

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**DISEÑO, CARACTERIZACIÓN, MODELADO Y
OPTIMIZACIÓN DE FOTOBIORREACTORES
DESTINADOS AL CULTIVO DE
MICROALGAS Y LA PRODUCCIÓN DE
METABOLITOS DE INTERÉS
TECNOLÓGICO-BIOLÓGICO**

Rodrigo Jorge Leonardi

Director de Tesis: Heinrich, Josué M.

Co-director de Tesis: Irazoqui, Horacio A.

Lugar de realización: Grupo de Ingeniería de Bioprocesos (GiiB) -
Operaciones y Procesos Biotecnológicos (OPB) - FBCB - UNL

-2019-

Página en blanco intencional

Agradecimientos

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB-UNL), al Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por brindarme la posibilidad de realizar una formación de doctorado. Encontraré la forma de pagar por tantos años de educación gratuita y libre.

A Horacio, por compartir todo su conocimiento científico y de vida ilimitado, por permitirme juzgar su trabajo en charlas y debates, y por darme la posibilidad de realizar actividades de docencia, las cuales disfruto mucho y me animan a superarme día a día.

A Miguel, por ser el disparador de las actividades realizadas y logros alcanzados durante la Tesis, por la paciencia, por la confianza, por darme un lugar y un rol en el equipo, por permitirme llevar a cabo proyectos personales, y por brindarme la posibilidad de formar integrantes del GiiB en tareas académicas.

A Nacho, por el apoyo emocional que siempre me ha brindado, su solidaridad, las charlas de vida, y por la formación académica recibida durante las primeras etapas en el GiiB.

A Manu y Mati, primero compañeros, luego colegas, y al día de hoy amigos. Gracias por su apoyo en situaciones de desborde, por dejarme en tierra y permitirme comprender que no todo es irreversible, y que muchas veces lo que uno piensa que son problemas, son oportunidades. Por su trabajo colaborativo en equipo, enriquecedor de donde se lo mire.

A todos los chicos del GiiB (Ludmi, Nadia, Vicky, Yami, Juan, Keki, Tulio) por los momentos divertidos, por confiar que podía ayudarlos con el oído y la opinión para resolver problemas de su vida personal, por permitirme aconsejarlos en su vida profesional, y por darme consejos y apoyo en mis momentos. Muy agradecido de compartir tiempo con ustedes.

Al grupo de los “Los pibes”, por la impagable amistad larga y duradera de estos años, y que sé que continuará por mucho más. Pese a la distancia y las actividades de cada uno, cuando se necesita algo hay un grupo que hará todo lo posible por ayudarte.

A mis padres, Jorge y Laura, por apoyarme siempre en todas las decisiones de vida que he tomado, por estar siempre disponibles en las cosas del día a día. Todo se resume en una frase, tengo unos padres increíbles. Saludos especiales a mis tíos Ester y Jorge, y a mi prima Macarena, por la preocupación diaria, el apoyo, y los consejos.

A Sofía, por mostrarme que existen aspectos importantes en la vida los cuales no estaba abordando por miedo o por el estilo de vida que llevaba, por los innumerables debates acerca del carácter y las personalidades de las personas, sociales y políticos, por escuchar mis expresiones emocionales de frustración o cansancio en los viajes de fin de semana, por permitirme conocer el mundo sin siquiera organizar una maleta, todas cosas que han hecho que al día de hoy pueda decir que estoy en equilibrio. Gracias por llenar completamente los vacíos de felicidad en mi interior y ser mi luz guía. Disfruto cada instante que tengo a tu lado.

Publicaciones

- RJ Leonardi, MV Ibáñez, MN Morelli, HA Irazoqui, JM Heinrich (2019) Influence of light stratification on the growth of *Scenedesmus quadricauda*. *Biochem. Eng. J.* 148: 97-107.
- RJ Leonardi, I Niizawa, HA Irazoqui, JM Heinrich (2018) Modeling and simulation of the influence of fractions of blue and red light on the growth of the microalga *Scenedesmus quadricauda*. *Biochem. Eng. J.* 129: 16-25.
- I Niizawa, BY Espinaco, RJ Leonardi, JM Heinrich, GA Sihufe (2018) Enhancement of astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under autotrophic growth conditions by a sequential stress strategy. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 48(6): 528-534.
- I Niizawa, RJ Leonardi, HA Irazoqui, JM Heinrich (2016) Light wavelength distribution effects on the growth rate of *Scenedesmus quadricauda*. *Biochem. Eng. J.* 126: 126-134.

