



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

# Bioconversión de CO<sub>2</sub> en pigmentos fotosintéticos

**Autor: Wahid El Haffari, Madiha**

Tutores:

LEBRERO FERNÁNDEZ, RAQUEL

ÁNGELES TORRES, ROXANA

Departamento de Ingeniería Química y

Tecnología del Medio Ambiente

Valladolid, septiembre 2024.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a Roxana Ángeles Torres por su gran paciencia y por haberme brindado mucho apoyo y ayuda guiándome durante estos meses en el laboratorio. Gracias a ella, aprendí mucho sobre microalgas y cianobacterias, un mundo totalmente nuevo para mí.

También agradezco a Raquel Lebrero Fernández por su guía y apoyo para llevar a cabo este trabajo fin de grado.

Principalmente, quiero agradecer a mi madre, Atika El Hafari, a mi padre, Mohamed Wahid, y a mi hermano, Houssam, que han sido un apoyo imprescindible para mí todos estos años.

Finalmente, gracias a mis amigos y compañeros de universidad con los que compartí esta experiencia.

## RESUMEN

En los últimos años, las actividades humanas han tenido un impacto negativo significativo en el medioambiente, especialmente a través de la emisión de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), lo que ha generado un alarmante calentamiento global. Esta situación resalta la urgente necesidad de adoptar tecnologías sostenibles que contribuyan a mitigar este problema. Una tecnología con un futuro prometedor para tratar las emisiones de CO<sub>2</sub> es el uso de los microorganismos fotosintéticos, que fijan este gas de efecto invernadero y, a su vez, pueden sintetizar productos de valor comercial.

Este trabajo fin de grado se enfoca en la exploración de un bioproceso fotosintético sostenible para capturar el CO<sub>2</sub> por consorcios de microalgas y sintetizar productos de interés industrial, como son los pigmentos naturales (carotenoides, clorofilas y ficocianinas). Para ello, se operó un fotobiorreactor cerrado tipo *airlift* con un consorcio de microalgas, evaluando el impacto del tipo de luz (blanca y azul) bajo ciclos de iluminación de 12 horas en varios parámetros del cultivo, como son el pH, la concentración y productividad de biomasa microalgal, la tasa de fijación de CO<sub>2</sub>, entre otros, y en la producción de pigmentos fotosintéticos. Además, se han optimizado las metodologías de extracción de los pigmentos fotosintéticos, en particular, de los carotenoides, las clorofilas y las ficocianinas.

Los resultados obtenidos muestran que, las luces azules mejoran el crecimiento de microalgas en comparación a las blancas, alcanzando una concentración máxima biomasa de 1,33 g L<sup>-1</sup> y una tasa de fijación máxima de CO<sub>2</sub> de 3,3 g m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Asimismo, la producción de clorofilas, carotenoides y ficocianinas se ve mejorada al emplear luces azules frente a las blancas, obteniendo porcentajes (% dcw) máximos de 0,28 ± 0,06, 0,70 ± 0,06 y 0,52 ± 0,01 % dcw, respectivamente.

**PRUEBAS CLAVE:** bioconversión de CO<sub>2</sub>, carotenoides, clorofilas, ficocianinas, microalgas.

## ABSTRACT

In recent years, human activities have significantly impacted the environment, particularly through carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) emissions, leading to alarming global warming. This situation highlights the urgent need to adopt sustainable technologies that can help mitigate this problem. A technology with a promising future to treat CO<sub>2</sub> emissions is based on the use of photosynthetic microorganisms to capture this greenhouse gas and convert it into products of commercial value. This final degree project focuses on the exploration of a sustainable photosynthetic bioprocess to capture CO<sub>2</sub> by a microalgae consortium and synthesize products of industrial interest, such as natural pigments (carotenoids, chlorophylls and phycocyanins).

To achieve this, a closed airlift photobioreactor with a microalgae consortium was operated, evaluating the impact of the type of light (white and blue) under lighting cycles of 12 hours on various culture parameters, such as pH, microalgal biomass concentration and productivity, as well as on the CO<sub>2</sub> fixation rate and the production of photosynthetic pigments. In addition, the extraction methodologies for the photosynthetic pigments carotenoids, chlorophylls and phycocyanins have been optimized.

The results obtained demonstrate that blue lights enhance microalgae growth compared to white ones, reaching a maximum biomass concentration of 1,33 g L<sup>-1</sup> and a maximum CO<sub>2</sub> fixation rate of 3,3 mg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Likewise, the production of chlorophylls, carotenoids and phycocyanin was improved when using blue lights compared to white illumination, obtaining maximum percentages (% dcw) of 0,28 ± 0,06, 0,70 ± 0,06 and 0,52 ± 0,01 % dcw, respectively.

**KEYWORDS:** carotenoids, CO<sub>2</sub> bioconversion, chlorophylls, microalgae, photobioreactor, and phycocyanins.

# Índice

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1.	PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DEL DIÓXIDO DE CARBONO .....	1
1.2.	MÉTODOS DE CAPTURA Y CONVERSIÓN DE CO <sub>2</sub> .....	2
1.2.1.	TECNOLOGÍAS FÍSICOQUÍMICAS DE CAPTURA DE CO <sub>2</sub> .....	3
1.2.2.	TECNOLOGÍAS BIOLÓGICAS DE CAPTURA DE CO <sub>2</sub> : FIJACIÓN POR MICROORGANISMOS .....	6
1.2.2.1.	Fotosíntesis.....	6
1.2.2.2.	Fijación de CO <sub>2</sub> en fotobiorreactores .....	8
1.3.	PIGMENTOS.....	13
1.3.1.	PIGMENTOS SINTÉTICOS.....	13
1.3.2.	PIGMENTOS NATURALES .....	14
1.3.2.1.	Carotenoides .....	14
1.3.2.2.	Clorofilas.....	16
1.3.2.3.	Ficobiliproteínas .....	17
1.4.	MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS PARA LA BIOCONVERSIÓN DE CO <sub>2</sub> EN PIGMENTOS NATURALES .....	19
1.4.1.	MICROALGAS.....	19
1.4.1.1.	Chlorella sp. ....	19
1.4.2.	CIAOBACTERIAS.....	21
1.4.2.1.	Nostoc Muscorum .....	22
1.4.3.	NUTRIENTES Y MEDIO DE CULTIVO .....	23
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1.	MEDIO DE CULTIVO .....	26
3.2.	PREPARACIÓN DEL INOCULO .....	27
3.3.	CONFIGURACIÓN EXPERIMENTAL: .....	27
3.3.1.	SISTEMA EXPERIMENTAL .....	27
3.3.2.	PRUEBA ABIÓTICA.....	29
3.3.3.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	30
3.3.4.	MUESTREO.....	30
3.4.	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	31
3.4.1.	VALORIZACIÓN DE BIOMASA .....	31
3.4.1.1.	Medición de sólidos suspendidos totales y volátiles .....	31
3.4.1.2.	Pigmentos fotosintéticos.....	31
3.4.2.	CARACTERIZACIÓN DE CALDO DE CULTIVO .....	35
3.4.2.1.	Carbono orgánico e inorgánico y nitrógeno total .....	35
3.4.2.2.	Concentración de cloruro, nitritos, nitratos, sulfatos y fosfatos: .....	35
3.4.2.3.	Actividad fotosintética, oxígeno disuelto y pH .....	36
3.4.3.	MEDICIÓN DE LA INTENSIDAD DE LUZ .....	36
3.5.	CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS:.....	37
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN: .....</b>	<b>39</b>

4.1.	PRODUCCIÓN DE BIOMASA.....	39
4.2.	PARÁMETROS OPERACIONALES.....	42
4.2.1.	TEMPERATURA.....	42
4.2.2.	OXÍGENO DISUELTO Y PH.....	42
4.2.3.	ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA.....	44
4.2.4.	NITRÓGENO Y FÓSFORO.....	44
4.2.5.	TASA DE FIJACIÓN DE CO <sub>2</sub> .....	46
4.2.6.	CARBONO INORGÁNICO.....	47
4.3.	CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS.....	49
4.3.1.	PRUEBAS DE EXTRACCIÓN.....	49
4.3.2.	EVOLUCIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS.....	51
<b>5.</b>	<b>APLICACIÓN A NIVEL INDUSTRIAL.....</b>	<b>53</b>
5.1.	BASES DE DISEÑO.....	53
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA:.....</b>	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>65</b>
8.1.	DISOLUCIÓN DE CARBONATOS.....	65
8.2.	OPTIMIZACIÓN DE CRECIMIENTO DE NOSTOC MUSCORUM.....	65
8.3.	OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO DE MICROALGAS.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Concentración de CO <sub>2</sub> desde 1959 hasta 2023 (Statista & Abigail Orús, 2024) .....	2
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de los procesos de captura de CO <sub>2</sub> (adaptado de Gibbins & Chalmers, 2008).....	6
<b>Figura 3.</b> Vía metabólica para la asimilación de carbono y la producción de glucógeno (GL) y PHB por las cianobacterias a través del ciclo CBB: ADP, adenosina-difosfato; ADP-G, ADP-glucosa pirofosforilasa; AGP, adenosina difosfato glucosa pirofosforilasa; ATP, adenosín trifosfato; FB-P, fructosa-1,6-bifosfato; F6-P, fructosa 6-fosfato; GS, glucógeno sintasa; G1-P, glucosa-1-fosfato; G3-P, gliceraldehído-3-fosfato; G6-P, glucosa-6-fosfato; NADH, nicotinamida adenina dinucleótido (reducido); NAD <sup>+</sup> , nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado); NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido); NADP <sup>+</sup> , nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidado); PGM, fosfoglucomutasa; RuBisCO, ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa; RuBP, ribulosa-1,5-bifosfato; R5-P, ribulosa 5-fosfato; 3-PG, 3-fosfoglicerato (Ángeles et al., 2021). .....	8
<b>Figura 4.</b> Fotobiorreactores abiertos a) Raceways b) Estanques circulares c) Estanques sin agitación (Y. Shen et al., 2009) .....	10
<b>Figura 5.</b> Fotobiorreactores cerrados: a) Columnas b) Plano, vertical c) Plano, inclinado (Y. Shen et al., 2009) .....	11
<b>Figura 6.</b> Fotobiorreactores tubulares: a) Recta horizontal b) Horizontal (Fernández, 2014) c) Vertical (Algae, 2024) d) Helicoidal e) Inclinada (Y. Shen et al., 2009).....	12
<b>Figura 7.</b> FBR <i>airlift</i> . Imagen a la izquierda tomada en el laboratorio del Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid (2024). Imagen a la derecha adaptada de Cultiply, 2023.....	13
<b>Figura 8.</b> Ejemplos de diferentes estructuras coloreadas de la naturaleza en las que se encuentran los carotenoides. La figura central representa los productores naturales de carotenoides (algas, bacterias, etc.) (Martínez-Cámara et al., 2021) .....	15
<b>Figura 9.</b> Representación de la estructura de clorofila a y clorofila b (Streit et al., 2015) .....	17
<b>Figura 10.</b> Consorcio de microalgas con especie dominante <i>Chlorella sp</i> observada en microscopio, ampliada 100x. Crecimiento con medio ES modificado en FBR con intensidad de luz $110,52 \pm 2,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperatura 22 °C. Imagen tomada en el laboratorio del Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid (2024). .....	20
<b>Figura 11.</b> Estructura celular en las cianobacterias (Noreña-Caro & Benton, 2018b).....	21
<b>Figura 12.</b> <i>Nostoc Muscorum</i> observada en microscopio, ampliada 100x. Crecimiento con medio M-IC (Ver apartado 3.1.2) en FBR con intensidad de luz $110,52 \pm 2,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperatura de 22 °C. Imagen tomada en el laboratorio del Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid (2024). .....	23
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática de la configuración experimental .....	28

<b>Figura 14.</b> Sistema Fotobiorreactor (FBR) tipo airlift en el laboratorio del Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid durante la prueba abiótica .....	29
<b>Figura 15.</b> A) FBR con panel cilíndrico de luz LED blanca cálida, B) FBR con panel cilíndrico de luz LED azul. ....	30
<b>Figura 16.</b> Representación esquemática de los puntos de medida de luz. ....	37
<b>Figura 17.</b> Variación de concentración de biomasa (SSV, g L <sup>-1</sup> ) (color verde) y productividad de biomasa algal (g m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> ) (color rojo). La línea azul representa el cambio de luces blancas a azules.....	39
<b>Figura 18.</b> Evolución de OD (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> ) (color naranja) y pH (color rojo) durante la operación en FBR. Línea azul representa cambio a luces LED azules. ....	42
<b>Figura 19.</b> Actividad fotosintética a lo largo de la operación en FBR. Línea azul representa cambio a luces azules. ....	44
<b>Figura 20.</b> Evolución de NT (color marrón), NT procedente de aniones NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (color verde) y PT (color naranja) (mg L <sup>-1</sup> ) durante la operación en FBR. La línea azul representa el cambio a luces azules. ....	45
<b>Figura 21.</b> Evolución de RCO <sub>2</sub> durante la operación el FBR. La línea azul representa el cambio a luces azules. ....	46
<b>Figura 22.</b> Evolución de Cl durante la operación el FBR. La línea azul que representa el cambio a luces azules. ....	48
<b>Figura 23.</b> Prueba de extracción de clorofilas realizada con biomasa de microalgas de FBR a diferentes tiempos de sonicación.....	49
<b>Figura 24.</b> Prueba de extracción de ficocianinas realizada con biomasa de <i>Nostoc Muscorum</i> a diferentes ciclos de congelación y descongelación.....	49
<b>Figura 25.</b> Evolución temporal del porcentaje de pigmentos fotosintéticos extraídos: carotenoides en color verde, clorofilas en color rojo y ficocianinas en color violeta. La línea azul representa el cambio a luces azules .....	51
<b>Figura 26.</b> Posible localización de una planta para captura de CO <sub>2</sub> y su conversión en pigmentos naturales, cerca de una cementera Votorantim Cementos, León, España .....	53
<b>Figura 27.</b> Diagrama de bloques del proceso de bioconversión de CO <sub>2</sub> a pigmentos naturales.....	55
<b>Figura 28.</b> Consorcio de microalgas con especie <i>Chlorella</i> sp observado al microscopio amplificada 100x en el día 9 de la operación en FBR .....	68
<b>Figura 29.</b> Consorcio de microalgas con especie <i>Chlorella</i> sp observado al microscopio amplificada 100x en el día 22 de la operación en FBR.....	68
<b>Figura 30.</b> Consorcio de microalgas con especie <i>Chlorella</i> sp dominante observado al microscopio amplificada 100x en el día 53 de la operación en FBR .....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1.</b> Composición del medio ES (M1) .....	25
<b>Tabla 3.2.</b> Composición de la disolución de micronutrientes.....	26
<b>Tabla 4.1.</b> Porcentaje promedio de carotenoides (% dcw) para cada volumen de muestra .....	26
<b>Tabla 5.1.</b> CO <sub>2</sub> capturado kg CO <sub>2</sub> d <sup>-1</sup> en FBR con volumen de 1 m <sup>3</sup> , empleando luces blancas y azules .....	56
<b>Tabla 5.2.</b> Producciones anuales de pigmentos (g año <sup>-1</sup> ) para FBR escalado empleando luces blancas y luces azules .....	56

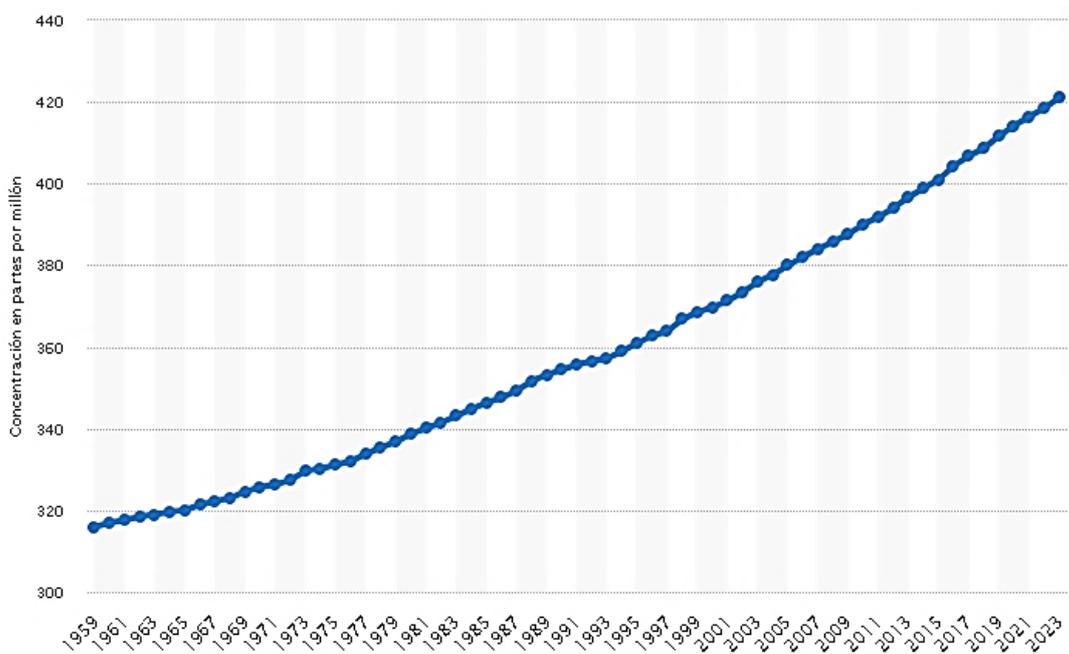


# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DEL DIÓXIDO DE CARBONO

El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es un gas incoloro e inodoro, es el principal gas de efecto invernadero (GEI), seguido por metano ( $\text{CH}_4$ ), óxidos nitrosos ( $\text{NO}_x$ ) y vapor de agua (PRTR España, 2021). Los GEI absorben parte de la radiación solar que atraviesa la atmósfera, permitiendo conservar el calor tanto en la superficie del planeta como en los niveles bajos de la atmósfera, ocasionando un efecto invernadero. El efecto invernadero es un fenómeno natural, que mantiene en la superficie de la Tierra la temperatura adecuada para la supervivencia de los organismos en ella. Sin embargo, el exceso de emisiones de  $\text{CO}_2$  debido a las actividades humanas han ocasionado un aumento de la temperatura drástico (Rahman et al., 2017). Esto se traduce en un aumento de la concentración de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera, que en las últimas décadas ha aumentado desde las 317 ppm en 1960 hasta un valor de 421 ppm registrado en 2023 (Fig. 1) (Statista, Abigail Orús, 2024).

Las fuentes de emisión de  $\text{CO}_2$  son tanto naturales como antropogénicas (Ecología verde, 2019). Entre las fuentes naturales se encuentran la respiración animal, las erupciones volcánicas y los incendios forestales, mientras que entre las fuentes antropogénicas destacan la quema de combustibles fósiles (que representa el 60 % de la emisión de  $\text{CO}_2$ ), los procesos industriales, los medios de transporte, la generación de electricidad y la agricultura (Mustafa et al., 2020). El ciclo del carbono se ve alterado por estas actividades pues producen una disminución de la capacidad de los disipadores naturales, como los bosques, que reducen la cantidad de  $\text{CO}_2$  de la atmósfera, y de la capacidad de las tierras de almacenarlo (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), 2024).



**Figura 1.** Concentración de CO<sub>2</sub> desde 1959 hasta 2023 (Statista & Abigail Orús, 2024)

La forma más efectiva de reducir la emisión del CO<sub>2</sub> es disminuir el consumo de combustibles fósiles, además de la descarbonización por sectores como, por ejemplo, la electrificación del sector del transporte y el uso de biocombustibles. Sin embargo, para resolver la problemática ambiental que genera la emisión del CO<sub>2</sub>, es necesario además el desarrollo de tecnologías para su captura y almacenamiento (Rahman et al., 2017).

## 1.2. MÉTODOS DE CAPTURA Y CONVERSIÓN DE CO<sub>2</sub>

El objetivo de la captura y almacenamiento de CO<sub>2</sub> (CAC) es generar una corriente concentrada de dicho gas para su posterior transporte a un lugar de almacenamiento seguro y permanente para evitar su liberación a la atmósfera. La captura puede incluirse en plantas químicas industriales, en plantas de producción de cemento, en centrales eléctricas u otras que emitan cantidades significativas de este gas.

Existen dos tipos de CAC, según se empleen tecnologías fisicoquímicas o tecnologías de fijación biológica.

### 1.2.1. Tecnologías fisicoquímicas de captura de CO<sub>2</sub>

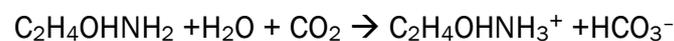
Los sistemas para la captura de CO<sub>2</sub> pueden clasificarse en tres tipos según el punto del proceso en el que se realiza la captura: postcombustión, precombustión y oxicomustión:

- **Postcombustión**

Se aplica a plantas de energía para separar el CO<sub>2</sub> presente en los gases de salida (3-15% v/v) justo antes de que se expulsen a la atmósfera, sin haber realizado ninguna operación previa a la combustión. Después de la combustión se realiza filtrado de partículas y eliminación de NO<sub>x</sub> y SO<sub>x</sub>. El CO<sub>2</sub> separado se lleva a almacenamiento mientras que el resto de los gases se liberan a la atmósfera. Las tecnologías más usadas para la separación de CO<sub>2</sub> son la absorción, la adsorción y la separación con membranas (Figuerola et al., 2008).

- Absorción

La absorción química se basa en el uso de disoluciones alcalinas de aminas, como es la monoetanolamina (MEA), dietanolamina (DEA), trietanolamina (TEA) y metildietanolamina (MDEA) que absorben el CO<sub>2</sub> formando un compuesto según la siguiente reacción:



Durante el proceso de absorción la reacción transcurre de izquierda a derecha y en el proceso de regeneración del disolvente se produce de derecha a izquierda (Herzog & Golomb, 2004). Se trata del proceso más usado en la industria pues es una tecnología bastante desarrollada. Una ventaja que presenta es la gran pureza del CO<sub>2</sub> que se puede obtener, así como la disponibilidad comercial, aunque tiene la desventaja de tener costes de regeneración de absorbentes muy altos (Mack & Endemann, 2010).

Por el contrario, en la absorción física no hay una reacción química con el absorbente pues la separación depende sólo de la solubilidad del gas en el solvente, en la que influye directamente la presión parcial del CO<sub>2</sub> y la temperatura. Para la absorción física de CO<sub>2</sub> se emplea generalmente el dimetil éter de polietilenglicol. Como ventaja presenta la capacidad de eliminación de trazas de otros compuestos no deseados de la corriente sin formar productos de reacción secundarios, sin embargo, no resulta rentable para tratar corrientes con concentraciones bajas de CO<sub>2</sub> (López Fuentes, 2021).

