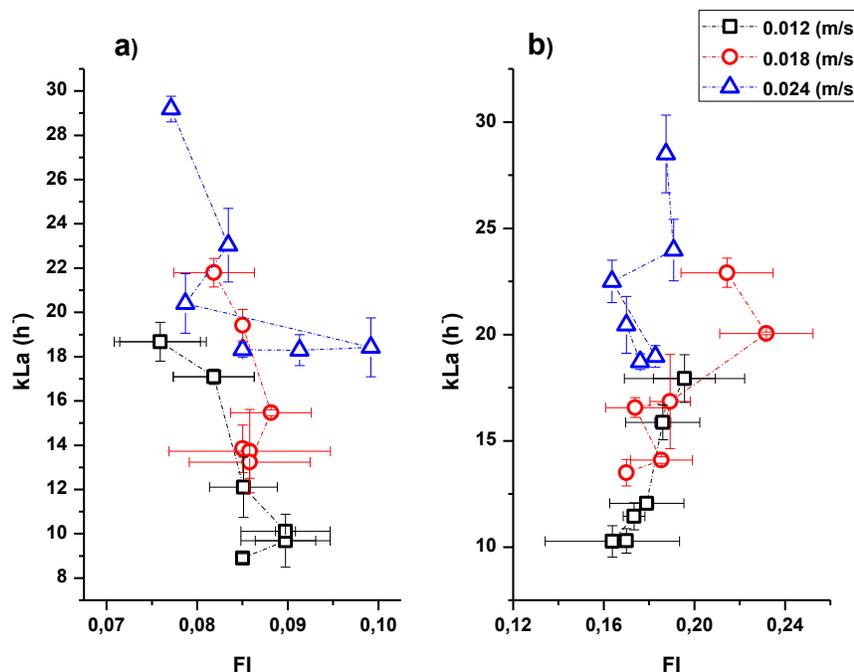


Figura 14. Efecto de la Fuerza iónica sobre el $k_L a$: a) para una fuerza iónica inicial de 0.085 y b) 0.17.

Con respecto al efecto de la fuerza iónica sobre la transferencia de masa; no se puede apreciar con claridad una relación entre la variación de la fuerza iónica al inicio y durante el desarrollo experimental con el $k_L a$ para cada velocidad evaluada (ver Figura 14). Como puede ser observado en la Tabla 1, la fuerza iónica presenta un impacto no tan significativo ($P=0.41$) como la velocidad superficial y la biomasa sobre el $k_L a$ ($P=0.0$). De hecho, no se aprecia una diferencia considerable entre los valores de $k_L a$ obtenidos para ambas condiciones iniciales de FI (0.085 y 0.17) durante todo el periodo experimental.

De manera general se sabe que las sales impactan la transferencia de masa mediante la inhibición de la coalescencia de las burbujas. Normalmente en agua pura cuando las burbujas entran en contacto ingresan en un periodo de coalescencia. En este periodo las burbujas no se fusionan inmediatamente. Su aproximación origina la deformación de su configuración y la ampliación de su área de contacto. Mientras tanto, el líquido ubicado entre ellas fluye de la región de contacto (alta presión) a los alrededores (baja presión). En este punto, la película de líquido se hace cada vez más delgada hasta que alcanza un grosor límite y se fractura. El resultado de este proceso es la unión de las burbujas o coalescencia.⁸⁴

Por su parte, cuando las sales están presentes el fenómeno de coalescencia se ve reducido. Para soluciones puras el grado de inhibición de este fenómeno depende del tipo de electrolito y de su concentración en solución acuosa.⁷² La inhibición de la coalescencia está relacionada con las interacciones iónicas en la interface gas-líquido; tales interacciones dependen de la naturaleza y concentración de los iones presentes en el medio de cultivo, así como también del reordenamiento de la estructura del agua.^{59,63,64,67} El aumento en la concentración de electrolitos favorece en gran medida el incremento del área interfacial (a) y la fracción volumétrica de gas retenido (ϵ_g) a diferencia del agua pura.^{69,74} Por otra parte, el coeficiente de transferencia de masa del lado del líquido (k_L) disminuye con el incremento en la concentración de electrolitos. Pero este comportamiento se ve compensado por la disminución del diámetro de las burbujas, lo cual aumenta la razón entre el área interfacial y el volumen de gas retenido dando como resultado un incremento neto en el coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$).^{6,74}

A pesar del efecto positivo que presentan las soluciones puras sobre la transferencia de masa. En el caso de mezclas de electrolitos (Fuerza iónica) el fenómeno es más complejo. Cuando una solución multicomponente se descompone en sus partes constituyentes, la adición de la fuerza iónica de cada especie se correlaciona bien con la fuerza iónica global de todos los electrolitos. Sin embargo, algunas sales no se comportan de esta manera debido a su incompleta disociación.^{65,117} En este sentido, Sovechles y Waters¹¹⁷ evaluaron el efecto de sales individuales y una mezcla salina marina sobre el diámetro de las burbujas. Sus resultados mostraron que la fuerza iónica crítica (valor de FI por arriba del cual ya no se observa un cambio en el diámetro promedio de las burbujas) para la solución marina es de 0.26. Este valor se encuentra dentro del rango presentado por las soluciones puras 0.22-0.28, exceptuando las sales de aluminio. La variación en las soluciones que contienen iones trivalentes es atribuida a su hidrólisis o incompleta disociación.^{65,117}

La hidratación de la superficie de los electrolitos es considerada la principal causa del fenómeno de inhibición de la coalescencia de las burbujas. Esto se debe a la reducción de la atracción hidrofóbica entre ellas.⁶⁵ Este comportamiento también ha sido reportado para mezclas salinas en función de la fuerza iónica. No obstante, la FI no puede ser usada de manera confiable como una medida del grado de inhibición de la coalescencia ya que algunas sales inorgánicas no muestran aptitudes inhibitorias mientras que otras contribuyen muy débilmente al fenómeno.¹¹⁷ Los efectos específicos de los iones son causados por sus tendencias a ser atraídos o repelidos de la interface aire-agua. Las sales que poseen un ion, de su par catión-anión, con una afinidad por la interfase y otro por el seno del líquido inhibirán la coalescencia de las burbujas.^{67,117}