Índice

Abreviaturas y Símbolos	(vii)
Resumen	(xv)
Abstract	(xvi)
Introducción	(1)
(1).- MICROALGAS	2
(2).- FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA EN EUCARIOTAS	2
(3).- USOS Y APLICACIONES DE MICROALGAS	5
(4).- REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES Y CONDICIONES DE CULTIVO	10
(5).- SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE ALGAS	11
Objetivos	(18)
Capítulo (1): Caracterización de una fuente artificial de energía radiante: Diodos emisores de luz (LEDs).	(19)
(1).- RESUMEN	20
(2).- INTRODUCCIÓN	20
(3).- OBJETIVOS	21
(4).- MATERIALES Y MÉTODOS	21
(4.1).- LEDs	21
(4.2).- Distribución direccional de emisión	22
(4.3).- Distribución espectral de emisión	23
(4.5).- Flujo de fotones	23
(4.6).- Algoritmos computacionales	24
(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
(5.1).- La transferencia de energía radiante	24
(5.2).- Distribución direccional de emisión	27
(5.3).- Distribución espectral de emisión	28
(5.4).- Flujo de fotones	29
(6).- CONCLUSIONES	33
Capítulo (2): Modelado físico-matemático del campo de radiación en suspensiones de microalgas: Simulación a través de la metodología de Monte Carlo.	(34)
(1).- RESUMEN	35
(2).- INTRODUCCIÓN	35
(3).- OBJETIVOS	36
(4).- MATERIALES Y MÉTODOS	36
(4.1).- Algoritmos computacionales e <i>inputs</i>	36
(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36

(5.1).- Fundamentos de la simulación MC y estructura de los algoritmos computacionales	36
(5.1.1).- Elección del modelo de LED, la dirección y la longitud de onda λ del fotón emitido.	38
(5.1.2).- Reflexión y refracción del fotón en las fronteras del FBR	40
(5.1.3) Fotón dentro de la suspensión de microalgas	41
(6).- CONCLUSIONES	45
Capítulo (3): Modelado y simulación de la influencia de las fracciones de luz azul y roja sobre el crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus quadricauda</i> .	(46)
(1).- RESUMEN	47
(2).- INTRODUCCIÓN	47
(3).- OBJETIVOS	48
(4).- MATERIALES Y MÉTODOS	48
(4.1).- Cepa e inóculos para ensayos en FBRs	48
(4.2).- FBRs y condiciones de cultivo	49
(4.3).- Fuente de radiación	49
(4.4).- Determinaciones experimentales	51
(4.5).- Modelado y simulación del CER en la suspensión de algas	51
(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
(5.1).- Crecimiento y contenido de pigmentos fotosintéticos	52
(5.2).- Análisis del CER en el FBR	54
(6).- CONCLUSIONES	60
Capítulo (4): Influencia de la estratificación de luz sobre el crecimiento de <i>Scenedesmus quadricauda</i> .	(61)
(1).- RESUMEN	62
(2).- INTRODUCCIÓN	62
(3).- OBJETIVOS	63
(4).- MATERIALES Y MÉTODOS	63
(4.1).- Cepa e inóculo para ensayos en FBR	63
(4.2).- FBR y condiciones de cultivo	63
(4.3).- Fuente de radiación	64
(4.4).- Determinaciones experimentales	65
(4.5).- Modelado y simulación del CER en la suspensión de algas	65
(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
(5.1).- Crecimiento y contenido de pigmentos fotosintéticos	65
(5.2).- Análisis del CER en el FBR	67
(5.3).- Análisis de la influencia del grado de estratificación de luz sobre el crecimiento	74
(6).- CONCLUSIONES	77
APÉNDICE (A4): Propiedades de la función $g(r_{PAR})$	78