- Adsorción

El proceso de adsorción se basa en la retención selectiva del CO<sub>2</sub> en una superficie sólida que es el adsorbente (p.ej. carbón activo y zeolitas), el cual puede ser regenerado con una disminución de temperatura o presión de manera que se libera el gas adsorbido. En función del enlace que se establezca entre la superficie del adsorbente y la molécula del CO<sub>2</sub> se pueden distinguir entre adsorción física y química.

En la adsorción física la molécula se adhiere al adsorbente por una unión de enlaces débiles, debido a la formación de fuerzas de Van der Waals entre los componentes. Se produce a bajas temperatura y no necesita una alta energía de activación. El adsorbente más usado para este caso es el carbón activo.

Por el contrario, en la adsorción química se establece una reestructuración electrónica en la que se forman enlaces fuertes iónicos o covalentes entre la molécula y el adsorbente. Este tipo de adsorción no necesita altas temperaturas y energías de activación.

Los materiales adsorbentes usados, tales como el carbón activo o las zeolitas poseen una estructura porosa bien definida que les aporta una buena capacidad de adsorción y selectividad al CO<sub>2</sub> (Rodríguez-Reinoso et al., 2014). Además, esta tecnología proporciona un ahorro energético, así como una reducción del tamaño de equipos usados (Plaza, 2015).

- Separación por membranas

Consiste en la separación del CO<sub>2</sub> del resto de gases empleando unas membranas con permeabilidad selectiva. Sin embargo, su uso se ve afectado por el coste alto de la compresión para conseguir la presión alta necesaria en el proceso (Antonio Luis, 2021). A pesar de ello, esta técnica presenta varias ventajas como son alta densidad de empaquetamiento, selectividad y facilidad de transporte, entre otros (Herzog & Golomb, 2004).

- **Precombustión**

El objetivo en los procesos de captura previos a la combustión es la separación del CO<sub>2</sub> antes de quemar los combustibles fósiles y antes de producir los gases de salida. El método más usado para esta tecnología es la gasificación del combustible, es decir, se

quemado parcialmente. Para ello, el combustible o el gas natural (CH<sub>4</sub>) es sometido a una reforma de vapor para transformarlo en gas de síntesis (CO+H<sub>2</sub>) y, después, con una reacción de desplazamiento gas-agua, se obtiene el CO<sub>2</sub> e hidrógeno, que posteriormente son separados, de manera que el primero se almacena y el segundo se usa como fuente de energía mucho más limpia (Rahman et al., 2017). Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:



En comparación con la captura postcombustión, el CO<sub>2</sub> se puede liberar a presión superior a la atmosférica y, por lo tanto, no se requiere mucha energía para regenerar el disolvente. Sin embargo, la eficiencia es menor en esta técnica (Rahman et al., 2017).

- **Captura en oxidación**

Se basa en el uso de oxígeno puro con ausencia de nitrógeno en lugar de aire para el proceso de combustión. De esta manera, los gases de salida solo están formados por CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O evitando los NO<sub>x</sub> para que la separación sea más fácil. Este tipo de técnica permite llevar a cabo una combustión sin llamas y genera una corriente concentrada de CO<sub>2</sub> lista para su captura y almacenamiento. Una parte del CO<sub>2</sub> se recircula para sustituir el nitrógeno pues éste tiene el papel de reducir la temperatura de combustión. Para el uso de oxígeno puro se implementa un sistema de separación de componentes del aire que supone mucho coste por la elevada energía que consume (Rahman et al., 2017).

La figura 2 muestra un resumen de los tres planteamientos de captura.

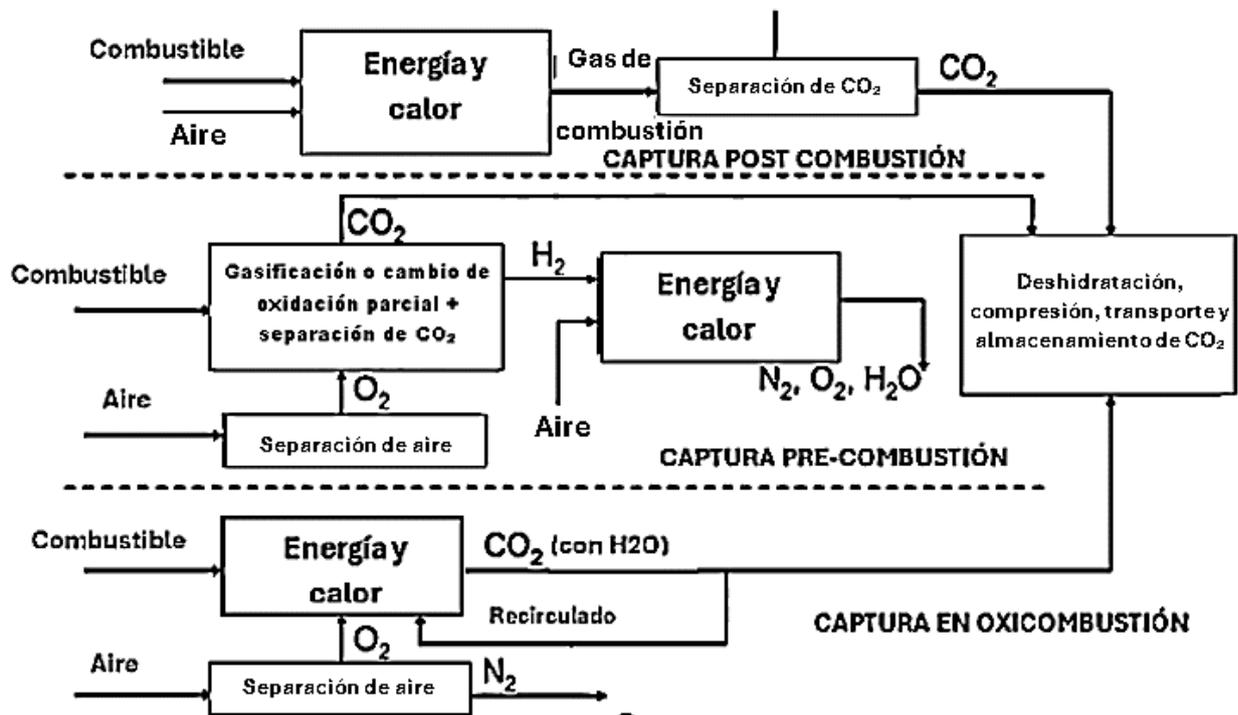
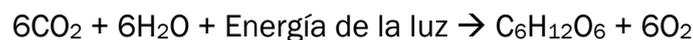


Figura 2. Representación esquemática de los procesos de captura de CO<sub>2</sub> (Gibbins & Chalmers, 2008)

## 1.2.2. Tecnologías biológicas de captura de CO<sub>2</sub>: fijación por microorganismos

### 1.2.2.1. Fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso por el que los organismos fotoautótrofos, como plantas, algas, microalgas, cianobacterias y algunas bacterias, son capaces de sintetizar compuestos orgánicos usando la energía de la luz y fijando el CO<sub>2</sub>. La fotosíntesis puede ser de dos tipos, anoxigénica, en la que no se produce oxígeno, y oxigénica, en la que el CO<sub>2</sub> y el agua se convierten a carbohidratos y oxígeno (O<sub>2</sub>) según la siguiente reacción:

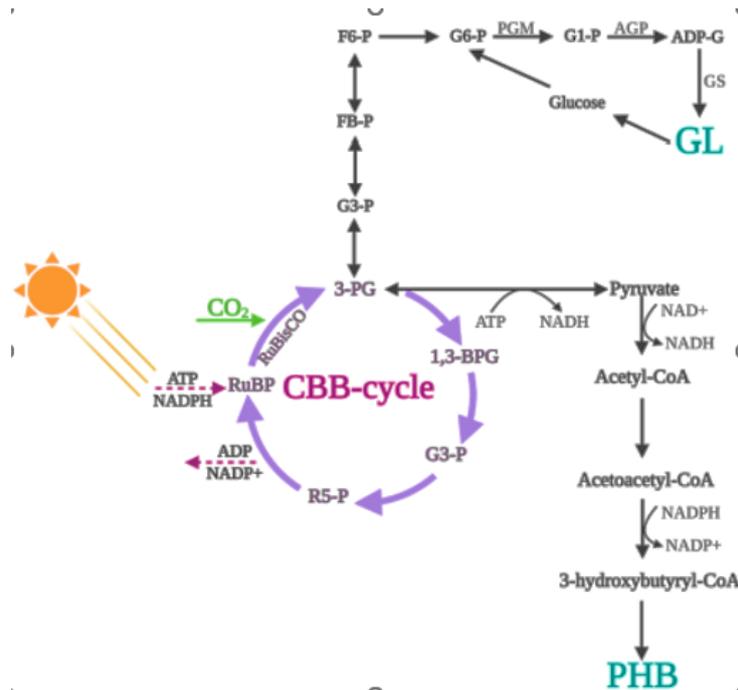


El proceso de fotosíntesis se produce en dos etapas, la luminosa y la oscura. Durante la fase luminosa, la energía de la luz solar se captura y modula por la clorofila y otros pigmentos accesorios, como los carotenoides y ficobilinas, que están organizados en complejos llamados fotosistemas. Los pigmentos se encargan de recolectar la luz en distintos intervalos de longitudes de onda y de transferir la energía a la clorofila, así como

de proteger a las células del posible daño causado por un exceso de luz. Cuando el pigmento absorbe un fotón, pasa al estado de excitación y se transfiere la energía por resonancia al pigmento vecino, que a su vez repite el proceso hasta llegar a la parte central del fotosistema II (PS II) que es el centro de reacción que cuenta con dos moléculas de clorofila a (par especial). Esta energía es usada por el PS II para hidrolizar el agua y reducir una pequeña molécula orgánica, que es la plastoquinona. Los electrones abandonan el PS II y se ceden a un complejo de citocromos. El fotosistema I (PS I) oxida a la plastoquinona y produce la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y el adenosín trifosfato (ATP), que son los precursores que impulsan la síntesis de moléculas de carbohidratos (Durall & Lindblad, 2015). Durante la fase oscura se produce la asimilación o fijación del CO<sub>2</sub> usando el NADPH y ATP generados en la fase luminosa.

El ciclo de Calvin Benson Bassham (CBB), descubierto en 1959, se describe como uno de los mecanismos más conocidos de fijación de carbono. Se puede encontrar en plantas, algas, microalgas y cianobacterias (Vicente Patriarca Eva, 2023). El ciclo CBB tiene como objetivo principal la conversión de CO<sub>2</sub> y las moléculas de ATP y NADPH en glucosa y otros compuestos orgánicos a partir de una serie de reacciones haciendo uso de unas enzimas específicas (Fig. 3). La ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) es la enzima más importante dentro del proceso de catálisis de la reducción de CO<sub>2</sub> a carbohidratos (Santos Correa et al., 2023).

Las cianobacterias y microalgas son capaces de fijar el CO<sub>2</sub> por el ciclo CBB, y varias de ellas pueden también fijar nitrógeno atmosférico. Además, su biomasa puede ser valorizada en productos de valor como, por ejemplo, proteínas, ácidos grasos, vitaminas, poliésteres (p.ej. polihidroxiacetato (PHA)), polisacáridos (p.ej. glucógeno (GL)) y pigmentos naturales (Ángeles et al., 2021). El tipo de producto depende de la cepa usada y de las condiciones de cultivo.



**Figura 3.** Vía metabólica para la asimilación de carbono y la producción de glucógeno (GL) y PHB por las cianobacterias a través del ciclo CBB: ADP, adenosina-difosfato; ADP-G, ADP-glucosa pirofosforilasa; AGP, adenosina difosfato glucosa pirofosforilasa; ATP, adenosín trifosfato; FB-P, fructosa-1,6-bifosfato; F6-P, fructosa 6-fosfato; GS, glucógeno sintasa; G1-P, glucosa-1-fosfato; G3-P, gliceraldehído-3-fosfato; G6-P, glucosa-6-fosfato; NADH, nicotinamida adenina dinucleótido (reducido); NAD<sup>+</sup>, nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado); NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido); NADP<sup>+</sup>, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidado); PGM, fosfoglucomutasa; RuBisCO, ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa; RuBP, ribulosa-1,5-bifosfato; R5-P, ribulosa 5-fosfato; 3-PG, 3-fosfoglicerato (Ángeles et al., 2021).

### 1.2.2.2. Fijación de CO<sub>2</sub> en fotobiorreactores

El crecimiento de microorganismos fotosintéticos empleando luz y CO<sub>2</sub> se lleva a cabo en fotobiorreactores (FBR). Las condiciones de cultivo, como el pH, la temperatura, o los nutrientes suplementados, deben ser controlados dentro de los valores óptimos dependiendo del tipo de microorganismos (Fernández, 2014). Los microorganismos fotosintéticos como las microalgas o cianobacterias (ver apartado 1.4) son los más usados para esta tecnología pues tienen una eficiencia fotosintética superior a las plantas, así como altas tasas de crecimiento y tolerancia a condiciones extremas (Yang et al., 2008).

El objetivo que se persigue es capturar el CO<sub>2</sub> generado en la industria antes de su emisión a la atmósfera y canalizarlo hacia los fotobiorreactores para cultivar los microorganismos y obtener productos de valor comercial.

- **Fotobiorreactores abiertos**

En esta configuración, los cultivos están en contacto con la atmósfera. El control de parámetros de operación como el pH o la temperatura en este tipo de fotobiorreactores es limitado, por lo que su coste y productividad también son menores. Además, como están abiertos, no se puede asegurar que otros microorganismos no deseados crezcan en el cultivo. Por ello, están recomendados para especies que tengan crecimiento rápido y sean robustas. A pesar de presentar estos inconvenientes son bastante usados y cuentan con la ventaja de ser fáciles y económicos de construir, incluso en grandes volúmenes (Fernández, 2014)

Dentro de esta configuración se encuentran los estanques abiertos (*open ponds*) que son balsas que se llenan con el medio de nutrientes para crecer los microorganismos. Resultan muy económicos pues tienen costes de operación bajos (25\$ m<sup>-2</sup>) a pesar de que la productividad no es tan alta. Son fáciles de ampliar, pues se puede aumentar el número de estanques, ya que cada estanque puede funcionar de manera independiente. Para este tipo de FBR, las microalgas recomendadas para cultivarse son las extremófilas, capaces de sobrevivir a condiciones extremas de temperatura, de pH ácidos y básicos (mayor de 8 y menor de 4), y alta salinidad (hasta 1 M) (Shen et al., 2009). Dentro de los estanques abiertos destacan tres diseños usados en la industria: canales de flujo continuo (*raceways*), estanques circulares y estanques sin agitación.

Los *raceways* se construyen con una profundidad entre 15 y 25 cm y cuentan con una rueda de paletas que aportan agitación y mezcla continua (Fig. 4-a). Pueden ser contruidos como estanques individuales o como grupos de canales y el material de construcción suele ser hormigón o tierra compactada. Usando este tipo de FBR se han reportado unas concentraciones de biomasa de 1 g L<sup>-1</sup> y productividades entre 10 y 25 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (Shen et al., 2009).

Los estanques circulares tienen un diámetro de 45 m y una profundidad entre 30 y 70 cm con un agitador central (Fig- 4-b). Son muy usados en el sudeste de Asia para la producción de caroteno a partir de *Chlorella sp.* registrando productividades de  $15 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (Shen et al., 2009).

Los estanques sin agitación son comúnmente utilizados pues son más económicos comparados con los otros dos diseños (Fig 4-c). Su profundidad normalmente es menos de 50 cm. Solo pueden emplearse para microalgas capaces de crecer en condiciones poco controladas (Shen et al., 2009).

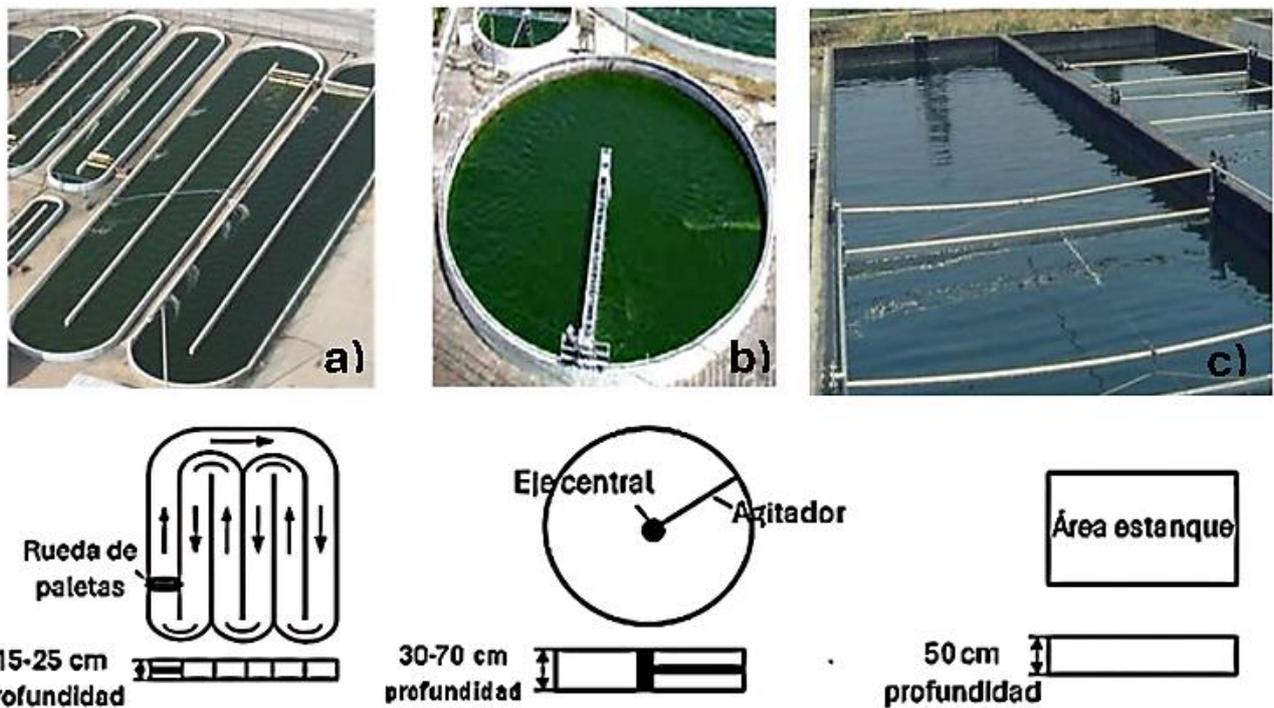


Figura 4. Fotobiorreactores abiertos a) Raceways b) Estanques circulares c) Estanques sin agitación (Y. Shen et al., 2009)

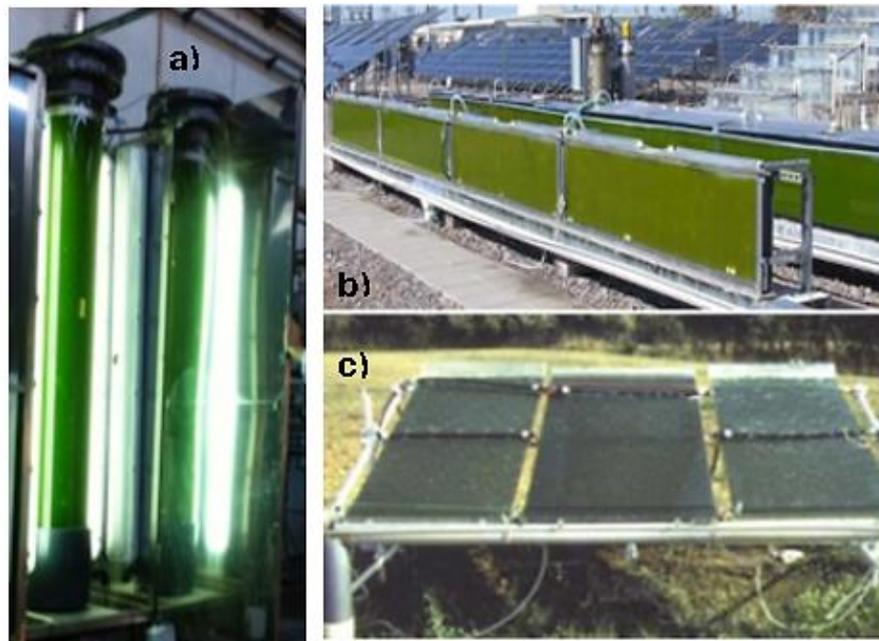
- **Fotobiorreactores cerrados**

Se caracterizan por mantener el cultivo aislado totalmente del exterior. Normalmente, llevan sistemas de agitación, control de pH y suministro de aire. Los FBR cerrados permiten un mayor control de las condiciones operacionales y de la población de microorganismos (Fernández, 2014).

Los FBR cerrados tipo columna cuentan con un sistema de burbujeo para una correcta agitación y mezcla del sistema (Fig. 5-a). Su forma cilíndrica permite una buena

distribución de la luz a todo el caldo de cultivo. Sin embargo, como desventaja presentan la dificultad de su construcción en grandes volúmenes porque un diámetro más grande significaría un área mayor no iluminada, traduciéndose en menor productividad, mientras que más altura supondría estrés hidrodinámico por la alta presión en la base debido al burbujeo (Fernández, 2014).

Por otra parte, los FBR planos intentan resolver los problemas planteados por las columnas, aunque se asemejan a los anteriores en que combinan el intercambio de materia y la agitación en el mismo espacio en el que la luz es recibida. Además, se caracterizan por un paso óptico reducido, pueden ser escalados a longitudes mayores, cuentan con una construcción simple y económica y es posible hacerlos inclinados para orientarlos hacia la luz solar (Fig. 5-b y 5-c) (Y. Shen et al., 2009).