Los cationes que son atraídos o repelidos de la interfase son asignados como β y α , respectivamente. En el caso de los aniones, esta asignación es opuesta. Es decir, las especies que son atraídas reciben la asignación α , mientras que las repelidas la asignación β . En base a esta clasificación se sabe que las relaciones iónicas similares ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$) reducen la coalescencia de las burbujas debido a la formación de una doble capa eléctrica que produce interacciones repulsivas entre las burbujas. En contraste las relaciones opuestas ($\alpha\beta$, $\beta\alpha$) no tienen un efecto aparente sobre este fenómeno debido a las interacciones atractivas de Van der Waals que facilitan el fenómeno de coalescencia.⁶⁵⁻⁶⁷

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo se explican aplicando la regla de combinaciones propuesta por Craig *et al.*⁶⁵ ya que todos los iones que conforman los macronutrientes del medio *Sueoka* pertenecen al grupo α , con excepción del H^+ que pertenece al grupo β . A pesar de este hecho, existe una competencia entre las relaciones $\alpha\alpha$ y $\alpha\beta$ debido a que los iones H^+ (β), PO_4^{3-} (α) y K^+ (α) son los más abundantes del medio *Sueoka*. Sin embargo, las relaciones $\alpha\alpha$ son ligeramente superiores ya que las concentraciones de PO_4^{3-} y K^+ son mayores que las del ión H^+ . Esto favorece la inhibición del proceso de coalescencia de las burbujas, lo que a su vez tiene un efecto positivo sobre el $k_L a$ como es señalado en la Tabla 1 con un valor de $P < 0.05$.

En relación a las proteínas y carbohidratos, desde el punto de vista estadístico las concentraciones registradas en este trabajo no ejercen ningún efecto sobre el $k_L a$ ($P > 0.05$). Sin embargo, concentraciones más elevadas de estos metabolitos podrían ser relevantes. De hecho, en el caso de la transferencia de oxígeno, Jamnongwong *et al.*¹¹³ han reportado que sólo a concentraciones de glucosa por arriba de 20 g/L se puede apreciar una disminución del diámetro promedio de las burbujas y el coeficiente lateral de transferencia de masa (k_L). Este comportamiento podría extenderse al CO_2 y otros carbohidratos, lo cual explicaría que las concentraciones registradas de estas sustancias no tengan un efecto significativo sobre la transferencia de masa.

Con respecto a las proteínas, no hay información disponible acerca del papel que juegan en los fenómenos de transferencia de masa. Sin embargo, al presentar actividad superficial probablemente intervengan en el proceso de inhibición de la coalescencia como ha sido observado en la mayoría de los surfactantes estudiados en la actualidad. De ser así, el grado de inhibición e incremento en el área interfacial podría depender de su composición y disposición de residuos hidrofóbicos.

Efecto de la velocidad superficial y las covariables sobre el a

La fuerza iónica es uno de los factores que presentó un efecto significativo sobre el área interfacial ($P < 0.05$). A pesar que durante el desarrollo experimental, para una determinada condición inicial de fuerza iónica (0.085 o 0.17) no se distingue el efecto de la variación de este parámetro sobre el área interfacial; se puede apreciar una diferencia

significativa entre ambas condiciones (ver Figura 15a y b). Para una velocidad de suministro de aire en particular, el incremento en la concentración inicial de los macronutrientes del medio *Sueoka* aumenta la relación del área interfacial por unidad de volumen como puede ser observado al comparar el rango de variación de este parámetro entre las condiciones iniciales de FI. Este comportamiento refuerza la idea de la competencia entre las interacciones atractivas y repulsivas de los iones que se encuentran en la superficie de las burbujas, así como el dominio de estas últimas debido a la mayor concentración del ión K^+ . Mayor número de interacciones repulsivas puede traducirse en una disminución del fenómeno de coalescencia o un incremento en el tiempo necesario para que se lleve a cabo el proceso, lo cual se traduce en un incremento de la tasa de transferencia de masa por parte de los iones como ha sido discutido previamente ($P=0.041$, ver Tabla 1).

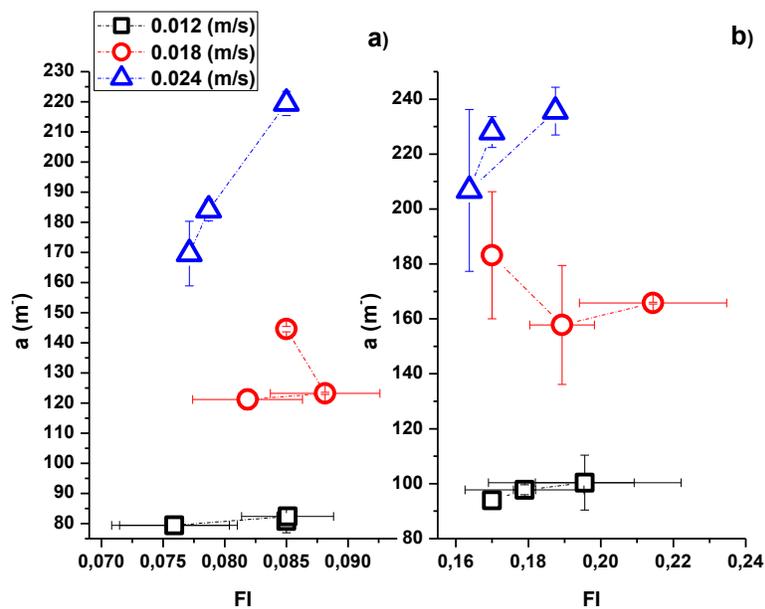


Figura 15. Efecto de la Fuerza iónica sobre el a: a) para una fuerza iónica inicial de 0.085 y b) 0.17.

Otra de las variables que tiene un efecto importante sobre el área disponible para la transferencia de masa es la velocidad superficial. Independientemente de la condición inicial de FI el aumento en la velocidad de suministro de aire guarda una relación de proporcionalidad con esta variable (ver Figura 16). El incremento en el área interfacial está relacionado con el aumento en la fracción de gas retenido dentro del sistema, así como a la generación de microburbujas a causa de las inestabilidades superficiales durante el fenómeno de coalescencia.^{20,82,86,126} Todos estos eventos afectan de manera positiva al coeficiente volumétrico de transferencia de masa como se puede apreciar en la Figura 12.