Capítulo (5): Un enfoque para estimar la productividad de fotobiorreactores (FBRs) 1: Bases y Fundamentos.	(80)
(1).- RESUMEN	81
(2).- INTRODUCCIÓN	82
(3).- OBJETIVOS	82
(4).- MATERIALES Y MÉTODOS	83
(4.1).- Radiación solar	83
(4.2).- Reactor outdoor columna de burbujeo	84
(4.3).- Reactor comercial de laboratorio	85
(4.4).- Fuente de energía radiante	86
(4.5).- Simulación computacional	86
(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
(5.1).- Posición del sol durante el transcurso del año	88
(5.2).- Radiación solar: conversión de unidades de energía a fotones y fracción PAR	88
(5.3).- Perfiles de intensidad de luz solar directa y difusa	91
(5.4).- Radiación solar que llega al FBR	94
(5.5).- Simulación de las condiciones de iluminación outdoor a escala laboratorio	96
(5.5.1).- Aspectos constructivos del módulo de iluminación	96
(5.5.2).- Aspectos del control de la luz emitida por el módulo LED	97
(5.5.3).- Intercambio de radiación: módulo LED-Infors HT	98
(5.6).- CER: Reactor <i>outdoor</i> vs reactor laboratorio	99
(6).- CONCLUSIONES	102
APÉNDICE (A5.1): Posición del sol durante el año para un sitio de la tierra	103
APÉNDICE (A5.2): Efecto de la composición direccional de la luz solar	107
APÉNDICE (A5.3): Distribución de radiación en la pared del Infors HT y Qv	108
Capítulo (6): Un enfoque para estimar la productividad de fotobiorreactores (FBRs) 2: <i>Haematococcus pluviialis</i> en condiciones de iluminación outdoor.	(111)
(1).- RESUMEN	112
(2).- INTRODUCCIÓN	112
(3).- OBJETIVOS	114
(4).- MATERIALES Y MÉTODOS	114
(4.1).- Perfiles de radiación outdoor	114
(4.2).- Fuente de iluminación PAR	114
(4.3).- Cepa, mantenimiento e inóculo para ensayos en FBR	114
(4.4).- Cultivo de <i>H.pluviialis</i> en FBR	115
(4.4).- Determinaciones experimentales	116
(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	117

(5.1).- Simulación de las condiciones de iluminación outdoor	117
(5.2).- Cultivos de <i>H.pluvialis</i> bajo condiciones de iluminación outdoor	118
(5.2.1).- Crecimiento y ciclo de vida	119
(5.2.2).- Clorofilas (Chls) y carotenoides (Cars)	122
(5.2.3).- Nitrato (NO ₃ ⁻)	124
(5.2.4).- Análisis del efecto del diámetro del FBR sobre los perfiles de Qv	124
(6).- CONCLUSIONES	126
Conclusiones y Perspectivas a Futuro	(127)
Bibliografía	(131)

Abreviaturas y Símbolos

Abreviaturas

3G	combustible de tercera generación
A	superficie [m ²]
V	volumen [m ³] [L]
A/V	relación área - volumen [m ⁻¹]
ASTM	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (<i>American Society for Testing and Materials</i>)
BBM, 3N-BBM	Bold Basal Medium, medio BBM con 3 veces el contenido original de NO ₃ ⁻
Car	carotenoides
CCAP	Culture Collection of Algae and Protozoa
CCD	dispositivo de carga acoplada (<i>Charge Coupled Device</i>)
CER	campo de energía radiante / campo de radiación
Chls, Chl a, Chl b	clorofilas, clorofila a, clorofila b
CIM	Centro de Informaciones Meteorológicas (FICH-UNL)
CR	centro de reacción del fotosistema
ETR	ecuación de transferencia radiativa
FBR	fotobiorreactor
Fd	ferredoxina
GiiB	Grupo de Ingeniería de Bioprocesos
HTL	licuefacción hidrotérmica
LED	diodo emisor de luz (<i>Light-Emitting Diode</i>)
LHC	complejo de pigmentos de captación de luz del PS / antena del PS
mBBM, 3N-mBBM	Bold Basal Medium modificado, mBBM con 3 veces el contenido original de NO ₃ ⁻
MC	Monte Carlo
PAR	radiación fotosintéticamente activa (<i>Photosynthetically Active Radiation</i>), 400 ≤ λ ≤ 700 [nm]
PFD	densidad de flujo de fotones [μmol s ⁻¹ m ⁻²]
PQ	plastoquinona
ps	peso en base seca
PS, PSI, PSII	fotosistema, fotosistema I, fotosistema II
PTLC	Parque Tecnológico Litoral Centro
PWM	modulación de ancho de pulso (<i>Pulse Width Modulation</i>)