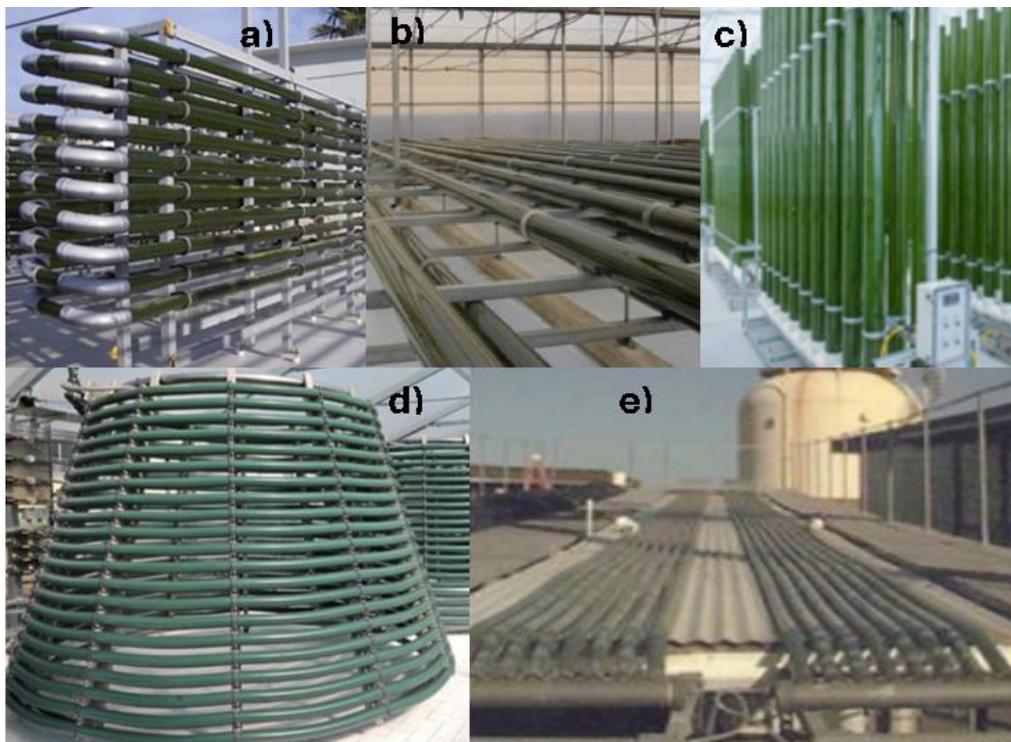


**Figura 5.** Fotobiorreactores cerrados: a) Columnas b) Plano, vertical c) Plano, inclinado (Y. Shen et al., 2009)

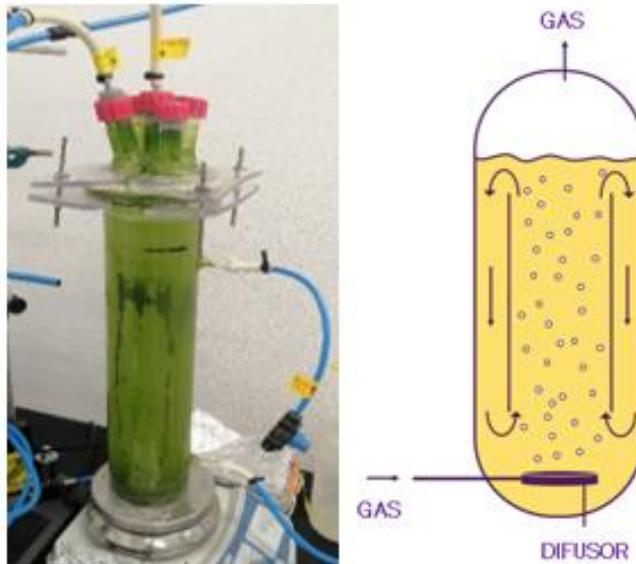
Los FBR tubulares tienen un coste mayor comparados con los anteriores y son los más complejos de construir, sin embargo, son los más usados en los cultivos de microalgas pues permiten mayores productividades y un control mejorado de la transferencia de gas. Su diseño consta de dos partes: el lazo y el desgasificador. El primero es la parte donde se capta la luz solar y consiste en un tubo que aporta una forma compacta a base de uso de codos y curvas. El segundo es la zona donde tiene lugar el intercambio de materia

(eliminación de oxígeno, intercambios de calor, etc.). Este diseño, en el que ambas funciones están separadas, permite una productividad máxima debido a que la eficiencia fotosintética se ve aumentada (Fernández, 2014). Como se puede observar en la figura 6, los tubos pueden adoptar varias configuraciones: recta horizontal, recta vertical, inclinada o helicoidal (Shen et al., 2009).

Los FBR tipo *airlift* (Fig. 7) son una variación de los tubulares y cuentan con dos tubos concéntricos, el cilindro interior canaliza el flujo de aire creando un flujo ascendente mientras que el cilindro exterior crea un espacio para el flujo descendente del líquido, por lo que la transferencia de masa y luz tienen lugar de forma separada. Este sistema de circulación de cultivo por el reactor es más robusto y permite purgar el exceso de oxígeno producido que puede provocar un daño foto-oxidativo a las células de las microalgas. (Rubio Fernández et al., 2013). Para obtener suficiente luz en el centro del FBR, el diámetro de la columna de un FBR tipo *airlift* no debería sobrepasar 0,2 m. Además, por razones estructurales y para reducir las zonas de sombra en los cultivos, la altura del cilindro está limitada a 4 m (Huang et al., 2017).



**Figura 6.** Fotobiorreactores tubulares: a) Recta horizontal b) Horizontal (Fernández, 2014) c) Vertical (Algae, 2024) d) Helicoidal e) Inclinada (Y. Shen et al., 2009)



**Figura 7.** FBR *airlift*. Imagen a la izquierda tomada en el laboratorio del Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid (2024). Imagen a la derecha adaptada de Cultiplly, 2023

### 1.3. PIGMENTOS

Los pigmentos son un material que se utiliza como colorante insoluble en el medio de aplicación y son usados para teñir pinturas, alimentos, tejidos, cosméticos, entre otros (Golka et al., 2004). Los pigmentos se pueden clasificar según la fuente de procedencia en sintéticos y naturales (KingChroma, 2024).

#### 1.3.1. Pigmentos sintéticos

Los pigmentos sintéticos son obtenidos a partir de síntesis química usando una materia prima más sencilla, lo que permite que tengan unos costes de producción menores.

Además, sus colores son brillantes porque los pigmentos sintéticos tienen estructuras químicas más simples y moléculas más pequeñas que los pigmentos naturales, cuyos colores son más suaves. Pueden encontrarse como polvo, pintura o partículas (KingChroma, 2024).

La ftalocianina, la alizarina y los pigmentos azoicos son ejemplos de pigmentos sintéticos, siendo los últimos cancerígenos (Golka et al., 2004) y otros han sido demostrados causantes de daños al ADN en grandes concentraciones. Además, no son biodegradables y durante su proceso de producción se generan aguas residuales peligrosas debido a los químicos tóxicos usados (Olas et al., 2021). Los pigmentos sintéticos pueden ser adecuados para mercados de una gama media y baja (p.ej. industria textil) porque tienen precios bajos, pero la contaminación que generan durante su proceso de producción, así como los riesgos que presentan para la salud hace que se busquen otras alternativas, como son los pigmentos naturales (KingChroma, 2024).

### **1.3.2. Pigmentos naturales**

Los pigmentos naturales son sustancias de color hechas de materiales naturales extraídos de plantas, animales o minerales y pueden ser aplicados en pintura, teñido, colorantes alimentarios, entre otros.

Actualmente, los pigmentos naturales están teniendo una alta demanda en el mercado debido a que, además de sus menores impactos medioambientales, son compuestos bioactivos que tienen beneficios para la salud y presentan propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas por lo que tienen muchas aplicaciones en medicina, alimentación, cosmética o farmacia, entre otros (Pailliè-Jiménez et al., 2020; KingChroma, 2024).

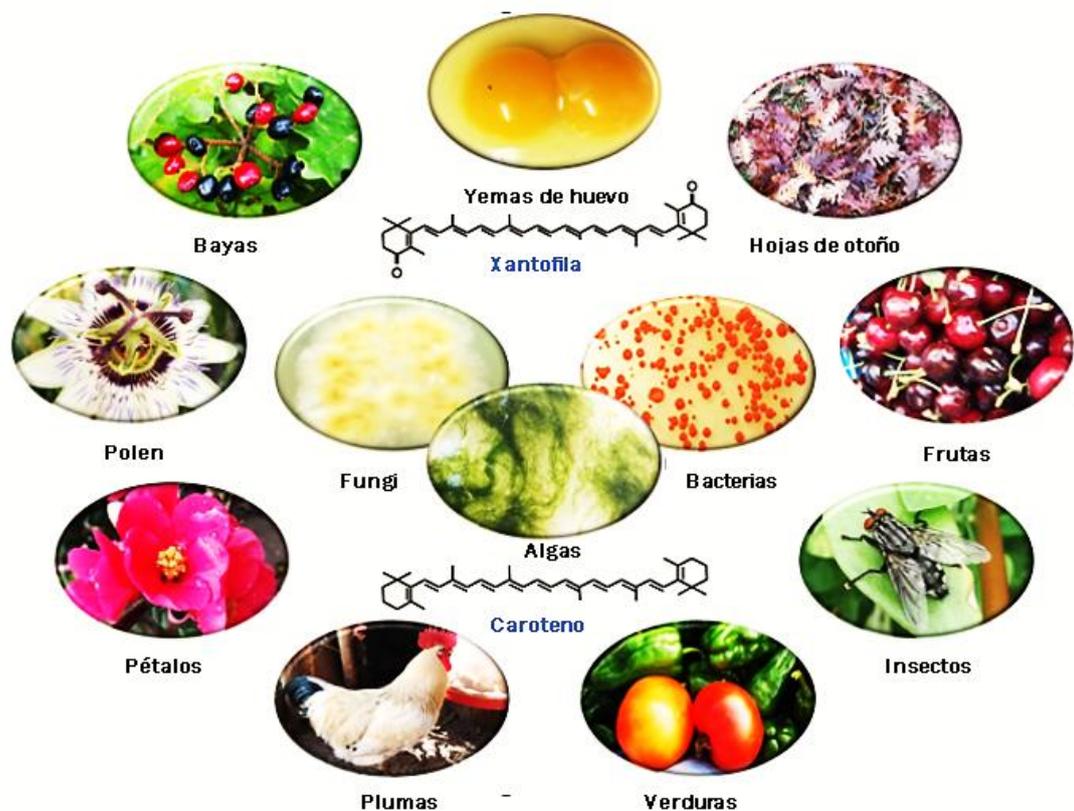
En este sentido, la producción de pigmentos a partir de microorganismos fotosintéticos (microalgas, cianobacterias, bacterias) puede competir con los tintes sintéticos reduciendo así la contaminación y los riesgos que éstos suponen (Mihai Grumezescu & Maria Holban, 2018; Novoveská et al., 2019). Especies como *Nostoc*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Spirulina*, entre otras son capaces de producir varios grupos de pigmentos, como carotenoides, clorofilas y ficobiliproteínas (Yusuf et al., 2017).

#### **1.3.2.1. Carotenoides**

Los carotenoides son pigmentos naturales que se encuentran en plantas, y microorganismos, como las cianobacterias y microalgas y son los responsables de los colores en ellos (Fig. 8) (Martínez-Cámara et al., 2021). Los carotenoides son compuestos lipófilos insolubles en agua con una cadena larga central de polieno con dobles enlaces

conjugados y presentan una absorbancia máxima en un rango de longitudes de onda entre 400 y 500 nm (color amarillo-naranja) (Martínez-Cámara et al., 2021).

Los carotenoides naturales son interesantes para el mercado debido a que tienen propiedades antioxidantes y promotoras de la salud además de no ser tóxicos, por lo que pueden tener aplicaciones en salud, alimentos y cosmética (Martínez-Cámara et al., 2021). Por ejemplo, los carotenoides como los carotenos se pueden utilizar como pigmentos colorantes alimentarios seguros (Novoveská et al., 2019).



**Figura 8.** Ejemplos de diferentes estructuras coloreadas de la naturaleza en las que se encuentran los carotenoides. La figura central representa los productores naturales de carotenoides (algas, bacterias, etc.) (Martínez-Cámara et al., 2021)

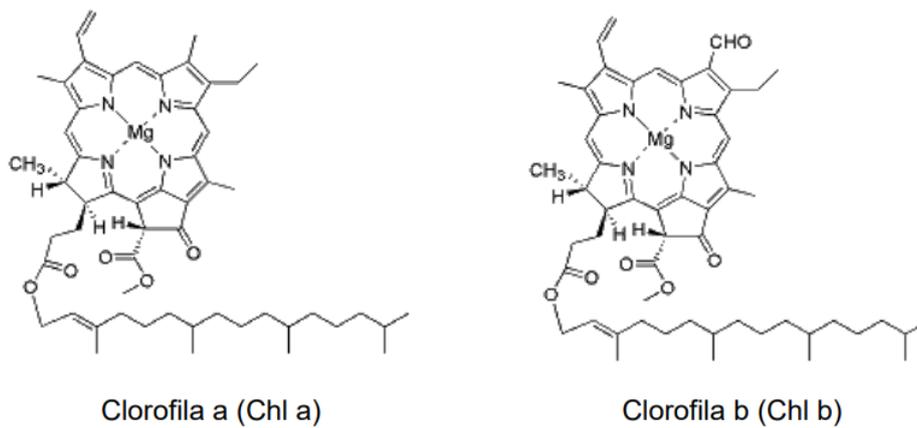
Los carotenoides pueden dividirse en dos grandes grupos según su estructura química: carotenos, que son hidrocarburos, y xantofilas, que contienen átomos de oxígeno que puede estar presente como grupos hidroxilo, metoxilo, carbonilo o carboxilo (Meléndez-Martínez, 2007).

La metodología más empleada para la extracción de pigmentos a partir de la biomasa es el uso de disolventes orgánicos, teniendo en cuenta la solubilidad de la molécula. Se emplean disolventes poco polares si se desea extraer los carotenos, y polares si se van a extraer las xantofilas. La selección del solvente adecuado es una fase importante pues influye en la eficacia de extracción (Meléndez Martínez, 2017).

#### **1.3.2.2. Clorofilas**

Las clorofilas son unos pigmentos naturales caracterizados por su color verde que se pueden encontrar en todos los organismos eucariotas que tengan cloroplastos (las plantas y algas) o algunos procariotas que no cuentan con cloroplastos (cianobacterias, bacterias púrpuras). Son biomoléculas que tienen una importante función en la fotosíntesis pues son las encargadas de absorber la energía de la luz solar y de mantener controladas las funciones metabólicas del organismo (Scheer, 2006). Estructuralmente, las clorofilas están formadas por dos partes, un anillo tetrapirrólico con un átomo de magnesio, y una cadena larga hidrófoba de un alcohol terpenoide (Taniguchi M, 2017). Dependiendo de la estructura química diferenciada por los sustituyentes de los grupos funcionales del anillo, se encuentran dentro de estos pigmentos varios grupos de clorofilas (Fig. 9), como las *clorofilas a*, las más abundantes (grupo metilo en posición 7, grupo vinilo en posición 3), *clorofilas b* (grupo formilo en posición 7), de la que carecen muchas cianobacterias, *clorofilas c*, *clorofilas d* (grupo formilo en posición 3), *clorofilas e* y *f* (Scheer, 2006). Presentan espectros de absorción con picos en el rango de longitudes de onda de 600 a 700 nm (Taniguchi M, 2017).

Ha sido demostrado que la clorofila tiene propiedades nutricionales, antioxidantes, antiinflamatorias, profilácticas y antiagregantes, y reduce el riesgo de cáncer por lo que es de interés para las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias (Hugo Scheer, 2006).



**Figura 9.** Representación de la estructura de clorofila a y clorofila b (Streit et al., 2015)

La mayoría de las microalgas y otros organismos fotosintéticos son capaces de producir la clorofila por dos vías, en condiciones de luz y de oscuridad. Su biosíntesis es un proceso complejo que involucra muchas reacciones enzimáticas y reducciones estereoespecíficas de la protoclorofila (precursor del pigmento) a clorofila, como ocurre para la *Chlorella* (da Silva, 2020). De la misma manera que para los carotenoides, la extracción de clorofilas de los microorganismos fotosintéticos también se realiza con disolventes orgánicos, como el metanol, junto a un método de ruptura celular para liberar el pigmento (Meléndez Martínez, 2017).

### 1.3.2.3. Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas son un grupo de proteínas coloreadas y solubles en el agua. Se encuentran en cianobacterias y en algunas microalgas. En la fotosíntesis tienen la función de captar la energía de la luz solar para transferirla a la clorofila (Sekar & Chandramohan, 2008).

Están formadas por dos tipos de monómeros ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de igual proporción. Dependiendo de su estructura y sus máximos de absorción de longitud de onda, existen cuatro tipos principales: aloficocianina (color verde azulado, pico absorción para 650-655 nm), ficocianina (C-FC, color azul, máx. de absorción para 610-625 nm), ficoeritrocianina (color naranja, máximo de absorción en 560-600 nm) y ficoeritrina (color púrpura, máximo de

absorción en 490-570 nm). La ficocianina es la ficobiliproteína que más abunda en las cianobacterias (Pagels et al., 2019).

La investigación sobre la obtención de ficobiliproteínas ha ganado mucho interés pues éstas presentan propiedades bioactivas ya que son antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas, antiinflamatorias, entre otras más, por lo que tienen un valor alto (Wildman & Bowen, 1974). Uno de los métodos para llevar a cabo la extracción de ficobiliproteínas es la extracción osmótica química conseguida al añadir un disolvente (p. ej. tampón de fosfato) a la biomasa de manera que se favorezca su solubilización. Sin embargo, puede ser un proceso complicado debido a la resistencia de la pared celular y el pequeño tamaño de los organismos. Para aumentar la solubilidad se puede someter a cambios de temperatura, ultra sonicación o sistemas de alta presión (Yunting Wu & Zhang, 2017).

En particular, la ficocianina es la que más interés recibe de este grupo de pigmentos. Es un pigmento fotosintético accesorio caracterizado por su color azul brillante. La ficocianina puede encontrarse en cuatro diferentes formas estructurales, monomérica, trimérica, hexamérica y decamérica, y la cantidad de cada una depende de la temperatura, pH, y otros factores (Romay et al., 1998). La ficocianina puede tener muchas aplicaciones dentro de la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, especialmente, ha recibido interés su uso como colorante pues es biodegradable y no tóxica. Se ha estado usando en alimentos como chicles, dulces, cosméticos como labiales y también sirven como marcadores fluorescentes. Cuenta con las mismas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que las otras de su grupo (Yunting Wu & Zhang, 2017).

La ficocianina de pureza baja tiene un valor aproximado de 0,13 \$ por miligramo, mientras que, si es de alta pureza, alcanza 15 \$ por miligramo (Benavides & Rito-Palomares, 2005). La metodología de extracción consiste en someter la biomasa recuperada a una extracción osmótica química añadiendo un disolvente como un tampón de fosfatos, aumentando así la solubilidad del pigmento y, después, a ciclos de congelación-descongelación de manera que se forman cristales de hielo que al fusionar se provocan una expansión celular y, por tanto, una ruptura de la pared celular permitiendo que la membrana sea permeable y las ficocianinas se liberen de las células (D'Hondt et al., 2017).

Cabe destacar que tanto las ficocianinas como los carotenoides y clorofilas presentan poca estabilidad si se exponen a la luz por lo que, durante los procesos de extracción, con objetivo de preservar las propiedades de los pigmentos y mantener su estabilidad, se mantienen en oscuridad (Yunting Wu & Zhang, 2017).

## 1.4. MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS PARA LA BIOCONVERSIÓN DE CO<sub>2</sub> EN PIGMENTOS NATURALES

### 1.4.1. Microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos eucariotas o procariotas, que pueden ser unicelulares o multicelulares y comprenden una gran diversidad de especies que son capaces de convivir en aguas dulces y marinas u otros ecosistemas como los desiertos, rocas y nieve, entre otros, debido a que han desarrollado una gran adaptación. Gracias a su estructura, son capaces de fijar el CO<sub>2</sub> a través de la fotosíntesis, pudiendo dar soluciones a los problemas de contaminación que este gas genera (Aslam et al., 2019).

Varios factores bióticos y abióticos influyen en el crecimiento de microalgas, como el pH, la temperatura, la luz, la fuente de carbono, el medio y su composición. Dependiendo de estas condiciones, los subproductos que puedan producirse a partir de la biomasa pueden variar en calidad y cantidad (Aslam et al., 2019).

Además, la biomasa de microalgas es rica en lípidos, carbohidratos y proteínas que pueden ser convertidos a bioproductos de alto valor comercial como la producción de biocombustibles, aditivos para la mejora de valor nutricional de piensos y alimentos, producción de pigmentos naturales, síntesis de vitaminas, productos cosméticos y farmacéuticos, etc. (Marques et al., 2013).

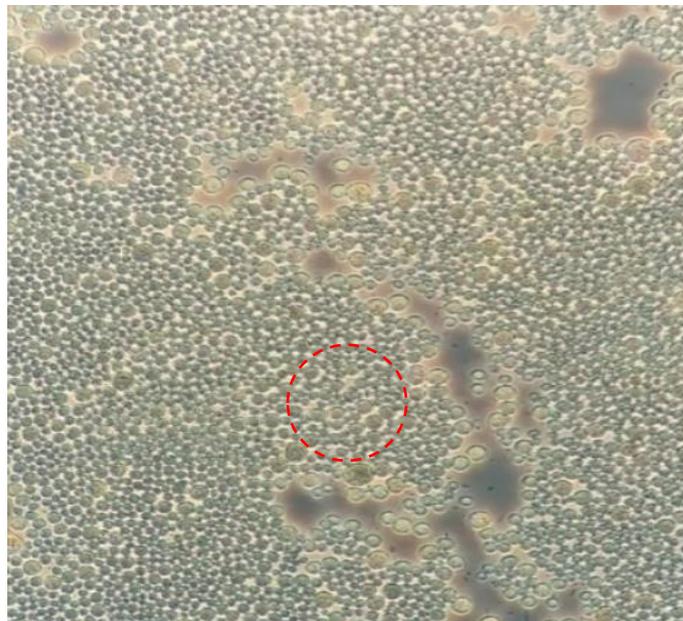
#### 1.4.1.1. *Chlorella* sp.

*Chlorella* es una microalga verde unicelular que pertenece a la división *Chlorophyta* o algas verdes y a la clase *Chlorophyceae*. Se trata de microorganismos unicelulares que tienen un tamaño de 2-12 µm con una forma elipsoidal o esférica y que son capaces de crecer

tanto en aguas dulces como marinas, pues se adaptan a muchos tipos de ecosistemas y diferentes condiciones ambientales (Infante et al., 2011; Safafar et al., 2016).

Una característica importante de esta microalga es la fuerte pared celular externa que posee y que le sirve de protección frente a agentes externos. Tienen un ciclo de vida simple y su reproducción es asexual, cada célula madre madura produce de 4 a 8 esporas (ALGATEX, 2024). Ha sido demostrado que esta cepa puede tener una cinética de crecimiento lineal bajo condiciones autótrofas y heterótrofas en presencia de aire con temperaturas moderadas, entre 20 y 30 °C (Infante et al., 2011).

Se han realizado varios estudios respecto a la producción de su biomasa y el alto contenido de bioproductos que esta especie de microalga puede aportar, tales como lípidos (Otsuki et al., 2015), así como su uso como biofertilizante (Silveira-Font Yadira et al., 2018). *Chlorella* es una de las microalgas que más cantidad de clorofila contiene, tanto clorofila a como b y también es rica en carotenoides, especialmente la luteína, cuyo contenido puede llegar a concentraciones de 7 mg por gramo de peso celular seco (Kulkarni & Nikolov, 2018; Safafar et al., 2016).