También es importante notar que no hay variación en la magnitud del área interfacial con respecto al tiempo como ha sido reportado por Ding *et al.*⁸⁶ en suspensión de microalgas. No obstante, si el efecto positivo que ejerce la biomasa sobre el $k_L a$ (Figura 13) no se debe a la inhibición de la coalescencia; podría ser resultado del consumo directo de CO_2 por parte de las microalgas adheridas a la interface gas-líquido. Fenómeno que mantiene un elevado gradiente de concentración entre las fases e impulsa el transporte local de masa.¹²⁷

Por otra parte, Zhao *et al.*⁸⁴ han observado que la tensión superficial de cultivos de microalgas es mucho menor que la presentada en agua pura. Ésto trae como resultado un mayor tiempo y área de contacto entre las burbujas antes de coalescer, y cuando el proceso ocurre, la burbuja adquiere cierta cantidad de energía cinética. Esta energía desencadena que la burbuja oscile y en conjunto con su mayor tamaño incrementa la interacción con la fase líquida, lo que a su vez incrementa la tasa local de transferencia de masa (ver Figura 11). El efecto positivo sobre el k_L favorece el aumento del $k_L a$ con respecto al tiempo y a la concentración celular (biomasa) como ha sido apreciado en las Figuras 1 y 13.

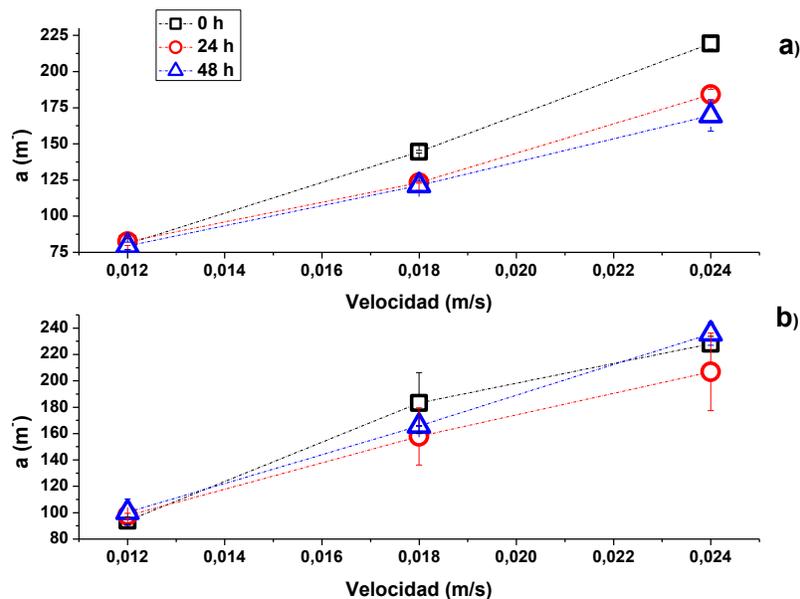


Figura 16. Efecto de la velocidad superficial sobre el a : a) para una fuerza iónica inicial de 0.085 y b) 0.17.

CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió el efecto de la presencia simultánea de electrolitos (medio de cultivo *Sueoka*), microorganismos (microalga) y sustancias poliméricas extracelulares (carbohidratos y proteínas totales) sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$) y el área interfacial (a). En base a lo discutido en la sección anterior, se establecen las siguientes conclusiones:

El aumento en la concentración celular (biomasa) incrementa el coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$) aproximadamente un 170% a las 48 h de cultivo en comparación al tiempo inicial. El principal responsable de este fenómeno probablemente es la acción de las células microalgales en la región interfacial como vectores de dióxido de carbono y como promotoras de un alto gradiente de concentración que incrementa la transferencia de masa conforme aumenta la concentración celular.

La fuerza iónica tiene un impacto positivo pero no tan significativo sobre el $k_L a$ como la concentración de biomasa y la velocidad superficial. Este hecho es explicado por el antagonismo presentado por algunos iones que conforman el medio de cultivo *Sueoka*. La regla de combinaciones iónicas de Craig *et al.*⁶⁵ es útil para explicar este fenómeno. Todos los aniones presentes en el cultivo son atraídos a la interfase (α) mientras que todos los cationes son repelidos de esta estructura (α) con excepción del H^+ (β). Por lo tanto, las relaciones iónicas que tienen lugar son $\alpha\alpha$ y $\alpha\beta$. A pesar de la superioridad de especies clasificadas como α sólo algunas se encuentran en grandes proporciones (PO_4^{3-} y K^+) mientras que la concentración de H^+ supera a la gran mayoría. Esto resulta en la competencia de las interacciones atractivas y repulsivas entre burbujas. El balance de fuerzas tiende a favorecer las interacciones repulsivas debido al mayor número de iones K^+ en comparación con los de H^+ . Bajo esta condición el fenómeno de coalescencia se ve reducido favoreciendo el aumento en el área disponible para la transferencia de masa, lo cual explica el incremento observado en el $k_L a$.

La relación de proporcionalidad del $k_L a$ con la velocidad superficial es atribuida a un mayor número burbujas dentro del sistema por unidad de tiempo y a una mayor velocidad de deslizamiento entre fases; lo cual se traduce en un incremento en la fracción de gas retenido y área interfacial disponible para la transferencia de masa.

La presencia de proteínas no ejerce ningún efecto sobre el $k_L a$ a pesar de haber sido comprobado en otros trabajos que estas sustancias alteran las propiedades fisicoquímicas del agua como la tensión superficial, densidad y viscosidad. Los muy bajos valores de concentración medidos probablemente no fueron suficientes para afectar significativamente las propiedades fisicoquímicas y de transporte del medio.

Al igual que las proteínas, los carbohidratos no presentaron un efecto significativo sobre el $k_L a$. Esto se debe a las bajas productividades de exopolisacáridos obtenidas durante el desarrollo experimental.

El área interfacial no tuvo una variación significativa con respecto al tiempo debido a que las especies que la afectan no variaron significativamente (sales) o tuvieron concentraciones muy bajas (carbohidratos y proteínas).

El k_L tiende a incrementar conforme pasa el tiempo. Este comportamiento está relacionado con la posible acción de las células como vectores de dióxido de carbono o promotores de un elevado gradiente de concentración en la interface. Bajo las condiciones de estudio la variación en la velocidad superficial no afectó este parámetro como ha sido reportado en otros trabajos.