RGB	LEDs multicolor rojo-verde-azul (<i>Red-Green-Blue</i>)
RuBisCO	Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa – Oxigenasa
SMARTS	Modelo simple para la transferencia radiativa atmosférica de la luz solar (<i>Simple Model of the Atmospheric Radiative Transfer of Sunshine</i>)
SST	sólidos suspendidos totales
UV	radiación ultravioleta del espectro electromagnético
VIS	radiación visible del espectro electromagnético, $400 \leq \lambda \leq 700$ [nm]
vvm	volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto

Capítulo (1)

λ	longitud de onda de la radiación [nm]
t	tiempo [s]
θ	ángulo polar
φ	ángulo acimutal
μ	coseno del ángulo polar θ , $\cos(\theta)$
N_λ	número de fotones con longitud de onda λ [μmol]
n_λ	intensidad de radiación de un haz de fotones con longitud de onda λ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{sr}^{-1}$]
$\hat{\underline{Q}}$	vector unitario que describe la dirección de movimiento
r	distancia entre las superficies que intercambian energía radiante [m]
\underline{r}	vector posición, describe la posición en el espacio
\hat{n}	vector unitario normal a una superficie
c	velocidad de la luz en el vacío [m s^{-1}]
h	constante de Planck [Joule s]
$q_{\lambda,w}, q_{\lambda,f}$	densidad espectral de flujo de fotones [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{nm}^{-1}$] o de energía [Joule $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{nm}^{-1}$]
Q_λ	flujo espectral de fotones [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{nm}^{-1}$]
E_θ, E_φ	función de distribución direccional de LEDs, en términos del ángulo polar θ y del acimutal φ
$E_{\lambda,w}(\lambda), E_{\lambda,f}(\lambda)$	función de distribución espectral de LEDs, en términos de energía o de fotones [nm^{-1}]
A_D	área del detector de energía radiante (radiómetro) [m^2]
\underline{v}	vector posición de un elemento de superficie definido sobre la superficie del detector
$ \underline{v} $	módulo del vector \underline{v}

Capítulo (2)

t	tiempo [s]
λ	longitud de onda de la radiación [nm]
$\hat{\underline{\Omega}}$	vector unitario que describe la dirección de movimiento
\underline{r}	vector posición, describe la posición en el espacio
\hat{n}	vector unitario normal a una superficie
θ	ángulo polar
φ	ángulo acimutal
μ	coseno del ángulo polar θ , $\cos(\theta)$
N_λ	número de fotones con longitud de onda λ [μmol]
n_λ	intensidad de radiación de un haz de fotones con longitud de onda λ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{sr}^{-1}$]
α_λ	coeficiente de absorción espectral [mm^{-1}]
ε_λ	coeficiente de <i>scattering</i> / dispersión espectral [mm^{-1}]
$B(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}')$	función de fase de <i>scattering</i> / dispersión
$p_{\lambda, \hat{\underline{\Omega}}}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$	densidad del número local de fotones con longitud de onda λ , y con trayectoria a través de la posición \underline{r} en la dirección $\hat{\underline{\Omega}}$ [$\mu\text{mol m}^{-3} \text{nm}^{-1} \text{sr}^{-1}$]
$e_\lambda(\underline{r}, t)$	densidad local de fotones con longitud de onda λ alrededor de la posición \underline{r} [$\mu\text{mol m}^{-3} \text{nm}^{-1}$]
$r_\lambda(\underline{r}, t)$	velocidad volumétrica espectral local de absorción de fotones [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-3} \text{nm}^{-1}$]
$n_\lambda(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$	intensidad de radiación asociada a un haz de fotones con longitud de onda λ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{sr}^{-1}$]
$q_\lambda(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$	densidad espectral de flujo de fotones en la posición \underline{r} [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{nm}^{-1}$]
δ	número aleatorio en el intervalo $0 \leq \delta \leq 1$
$E_{\lambda, f}(\lambda)$	función de distribución espectral de LEDs en términos del número de fotones [nm^{-1}]
$P(\theta), P(\varphi), P(\lambda)$	probabilidades para la dirección del fotón emitido y la longitud de onda λ
\hat{e}_i	vectores unitarios accesorios
n_i	índice de refracción del medio i
$\rho_{i, j}$	reflectividad en la interface entre los medios i y j
$T_{i, j}$	transmisividad en la interface entre los medios i y j
σ_i	ángulo de incidencia, reflexión o refracción en el medio i
$P(A)$	probabilidad de absorción del fotón
$P(D)$	probabilidad de <i>scattering</i> / dispersión del fotón