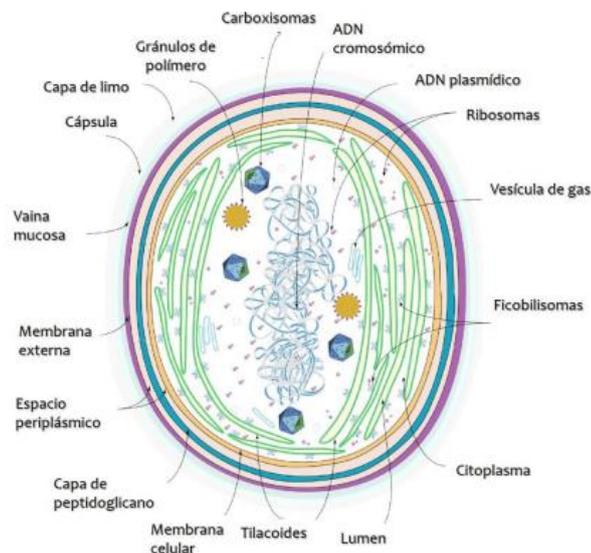


**Figura 10.** Consorcio de microalgas con especie dominante *Chlorella sp* observada en microscopio, amplificada 100x. Crecimiento con medio ES modificado en FBR con intensidad de luz  $\approx 110 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  y temperatura 22 °C. Imagen tomada en el laboratorio del Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid (2024).

### 1.4.2. Cianobacterias

Las cianobacterias son el grupo de microorganismos fotosintéticos más antiguo conocido y se refiere a procariotas Gram-negativos. Originalmente, se encontraban dentro del grupo de microalgas, pero, más tarde, se las clasificó dentro del dominio de bacterias debido a su mayor parecido a ese reino, pues sus estructuras son similares. Sin embargo, la característica que la diferencia del resto de bacterias es su contenido de *clorofila a, b, c y d*, así como el glucógeno y otros compuestos (Noreña-Caro & Benton, 2018a).

Se trata de microorganismos que tienen células muy largas, pero con un diámetro de unos pocos micrómetros. Al ser procariotas, sus células carecen de núcleo y la información genética está libre en el citoplasma celular. Cuentan con morfologías muy diversas que incluyen filamentos uniseriados, multiseriados, ramificados o no e incluso agregados coloniales (Noreña-Caro & Benton, 2018a). Son capaces de crecer en aguas marinas, dulces, en suelos húmedos, rocas, arroyos y algunas soportan condiciones extremas (Lee, 2008).



**Figura 11.** Estructura celular en las cianobacterias (Noreña-Caro & Benton, 2018b)

Sus células se rodean de una cápsula formada por proteínas y carbohidratos que protegen a la cianobacteria de desecación y su citoplasma está compuesto por estructuras como los carboxisomas que se encargan de contener a la enzima ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa (RuBisCO, ver apartado 1.2.2.1.) que tiene la función de catalizar la fijación

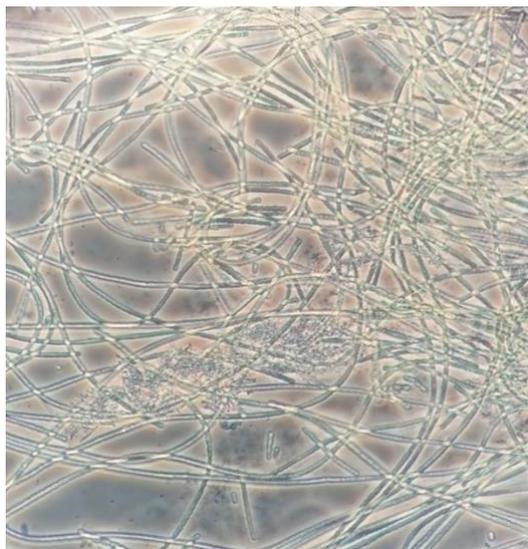
del dióxido de carbono por el ciclo CBB durante la fotosíntesis (Fig.11) (Lee, 2008). Muchas otras cianobacterias son capaces de fijar también el nitrógeno atmosférico (Jacobsen & Frigaard, 2014).

Además, las cianobacterias pueden sintetizar más de 1000 metabolitos secundarios por lo que tienen una gran versatilidad ya que pueden ser usadas en muchas aplicaciones biotecnológicas como la producción de compuestos bioactivos (proteínas, ácidos grasos, polisacáridos) empleados en industrias farmacéuticas y alimentarias (Ángeles et al., 2021).

#### **1.4.2.1. *Nostoc Muscorum***

*Nostoc Muscorum* es una cianobacteria filamentosa capaz de crecer en varios tipos de ecosistemas terrestres y agua dulce. Sus filamentos se componen de células esféricas de color verde y presentan estructuras especializadas llamadas heterocistes que son las que le permiten fijar el nitrógeno atmosférico y convertirlo a otros compuestos (como el amonio) (Zúñiga Vega, 2022).

La cianobacteria *Nostoc* puede ser empleada en aplicaciones farmacéuticas, médicas y en la nutrición humana, pues es capaz de sintetizar sustancias antivirales que actúan contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como antibióticos capaces de controlar la criptococosis (infección fúngica que puede afectar a pacientes de SIDA). También puede ser aplicada como biofertilizante en varios cultivos pues, como se ha comentado antes, puede ayudar en la fijación del nitrógeno, mejorando el crecimiento de plantas. Por otra parte, puede sintetizar ácidos grasos insaturados de interés en industria farmacéutica y polímeros (p.ej. el termoplástico polihidroxibutirato) que se emplean en aplicaciones clínicas e industriales (Ortiz-Moreno et al., 2020).



**Figura 12.** *Nostoc Muscorum* observada en microscopio, amplificada 100x. Crecimiento con medio M-IC (Ver apartado 3.1.2) en FBR con intensidad de luz  $\approx 110 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y temperatura de 22 °C. Imagen tomada en el laboratorio del Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid (2024).

### 1.4.3. Nutrientes y medio de cultivo

Las microalgas y las cianobacterias no presentan requisitos nutritivos complicados. Dependiendo de la cantidad necesaria, es posible clasificar a los nutrientes esenciales en dos grupos: macro y micronutrientes. Los macronutrientes son moléculas como el carbono, nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio, azufre y potasio. Los micronutrientes son aquellos que se necesitan en menor cantidad pero que tienen un papel importante para el crecimiento del cultivo, como el manganeso, cobre, hierro, cobalto y molibdeno (Abalde, 1995).

El carbono es un nutriente con gran importancia porque supone el 50 % de la biomasa y puede ser aplicado de dos maneras al medio, como orgánico o inorgánico. Se considera un cultivo fotoautótrofico si el carbono proviene de una fuente inorgánica (p.ej. como  $\text{CO}_2$  o carbonatos) mientras que se considera heterótrofico si se trata de carbono orgánico y mixotrófico cuando la energía procede de la fotosíntesis y del carbono orgánico (Abalde, 1995). Por otra parte, el nitrógeno es un componente que puede suministrarse en forma inorgánico u orgánica (p.ej. urea). Por lo general se emplea N inorgánico, por ejemplo, nitritos y nitratos, ya que las fuentes orgánicas provocan un exceso de acidificación del medio. Otros nutrientes, como el fósforo, tienen un papel importante en la transferencia de energía, mientras que otros, como el magnesio, se encuentran en la clorofila e influye

en la fotosíntesis. Además de estos nutrientes, las cepas pueden presentar unos requisitos nutritivos específicos (Abalde, 1995).

## 2. OBJETIVOS

Este trabajo de fin de grado se enfoca en el desarrollo de un bioproceso fotosintético sostenible con el objetivo de capturar el CO<sub>2</sub>, uno de los principales gases de efecto invernadero, usando una tecnología basada en la fijación del CO<sub>2</sub> por consorcios de microalgas para la síntesis de productos de valor agregado como son los pigmentos naturales (carotenoides, clorofilas y ficocianinas).

Así, el trabajo tiene como objetivo principal la evaluación de un proceso biológico a escala laboratorio para la captura de CO<sub>2</sub> en un FBR tipo *airlift* por un consorcio de microalgas, y la valorización de la biomasa de microalgas producida en pigmentos naturales. Como objetivos específicos se definen los siguientes:

- Evaluación del efecto de dos tipos de luz (blanca cálida y azul) sobre el crecimiento, la composición de pigmentos y el desempeño fotosintético analizando la fijación del CO<sub>2</sub> del consorcio de microalgas.
- Optimización de la extracción de carotenoides, clorofilas y ficocianinas.
- Plantear una aplicación industrial real de la captura y bioconversión de CO<sub>2</sub> a pigmentos naturales.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo usado durante la experimentación en el FBR tipo *airlift* fue Erddekot + Salze (ES) modificado (SAG, 2007), el cual previamente fue esterilizado. La composición del medio se detalla en la tabla 3.1, y la de la solución de micronutrientes se describe en la tabla 3.2. El pH fue ajustado a 7,5 usando una disolución de NaOH 6M. Todos los reactivos se obtuvieron de Panreac ® con una pureza de, al menos, 99%.

**Tabla 3.1.** Composición del medio ES modificado

	<b>Composición (g L<sup>-1</sup>)</b>
KNO <sub>3</sub>	1,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,02
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5,05
NaHCO <sub>3</sub>	10
Disolución de micronutrientes	5 (mL L <sup>-1</sup> )

**Tabla 3.2.** Composición de la disolución de micronutrientes

	<b>Composición (g L<sup>-1</sup>)</b>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,001 g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,002 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,001 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,001 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,000005 g

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,7 g
EDTA (Titriplex III, Merck)	0,8 g

### 3.2. PREPARACIÓN DEL INOCULO

La cianobacteria *N. muscorum* (1453-12b) fue obtenida de la colección de cultivos de algas (SAG) de la Universidad de Göttingen, Alemania. Primero, el inóculo de *N. muscorum* se cultivó en 100 mL de medio líquido ES modificado reemplazando la fuente de carbono inorgánica por una fuente de carbono orgánica (extracto de carne, 0,1 % v/v) en matraces Erlenmeyer a una intensidad de luz de  $308,65 \pm 12,86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Posteriormente, cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial fue resuspendido en una botella de vidrio de 2,2 L cerrada con tapón de caucho de butilo y sellos de aluminio y, a cada una, se le añadieron 250 mL de medio ES modificado. El espacio de cabeza de las botellas contenía aire (0,04% CO<sub>2</sub>). Dichas botellas se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm, en ciclos de luz y oscuridad (12:12 h) con intensidad de luz promedio de  $50,40 \pm 6,65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una temperatura de  $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Finalmente, cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial fue usado como inóculo del FBR.

### 3.3. CONFIGURACIÓN EXPERIMENTAL

#### 3.3.1. Sistema experimental

Se empleó un FBR tipo *airlift* (Fig. 13) situado en el laboratorio del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid.

El volumen total del FBR era de 2,5 L y el volumen trabajo de 2,2 L. El tubo interior tenía un diámetro de 0,05 m y una altura de 0,31 m, mientras que el diámetro y altura del cilindro exterior era de 0,09 m y 0,40 m, respectivamente. En la parte inferior del tubo interno se colocó un difusor metálico poroso, con un diámetro medio de poro de 2  $\mu\text{m}$  para promover la distribución de gas. En este tipo de FBR, la agitación mecánica se sustituye por la aireación, sin embargo, para evitar la adherencia de biomasa a las paredes, se disponía de agitación adicional mediante un imán y una placa agitadora (Agimatic, Selecta P, España) colocada bajo el FBR.

El sistema constaba de dos fases, una líquida y una gaseosa. Para la primera fase, se disponía de una entrada de medio ES modificado en la parte superior del reactor. El medio se almacenaba en condiciones estériles en un recipiente de 1 L tapado con un septum perforado y conectado al reactor mediante una tubería y una bomba peristáltica (Watson Marlow 323U). Además, se disponía de una salida por la parte inferior conectada a otro recipiente de 1 L para la recogida de biomasa. Ambas conexiones estaban controladas por válvulas manuales. Para la fase gaseosa, se disponía de un compresor que aportaba el aire atmosférico ( $\sim 0,04\% \text{ CO}_2$ ) al sistema, conectado a un rotámetro para controlar el flujo entrante que se mantuvo constante durante toda la operación a  $1 \text{ L min}^{-1}$ . La salida del aire tratado estaba colocada en la zona superior del reactor, conectada al sistema de extracción del laboratorio.

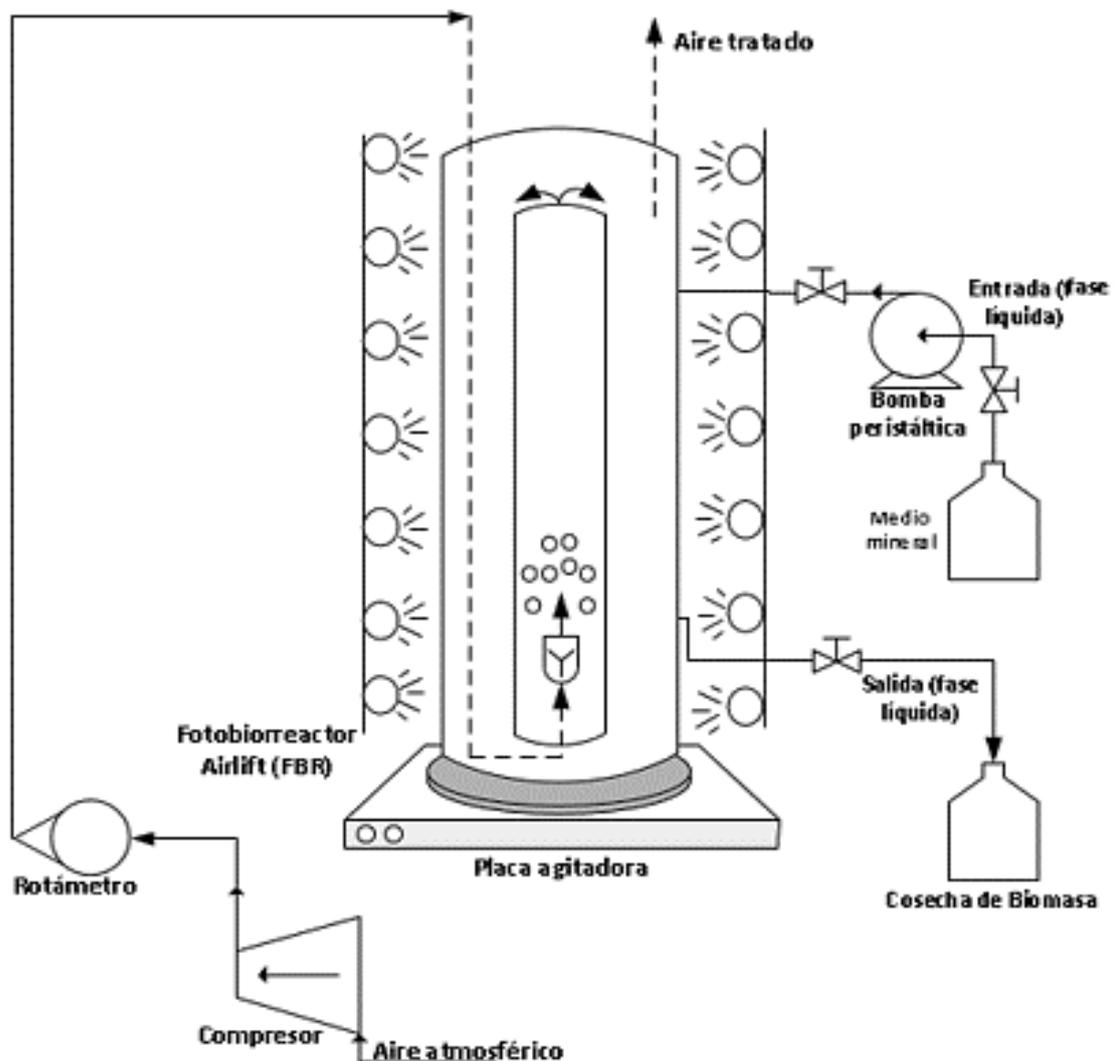


Figura 13. Representación esquemática de la configuración experimental

El tiempo de retención hidráulico promedio del FBR fue de  $16,0 \pm 6,4$  días. El FBR se iluminó en ciclos de luz y oscuridad (12:12 h) con luces LED dispuestas concéntricamente de color blanco cálidas desde el día 0 al 38 de operación a una intensidad de luz de  $110,52 \pm 2,20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y, posteriormente, con luces azules desde el día 38 al 53 de operación, con una intensidad de luz promedio de  $76,20 \pm 2,36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 3.3.2. Prueba abiótica

Se realizó una prueba abiótica con medio ES modificado antes de inocular el FBR para comprobar la hermeticidad del sistema, posibles pérdidas de nutrientes debido a condiciones ambientales y fisicoquímicas, la existencia del crecimiento de microorganismos y la influencia de los cambios de temperatura y pH en la operación del FBR. Errores en la configuración del sistema, por ejemplo, fugas en la línea de conexión del compresor-reactor, fueron resueltos antes de inocular el fotobiorreactor.

Durante 10 días, se mantuvo el sistema con medio mineral a una temperatura promedio de  $19,3 \pm 3,0$  °C y una intensidad de luz promedio de  $142,40 \pm 58,30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con luces LED blancas. Los días 0, 5 y 10 de operación de la prueba abiótica se realizaron análisis de pH, carbono orgánico total (COT) y carbono inorgánico (CI), nitrógeno total (NT) y presencia de los aniones de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), así como medición de intensidad de luz.

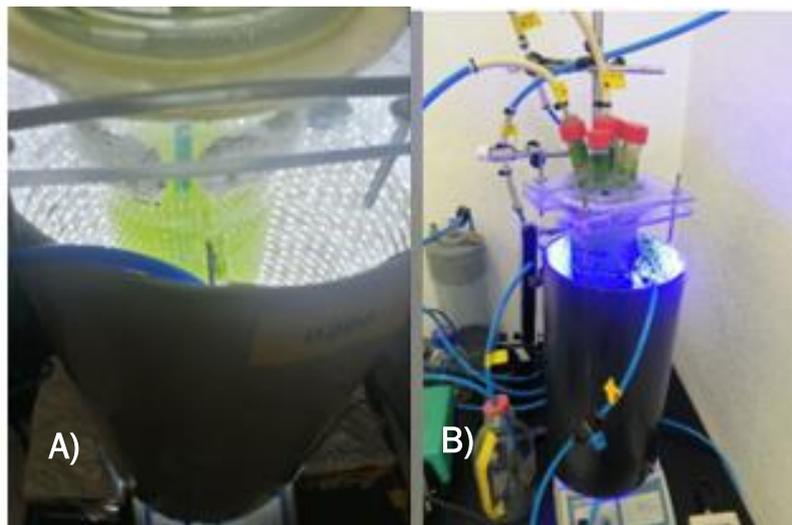


**Figura 14.** Sistema Fotobiorreactor (FBR) tipo airlift en el laboratorio del Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid durante la prueba abiótica

### 3.3.3. Estrategia experimental

La operación en el FBR tuvo una duración de 53 días. El primer día se llevó a cabo la inoculación del FBR con la cianobacteria *N. Muscorum*. Para ello, se prepararon 2,2 L de medio ES modificado que contenía 1987 mg Cl L<sup>-1</sup>. A partir del día 9 se realizó el intercambio diario de 0,15 L de caldo de cultivo, reemplazándolo por medio ES modificado.

Con el objetivo de optimizar la producción de pigmentos fotosintéticos, se estudiaron dos fases de iluminación: la primera fue desde el día 0 al día 38, donde el FBR se operó con luces LED color blanco cálido con una longitud de onda entre 400 y 700 nm a una intensidad promedio de  $110,52 \pm 2,20 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ; y la segunda fase desde el día 38 hasta el día 53 cuando se operó con luces azules (450 - 495 nm) a una intensidad promedio de  $76,20 \pm 2,36 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ .



**Figura 15.** A) FBR con panel cilíndrico de luz LED blanca cálida, B) FBR con panel cilíndrico de luz LED azul.

### 3.3.4. Muestreo

Tres veces a la semana, se tomaban muestras para analizar sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV), para la cuantificación de pigmentos, COT y CI, NT y concentración de Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> y PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>. Por otra parte, cinco veces a la semana, se realizaban medidas de oxígeno disuelto (OD), temperatura de reactor y ambiente, pH y actividad fotosintética (Fv/Fm). Además, una vez por semana, se medía la intensidad de la luz y se

tomaba una muestra para realizar una observación al microscopio y comprobar el estado de los microorganismos.

## 3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 3.4.1. Valorización de biomasa

#### 3.4.1.1. Medición de sólidos suspendidos totales y volátiles

La concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de SST y SSV fue medida empleando filtros de microfibras de vidrio Whatman®. Para ello, 25 mL de la muestra del caldo de cultivo fueron filtrados y secados en la estufa a una temperatura de 105 °C durante 24 horas, y colocados en un desecador durante 30 minutos, de manera que se eliminara toda la humedad para determinar los SST. A continuación, los filtros fueron introducidos, primero, en la mufla a 550 °C durante 45 minutos y, después, en el horno a 105 °C durante 30 minutos. Finalmente, se colocaron en el desecador durante 30 minutos y se pesaron.

Para el cálculo de SST y SSV se emplean las siguientes ecuaciones:

$$\text{SST (g L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Peso de filtro a 105}^{\circ}\text{C (g)} - \text{Peso filtro (g)}}{\text{Volumen filtrado (L)}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{SSV (g L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Peso de filtro a 105}^{\circ}\text{C (g)} - \text{Peso filtro a 550}^{\circ}\text{C (g)}}{\text{Volumen filtrado (L)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

#### 3.4.1.2. Pigmentos fotosintéticos

##### 3.4.1.2.1. Carotenoides totales

La extracción de carotenoides totales de la biomasa húmeda se realizó adaptando el método del solvente orgánico, empleando una disolución de acetona-metanol 7:2 v/v (Afonso Vicente Patriarca, 2023).

Para adecuar el método analítico, se empleó caldo de cultivo de un consorcio de microalgas proveniente de un fotobiorreactor abierto tipo HRAP (High Rate Algae Pond), que contenía una concentración de biomasa de  $5 \text{ g L}^{-1}$ . Se llevó a cabo la prueba con tres volúmenes diferentes del caldo de cultivo de manera que el contenido de biomasa fuera de 0,0075, 0,005 y 0,0025 g. Los tubos eppendorf se centrifugaron a  $10500 \text{ g} \times$  por 5

minutos (Spectrafuge 24D, Labnet International, EEUU) y se descartó el sobrenadante usando una jeringa y aguja evitando la pérdida de la biomasa. A continuación, en una campana extractora, se añadieron 1,5 mL de solución de acetona (77% v/v) y metanol (22,22 % v/v), se cubrieron los tubos eppendorf con aluminio y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en oscuridad.