REFERENCIAS

- (1) Cheah, W. Y.; Show, P. S.; Chang, J.; Ling, T.; Juan, J. *Bioresour. Technol.* **2015**, *184*, 190–201.
- (2) Hernández-Pérez, A.; Labbé, J. I. *Biol. Mar. y Oceanogr.* **2014**, *49* (2), 157–173.
- (3) Pires, J. C. M. In *Handbook of Marine Microalgae.*; Kim, S., Ed.; 2015; pp 55–68.
- (4) Ramírez, O. T. In *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna.*; Bolívar, F. G., Ed.; EL COLEGIO NACIONAL: México, 2007; pp 249–296.
- (5) Raeesossadati, M. J.; Ahmadzadeh, H.; McHenry, M. P.; Moheimani, N. R. *Algal Res.* **2014**, *6* (PA), 78–85.
- (6) Al Taweel, A. M.; Idhbeaa, A. O.; Ghanem, A. *Chem. Eng. Sci.* **2013**, *100*, 474–485.
- (7) Adler, H.; Buchholz, H.; Voigt, J.; Wittler, R.; Schügerl, K. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1980**, *9*, 249–260.
- (8) Willamme, R.; Alsafrá, Z.; Arumugam, R.; Eppe, G.; Remacle, F.; Levine, R. D.; Remacle, C. *J. Biotechnol.* **2015**, *215*, 20–26.
- (9) Chang, H. X.; Huang, Y.; Fu, Q.; Liao, Q.; Zhu, X. *Bioresour. Technol.* **2016**, *206*, 231–238.
- (10) Yarnold, J.; Ross, I. L.; Hankamer, B. *Algal Res.* **2015**, *13*, 182–194.
- (11) He, Y.; Chen, L.; Zhou, Y.; Chen, H.; Zhou, X.; Cai, F.; Huang, J.; Wang, M.; Chen, B.; Guo, Z. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *111*, 108–116.
- (12) Küçük, K.; Tevatia, R.; Sorgüven, E.; Demirel, Y.; Özilgen, M. *Energy* **2015**, *83*, 503–510.
- (13) Wang, X.; Ruan, Z.; Sheridan, P.; Boileau, D.; Liu, Y.; Liao, W. *Biomass and Bioenergy* **2015**, *74*, 280–287.
- (14) Taher, H.; Al-Zuhair, S.; Al-Marzouqi, A.; Haik, Y.; Farid, M. *Renew. Energy* **2015**, *82*, 61–70.
- (15) Pegallapati, A. K.; Nirmalakhandan, N. *Bioresour. Technol.* **2012**, *124*, 137–145.
- (16) Mandal, S.; Mallick, N. In *bioenergy research: advances and applications.*; Gupta, V. G., Tuohy, M., Kubicek, C. P., Saddler, J., Xu, F., Eds.; 2014; pp 171–184.
- (17) Posadas, E.; Morales, M. del M.; Gomez, C.; Ación, F. G.; Muñoz, R. *Chem. Eng. J.* **2015**, *265*, 239–248.
- (18) Garibay, A.; Vázquez, R.; Sánchez, M.; Serrano, L.; Martínez, A. *BioTecnología.* **2009**, *13*, No 3, 38–61.
- (19) Oncel, S.; Kose, A.; Vardar, F.; Torzillo, G. In *Handbook of Marine Microalgae.*; Kim, S., Ed.; 2015; pp 127–144.
- (20) Guo, Z.; Phooi, W. B. A.; Lim, Z. J.; Tong, Y. W. *Bioresour. Technol.* **2015**, *186*, 238–245.
- (21) Nwokoagbara, E.; Olaleye, A. K.; Wang, M. *Fuel.* **2015**, *159*, 241–249.
- (22) Chisti, Y. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25* (3), 294–306.
- (23) Vázquez, R.; Robledo, D. *Rev. la Fac. Ing. Química* **2010**, *50*, 37.
- (24) James, G. O.; Hocart, C. H.; Hillier, W.; Price, G. D.; Djordjevic, M. A. *Bioresour. Technol.* **2013**, *127*, 441–447.

- (25) Kamalanathan, M.; Gleadow, R.; Beardall, J. *ALGAL* **2015**, *12*, 191–196.
- (26) Rivera, R.; Peraza, S.; Herrera, V. *Ciencia* **2011**, 1–9.
- (27) López Limón, A. R. Producción de Lactostanina en cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii*, Universidad Autónoma de Aguascalientes: Aguascalientes, 2014.
- (28) Harris, E. H. *The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*; 1989.
- (29) Day, J. G.; Day, U. A.; Brown, S.; Warren, A. In *Manual of Environmental Microbiology*; Hurst, C. J., Crawford, R. L., Garland, J. L., Lipson, D. A., Mills, A. L., Stetzenbach, L. D., Eds.; ASM Press: United States of America, 2007; pp 79–83.
- (30) Singh, P.; Gupta, S. K.; Guldhe, A.; Rawat, I.; Bux, F. In *Handbook of Marine Microalgae*; Elsevier Inc., 2015; pp 43–54.
- (31) Ovalle, A.; Manrique, R. *Iteckne* **2011**, *8*, 23–30.
- (32) Chávez, P.; Pantí, L.; Robledo, D.; Patiño, R.; Mérida, C.; Cordemex, a P. *Energy* **2006**, 2006–2006.
- (33) Korkaric, M.; Behra, R.; Fischer, B. B.; Junghans, M.; Eggen, R. I. L. *Aquat. Toxicol.* **2015**, *162*, 18–28.
- (34) Küçük, K.; Tevatia, R.; Sorgüven, E.; Demirel, Y.; Özilgen, M. *Energy* **2015**, *83*, 503–510.
- (35) Kantarci, N.; Borak, F.; Ulgen, K. O. *Process Biochem.* **2005**, *40* (7), 2263–2283.
- (36) Folescu, E.; Ferreira, A.; Rocha, F.; Teixeira, J. A. *Environ. Eng. Manag. J.* **2012**, *11* (11), 1953–1961.
- (37) Rollbusch, P.; Bothe, M.; Becker, M.; Ludwig, M.; Grünewald, M.; Schlüter, M.; Franke, R. *Chem. Eng. Sci.* **2015**, *126*, 660–678.
- (38) Guan, X.; Gao, Y.; Tian, Z.; Wang, L.; Cheng, Y.; Li, X. *Chem. Eng. Res. Des.* **2015**, *102*, 196–206.
- (39) Welty, J.; Wicks, C.; Rorrer, G.; Rorrer, W. *Fundamental Mechanics of Fluids Third Edition*; 2008.
- (40) Berk, Z. *Heat and Mass Transfer*; 2013.
- (41) Raymond Chang. *Química*; 2010.
- (42) Cengel, Y. A. *Transferencia de calor y masa*, 2nd ed.; McGraw-Hill Interamericana, Ed.; 2004.
- (43) Farid, M. In *Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery Engineering*; Elsevier Inc., 2013; pp 379–401.
- (44) Muñoz, V.; Maroto, A. *Operaciones unitarias y reactores químicos*, 1st ed.; UNED, Ed.; UNED: Madrid, España, 2013.
- (45) Doran, M. D. *Bioprocess engineering principles*; Elsevier Science and Technology Books, Ed.; Sydney, Australia, 1995; Vol. 9.
- (46) Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27* (2), 153–176.
- (47) Majumder, S. K. *MASS TRANSFER CHARACTERISTICS*; 2016.
- (48) Charpentier, J. C. *Adv. Chem. Eng.* **1981**, *11* (C), 1–133.
- (49) Nikolaou, A.; Hartmann, P.; Sciandra, A.; Chachuat, B.; Bernard, O. *J. Theor. Biol.*