$P(NA,ND)$	probabilidad de que no se produzca absorción ni <i>scattering</i> / dispersión del fotón
$S_{L,M}$	camino medio esperable / camino libre medio
ΔS	distancia que avanza el fotón en la suspensión de microalgas

Capítulo (3)

(A)	luz azul
(R)	luz roja
\underline{r}	posición en el FBR
H	distancia en el FBR, tomando como referencia la base del reactor [mm]
R	distancia en el FBR, tomando como referencia el centro del reactor [mm]
t	tiempo [s]
λ	longitud de onda de la radiación [nm]
x	concentración de biomasa [mg L^{-1}]
r_x	velocidad de crecimiento de la biomasa [$\text{mg h}^{-1} \text{L}^{-1}$]
Q_v	flujo de fotones volumétrico [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]
α_λ	coeficiente de absorción espectral [mm^{-1}]
ε_λ	coeficiente de <i>scattering</i> / dispersión espectral [mm^{-1}]
$B(\underline{\hat{\Omega}} \cdot \underline{\hat{\Omega}}')$	función de fase de <i>scattering</i> / dispersión
$r_\lambda(\underline{r}, t)$	velocidad volumétrica espectral local de absorción de fotones [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1} \text{nm}^{-1}$]
$r_{PAR}(\underline{r}, t)$	velocidad volumétrica local de absorción de fotones PAR [$\mu\text{mol dia}^{-1} \text{L}^{-1}$]
$\langle r_{PAR} \rangle$	velocidad volumétrica promedio de absorción de fotones PAR [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]
Φ_{FBR}	biomasa generada con la radiación suministrada al FBR [$\text{mg } \mu\text{mol}^{-1}$]
$\Phi_{ABS}, \Phi_{ABS}^A, \Phi_{ABS}^R$	rendimiento fotosintético / eficiencia fotosintética, biomasa generada a partir de la radiación total absorbida [$\text{mg } \mu\text{mol}^{-1}$]
r_x^{TEO}	velocidad de crecimiento de la biomasa predicha asumiendo un modelo de absorción de radiación sin interacción entre los colores de luz [$\text{mg dia}^{-1} \text{L}^{-1}$]
r_x^{EXP}	velocidad de crecimiento de la biomasa calculada con las mediciones experimentales de SST [$\text{mg dia}^{-1} \text{L}^{-1}$]

Capítulo (4)

(LS)	configuración de LEDs que inducen una menor estratificación de la luz
(HS)	configuración de LEDs que inducen una mayor estratificación de la luz
\underline{r}	posición en el FBR
H	distancia en el FBR, tomando como referencia la base del reactor [mm]