Tras ello, fueron centrifugados bajo las mismas condiciones anteriores y se midieron las absorbancias para un rango de longitudes de onda de 190 a 900 nm usando un espectrofotómetro UV - Vis 2550 (Shimadzu, Japón). Para ello, se hizo uso de cubetas de cuarzo (Hellma Analytics, QS - 10 mm) que se lavaron con acetona entre cada medición. En una de las cubetas, se colocó como blanco una disolución de acetona-metanol 7:2 v/v y en la otra, se iba colocando la muestra a analizar.

Para convertir el valor de absorbancia en gramos de pigmentos se empleó la ecuación de Lamber-Beer (ecuación 3), donde  $c$  es la cantidad de pigmento (g),  $\epsilon$  es el coeficiente de absorción molar en  $\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $l$  es el camino óptico en cm y  $A$  es la absorbancia.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad \text{Ecuación 3}$$

Para el cálculo de los carotenoides totales (TC) en gramos de pigmentos por gramos de biomasa ( $\text{g gdcw}^{-1}$ ), se empleó la ecuación 4, donde  $A_{450}$  es la absorbancia a 450 nm, teniendo en cuenta que  $l$  es 1cm y  $\epsilon$  tiene un valor de  $163,9 \text{ g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Los SSV fueron usados como aproximación de  $dcw$  (Liaaen-Jensen & Jensen, 1971).

$$\text{TC (g gdcw}^{-1}\text{)} = \frac{A_{450 \text{ nm}}}{163,9 \text{ g}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \cdot \frac{1}{dcw \text{ (g)}} \quad \text{Ecuación 4}$$

De acuerdo con los resultados obtenidos, se decidió realizar la extracción de carotenoides totales con 1,5 mL de caldo de cultivo proveniente del FBR. Todos los análisis se llevaron a cabo en triplicado.

### 3.4.1.2.2. Clorofilas totales

Para determinar las condiciones apropiadas de extracción de clorofilas totales se adaptó un método de solvente orgánico empleando una disolución de metanol 90 % v/v (Toledo-Cervantes et al., 2013; Koli & Kumar, 2018a).

Para ello, se recolectaron 1,5 mL de caldo de cultivo en un tubo eppendorf, se centrifugaron a 10500 g × 5 minutos (Spectrafuge 24D, Labnet International, EEUU) y se descartó el sobrenadante, empleando una jeringa y aguja, cuidadosamente, evitando perder la biomasa. En una campana extractora, con las luces apagadas, se añadió 1 mL de una disolución de metanol al 90 % v/v sobre el pellet restante en el tubo, que se cubrió con aluminio previamente. A continuación, se vertió la mezcla en tubos cubiertos con aluminio, añadiendo 4 mL de la disolución de metanol al 90 % v/v. Se colocaron los tubos en una gradilla y se llevaron a un equipo de sonicación (Bandelin Sonorex Digitec DT 102 H, Alemania) a 60 °C durante 15, 30, 45 y 60 minutos, respectivamente. Estas condiciones se analizaron en triplicado. Finalizada la extracción, 1,5 mL fueron recogidos de cada tubo y llevados a eppendorfs que se centrifugaron bajo las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante se recuperó en cubetas de cuarzo (Hellma Analytics, QS - 10 mm) y se analizaron las muestras en el espectrofotómetro UV - Vis 2550 (Shimadzu, Japón) para un rango de longitudes de onda de 190 a 900 nm. Como blanco se usó la disolución de metanol al 90 % v/v. Para convertir el valor de absorbancia a concentración de clorofilas en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  se empleó la ecuación 5 (Koli & Kumar, 2018b), donde  $A_{650}$ ,  $A_{665}$ ,  $A_{750}$  son las absorbancias a 650, 665 y 750 nm, respectivamente.

$$C (\mu\text{g mL}^{-1}) = 16,5 \cdot (A_{665} - A_{750}) - 8,3 \cdot (A_{650} - A_{750}) \quad \text{Ecuación 5}$$

Cabe destacar que cuando la lectura de absorbancia a 750 nm es mayor a 0,01 se recomienda volver a centrifugar la muestra y analizarla de nuevo en el espectrofotómetro.

Para el cálculo de la concentración de clorofilas en gramos de pigmento por gramos de biomasa ( $\text{g gdcw}^{-1}$ ), se empleó la ecuación 6, aproximando  $\text{dcw} \approx \text{SSV}$  y donde V es el volumen total que toma el valor de 5 mL.

$$C (\text{g gdcw}^{-1}) = \frac{C (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot V(\text{mL})\cdot 10^{-6}}{\text{dcw (g)}} \quad \text{Ecuación 6}$$

De acuerdo con los resultados obtenidos, se decidió realizar la extracción de clorofilas totales usando un tiempo de 60 minutos en el equipo de sonicación. Todos los análisis se llevaron a cabo en triplicado.

### 3.4.1.2.3. Ficocianinas totales (C-FCs)

Para determinar la presencia de C-FCs totales en la biomasa se comenzó primero con una prueba para optimizar la técnica de análisis. En primer lugar, para la extracción, se preparó una disolución buffer de 250 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a un pH final de 8. Haciendo uso de la ecuación de Henderson – Hasselbach (ecuación 7), se calculó la cantidad necesaria de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  necesarios para conseguir el pH deseado. El valor de pKa de la forma ácida es igual a 6,8. Se establece conocida la concentración de uno de los dos compuestos, por ejemplo,  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,1 \text{ M}$  y se calcula la del otro.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{HPO}_4^{-2}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \quad \text{Ecuación 7}$$

Para la realización de la prueba, se empleó biomasa de *N. Muscorum* cultivada en medio ES modificado.

En tubos eppendorf, cubiertos con aluminio previamente, se añadió 1 mL de caldo de cultivo proveniente del FBR, se centrifugaron a  $10500 \text{ g} \times 5$  minutos, se descartó cuidadosamente el sobrenadante con jeringa y aguja evitando perder la biomasa. Sobre el pellet restante, se añadieron 2 mL de la disolución buffer de fosfatos y se sometieron a 3 ciclos repetidos de congelación-descongelación. Se probaron tres condiciones diferentes de duración de los ciclos: 1, 2 y 24 horas (con 15 minutos de descongelación) a una temperatura de  $-12^\circ \text{C}$  y  $22^\circ \text{C}$ , respectivamente. Finalizada la extracción, se midieron las absorbancias para un rango de longitudes de onda de 190 a 900 nm en un espectrofotómetro UV - Vis 2550 (Shimadzu, Japón) usando cubetas de cuarzo (Hellma Analytics, QS - 10 mm). Para el cálculo de concentración de C-FCs totales se empleó la ecuación 8 (Chaiklahan et al., 2022) donde  $V_e$  es el volumen total del tubo que es 2 mL,  $A_{620}$  es la absorbancia a 620 nm y  $dcw$  se aproxima al valor de SSV.

$$\text{C-PC (mg gdcw}^{-1}) = \frac{A_{620} \cdot V_e}{3,39 \cdot dcw} \quad \text{Ecuación 8}$$

De acuerdo con los resultados obtenidos, se finalizó la prueba concluyendo que el tratamiento óptimo consiste en realizar 3 ciclos repetidos de congelación-descongelación de 24 horas.

### **3.4.2. Caracterización de caldo de cultivo**

#### **3.4.2.1. Carbono orgánico e inorgánico y nitrógeno total**

Durante el análisis rutinario, tres veces por semana, se recogieron en cada uno de los 16 tubos eppendorf 1,5 mL de caldo de cultivo y se centrifugaron a  $10500\text{ g} \times 5$  minutos. El sobrenadante resultante se colectaba usando una jeringa y aguja y se filtraba con filtros de  $0,2\ \mu\text{m}$  en los tubos de muestra, a los que previamente se añadía una gota de NaOH 6M para evitar pérdidas por *stripping*. Estos tubos se almacenaban en congelador a una temperatura de  $-10\ ^\circ\text{C}$  hasta analizar la concentración de COT, CI y NT.

Las muestras para CI y COT se diluyeron con agua MiliQ en una relación de 1:40 y las de NT a 1:5. El análisis se llevó a cabo en un Analizador TOC-VCSH Shimadzu (Jiangsu, China). Para la medición de CT en el caldo de cultivo, el equipo lleva a cabo una oxidación catalítica, calentando la muestra a  $680\ ^\circ\text{C}$  en presencia de un catalizador de platino, de manera que todo el carbono presente se vaporiza. Posteriormente se cuantifica mediante un sensor infrarrojo no dispersivo (NDIR). Por otra parte, para la medición de CI, se acidificó la muestra haciendo que el CI presente se libere como  $\text{CO}_2$  y se cuantifique usando el mismo sensor. La concentración de COT se determina como la diferencia entre CT y CI.

#### **3.4.2.2. Concentración de cloruro, nitritos, nitratos, sulfatos y fosfatos:**

Para la medición de la concentración de aniones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  se recogieron en cada uno de los 16 tubos eppendorf 1,5 mL de caldo de cultivo y se centrifugaron a  $10500\text{ g}$  durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se colectaba usando una jeringa y aguja y, después, se filtraba con filtros de  $0,2\ \mu\text{m}$ . En dos viales de 1 mL se colectó la muestra y se almacenó en frigorífico a una temperatura de  $4\ ^\circ\text{C}$  hasta ser analizada. El equipo de análisis trabajaba con un rango de concentraciones de  $12,5$  a  $150\text{ mg L}^{-1}$ , por lo que la muestra fue diluida en función de la concentración con agua MiliQ en ratios 1:1, 1:2 y 1:3. Para el análisis de estos aniones se hizo uso de un Cromatógrafo iónico HPLC,

que es un método eficaz para la separación y determinación de iones, basado en la utilización de resinas de intercambio iónico. Cuando la muestra atraviesa las columnas, los iones presentes se separan debido a las diferentes reacciones que se producen al interactuar con la fase estacionaria de las columnas analíticas. A su salida de la columna, la muestra pasa a través de un detector en el que se registra la señal obtenida respecto al tiempo de retención.

#### **3.4.2.3. Actividad fotosintética, oxígeno disuelto y pH**

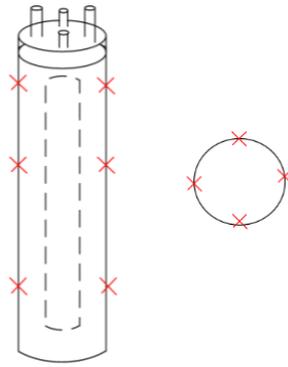
La temperatura ambiente, la temperatura del FBR, la concentración de oxígeno disuelto (OD), la actividad fotosintética (Fv/Fm) así como el pH en el caldo de cultivo fueron medidos cinco veces a la semana.

La temperatura del FBR y concentración de OD fueron medidos empleando un oxímetro Oxi 3310m conectado a un sensor Cellox 325 (WTW, Alemania). El pH fue medido empleando un pH-metro Accumet AB315 (FisherBrand, Alemania). Por otra parte, la actividad fotosintética (Fv/Fm) fue medida empleando un fluorómetro AquaPen AP 110C (Photon Systems Instruments, Drasov, Czech Republic) a una longitud de onda de 445 nm.

#### **3.4.3. Medición de la intensidad de luz**

La intensidad de luz se registró una vez cada semana durante el funcionamiento del FBR con un medidor de luz LI-COR LI-250A, conectado a un piranómetro LI-200SA.

La superficie del FBR que se encontraba iluminada era de 0,113 m<sup>2</sup>, pues las luces LED se colocaron en un cilindro de PVC de manera que el reactor se encontrara en la parte interior, concéntrico a él. Tal y como se muestra en figura 16, se hicieron medidas de intensidad de luz en las zonas marcadas con cruces rojas para una mayor exactitud y, después, se calculó la media y la desviación estándar. El FBR estaba sometido a un fotoperiodo de 12 horas de iluminación y 12 de oscuridad. Las unidades de la intensidad de luz son  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



**Figura 16.** Representación esquemática de los puntos de medida de luz.

### 3.5. CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Para el análisis de los resultados, se calculan los siguientes parámetros cinéticos:

- La tasa máxima de crecimiento específico ( $\mu_{\text{máx}}$ ) se determina según la ecuación 9, donde  $SSV_n$  y  $SSV_0$  son las concentraciones de SSV para tiempos  $t_n$  y  $t_0$ .

$$\mu_{\text{máx}} (\text{d}^{-1}) = \frac{\ln SSV_n - \ln SSV_0}{t_n - t_0} \quad \text{Ecuación 9}$$

- El rendimiento de biomasa o productividad de biomasa por día se estima con la ecuación 10:

$$\text{Rendimiento Biomasa (g d}^{-1}\text{)} = \frac{\text{SSV (g L}^{-1}\text{)} \cdot \text{Volumen purgado (L)}}{\text{Día de cultivación(d)}} \quad \text{Ecuación 10}$$

- La productividad de biomasa algal ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) se determina según la ecuación 11:

$$\text{Productividad (g m}^{-2} \text{d}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Rendimiento biomasa (g d}^{-1}\text{)}}{\text{Área de trabajo (m}^2\text{)}} \quad \text{Ecuación 11}$$

- La tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  ( $R_{\text{CO}_2}$ ) se calculó como la relación entre el contenido de carbono en las células y la productividad de la biomasa, según la ecuación 12:

$$R_{\text{CO}_2} = P \cdot C_{\text{CO}_2} \left( \frac{M_{\text{CO}_2}}{M_C} \right) \quad \text{Ecuación 12}$$

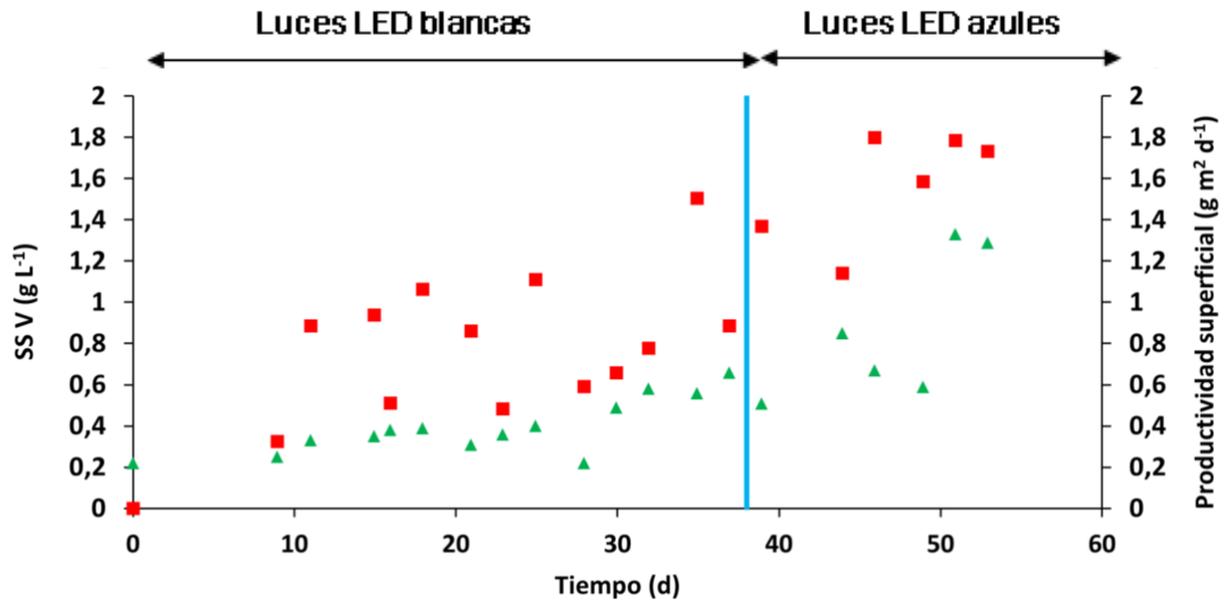
Donde  $P$  es la productividad superficial de biomasa ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ),  $C_{CO_2}$  es el contenido de carbono en las células de la microalga, que se considerará 50 % de la masa celular,  $M_{CO_2}$  es la masa molecular del dióxido de carbono y  $M_C$  la masa molecular del carbono.

Se realizaron por triplicado todos los análisis durante la operación del FBR. Los valores se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar (DS).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA

El FBR fue inoculado con la cianobacteria *N. muscorum*; sin embargo, después de 9 días de operación del FBR y tras observaciones al microscopio se determinó la presencia de un consorcio de microalga donde la especie dominante fue *Chlorella sp.* Esto pudo deberse a condiciones ambientales como temperatura, pH, inhibición de la cianobacteria o contaminación ambiental.



**Figura 17.** Variación de concentración de biomasa (SSV, g L<sup>-1</sup>) (color verde) y productividad de biomasa algal (g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) (color rojo). La línea azul representa el cambio de luces blancas a azules.

La figura 17 muestra los resultados obtenidos como concentración de la biomasa microalgal (SSV, g L<sup>-1</sup>) y productividad de biomasa algal (g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) obtenidas durante la operación del FBR. El primer día de la operación (día de inoculación del FBR) se registró una concentración de biomasa de 0,22 g L<sup>-1</sup> que fue en aumento hasta el día 18 con un valor de 0,39 g L<sup>-1</sup>. La productividad de biomasa algal comenzó con un valor de 0,32 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y aumentó hasta el día 18 con un valor de 1,07 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>.

Sin embargo, el día 21 la concentración de biomasa algal y la productividad de biomasa algal disminuyeron a  $0,31 \text{ g L}^{-1}$  y  $0,86 \text{ g m}^2 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente, lo cual pudo ser consecuencia a un error de medidas de algún nutriente empleado en el medio ES que podría provocar un menor crecimiento algal.

El día 23, la concentración y la productividad de biomasa algal en el FBR fueron de  $0,36 \text{ g SSV L}^{-1}$  y  $0,48 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente y se mantuvo aproximadamente constante hasta el día 28, en el que se registraron valores más bajos, con una concentración de  $0,22 \text{ g L}^{-1}$  y una productividad de  $0,59 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . Esto se atribuyó a una mala agitación del caldo de cultivo a la hora de tomar la muestra para sólidos, lo que resultó en un valor de la concentración de biomasa inferior al esperado.

El día 30 de operación se observa un incremento en la concentración de biomasa algal de  $0,49 \text{ g L}^{-1}$ , que corresponde a una productividad de biomasa de  $0,66 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , manteniéndose la tendencia ascendente hasta el día 37, que es el fin de la etapa de iluminación con luces blancas, con concentración y productividad de biomasa algal de  $0,66 \text{ g L}^{-1}$  y  $0,89 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. En esta etapa de 37 días con una iluminación con luces blancas con una intensidad promedio  $110,15 \pm 2,10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y con una temperatura media de  $19,8 \pm 1,0 \text{ }^\circ \text{C}$ , los valores máximos de concentración y de productividad de biomasa algal fueron registrados el día 37, con valores de  $0,66 \text{ g L}^{-1}$  y  $1,50 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Por otro lado, los valores promedio de concentración y productividad de biomasa algal fueron de  $0,39 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$  y de  $0,73 \pm 0,40 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Además, en esta etapa, la tasa máxima de crecimiento específico ( $\mu_{\text{máx}}$ ) fue de  $0,13 \text{ d}^{-1}$ , registrada el día 11.

El día 38 comienza la etapa de luces LED azules y el día 39 se realizó el primer análisis de esta parte, obteniendo una concentración y productividad de biomasa algal de  $0,51 \text{ g L}^{-1}$  y  $1,37 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Posteriormente, la tendencia se mantiene creciente hasta el fin de esta etapa con una concentración y productividad de biomasa algal de  $1,29 \text{ g L}^{-1}$  y  $1,73 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Los valores máximos de concentración y productividad de biomasa algal observados durante esta etapa fueron de  $1,33 \text{ g L}^{-1}$  y  $1,80 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  registrados el día 51 con iluminación con luces azules con intensidad promedio de  $74,60 \pm 11,90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y una temperatura promedio de  $20,4 \pm 0,7 \text{ }^\circ \text{C}$ . Los valores promedio de concentración y productividad de biomasa algal fueron de  $0,87 \pm 0,35 \text{ g L}^{-1}$

y  $1,57 \pm 0,26 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Además, la tasa máxima de crecimiento específico obtenida fue de  $0,41 \text{ d}^{-1}$ , registrada el día 51.

Se observa que, implementando la estrategia de iluminación con luces LED azules con un fotoperíodo 12:12 h, la productividad de biomasa del consorcio de microalgas fue mayor comparado a la iluminación usando luces blancas. Esto coincide con algunos estudios previos que también informaron que las luces LED azules, comparadas con otras, como las blancas, permiten que la intensidad de luz penetre en profundidad en el cultivo de manera que se mejora la duplicación de las microalgas y, por tanto, aumenta la acumulación de biomasa. En concreto, Atta et al., (2013) estudió el crecimiento de la microalga *Chlorella Vulgaris* bajo luces LED blancas con una intensidad de  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  con un fotoperíodo de 12:12 h y obtuvo una tasa máxima de crecimiento específico de  $1,15 \text{ d}^{-1}$ , mientras que, para las luces azules, con las mismas condiciones, la tasa máxima fue de  $1,26 \text{ d}^{-1}$ .

Además, Yadavalli et al., (2016) demostró que se obtuvo un crecimiento mayor de *Chlorella pyrenoidosa* en presencia de luces azules con una tasa máxima de crecimiento específico de  $0,506 \text{ d}^{-1}$ , comparadas con las luces rojas, con  $0,215 \text{ d}^{-1}$ , y las verdes y blancas, con  $0,240 \text{ d}^{-1}$ .

Se ha demostrado que el fotosistema I (PS I) de microalgas se ve mejorado con la longitud de luz de la luz roja, pues contiene más *clorofila-a*, cuyo pico de absorbancia se presenta en la longitud de la luz roja (620 a 750 nm), mientras que el fotosistema II (PS II) puede ser inducido por la longitud de onda de la luz azul debido a que contiene más *clorofila-b* que presenta el pico de absorbancia en la misma longitud de la luz azul (450 a 495 nm), lo que puede suponer un mayor crecimiento de microalgas (Yan & Zheng, 2014). Además, la frecuencia del fotón azul es corta y con mucha energía, necesaria para catalizar las reacciones que ocurren en la fotosíntesis (Atta et al., 2013).