- 2016**, 390, 61–72.
- (50) Hill, G. A. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, 45, 5796–5800.
- (51) Elhajj, J.; Al-Hindi, M.; Azizi, F. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, 53, 2–22.
- (52) Valdés, F. J.; Hernández, M. R.; Catalá, L.; Marcilla, A. *Bioresour. Technol.* **2012**, 119, 1–6.
- (53) Robinson, C. W.; Wilke, C. R. *Biotechnol. Bioeng.* **1973**, 15, 755.
- (54) Wilke, C. R.; Chang, P. *AIChE J.* **1955**, 1, 264.
- (55) García, A.; Gómez, D.; Navaza, M. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, 51, 5585–5591.
- (56) Aoki, J.; Hayashi, K.; Tomiyama, A. *Int. J. Heat Mass Transf.* **2015**, 83, 652–658.
- (57) Mandal, A.; Kundu, G.; Mukherjee, D. *Can. J. Chem. Eng.* **2003**, 81, 212–219.
- (58) Royce, P.; Thornhill, N. F. *AIChE Journal.* **1991**, 37, 1680–1686.
- (59) Marrucci, G.; Nicodemo, L. *Chem. Eng. Sci.* **1967**, 22, 1257–1265.
- (60) Lessard, R.; Zieminski, S. A. *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **1971**, 10, 260–269.
- (61) Zieminski, S. A.; Whittemore, R. C. *Chem. Eng. Sci.* **1971**, 26, 509–520.
- (62) Weissenborn, P. K.; Pugh, R. J. *Langmuir.* **1996**, 11, 1422–1426.
- (63) Tsang, Y. H.; Ho Koh, Y.; Koch, D. L. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, 275, 290–297.
- (64) Ribeiro, C. P.; Mewes, D. *Chem. Eng. Sci.* **2007**, 62, 4501–4509.
- (65) Craig, V. S.; Pashley, N.; Pashley, R. M. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 10192–10197.
- (66) Marcelja, S. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 13062–13067.
- (67) Marcelja, S. *Curr. Colloid Interface Sci.* **2004**, 9, 165–167.
- (68) Henry, C. L.; Dalton, C. N.; Scruton, L.; Craig, V. *J. Phys. Chem.* **2007**, 111, 1015–1023.
- (69) Baz, S. A.; Botello, J. E.; Estrada, A.; Vilchiz, L. E.; Padilla, J. A.; Miranda, R. *Chem. Eng. Res. Des.* **2014**, 92, 2352–2360.
- (70) Firouzi, M.; Howes, T.; Nguyen, A. V. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, 222, 305–318.
- (71) Chan, B. S.; Tsang, Y. H. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 286, 410–413.
- (72) Nguyen, P. T.; Hampton, M. A.; Nguyen, A. V.; Birkett, G. R. *Chem. Eng. Res. Des.* **2012**, 90, 33–39.
- (73) Botello, J. E.; Baz, S. A.; Gonzáles, R.; Estrada, A.; Padilla, J. A.; Gonzáles, G.; Navarrete, J. L. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, 50, 12203–12207.
- (74) Pohorecki, R.; Nowosielski, J. *AIChE Journal.* **1986**, 32, 632–639.
- (75) Ruthiya, K. C.; Schaaf, J.; Kuster, B.; Schouten, J. C. *Int. J. Chem. React. Eng.* **2006**, 4, Article.
- (76) Kirkpatrick, R. D.; Lockett, M. J. *Chem. Eng. Sci.* **1974**, 29, 2363–2373.
- (77) Castillo, L.; Ohnishi, S.; Horn, R. *J. Colloid interface Sci.* **2011**, 356, 316–324.
- (78) Orvalho, S.; Ruzicka, M. C.; Olivieri, G.; Marzocchella, A. *Chem. Eng. Sci.* **2015**, 134, 205–216.
- (79) Gao, X.; Kong, B.; Vigil, R. D. *Bioresour. Technol.* **2015**, 198, 283–291.
- (80) Gao, X.; Kong, B.; Vigil, R. D. *Chem. Eng. J.* **2015**, 270, 508–518.
- (81) de Godos, I.; Mendoza, J. L.; Ación, F. G.; Molina, E.; Banks, C. J.; Heaven, S.; Rogalla, F. *Bioresour. Technol.* **2014**, 153, 307–314.

- (82) Guo, X.; Yao, L.; Huang, Q. *Bioresour. Technol.* **2015**, *190*, 189–195.
- (83) Khoo, C. G.; Lam, M. K.; Lee, K. T. *Algal Res.* **2016**, *15*, 65–76.
- (84) Zhao, S.; Ding, Y.; Chen, R.; Liao, Q.; Zhu, X. *Int. J. Heat Mass Transf.* **2015**, *90*, 1001–1008.
- (85) Wu, X.; Merchuck, J. C. *Chem. Eng. Sci.* **2004**, *59*, 2899–2912.
- (86) Ding, Y. D.; Zhao, S.; Liao, Q.; Chen, R.; Huang, Y.; Zhu, X. *Int. J. Hydrogen Energy* **2016**, *41* (8), 4879–4887.
- (87) Ozkan, A.; Berberoglu, H. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2013**, *112*, 287–293.
- (88) Bournival, G.; Ata, S.; Karakashev, S. I.; Jameson, G. J. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *414*, 50–58.
- (89) Ata, S. *Langmuir* **2008**, *24*, 6085–6091.
- (90) Lauersen, K. J.; Berger, H.; Mussnug, J. H.; Kruse, O. *J. Biotechnol.* **2013**, *167* (2), 101–110.
- (91) Jurado-Oller, J. L.; Dubini, A.; Galván, A.; Fernández, E.; González-Ballester, D. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8* (1), 149.
- (92) Yang, D.; Song, D.; Kind, T.; Ma, Y.; Hoefkens, J.; Fiehn, O. *PLoS One* **2015**, *10* (9), 1–17.
- (93) Xiao, R.; Zheng, Y. *Biotechnol. Adv.* **2016**, 1–20.
- (94) Bafana, A. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95* (2), 746–752.
- (95) Allard, B.; Tazi, A. *Phytochemistry* **1992**, *32* (1), 41–47.
- (96) Wang, M.; Kuo-Dahab, W. C.; Dolan, S.; Park, C. *Bioresour. Technol.* **2014**, *154*, 131–137.
- (97) Geun Goo, B.; Baek, G.; Jin Choi, D.; Il Park, Y.; Synytsya, A.; Bleha, R.; Ho Seong, D.; Lee, C. G.; Kweon Park, J. *Bioresour. Technol.* **2013**, *129*, 343–350.
- (98) Bokkhim, H.; Bansal, N.; Grndahl, L.; Bhandari, B. *Food Chem.* **2013**, *141* (3), 3007–3013.
- (99) Carugo, O. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *99*, 160–165.
- (100) Das, S.; Dash, U. N. *J. Mol. Liq.* **2017**, *236*, 283–289.
- (101) Ercili-Cura, D.; Miyamoto, A.; Paananen, A.; Yoshii, H.; Poutanen, K.; Partanen, R. *Food Hydrocoll.* **2015**, *44*, 183–190.
- (102) Galush, W. J.; Le, L. N.; Moore, J. M. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 1012–1020.
- (103) Godfrin, P. D.; Hudson, S. D.; Hong, K.; Porcar, L.; Falus, P.; Wagner, N. J.; Liu, Y. *Phys. Rev. Lett.* **2015**, *115* (22), 1–5.
- (104) Neergaard, M. S.; Kalonia, D. S.; Parshad, H.; Nielsen, A. D.; Møller, E. H.; Van De Weert, M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49* (3), 400–410.
- (105) Zhang, Z.; Liu, Y. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2017**, *16*, 48–55.
- (106) Kezwon, A.; Wojciechowski, K. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *460*, 168–175.
- (107) Ulaganathan, V.; Retzlaff, I.; Won, J. Y.; Gochev, G.; Gehin-Delval, C.; Leser, M.; Noskov, B. A.; Miller, R. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *519*, 153–160.
- (108) Adhikari, B.; Howes, T.; Shrestha, A.; Bhandari, B. R. *J. Food Eng.* **2007**, *79* (4),

- 1136–1143.
- (109) Dickinson, E. *Food Hydrocoll.* **2003**, *17* (1), 25–39.
- (110) Asgharpour, M.; Mehrnia, M. R.; Mostoufi, N. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *49* (3), 351–360.
- (111) Kim, K.; Seo, K.; Kim, Y.; Yang, J.; Ha, K. S.; Lee, J.; Kim, C. *J. Ind. Eng. Chem.* **2017**, *53*, 228–232.
- (112) Jia, X.; Hu, W.; Yuan, X.; Yu, K. *Chinese J. Chem. Eng.* **2015**, *23* (3), 476–481.
- (113) Jamnongwong, M.; Loubiere, K.; Dietrich, N.; Hébrard, G. *Chem. Eng. J.* **2010**, *165* (3), 758–768.
- (114) Moore, B. G.; Tischer, R. G. *Science (80-)*. **1964**, *145*, 586–587.
- (115) Band-Schmidt, C. J. In *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalga*; Arredondo-Vega, B. O., Voltolina, D., Eds.; Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.: La Paz, B.C.S., México, 2007; pp 1–11.
- (116) Sueoka, N. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1960**, *46* (1), 83–91.
- (117) Sovechles, J.; Waters, K. *AIChE Journal.* **2015**, *61* (bubble size, bubble coalescence, critical coalescence concentration, critical coalescence ionic strength, inorganic salt, seawater, flotation), 2489–2496.
- (118) Lohman, E. J.; Gardner, R. D.; Halverson, L. D.; Peyton, B. M.; Gerlach, R. *ALGAL* **2014**, *5*, 171–180.
- (119) LeGresley, M.; McDermott, G. In *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis* ; Karlson, B., Cusack, C., Bresnan, E., Eds.; UNESCO: Paris, 2010; pp 25–30.
- (120) Arredondo-Vega, B. O.; Voltolina, D. *Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico*; Arredondo-Vega, B. O., Voltolina, D., Eds.; Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.: La Paz, México, 2007.
- (121) Waterborg, J. H.; Matthews, H. R. *Methods Mol. Biol.* **1984**, *1*, 1–3.
- (122) Lewin, R. a. *Can. J. Microbiol.* **1956**, *2* (7), 665–672.
- (123) Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. **1956**, 350–356.
- (124) Baba, M.; Suzuki, I.; Shiraiwa, Y. *Plant Cell Physiol.* **2011**, *52* (8), 1302–1314.
- (125) Barbosa, M. J.; Albrecht, M.; Wijffels, R. H. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *83* (1), 112–120.
- (126) Sadeghizadeh, A.; Farhad, F.; Moghaddasi, L.; Rahimi, R. *Bioresour. Technol.* **2017**, *243*, 441–447.
- (127) Rols, J. L.; Goma, G. *Biotechnol. Adv.* **1989**, *7*, 1–14.

ANEXOS

1. Composición del medio Sueoka

Tabla 3. Componentes mayoritarios del medio *Sueoka*.

Especie iónica	Concentración molar	Carga ²	Fuerza iónica (FI)
NH ₄ ⁺	0.00935	1	0.004675
K ⁺	0.02212	1	0.01106
Na ⁺	0.00027	1	0.000135
Ca ²⁺	0.000068	4	0.000136
Mg ²⁺	0.000081	4	0.000162
Cl ⁻	0.00955	1	0.004775
SO ₄ ²⁻	0.000182	4	0.000364
PO ₄ ³⁻	0.0136	9	0.0612
TOTAL MAYORITARIOS			0.082507

Tabla 4. Componentes minoritarios del medio *Sueoka*.