Por lo tanto, con este estudio realizado queda demostrado que el consorcio de microalgas con *Chlorella sp.* como especie dominante tuvo un crecimiento más rápido ( $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,41 \text{ d}^{-1}$ ) empleando una iluminación con luces LED azules con un fotoperíodo 12:12 h a una intensidad promedio de  $74,60 \pm 11,90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  comparado al obtenido con luces blancas ( $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,13 \text{ d}^{-1}$ ) con una intensidad promedio de  $110,15 \pm 2,10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

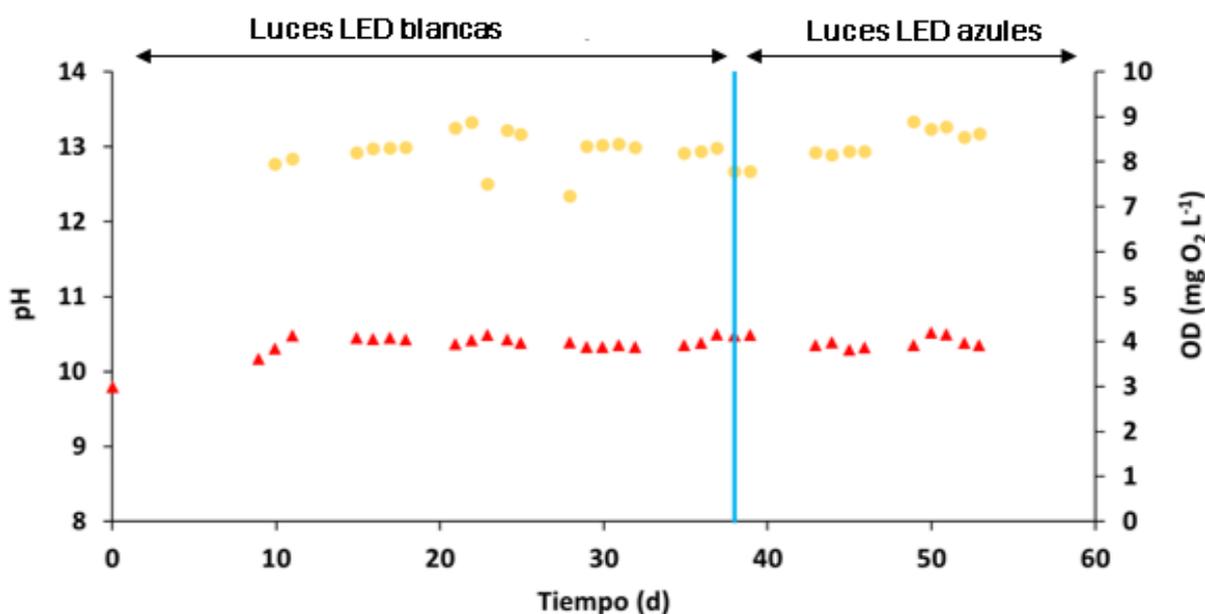
## 4.2. PARÁMETROS OPERACIONALES

### 4.2.1. Temperatura

La temperatura del laboratorio permaneció constante durante la operación y tuvo un valor promedio de  $19,9 \pm 0,9^\circ\text{C}$ . La temperatura dentro del FBR tuvo un valor promedio de  $23,0 \pm 1,3^\circ\text{C}$  que se encuentra dentro del rango de temperaturas adecuado para el crecimiento de microalgas (15 a  $35^\circ\text{C}$ ) (Ángeles, et al., 2021). La diferencia de temperaturas puede deberse al calor que las luces LED utilizadas aportaban.

### 4.2.2. Oxígeno disuelto y pH

En la figura 18 se pueden observar los datos obtenidos referidos al OD y el pH en el caldo de cultivo del fotobiorreactor.



**Figura 18.** Evolución de OD ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ) (color naranja) y pH (color rojo) durante la operación en FBR. Línea azul representa cambio a luces LED azules.

La concentración promedio del OD del sistema fue de  $8,30 \pm 0,38 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ . Los valores de OD se han mantenido aproximadamente constantes a lo largo de la operación, excepto el día 23 y 28 con valores más bajos de  $7,51$  y  $7,24 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ , respectivamente, debido a que fueron días en los que se registraron concentraciones de biomasa menores.

Los valores de OD registrados en todo el periodo experimental se han mantenido por debajo de los valores que inhiben a las microalgas, que son mayores a 25 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (Rodero et al., 2019).

La transferencia de oxígeno tiene lugar entre la fase gaseosa (el aire) a la fase líquida (el caldo de cultivo) y viceversa. Durante las horas de luz, las microalgas realizan la fotosíntesis y el O<sub>2</sub> se libera, mientras que, durante la oscuridad, se produce la respiración celular que requiere un suministro de O<sub>2</sub>. Una mala transferencia de O<sub>2</sub> puede provocar una saturación que causaría un daño celular durante la fotosíntesis, o un déficit de oxígeno durante la respiración celular. Para mejorar este proceso, es necesario una correcta agitación del medio de cultivo con el uso de difusores y un control de la aireación y de las temperaturas.

La concentración de OD en el caldo de cultivo se ve incrementada cuando aumenta la productividad de biomasa microalgal ya que la capacidad fotosintética es mayor y la producción de oxígeno es más alta. Algunos factores que afectan en la concentración de OD son la hora en la que se realizan las mediciones, la agitación del medio de cultivo, la intensidad de luz, la temperatura y la presión (a temperaturas altas y presiones bajas, la solubilidad del O<sub>2</sub> disminuye y se registra menor OD).

Por otra parte, el pH puede verse afectado por la composición del medio de cultivo, la actividad metabólica de las microalgas, la temperatura, entre otros. Durante toda la operación del FBR, el pH se mantuvo con un valor promedio  $10,4 \pm 0,1$ , gracias al aporte constante de carbono inorgánico al sistema. Si bien es cierto que se trata de un valor de pH alcalino, *Chlorella* es un microorganismo que ha sido capaz de crecer en estas condiciones. Por lo tanto, el pH promedio mantenido en el caldo de cultivo fue adecuado para el crecimiento del consorcio de microalgas pues una disminución del pH por debajo de 6 o un aumento por encima de 10 puede afectar la fisiología de las células y de las enzimas que catalizan las reacciones de fotosíntesis. La actividad fotosintética también afecta al valor del pH, ya que el consumo de carbono inorgánico genera una acumulación de iones hidroxilo y, por lo tanto, un aumento del pH del caldo de cultivo (Salama et al., 2014).

### 4.2.3. Actividad fotosintética

La actividad fotosintética se ha representado como la relación  $F_v/F_m$ , donde  $F_v$  es la fluorescencia máxima variable y  $F_m$ , la fluorescencia máxima de clorofila, siendo  $F_v/F_m$  adimensional. La actividad fotosintética del consorcio de microalgas ( $F_v/F_m$ ) se midió a una longitud de onda de 445 nm (Ángeles et al., 2021). En la figura 19, se representa la variación de  $F_v/F_m$  a lo largo de los 53 días de operación del FBR. Como se puede observar, la medición de  $F_v/F_m$  comenzó el día 10 con un valor de 0,64 y se mantuvo con un promedio de  $0,62 \pm 0,03$ . El cambio de luces blancas a azules no parece haber afectado el valor de  $F_v/F_m$  ya que se registró un valor promedio de  $0,61 \pm 0,02$  durante la operación con luces LED azules. Estos valores se encuentran dentro del rango óptimo para un buen cultivo de microalgas, que suele ser de 0,6 a 0,8 (López-Rosales et al., 2013).

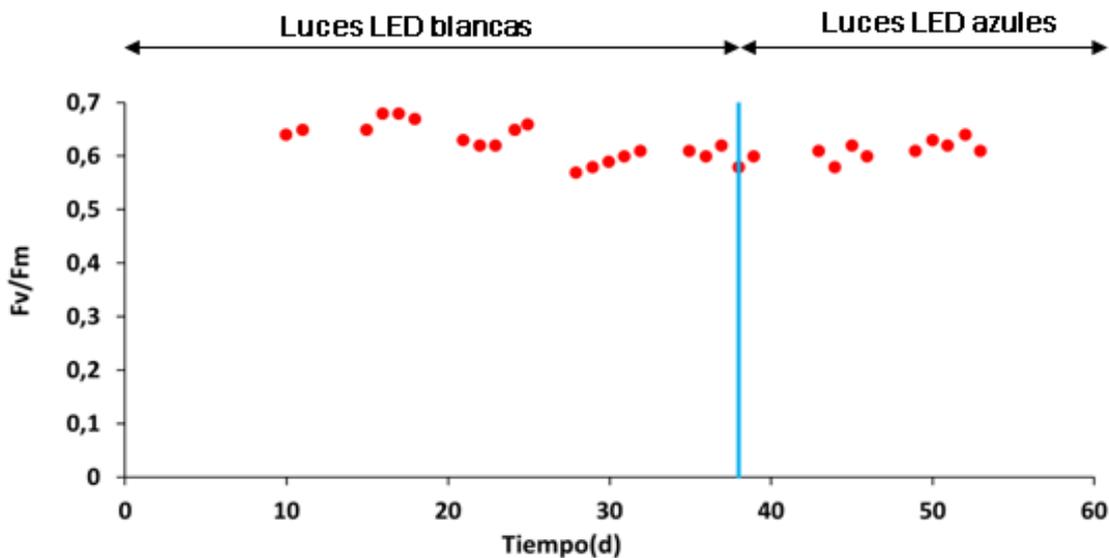
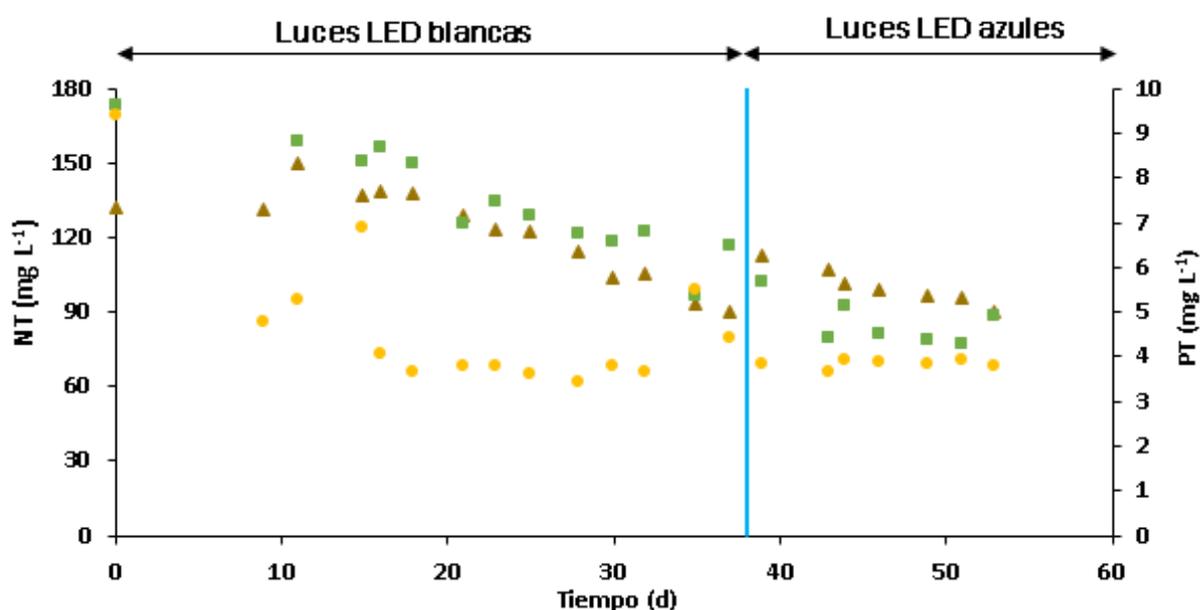


Figura 19. Actividad fotosintética a lo largo de la operación en FBR. Línea azul representa cambio a luces azules.

### 4.2.4. Nitrógeno y fósforo

El NT presente en el caldo de cultivo proviene del  $KNO_3$  añadido en una concentración de  $1,2 \text{ g L}^{-1}$ , el anión  $NO_2^-$  se debe a la actividad metabólica del consorcio de microalgas mientras que el fósforo total (PT) procede del  $K_2HPO_4$ . En la figura 20 se representa la evolución de NT y PT en el caldo de cultivo.



**Figura 20.** Evolución de NT (color marrón), NT procedente de aniones  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  (color verde) y PT (color amarillo) ( $\text{mg L}^{-1}$ ) durante la operación en FBR. La línea azul representa el cambio a luces azules.

Como se puede apreciar, el valor inicial del NT fue de  $131,9 \text{ mg L}^{-1}$  y aumentó a  $150,2 \text{ mg L}^{-1}$  en el día 11. Este aumento se traduce en un menor consumo de NT posiblemente por la menor actividad de las microalgas o por el uso de un nuevo medio ES modificado en el que la concentración pudo haber variado ligeramente respecto al usado el día 1.

El día 15 el valor de NT fue menor,  $137,13 \text{ mg L}^{-1}$  y, a partir de entonces, se observa una disminución alcanzando un valor de  $89,95 \text{ mg L}^{-1}$  el día 38, en el que se produce el cambio de etapa a luces azules. El rendimiento de eliminación del NT (RE-NT %) durante esta etapa fue de 31,80 %.

El consumo de NT por las microalgas se siguió también apreciando en la etapa de iluminación con luces azules. El día 39 se registró un valor de  $112,65 \text{ mg L}^{-1}$ , mayor que el último valor obtenido debido, probablemente, a un menor crecimiento de biomasa y a que el consorcio de microalgas se encontraba en período de adaptación a las luces azules, por lo que el consumo de NT fue ligeramente menor. A partir de ese día, se observa un aumento en el consumo de NT pues se registró una disminución en la concentración obteniendo un valor final el día 53 de  $90,55 \text{ mg L}^{-1}$ .

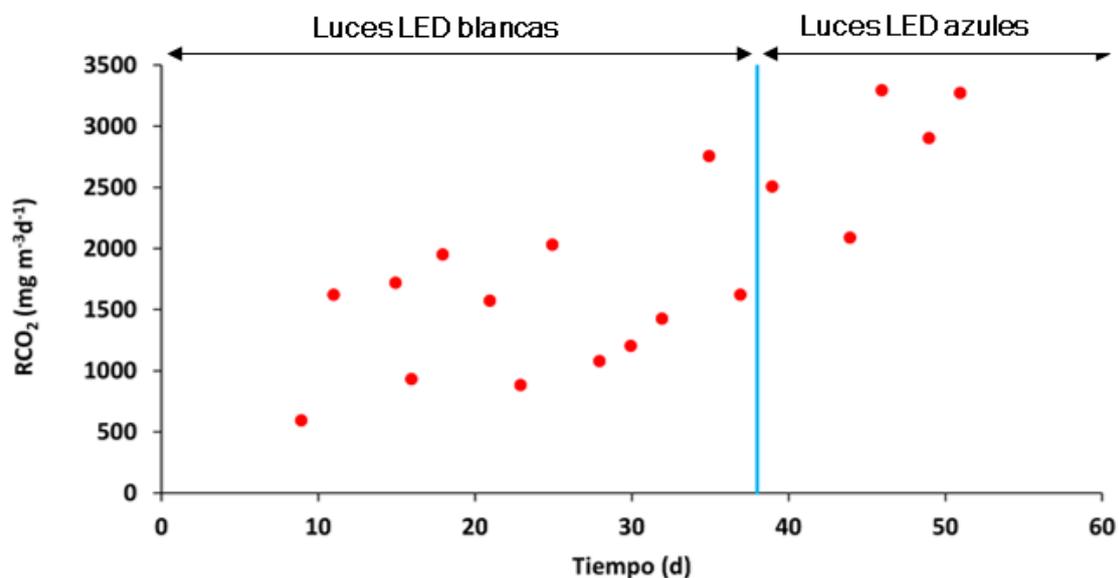
Dado que la etapa con luces azules duró 16 días frente a los 37 días del periodo con luces blancas y para confirmar si la fijación de nitrógeno se ve favorecida por el color de la luz,

se realiza una comparativa entre el RE-NT obtenido en los primeros 16 días de iluminación con los dos tipos de luz. En los 16 días que duró la operación con luces azules se obtuvo un RE-NT de 19,61 % frente a 2,42 % en 16 días con luces blancas. Por lo tanto, el consorcio de microalgas fija el nitrógeno más rápidamente siendo iluminadas con luz azul.

Por otra parte, el fósforo presentó un valor inicial de 9,40 mg L<sup>-1</sup> y fue disminuyendo hasta un valor de 4,47 mg L<sup>-1</sup> el día 9. A partir de entonces, se mantuvo prácticamente constante durante toda la operación con luces blancas, presentando un valor el día 37 de 4,43 mg L<sup>-1</sup>, con un rendimiento de eliminación (RE-PT) de 52,80 %. En la etapa con luces azules, el valor del fósforo se mantuvo aproximadamente constante, con un valor el día 39 de 3,86 mg L<sup>-1</sup> y un valor final el día 53 de 3,80 mg L<sup>-1</sup> día 53, obteniendo un RE-PT de 59,14 %.

#### 4.2.5. Tasa de fijación de CO<sub>2</sub>

En la figura 21 se representa la evolución temporal de la fijación de CO<sub>2</sub> (R<sub>CO<sub>2</sub></sub>) durante la toda la operación en el FBR.



**Figura 21.** Evolución de R<sub>CO<sub>2</sub></sub> durante la operación en el FBR. La línea azul representa el cambio a luces azules.

Se puede observar que la tendencia de la evolución de este parámetro es creciente y similar a la de la productividad de biomasa algal, pues es directamente proporcional a la concentración de biomasa en el FBR.

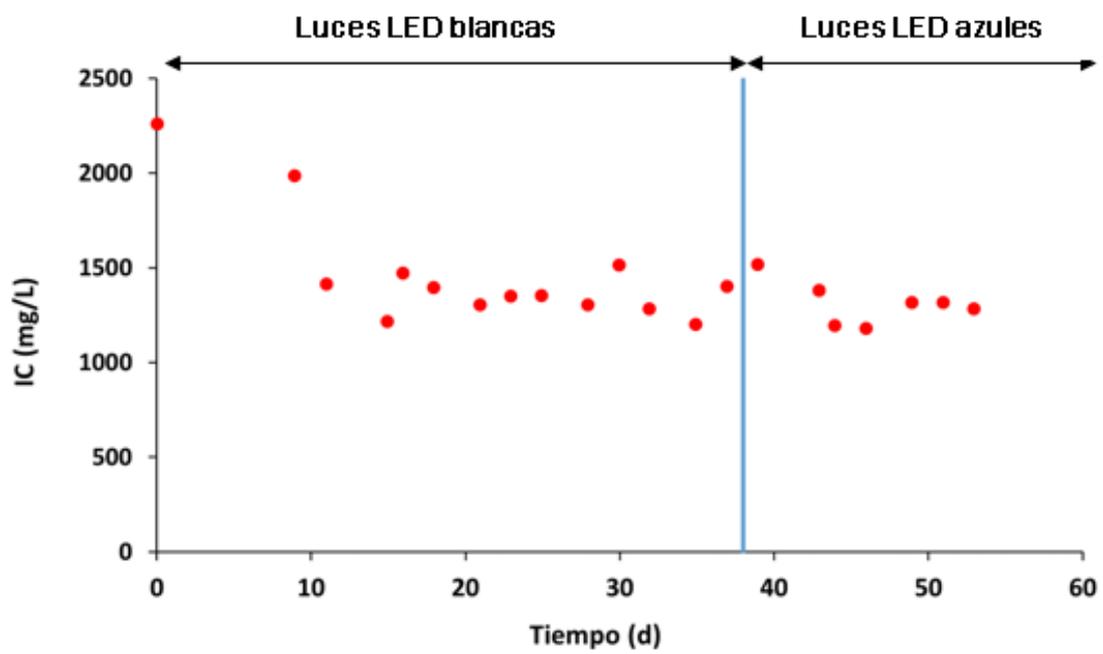
$R_{CO_2}$  se calcula a partir del día 9 en el que se registró un valor de  $595 \text{ mg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Posteriormente, la tasa de fijación aumenta hasta un valor de  $1723 \text{ mg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  registrado el día 15, reduciéndose al día siguiente a  $936 \text{ mg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  debido a una disminución en la productividad de la biomasa. Al final de la etapa con luces blancas la tasa de fijación presentó una tendencia creciente, alcanzando un valor máximo de  $R_{CO_2}$  el día 35 de  $2758 \text{ mg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , coincidiendo con la máxima productividad registrada.

Después del cambio a iluminación con luces azules, el día 39 se obtuvo un valor de  $2512 \text{ mg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  y, en los posteriores días, siguió aumentando hasta el fin de etapa con un valor de  $3176 \text{ mg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . El valor máximo presentado con luces azules fue de  $3300 \text{ mg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Por lo tanto, se puede concluir que  $R_{CO_2}$  se ve favorecida por la iluminación con luces azules frente a las luces blancas, pues al aumentar la productividad de biomasa, el consorcio de microalgas fija el  $CO_2$  en mayor proporción.

#### **4.2.6. Carbono inorgánico**

El CI en el caldo de cultivo se encuentra de tres formas:  $CO_2$  libre,  $CO_3^{2-}$  y  $HCO_3^-$ . Estas tres formas también están controladas por el pH debido al equilibrio del carbonato. Así, si el pH está entre un valor de 6 y 10, el CI existe, principalmente, como  $HCO_3^-$ , siendo esta la forma que las células de las microalgas más usan (Salama et al., 2014). En la figura 22 se presenta la evolución de CI durante la operación en el FBR.

La concentración inicial de CI fue de  $2262 \text{ mg L}^{-1}$  y, posteriormente, fue disminuyendo hasta mantenerse casi constante durante el resto de la operación. Se aprecian ligeros cambios en los valores cuando se hace uso de un nuevo medio ES modificado preparado cada semana. El cambio a luces azules no parece haber afectado los valores de CI registrados. El valor promedio de CI fue  $1413 \pm 259 \text{ mg L}^{-1}$ . Por otro lado, la eficacia de eliminación de CI (RE-CI) fue de 43,14 %.



**Figura 22.** Evolución de CI durante la operación el FBR. La línea azul que representa el cambio a luces azules.

## 4.3. CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS

### 4.3.1. Pruebas de extracción

Para la extracción de carotenoides, clorofilas y ficobiliproteínas se realizaron pruebas para optimizar la técnica empleada.

Para el caso de los carotenoides, se realizó la prueba con tres volúmenes diferentes de biomasa: 1,5 mL, 0,75 mL y 0,5 mL que corresponden a diferentes cantidades de biomasa (0,0075, 0,005 y 0,0025 g). Dado que la muestra empleada para la prueba era muy concentrada, con una concentración de SST de 5 g L<sup>-1</sup>, el pellet mantenía el color verde para un volumen de 1,5 y 0,75 mL ya que el solvente se saturaba. Sin embargo, para el volumen de 0,5 mL de biomasa, el pellet tenía un color transparente. A pesar de este resultado, no se siguió esta metodología, pues las muestras del FBR usadas para las extracciones rutinarias no se encontraban tan concentradas y se podía trabajar con un volumen de 1,5 mL sin llegar a saturar el disolvente. En la tabla 4.1. se presentan los porcentajes de carotenoides (% dcw) obtenidos para cada volumen de muestra empleado, observando que, empleando mayor cantidad de biomasa se obtienen concentraciones de pigmento mayores.