Especie iónica	Concentración molar	Carga ²	Fuerza iónica (FI)
Fe ²⁺	0.0000179	4	0.0000358
Zn ²⁺	0.0000765	4	0.000153
Cu ²⁺	0.0000063	4	0.0000126
Co ²⁺	0.0000068	4	0.0000136
Mn ²⁺	0.0000256	4	0.0000512
Mo ⁶⁺	0.0000062	36	0.0001116
BO ₃ ³⁻	0.000184	9	0.000828
TOTAL TRAZA			0.0012058

2. Algoritmo de MATLAB para la adquisición de imágenes

```
close all; clear; clc;
obj = VideoReader('DSC_4054.MOV');
vid = read(obj);
frames = obj.NumberOfFrames;

for x = 1 : 1
    FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
    imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 150 : 150
    FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
    imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 300 : 300
    FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
    imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 450 : 450
    FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
    imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 600 : 600
    FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
    imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 750 : 750
    FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
    imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 900 : 900
    FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
    imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 1050 : 1050
    FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
    imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 1200 : 1200
    FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
    imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
```

```

end
for x = 1350 : 1350
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 1500 : 1500
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 1650 : 1650
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 1800 : 1800
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 1950 : 1950
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 2100 : 2100
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 2250 : 2250
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 2400 : 2400
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 2550 : 2550
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 2700 : 2700
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 2850 : 2850

```

```
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 3000 : 3000
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 3150 : 3150
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 3300 : 3300
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 3450 : 3450
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
for x = 3600 : 3600
FileName = sprintf('cuadro_%04d', x);
imwrite(vid(:,:,x),strcat(FileName,'.png'));
end
```

3. Algoritmo de MATLAB para el análisis digital de imágenes

```
clear;clc
p = which('cuadro_0001.png'); %Nombre del primer cuadro a procesar
filelist = dir([fileparts(p) filesep 'cuadro_*.png']);
filename1 = {filelist.name};

for i=1:25
A=imread(filename1{i});% permite leer la imagen.
RGB=A;
figure % cada "figure" permite mostrar cada imagen en una nueva ventana.
imshow(RGB)% este comando sirve para mostrar la imagen.
J=rgb2gray(RGB); % cambia la imagen en RGB a escala de grises.
I= imcomplement(J); %Invertir los colores blanco y negro de una imagen binaria
imshow(I)
imhist(I) % muestra un histograma donde se presena la distribución de las intensidades de
los pixeles en la imagen.
I2=adapthisteq(I); % mejora el contraste de la imagen previa.
imshow(I2)
imhist(I2)
rc= imextendedmin(I2,70); %Definir regiones claras como negro y regiones oscuras como
blanco
im = imimposemin(I2,rc); %modifica la intensidad de la imagen usando una reconstrucción
morfológica.
fondo=imopen(I2,strel('disk',5));%imopen=indica una apertura morfológica sobre escala de
grises o una imagen binaria. STREL crea un elemento estructural en forma de disco. el
valor después de la coma indica el radio.
imshow(fondo)
surf(double(fondo(1:8:end,1:8:end))),zlim([0 260])% surf(double(fondo(1:8:end,1:8:end)))=
crea una superficie paramétrica coloreada en los ejes x,y. zlim([0 260]= ajusta el límite del
eje z para los ejes actuales. se crea un vector de dos elementos [min max].
set(gca,'ydir','reverse')%gca hace referencia a los ejes en el espacio. ydir es la propiedad
que nos interesa modificar. reverse es el valor que queremos para la propiedad.
I3=im-fondo;
imshow(I3)
I4=imadjust(I3);%incredmta el contraste de la imagen procesada.
imshow(I4)
level = graythresh(I4);%determina automáticamente el nivel de blanco y negro [0-1] que se
utilizará para convertir la imagen en escala de grises a binaria.
bw = im2bw(I4,level);%transforma una imagen en escala de grises a binaria.
bw = bwareaopen(bw,30);%remueve el ruido de la imagen. el valor 30 indica que
eliminará archivos con menos de 30 pixeles.
```

```

cc = bwconncomp(bw);%devuelve los componentes relacionados cc encontrados en la
imagen bw. el 4 indica el número de componentes relacionados. cuando se omite el
cuatro; el comando toma por default 8 conecciones.
burbuja=false(size(bw));% el comando false(n) es un arreglo de n por n ceros lógicos. en
este caso es de size bw por size bw ceros.x1= edge(bw,'canny');
x1 = edge(bw,'canny'); %Encontrar bordes y delimitar fronteras
bw2 = imfill(x1,'holes'); %Rellenar espacios
bw22 = medfilt2(bw2); %Filtrar imagen para desaparecer espacios sin relleno
L1=bwlabel(bw22);
stats = regionprops(L1,'Area','Eccentricity','Solidity');
idx = find([stats.Area] >= 75 & [stats.Eccentricity] >=0.3 & [stats.Solidity] >= 0.95);
bw22 = ismember(L1,idx);
A = J(1:10,1:0);
L1 = double(bw22);
L1 = 255*L1;
L1(1:10,1:0)=A;
colormap(gray(256));
w = im2bw(L1,0.5);
figure; imshow(w)
display(filename1{i});
datosburbuja=
regionprops('table',w,'centroid','MajorAxisLength','MinorAxisLength','Area','EquivDiameter','
Perimeter','PixelList','Eccentricity','Solidity')% calcula las propiedades de la región en la
imagen y devuelve los datos en forma de tabla.
centroids = cat(1,datosburbuja.Centroid);
hold on
plot(centroids(:,1),centroids(:,2),'b*')
hold off
%centers = datosburbuja.Centroid;%se obtienen los centros, diámetros y radio de las
burbujas.
%diameters = mean([datosburbuja.MajorAxisLength datosburbuja.MinorAxisLength],2);
%radii = diameters/2;
%hold on% gráfica los círculos
%viscircles(centers,radii);
%hold off

%Guardando imagen producida con dimensiones originales

[r,c,~] = size(w); %Obteniendo dimensiones de imagen
set(gca,'Units','normalized','Position',[0 0 1 1]); %Modificar el tamaño de ejes
set(gcf,'Units','pixels','Position',[200 200 c r]); %Modificar el tamaño de la figura
hold on;

```

```

f = getframe(gcf); %Capturar la ventana actual
filename2 = sprintf('centroide_%04d.png', i) ;
imwrite(f.cdata,filename2); %Guardar los datos del cuadro

%Las siguientes líneas de código son para colocar el nombre del cuadro en
%la imagen. Al hacer esto, se produce y guarda una nueva imagen (con el nombre) que
%se sobrescribe a la ya guardada

lm=imread(filename2);
position = [300 20];
value = filename1{i};
lol = insertText(lm,position,value,'AnchorPoint','LeftBottom');
figure,imshow(lol)

[r,c,~] = size(lol); %Obteniendo dimensiones de imagen
set(gca,'Units','normalized','Position',[0 0 1 1]); %Modificar el tamaño de ejes
set(gcf,'Units','pixels','Position',[200 200 c r]); %Modificar el tamaño de la figura
hold on;

fu = getframe(gcf); %Capturar la ventana actual
filename3 = sprintf('centroide_%04d.png', i) ;
imwrite(fu.cdata,filename3); %Guardar los datos del cuadro

%Comparando la imagen original y la producida

[X1,map1] = imread(filename1{i});
[X2,map2] = imread(filename2);
subplot(2,1,1), imshow(X1,map1)
subplot(2,1,2), imshow(X2,map2)
trueize

%Guardando ambas imágenes como una sola

efe = getframe(gcf); %Capturar la ventana actual
filename4 = sprintf('comparacion_%04d.png', i);
imwrite(efe.cdata,filename4); %Guardar los datos del cuadro

%Las siguientes líneas de código son para colocar el nombre del cuadro en
%la imagen. Al hacer esto, se produce y guarda una nueva imagen (con el nombre) que
%se sobrescribe a la ya guardada

lma=imread(filename4);