Cantidad de biomasa empleada (g)	Porcentaje carotenoides totales (% dcw)
0,0075	0,37±0,05
0,005	0,26±0,04
0,0025	0,16±0,04

**Tabla 4.1.** Porcentaje promedio de carotenoides totales (% dcw) para cada volumen de muestra.

Por otra parte, en la figura 23 se pueden observar los resultados de las pruebas realizadas para la extracción de clorofilas. Se llevaron a cabo 4 tratamientos diferentes a 60 °C y diferentes tiempos de sonicación: 15, 30, 45 y 60 minutos. Con el tratamiento de sonicación durante 60 minutos a 60 °C se obtuvo el mayor porcentaje de clorofilas por peso seco celular y, por lo tanto, se decidió usar esta metodología para las extracciones con biomasa del FBR.

Finalmente, se realizó otra prueba para el método de extracción de ficocianinas con biomasa de *N. Muscorum*. Para la prueba de ficocianinas se llevaron a cabo tres tratamientos dependiendo de la duración de los ciclos de congelación y descongelación, 1, 2 y 24 horas. Los resultados se pueden observar en la figura 24. Para los ciclos de 1 hora de congelación, se obtuvieron resultados negativos de absorbancias debido a que el tiempo de tratamiento no es suficiente para realizar la extracción del pigmento, por lo que este método se descartó. Para los ciclos de 2 horas de congelación, se obtuvieron resultados positivos por lo que podría ser válido. Sin embargo, dado que con ciclos de 24 horas de congelación se obtuvieron porcentajes de ficocianinas totales mayores, se usó esta técnica para las posteriores extracciones usando biomasa del FBR.

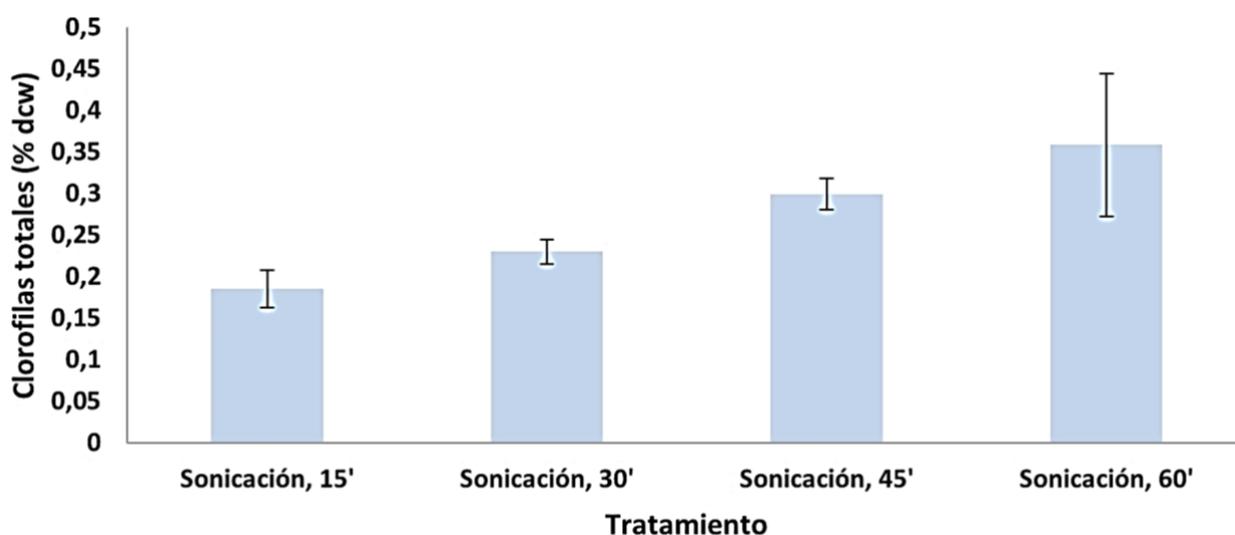


Figura 23. Prueba de extracción de clorofilas realizada con biomasa de microalgas de FBR a diferentes tiempos de sonicación.

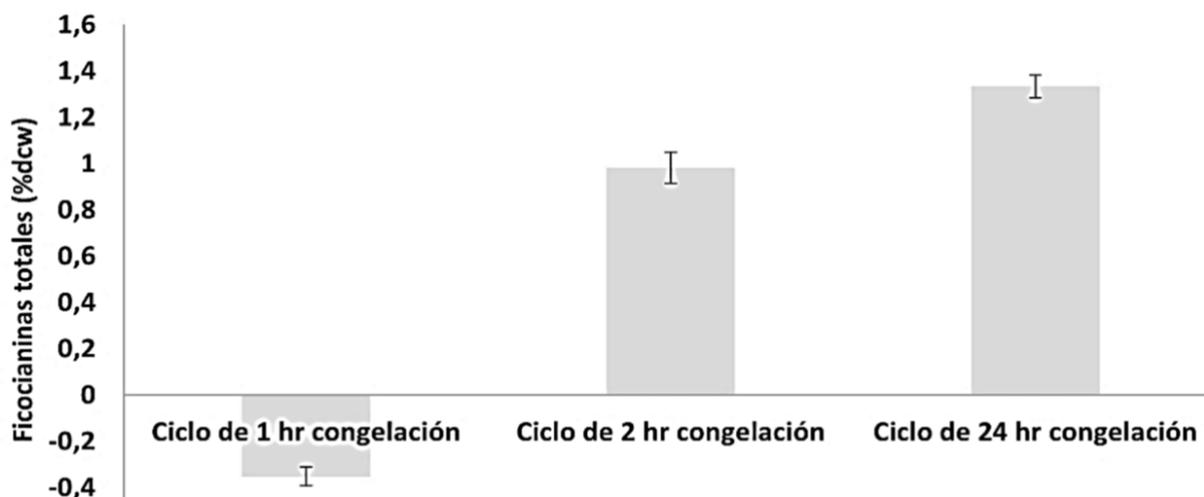


Figura 24. Prueba de extracción de ficocianinas realizada con biomasa de *Nostoc Muscorum* a diferentes ciclos de congelación y descongelación.

### 4.3.2. Evolución de concentración de pigmentos fotosintéticos

En la figura 25 se presenta la evolución temporal de los porcentajes respecto al peso seco celular de los pigmentos fotosintéticos (% dcw) durante toda la operación en el FBR. A partir del día 10 se comenzaron a realizar extracciones de clorofilas y carotenoides. En general, se puede observar que la producción de los pigmentos fotosintéticos depende del tipo de luces empleadas y que aumenta a medida que avanza la edad del cultivo.

Los porcentajes iniciales (% dcw) de carotenoides y clorofilas fueron de  $0,02 \pm 0,00$  % y de  $0,13 \pm 0,02$  %, respectivamente. Posteriormente, en los siguientes días se tiene una tendencia creciente con algunas excepciones en las que se muestran porcentajes ligeramente menores, debido a ciertos aumentos en la concentración de biomasa que dan lugar a valores menores de porcentajes de pigmento por peso seco de biomasa.

A partir del día 38, el día del cambio a la etapa con luces azules, se observa una evolución más rápida en la producción de clorofilas y carotenoides. Durante esta etapa, con una iluminación usando luces LED azules con una intensidad promedio de  $74,60 \pm 11,90$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , se registraron los porcentajes máximos (% dcw) de carotenoides y clorofilas, con valores de  $0,28 \pm 0,06$  % y  $0,70 \pm 0,06$  % los días 46 y 43, respectivamente. Los porcentajes promedio de carotenoides y clorofilas durante la operación en el FBR fueron de  $0,14 \pm 0,02$  % y  $0,35 \pm 0,14$  %, respectivamente.

Esto significa que, en comparación con la iluminación con luces blancas, el empleo de luces azules, con un fotoperíodo 12:12 h estimuló la acumulación del contenido de carotenoides en un 55,81 % y de clorofilas en un 42,48 %.

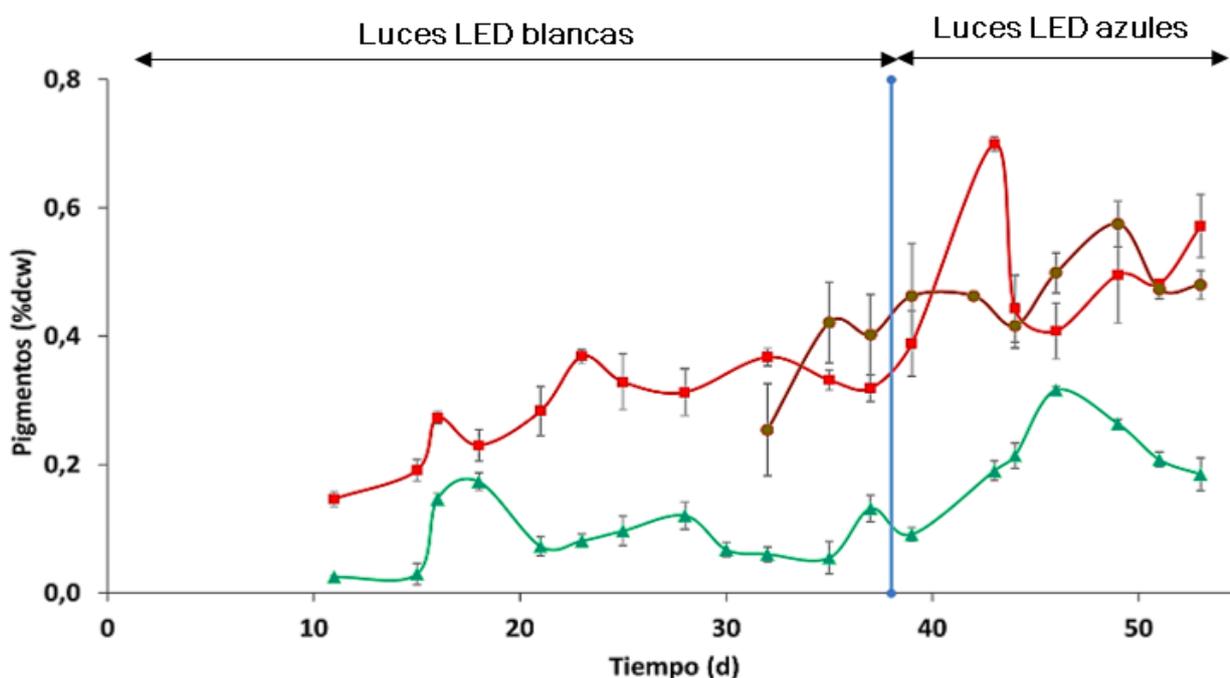
Estudios previos afirmaron que la producción de los pigmentos en las microalgas se asocia a los colores de la luz recibidos y son capaces de adaptarse y responder a varios colores de luces (adaptación cromática), mostrando una mejora en la producción con luces azules. Específicamente, es de esperar que el contenido de carotenoides aumente con luces azules (450-495 nm) pues coinciden con los picos de absorción de dichos pigmentos (Suresh et al., 2018).

Por otro lado, se realizó la extracción de ficocianinas a partir del día 32 hasta el final de la operación (día 53). Las ficocianinas mostraron porcentajes ligeramente menores durante

la etapa de luces blancas en comparación a la de luces azules. Para las tres extracciones realizadas durante la etapa de iluminación con luces blancas se obtuvieron valores de  $0,25 \pm 0,07$ ,  $0,42 \pm 0,15$  y  $0,40 \pm 0,06$  % dcw, respectivamente. El día 39 en el que se realizó la primera extracción de ficocianinas en la etapa de luces azules, el valor se incrementó a  $0,46 \pm 0,08$ % dcw y siguió aumentando hasta un valor máximo de  $0,52 \pm 0,01$  % dcw registrado el día 49.

En este experimento se ha podido cuantificar la presencia de ficocianinas en el consorcio de microalgas, así como la mejora de su producción con la iluminación empleando luces LED azules. De la misma manera que para los carotenoides y clorofilas, el aumento de producción de ficocianinas bajo la luz azul indicaría que el consorcio de microalgas realiza modificaciones en las características de absorción de la luz para regular el proceso de la fotosíntesis (adaptación cromática). Esto coincide con algunos estudios anteriores que muestran que en cianobacterias como *Spirulina platensis* y *Synechococcus sp* la luz azul aumentó la producción de ficocianinas (Tian et al., 2018).

Sin embargo, se han encontrado pocos estudios que afirmen la existencia de ficocianinas en la microalga *Chlorella sp* por lo que la presencia de ficocianinas puede proceder de otro tipo de microalga presente en menor medida en el consorcio que no sea *Chlorella*.



**Figura 25.** Evolución temporal del porcentaje de pigmentos fotosintéticos extraídos: carotenoides en color verde, clorofilas en color rojo y ficocianinas en color marrón. La línea azul representa el cambio a luces azules.

## 5. APLICACIÓN A NIVEL INDUSTRIAL

El escalamiento permite reproducir en pequeña escala las condiciones necesarias para implementarlas a nivel industrial, lo que facilita evaluar la viabilidad de una operación o una planta de producción. En este documento, se llevará a cabo un escalamiento a nivel industrial de la propuesta desarrollada en el laboratorio.

### 5.1. BASES DE DISEÑO

#### Localización de la planta

La localización de la planta dependerá mucho de la industria de la que proceda la corriente de CO<sub>2</sub> residual que alimentará directamente el cultivo, así como de su cercanía a servicios auxiliares necesarios como son las redes de saneamiento, agua potable y el acceso a redes de transporte.

La fabricación del cemento supone un 5 % de las emisiones globales de CO<sub>2</sub> (Callejo, 2018), un dato determinante para localizar la planta cerca de una cementera, como puede ser Votorantim Cementos España, del grupo Cementos Cosmos S.A, situada en Toral de los Vados, en la provincia de León (Fig.26). Esta fábrica tuvo una emisión de 397.000 toneladas de CO<sub>2</sub> en el año 2022 (PRTR España, 2022).



Figura 26. Posible localización de una planta para captura de CO<sub>2</sub> y su conversión en pigmentos naturales, cerca de una cementera Votorantim Cementos, León, España.

## **Capacidad de producción**

Todos los valores presentados a continuación corresponden a un solo FBR, sin embargo, dependiendo de la producción de pigmentos y eliminación de CO<sub>2</sub> deseada se pueden emplear varios FBR.

La planta de captura de CO<sub>2</sub> para la producción de pigmentos fotosintéticos operará de forma continua durante los 365 días del año, obteniendo para cada FBR operativo tubular con volumen de trabajo de 1 m<sup>3</sup>, con luces blancas cálidas, 46,3 g año<sup>-1</sup> de pigmentos fotosintéticos totales y 206,4 g año<sup>-1</sup>, con luces azules.

## **Especificaciones de materia prima**

Entre las materias primas principales para obtener los pigmentos naturales de interés a partir de las microalgas se encuentra el CO<sub>2</sub> contenido en una corriente de gas residual que alimentará al cultivo de microalgas capaces de acumular pigmentos como los carotenoides, clorofilas y ficocianinas. Además, se necesitará un aporte continuo de medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microalgas.

Por otra parte, para la extracción de pigmentos se emplearán disolventes orgánicos como el metanol y la acetona. Además, para la purificación de los pigmentos se considerará como corriente de alimentación la disolución que los contiene.

## **Descripción del proceso**

El proceso consistirá en dos partes principales, una primera de acumulación de pigmentos en un cultivo de microalgas en varios FBR tubulares iluminados (el número de FBR depende de la producción deseada) con la posterior centrifugación para separar la biomasa, mientras que la segunda será la fase de extracción y purificación.

El cultivo de microalgas se llevará a cabo en un FBR tubular de volumen total 1 m<sup>3</sup> iluminado tanto con luces blancas cálidas como con luces azules, dependiendo de la producción deseada, teniendo en cuenta que se alcanzan rendimientos mayores con luz azul. Para esta parte, será necesario llevar un control sobre el pH, la temperatura, la intensidad de luz, el oxígeno disuelto, para evitar un exceso que pueda provocar daños celulares, así como un aporte continuo de medio de cultivo. La corriente de gas que contiene CO<sub>2</sub> procedente de la cementera se alimentará directamente al reactor y servirá

como fuente de carbono inorgánico necesario para que las microalgas realicen la fotosíntesis.

Una vez se lleva a cabo el cultivo de microalgas, el siguiente paso será recuperar la biomasa generada, de manera que se concentra en forma de pasta separándola del líquido que se recirculará al FBR. Para ello, se empleará una centrifugadora, pues es una tecnología rápida y efectiva.

Obtenida la biomasa seca se llevará a la unidad de extracción de pigmentos naturales. A pesar de que se puede realizar la extracción de los tres pigmentos, se recomienda dirigir la valorización de la biomasa a la síntesis de ficocianinas ya que, durante la operación en el FBR a escala laboratorio, la producción de dicho pigmento ha sido mayor que la de carotenoides y clorofilas y, además, el valor económico de las ficocianinas es más elevado.

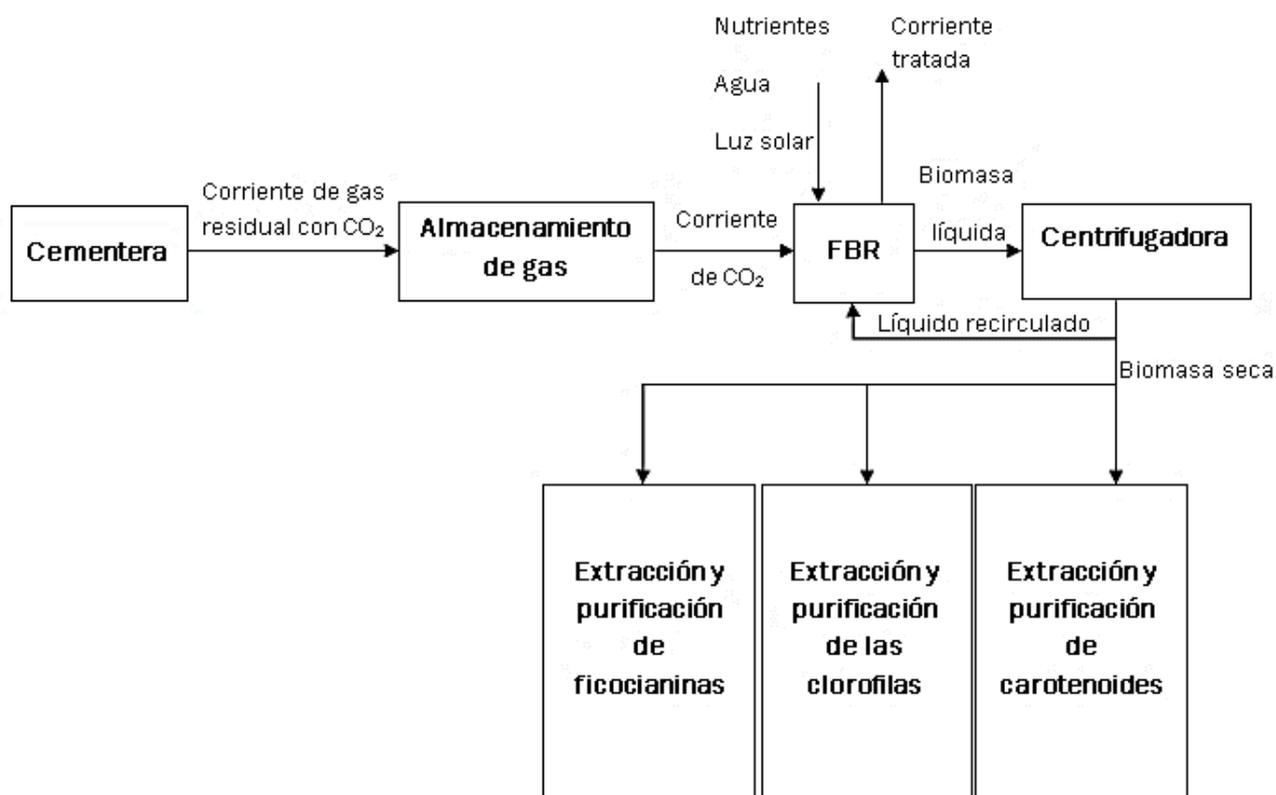
Para la extracción se pueden emplear mezcladoras en las que se coloca el disolvente junto a la biomasa. Para los carotenoides se mantendrá la biomasa en una disolución de acetona metanol 7:2 v/v durante 24 horas, para las clorofilas, se empleará una disolución de metanol al 90 % v/v y se someterá a un proceso de sonicación y para las ficocianinas, se usará buffer de fosfatos para, posteriormente, someterla a ciclos repetidos de congelación-descongelación.

Para la concentración de los pigmentos es necesario separar el disolvente usado en la extracción realizando procesos de filtración o centrifugación o empleando evaporadores a baja presión. El disolvente separado puede ser recirculado para usarlo de nuevo en la extracción.

Para la purificación de carotenoides y clorofilas se puede emplear la cromatografía de adsorción que utiliza adsorbentes como la alúmina, capaz de retener los carotenoides. Para la purificación de ficocianinas, se hace uso del sulfato de amonio que se añade a la mezcla para que se genere una precipitación fraccionada del pigmento. Para una mayor pureza, se emplean columnas con resinas a las que se adhieren las ficocianinas de manera que se consigue una separación de otros elementos no deseados.

Se recomienda almacenar los pigmentos en envases oscuros y a bajas temperaturas pues son sensibles a la luz, al oxígeno y la temperatura.

El proceso planteado se presenta en la figura 27.



**Figura 27.** Diagrama de bloques del proceso de bioconversión de CO<sub>2</sub> a pigmentos naturales

En los experimentos realizados en el laboratorio, para un FBR con un volumen de trabajo de 2,22 L, un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 16 días y una concentración inicial de carbono inorgánico teórico de 2000 mg L<sup>-1</sup>, las eficacias de eliminación de CO<sub>2</sub> obtenidas en la operación con luces blancas y azules fueron de 29,80 % y 35,70 %, respectivamente.

Se escalan estos datos a un FBR de volumen total de 1 m<sup>3</sup>, manteniendo las mismas eficacias de eliminación, así como el mismo TRH, de manera que se necesitará realizar un intercambio de medio diario de 62,5 L.

Si se alimenta al FBR con una corriente de 125 kg CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> o 67,6 Nm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup>, las microalgas serán capaces de eliminar 37,25 kg CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> si son iluminadas con luces

blancas cálidas, mientras que eliminarán 44,60 kg CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup>, si se emplean luces azules (Tabla 5.1.).

	Luces blancas	Luces azules
CO <sub>2</sub> capturado (kg CO <sub>2</sub> d <sup>-1</sup> )	37,25	44,60

**Tabla 5.1.** CO<sub>2</sub> capturado kg CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> en FBR con volumen de 1000 L, empleando luces blancas y azules.

Los 62,5 L diarios que se extraen del FBR se dirigen a la unidad de extracción de los pigmentos fotosintéticos.

Durante la iluminación con luces blancas, el porcentaje promedio de carotenoides por biomasa fue de 0,09 %, de clorofilas fue de 0,29 % y de ficocianinas, 0,12 %. Para el período de iluminación con luces azules, los porcentajes promedios de carotenoides, clorofilas y ficocianinas fueron de 0,21, 0,50, 0,33 %, respectivamente. Manteniendo estos porcentajes para el FBR de un volumen de 1 m<sup>3</sup>, conociendo que la purga realizada será de 62,65 L d<sup>-1</sup>, se obtendrán las producciones anuales de carotenoides, clorofilas y ficocianinas presentadas en la tabla 5.2.

	Producción (g año <sup>-1</sup> )		
	Carotenoides	Clorofilas	Ficocianinas
Luces blancas	8,20	26,60	11,54
Luces azules	41,90	99,52	65,01

**Tabla 5.2.** Producciones anuales de pigmentos (g año<sup>-1</sup>) para un FBR de 1 m<sup>3</sup> empleando luces blancas y luces azules.

## 6. CONCLUSIONES

En este trabajo se exploró la capacidad de un consorcio de microalgas para fijar el CO<sub>2</sub> en un FBR cerrado tipo *airlift* con un medio de cultivo que aporta CI procedente de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaHCO<sub>3</sub> empleando luces blancas cálidas y azules, para realizar una comparativa entre los resultados obtenidos con ambas luces, así como el estudio de la producción de pigmentos fotosintéticos a partir de la biomasa acumulada.

El resultado obtenido evidencia que el consorcio de microalgas con dominancia de la especie *Chlorella sp* fija el CO<sub>2</sub> con una tasa promedio de fijación durante la operación con luces LED blancas de  $1495 \pm 573 \text{ mg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , mientras que durante la operación con luces LED azules fue de  $2877 \pm 485 \text{ mg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , por lo que se afirma que la iluminación con luces azules con una intensidad promedio de  $74,6 \pm 11,89 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  incrementa la tasa de fijación del CO<sub>2</sub>.

Además, se comprueba que la concentración de biomasa se ve favorecida con las luces azules, pues el punto máximo con éstas fue de  $1,33 \text{ g L}^{-1}$  frente a  $0,66 \text{ g L}^{-1}$  con luces blancas, ambas con un fotoperíodo de 12:12 h.

Por otra parte, se ha demostrado que la producción de pigmentos se ve favorecida con las luces azules, pues los porcentajes máximos fueron registrados durante esa etapa, siendo éstos  $0,28 \pm 0,06 \%$ ,  $0,70 \pm 0,06 \%$  y  $0,52 \pm 0,01 \%$  dcw, para carotenoides, clorofilas y ficocianinas, respectivamente.

Con todo ello, se concluye que la operación de FBR con luces azules frente a la operación con luces blancas, presenta mayores tasas de fijación de CO<sub>2</sub> y mejora en las productividades de biomasa de microalgas y de pigmentos fotosintéticos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J. e. (1995). *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*. A Coruña: Universidade da Coruña - Servicio de Publicaciones.
- Algae, T. (2024). *TRUE ALGAE*. Obtenido de <https://truealgae.com/es/faqs/>
- ALGATEX. (ABRIL de 2024). *Semilla de Chlorella Vulgaris*. Obtenido de ALGATEX: <https://www.algatex.org/service/semilla-de-chlorella-vulgaris/>
- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). (2024, May 30). *Emisiones de dióxido de carbono*.
- Ángeles, R., Arnaiz, E., Gutiérrez, J., Muñoz, R., & Lebrero, R. (2021). Biogas-based production of glycogen by *Nostoc muscorum*: Assessing the potential of transforming CO<sub>2</sub> into value added products. *Chemosphere*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129885>
- Ángeles, R., Vega-Quiel, M. J., Batista, A., Fernández-Ramos, O., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2021). Influence of biogas supply regime on photosynthetic biogas upgrading performance in an enclosed algal-bacterial photobioreactor. *Algal Research*, 57. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102350>
- Antonio Luis, L. Fuentes. U. de S. E. (2021). *Diseño y montaje de una instalación de laboratorio para la caracterización y desarrollo de absorbentes de CO<sub>2</sub> basados en aminas*.
- Aslam, A., Fazal, T., Zaman, Q. U., Shan, A., Rehman, F., Iqbal, J., Rashid, N., & Rehman, M. S. U. (2019). Biorefinery of microalgae for nonfuel products. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (pp. 197–209). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00013-8>
- Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., & Wahidin, S. (2013). Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 148, 373–378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.162>
- Bahrami, A., Zolghadri, S., & Deilami, E. (1397). Optimization of phycocyanin extraction from wett biomass of *chlorella* sp. . <https://civilica.com/doc/875242>
- Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2005). Potential Aqueous Two-Phase Processes for the Primary Recovery of Colored Protein from Microbial Origin. *Engineering in Life Sciences*, 5(3), 259–266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elsc.200420073>

- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Srinorasing, T., Attasat, S., Nopharatana, A., & Bunnag, B. (2022). Enhanced biomass and phycocyanin production of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by a cultivation management strategy: Light intensity and cell concentration. *Bioresource Technology*, 343. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126077>
- da Silva Jaqueline Carmo and Lombardi, A. T. (2020). Chlorophylls in Microalgae: Occurrence, Distribution, and Biosynthesis. In M. I. and Z. L. Q. Jacob-Lopes Eduardo and Queiroz (Ed.), *Pigments from Microalgae Handbook* (pp. 1–18). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2_1)
- D'Hondt, E., Martín-Juárez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K., & Bastiaens, L. (2017). Cell disruption technologies. In *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products* (pp. 133–154). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6>
- Durall, C., & Lindblad, P. (2015). Mechanisms of carbon fixation and engineering for increased carbon fixation in cyanobacteria. In *Algal Research* (Vol. 11, pp. 263–270). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.002>
- Ecología verde. (2019). *El impacto medioambiental del dióxido de carbono*.
- Figueroa, J. D., Fout, T., Plasynski, S., McIlvried, H., & Srivastava, R. D. (2008). Advances in CO<sub>2</sub> capture technology-The U.S. Department of Energy's Carbon Sequestration Program. In *International Journal of Greenhouse Gas Control* (Vol. 2, Issue 1, pp. 9–20). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1750-5836\(07\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S1750-5836(07)00094-1)
- Golka, K., Kopps, S., & Myslak, Z. W. (2004). Carcinogenicity of azo colorants: Influence of solubility and bioavailability. In *Toxicology Letters* (Vol. 151, Issue 1, pp. 203–210). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.11.016>
- Herzog, H., & Golomb, D. (2004). *Elsevier Proof Carbon Capture and Storage from Fossil Fuel Use*.
- Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., & Yang, C. (2017). Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering*, 3(3), 318–329. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>
- Hugo Scheer. (2006). *Descripción general de las clorofilas y bacterioclorofilas: bioquímica, biofísica, funciones y aplicaciones*. Department Biologie I – Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität, Menzinger, München, Germany.
- Infante, C., Angulo, E., Zárata, A., Florez, J. Z., Barrios, F., & Zapata, C. (n.d.). PROPAGACIÓN DE LA MICROALGA *Chlorella* sp. EN CULTIVO POR LOTE: CINÉTICA DEL CRECIMIENTO CELULAR CULTIVATION OF *Chlorella* sp. MICROALGAE IN BATCH CULTURE: CELL GROWTH KINETICS. [http://www.exeeedu.com/publishing.cl/av\\_cienc\\_ing/159](http://www.exeeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/159)

- Jacobsen, J. H., & Frigaard, N.-U. (2014). Engineering of photosynthetic mannitol biosynthesis from CO<sub>2</sub> in a cyanobacterium. *Metabolic Engineering*, 21, 60–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.11.004>
- Koli, D. K., & Kumar, A. (2018). *Pigments analysis of cyanobacterial strains*. <https://www.researchgate.net/publication/365097430>
- Kulkarni, S., & Nikolov, Z. (2018). Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 35, 185–193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.024>
- Lee, R. E. (2008). *Phycology*. Cambridge University Press. <https://books.google.com.bo/books?id=gfolAFHgusgC>
- Liaaen-Jensen, S., & Jensen, A. (1971). [56] Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. *Methods in Enzymology*, 23(C), 586–602. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(71\)23132-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(71)23132-3)
- López-Rosales, L., Gallardo-Rodríguez, J. J., Sánchez-Mirón, A., Cerón-García, M. del C., Belarbi, E. H., García-Camacho, F., & Molina-Grima, E. (2013). Simultaneous effect of temperature and irradiance on growth and okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum*. *Toxins*, 6(1), 229–253. <https://doi.org/10.3390/toxins6010229>
- Mack, J., & Endemann, B. (2010). Making carbon dioxide sequestration feasible: Toward federal regulation of CO<sub>2</sub> sequestration pipelines. *Energy Policy*, 38(2), 735–743. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2009.10.018>
- Marques, A. E., Miranda, J. R., Batista, A., & Gouveia, L. (2013). Microalgae biotechnological applications: Nutrition, health and environment. *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy*, 1–60.
- Martínez-Cámara, S., Ibañez, A., Rubio, S., Barreiro, C., & Barredo, J.-L. (2021). Main Carotenoids Produced by Microorganisms. *Encyclopedia*, 1(4), 1223–1245. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1040093>
- Meléndez Martínez, A. J. (2017). *Carotenoides en agroalimentación y salud*. Editorial Terracota, SA de CV.
- Mihai Grumezescu, A., & Maria Holban, A. (2018). Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes. In *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*.
- Mustafa, J., Mourad, A. A. H. I., Al-Marzouqi, A. H., & El-Naas, M. H. (2020). Simultaneous treatment of reject brine and capture of carbon dioxide: A comprehensive review. In *Desalination* (Vol. 483). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2020.114386>

- Noreña-Caro, D., & Benton, M. G. (2018a). Cyanobacteria as photoautotrophic biofactories of high-value chemicals. *Journal of CO2 Utilization*, 28, 335–366. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.10.008>
- Noreña-Caro, D., & Benton, M. G. (2018b). Cyanobacteria as photoautotrophic biofactories of high-value chemicals. In *Journal of CO2 Utilization* (Vol. 28, pp. 335–366). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.10.008>
- Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V., & Sassi, J. F. (2019). Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. In *Marine Drugs* (Vol. 17, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md17110640>
- Olas, B., Bialecki, J., Urbańska, K., & Bryś, M. (2021). The Effects of Natural and Synthetic Blue Dyes on Human Health: A Review of Current Knowledge and Therapeutic Perspectives. In *Advances in Nutrition* (Vol. 12, Issue 6, pp. 2301–2311). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab081>
- Ortiz-Moreno, M. L., Solarte-Murillo, L. V., & Sandoval-Parra, K. X. (2020). Analysis of *Nostoc muscorum* biomass production in a hydroponic system. *Orinoquia*, 24(1), 23–31. <https://doi.org/10.22579/20112629.599>
- Otsuki, T., Shimizu, K., & Maeda, S. (2015). Changes in arterial stiffness and nitric oxide production with Chlorelladerived multicomponent supplementation in middleaged and older individuals. *J. Clin. Biochem. Nutr*, 57(3), 228–232. <https://doi.org/10.3164/jcfn.15586>
- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoa, A., & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 37(3), 422–443. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>
- Paillière-Jiménez, M. E., Stincone, P., & Brandelli, A. (2020). Natural Pigments of Microbial Origin. In *Frontiers in Sustainable Food Systems* (Vol. 4). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.590439>
- Ping Yu Yunting Wu, G. W. T. J., & Zhang, Y. (2017). Purification and bioactivities of phycocyanin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(18), 3840–3849. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668>
- PRTR España. (2021). *CO2 (Dióxido de carbono)*. Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes.
- Rahman, F. A., Aziz, M. M. A., Saidur, R., Bakar, W. A. W. A., Hainin, M. R., Putrajaya, R., & Hassan, N. A. (2017). Pollution to solution: Capture and sequestration of carbon dioxide (CO2) and its utilization as a renewable energy source for a sustainable future.

In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 71, pp. 112–126). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.011>

Rodero, M. del R., Lebrero, R., Serrano, E., Lara, E., Arbib, Z., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2019). Technology validation of photosynthetic biogas upgrading in a semi-industrial scale algal-bacterial photobioreactor. *Bioresource Technology*, 279, 43–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.110>

Rodríguez-Reinoso Silvestre-Albero A Silvestre-Albero M E Casco, F. J., Silvestre-Albero, J., Silvestre-Albero, A., Casco, M. E., & Rodríguez-Reinoso, F. (2014). *Química y Medio Ambiente Panorama y tecnología actual Retos actuales para la captura y almacenamiento de CO 2* (Vol. 110, Issue 1). [www.rseq.org](http://www.rseq.org)

Romay, C., Armesto, J., Ramirez, D., González, R., Ledon, N., & García, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*, 47(1), 36–41. <https://doi.org/10.1007/s000110050256>

Rubio Fernández, D., Alexandra Sierra Herrera, J., Ruiz Fonseca, S., & Andrés Sandoval Herrera, J. (n.d.). *Diseño de un fotobiorreactor Airlift a escala banco Grupo de investigación BIOTECFUA*.

Safar, H., Uldall Nørregaard, P., Ljubic, A., Møller, P., Løvstad Holdt, S., & Jacobsen, C. (2016). Enhancement of Protein and Pigment Content in Two *Chlorella* Species Cultivated on Industrial Process Water. *Journal of Marine Science and Engineering*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/jmse4040084>

SAG. (2007). *Maintenance of cultures*.

Salama, E.-S., Kabra, A. N., Ji, M.-K., Kim, J. R., Min, B., & Jeon, B.-H. (2014). Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones. *Bioresource Technology*, 172, 97–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.002>

Santos Correa, S., Schultz, J., Lauersen, K. J., & Soares Rosado, A. (2023). Natural carbon fixation and advances in synthetic engineering for redesigning and creating new fixation pathways. In *Journal of Advanced Research* (Vol. 47, pp. 75–92). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.07.011>

Sekar, S., & Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20(2), 113–136. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9188-1>

Silveira-Font Yadira AND GÃ-Luna, L. A. N. D. K.-W. M. D. A. N. D. S.-H. D. A. N. D. O.-Dã. Y. (2018). VariaciÃ de la composiciÃ de pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con la aplicaciÃ del campo magnÃ estÃ!`tico. *Revista Cubana de QuÃmica*, 30, 55–67.

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-54212018000100005&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212018000100005&nrm=iso)

- Statista, & Abigail Orús. (2024, May 22). *Nivel promedio de dióxido de carbono (CO2) en la atmósfera entre 1959 y 2023*.
- Suresh, A., Journal of Biotechnology, E., Sharmila, D., Indhumathi, J., Gowtham, K., & Velmurugan, N. (2018). *Impact of various color filtered LED lights on microalgae growth, pigments and lipid production*. [www.biosciencejournals.com](http://www.biosciencejournals.com)
- Tian, F., Buso, D., Wang, T., Lopes, M., Niangoran, U., & Zissis, G. (2018). Effect of Red and Blue LEDs on the Production of Phycocyanin by *Spirulina Platensis* Based on Photosynthetically Active Radiation. *Journal of Science and Technology in Lighting*, 41(0), 148–152. <https://doi.org/10.2150/jstl.ieij160000597>
- VICENTE PATRIARCA EVA in Biochemistry, A. (2023). *Evaluation and optimization of bioprocesses for CO 2 capture and biomass valorization into value-added products by green non-sulfur bacteria: Chloroflexus aurantiacus*.
- Wildman, R. B., & Bowen, C. C. (1974). Phycobilisomes in Blue-Green Algae. In *JouRNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 117, Issue 2). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Y. Shen, W. Yuan, Z. J. Pei, Q. Wu, & E. Mao. (2009). Microalgae Mass Production Methods. *Transactions of the ASABE*, 52(4), 1275–1287. <https://doi.org/10.13031/2013.27771>
- Yadavalli, R., Asuthkar, M., Gunti, Y., Rao, R., & Rao, C. S. (2016). EFFECT OF DIFFERENT WAVELENGTHS OF LIGHT ON THE GROWTH OF CHLORELLA PYRENOIDOSA. *Article in International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(2), 1000–1005. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(2\).1000-05](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(2).1000-05)
- Yan, C., & Zheng, Z. (2014). Performance of mixed LED light wavelengths on biogas upgrade and biogas fluid removal by microalga *Chlorella* sp. *Applied Energy*, 113, 1008–1014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.012>
- Yang, H., Xu, Z., Fan, M., Gupta, R., Slimane, R. B., Bland, A. E., & Wright, I. (2008). Progress in carbon dioxide separation and capture: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 20(1), 14–27. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)60002-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)60002-9)
- Yusuf, M., Shabbir, M., & Mohammad, F. (2017). Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects. In *Natural Products and Bioprospecting* (Vol. 7, Issue 1, pp. 123–145). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13659-017-0119-9>

## 8. ANEXOS

### 8.1. DISOLUCIÓN DE CARBONATOS

Tanto para la prueba abiótica como para el intercambio de medio en el reactor, se preparó una disolución stock de carbonatos de 500 mL que contenía 80 g de  $\text{NaHCO}_3$  y 40 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (para una concentración final de  $160 \text{ g NaHCO}_3 \text{ L}^{-1}$  y  $80 \text{ g Na}_2\text{CO}_3 \text{ L}^{-1}$ ).

Para la operación en el FBR, a cada 937,5 mL de medio ES modificado se añadieron 62,5 mL de la disolución de carbonatos para tener una concentración teórica de carbono inorgánico final de  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 8.2. OPTIMIZACIÓN DE CRECIMIENTO DE NOSTOC MUSCORUM

Además del consorcio de microalgas con la especie *Chlorella sp* dominante, también se trabajó con la cianobacteria *Nostoc Muscorum*.

Se buscó la optimización del crecimiento de *N.Muscorum* con varios medios con diferentes fuentes de carbono (carbono orgánico proveniente de glucosa y extracto de carne, así como carbono inorgánico).

Para ello, se hizo uso de dos medios, el medio ES con la composición de la tabla 3.1. y 3.2. pero sin añadir  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ni  $\text{NaHCO}_3$  y el medio ES modificado añadiendo extracto de carne al 0,1 % en masa.

Para la preparación de los medios se hizo uso de disoluciones stock de 100 mL preparadas con agua tipo II y almacenadas en cámara fría a una temperatura de  $2,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . El pH se ajustó a 7,5 con una disolución de NaOH 6 M.

Se distribuyó el medio en botellas serológicas y matraces de 250 mL de capacidad con 100 mL en cada uno dejando un espacio de cabeza de 150 mL con aire que contiene 0,04%  $\text{CO}_2$ , algunos se taponaron con papel aluminio y otros, con algodón para,

posteriormente, ser esterilizados siguiendo un programa a 121 °C/20 min (líq.) en el equipo de autoclave (JP Selecta, España) y almacenadas en una zona oscura a temperatura ambiente hasta ser usadas.

Para la reactivación de cultivo seco que contenía *Nostoc Muscorum* se hizo uso de placas Petri con un medio ES con una concentración de agar de 15 g L<sup>-1</sup>.

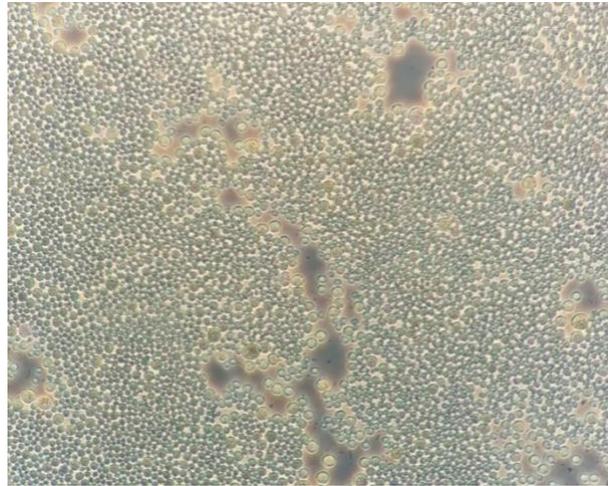
Posteriormente, para llevar a cabo el procedimiento de inoculación, todo el material fue rociado con etanol y colocado en la cámara de flujo laminar esterilizada previamente con radiación ultravioleta (UV) durante 10 minutos. A continuación, con un asa bacteriológica esterilizada con llama se recogieron partes pequeñas de biomasa del medio sólido donde estaba contenida la cianobacteria y se introdujeron en las botellas serológicas y se cerraron con tapones de aluminio.

La inoculación en medio ES sin extracto de carne no dio resultados de crecimiento de la cianobacteria. Por ello, se inocularon botellas nuevas con 0,02 g de glucosa añadido y se sometieron durante 5 días a agitación magnética con velocidad de 250 rpm, una temperatura y una intensidad de luz promedio de  $34 \pm 1,01$  °C y  $308,65 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ , respectivamente. Sin embargo, no se observó crecimiento de la cianobacteria en estas condiciones.

Por otra parte, la inoculación en medio ES modificado con extracto de carne al 0,1 % mostró un crecimiento notorio, especialmente en los matraces cerrados con algodón ya que, al contrario de los tapones de aluminio, el algodón permitía un intercambio de aire con el exterior sustituyendo al aire del espacio de cabeza por otro nuevo permitiendo disponibilidad de CO<sub>2</sub> continuamente. En este caso, los matraces se sometieron a menos intensidad de luz ( $65,255 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ) con una temperatura promedio  $22 \pm 1,05$  °C sin agitación. Después de 24 horas se apreciaba un crecimiento por lo que se dejaron 6 días más.

Finalmente, las botellas de 2,2 L en los que se traspasó el inóculo fueron sometidas durante 6 días a una intensidad de luz media de  $50,4 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  y una temperatura de  $23 \pm 1,00$  °C con agitación constante de 150 rpm antes de pasar el inóculo al FBR.

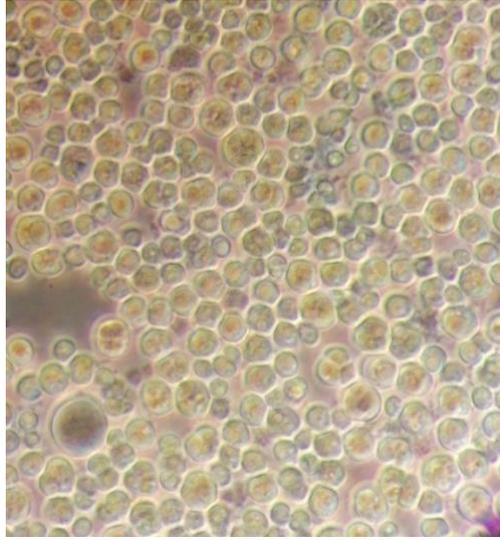
### 8.3. OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO DE MICROALGAS



**Figura 28.** Consorcio de microalgas con especie *Chlorella sp* observado al microscopio amplificada 100x en el día 9 de la operación en FBR



**Figura 29.** Consorcio de microalgas con especie *Chlorella sp* observado al microscopio amplificada 100x en el día 22 de la operación en FBR



**Figura 30.** Consorcio de microalgas con especie *Chlorella sp* observado al microscopio amplificada 100x en el día 53 de la operación en FBR