```

```

position = [300 20];
value = filename1{i};
lolo = insertText(lma,position,value,'AnchorPoint','LeftBottom');
figure,imshow(lolo)

[r,c,d] = size(lolo); %Obteniendo dimensiones de imagen
set(gca,'Units','normalized','Position',[0 0 1 1]); %Modificar el tamaño de ejes
set(gcf,'Units','pixels','Position',[200 200 c r]); %Modificar el tamaño de la figura
hold on;

fur = getframe(gcf); %Capturar la ventana actual
filename5 = sprintf('comparacion_%04d.png', i) ;
imwrite(fur.cdata,filename5); %Guardar los datos del cuadro
close all;
end

```

4. Abreviaturas

a : Área interfacial disponible para la transferencia de masa (m^2).

$k_L, k_{L,app}$: Coeficiente lateral de transferencia de masa por parte del líquido (m/s).

k_G : Coeficiente lateral de transferencia de masa por parte del gas (m/s).

$k_L a$: Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (s^{-1} , h^{-1}).

K_G : Coeficiente global de transferencia de masa por parte del gas (m/s).

K_L : Coeficiente global de transferencia de masa por parte del líquido (m/s).

Fl_i : Fuerza iónica (adimensional).

A y B : Especies químicas.

J_A, N_A : Flux difusivo de A ($gmol/m^2 \cdot s$).

N_{AG} : Flux de A en la fase gaseosa ($gmol/m^2 \cdot s$).

N_{AL} : Flux de A en la fase líquida ($gmol/m^2 \cdot s$).

C_A : Concentración de la especie A (mg/L, g/L, gmol/L).

D : Coeficiente de difusión (m^2/s).

∇_{CA} : Gradiente de concentración de la especie A en el espacio (mg/L, g/L, gmol/L).

$\frac{dC_A}{dz}$: Gradiente de concentración molar en la dirección Z (gmol/L).

c : Concentración molar total de una mezcla (gmol/L).

y_A : Fracción molar del componente A (gmol A/gmol totales).

v_{AZ} : Velocidad de difusión de la especie A (m/s).

V_Z : Velocidad promedio molar de la mezcla (m/s).

R_A : Velocidad de absorción del gas A (moles/s).

S_w : Solubilidad de la especie A (g/mL).

V_i : Volumen del reactor (L, m^3).

C_{AG} : Concentración de A en el seno de la fase gaseosa (mg/L, g/L, gmol/L).

C_{AL} : Concentración de A en el seno de la fase líquida (mg/L, g/L, gmol/L).

C_{AGi} : Concentración en equilibrio de A en la fase gaseosa (mg/L, g/L, gmol/L).

C_{ALi} : Concentración en equilibrio de A en la fase líquida (mg/L, g/L, gmol/L).

C_{AG}^* : Concentración en equilibrio de A en la fase gaseosa (mg/L, g/L, gmol/L).

C_{AL}^* : Concentración en equilibrio de A en la fase líquida (mg/L, g/L, gmol/L).

$C_{Na_2SO_3}$: Concentración de sulfito de sodio (mg/L, g/L, gmol/L).

C^* : Concentración de saturación del sulfito de sodio (mg/L, g/L, gmol/L).

$C_{A,e}$: Concentración en equilibrio del componente A (mg/L, g/L, gmol/L).

ρ_{CO_2L} : Concentración de CO_2 en el medio de cultivo (mg/mL).

$\rho_{CO_2L}^*$: Concentración de saturación del CO_2 en el medio de cultivo (mg/mL).

m : Coeficiente de distribución (adimensional).

d_{32} : Diámetro promedio de Sauter (m).

\mathcal{E}_g : Fracción de gas retenido dentro del sistema (adimensional).

z_i : Carga iónica.

m_i : Concentración iónica (gmol/kg).

m^0 : Constante (1 gmol/kg).

b : Rendimiento de sustrato disponible/Biomasa ($\text{mgCO}_2/\text{mgBiomasa}$).

μ : Tasa específica de crecimiento (h^{-1} , s^{-1}).

ρ_{XL} : Concentración de biomasa en el medio de cultivo (mg/mL).

t : Tiempo de cultivo (h).

d_{bi} : Diámetro equivalente (m).

dH : Eje mayor de una burbuja (m).

dL : Eje menor de una burbuja (m).

n_i : Número de burbujas con un mismo diámetro equivalente.

ΔV : Incremento en el volumen del cultivo a causa de la aireación (m^3 , L).

V_L : Volumen del cultivo sin aireación (m^3 , L).

5. Recomendaciones

Se recomienda para futuros experimentos de este tipo además de realizar la determinación de los coeficientes de transferencia de masa (k_L y $k_L a$) y las variables hidrodinámicas (a , \mathcal{E}_G y d_{32}), hacer el seguimiento con respecto al tiempo de las propiedades fisicoquímicas del medio de cultivo para poder establecer con mayor certeza un relación entre ellas y las variables de respuesta (a , k_L y $k_L a$).

Realizar experimentos de transferencia de masa con soluciones puras de proteínas y carbohidratos para evaluar si estas sustancias tienen algún efecto sobre las propiedades hidrodinámicas, el k_L y el $k_L a$. En caso de resultar positivas realizar experimentos con mezclas de tales soluciones con el objetivo de identificar algún efecto antagonico o sinérgico entre ellas.

Realizar estudios sobre el comportamiento dinámico de las burbujas coalescentes en suspensión de carbohidratos, proteínas, mezclas de carbohidratos, mezclas de proteínas y mezclas de ambas sustancias así como en la presencia de electrolitos.

Realizar estudios sobre los patrones de hidratación de mezclas de carbohidratos y proteínas, así como en la presencia de sales con el objetivo de determinar el efecto de estas sustancias sobre el reestructuramiento del agua para poder evaluar si existe alguna relación entre estos procesos y el fenómeno de transferencia de masa