R	distancia en el FBR, tomando como referencia el centro del reactor [mm]
α_λ	coeficiente de absorción espectral [mm^{-1}]
ε_λ	coeficiente de <i>scattering</i> / dispersión espectral [mm^{-1}]
$B(\underline{\hat{\Omega}} \cdot \underline{\hat{\Omega}}')$	función de fase de <i>scattering</i> / dispersión
t	tiempo [s]
λ	longitud de onda de la radiación [nm]
Δt	duración de cada etapa de la metodología de cultivo
V	volumen del reactor [L]
x	concentración de biomasa [gr L^{-1}]
\bar{x}	promedio temporal de la concentración de biomasa [gr L^{-1}]
r_x	velocidad de crecimiento de la biomasa [$\text{gr día}^{-1} \text{L}^{-1}$]
\bar{r}_x	promedio temporal de la velocidad de crecimiento de la biomasa
ΔV	volumen de suspensión de algas retirado del FBR al final de cada etapa Δt [L]
μ	velocidad de crecimiento específica de la biomasa [día^{-1}]
$r_\lambda(\underline{r}, t)$	velocidad volumétrica espectral local de absorción de fotones [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1} \text{nm}^{-1}$]
$r_{PAR}(\underline{r}, t)$	velocidad volumétrica local de absorción de fotones PAR [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$]
$\langle r_{PAR} \rangle$	velocidad volumétrica promedio de absorción de fotones PAR obtenida de MC [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]
$g(r_{PAR})$	función de distribución del volumen del medio que absorbe a lo largo de los valores de r_{PAR}
$G(r_{PAR})$	función de distribución acumulada del volumen del medio que absorbe a lo largo de los valores de r_{PAR}
$\delta(r_{PAR} \rightarrow 0^+)$	“función” Delta de Dirac
β	parámetro de ajuste de $g(r_{PAR})$
k	parámetro de ajuste de $g(r_{PAR})$, y refiere a la fracción del volumen a oscuras del FBR
r_{PAR}^{AV}	promedio estadístico para r_{PAR} , obtenido de $g(r_{PAR})$ [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$]
$r_{PAR}^{AV,SP}$	velocidad específica promedio de absorción de fotones PAR obtenido de $g(r_{PAR})$ [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{gr}^{-1}$]
$\sigma_{r_{PAR}}$	desviación estándar de $g(r_{PAR})$ [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$]
$\sigma_{r_{PAR}}^2$	varianza de $g(r_{PAR})$ [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$] ²
Φ_{ABS}	rendimiento fotosintético / eficiencia fotosintética, biomasa generada a partir de la radiación total absorbida [$\text{gr } \mu\text{mol}^{-1}$]

Capítulo (5)

(S), (N), (O), (E)	Puntos cardinales de orientación, Sur - Norte - Oeste - Este
(R)	Coordenada radial de un sistema de referencia local
λ	longitud de onda de la radiación [nm]
L	longitud geográfica de un sitio de la tierra
γ	latitud geográfica de un sitio de la tierra
T_{LA}	tiempo local aparente
T_{LM}	tiempo local medio
E_t	“ecuación del tiempo”
L_R	longitud geográfica correspondiente al uso horario
$\{e_1, e_2, e_3\}$	sistema de referencia ecuatorial
$\{e'_1, e'_2, e'_3\}$	sistema de referencia de la eclíptica
$\{x_1, x_2, x_3\}$	sistema de referencia accesorio
$\{N, E, R\}$	sistema de referencia local (N) - (E) - (R)
\hat{X}_i, \hat{x}_i	versor i de un sistema de coordenadas
d	día del año
\hat{s}	vector posición del sol, respecto al centro de la tierra o a un sitio de interés
β, ε, ϕ	ángulos accesorios para definir la posición del sol
α	ángulo de elevación solar (altitud)
φ	ángulo acimutal (azimut)
ω	ángulo horario
θ_z	ángulo cenital (zenit)
δ	ángulo de declinación solar
t	tiempo [s] [hs]
\underline{r}	vector posición
$q_w(\underline{r}, t)$	radiación solar global [Joule s ⁻¹ m ⁻²]
$q_w^D(\underline{r}, t)$	radiación solar directa [Joule s ⁻¹ m ⁻²]
$q_w^d(\underline{r}, t)$	radiación solar difusa [Joule s ⁻¹ m ⁻²]
$q_{\lambda,w}(\underline{r}, t), q_{\lambda,f}(\underline{r}, t)$	densidad espectral de energía o de flujo de fotones [Joule s ⁻¹ m ⁻² nm ⁻¹] [μ mol s ⁻¹ m ⁻² nm ⁻¹]
$E_{\lambda,w}(\lambda), E_{\lambda,f}(\lambda)$	función de distribución espectral solar en energía o fotones [nm ⁻¹]
f_{VIS}	radiación VIS que llega al detector, respecto a la radiación total
$q_{VIS,w}, q_{VIS,f}$	densidad de energía o de flujo de fotones con longitud de onda λ en el rango VIS, [Joule s ⁻¹ m ⁻² nm ⁻¹] [μ mol s ⁻¹ m ⁻² nm ⁻¹]

$I_{\lambda}^p, I_{\lambda}^d$	intensidad espectral de la radiación solar directa o difusa [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{sr}^{-1}$]
I_{VIS}^p, I_{VIS}^d	intensidad de la radiación solar VIS directa o difusa, [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{sr}^{-1}$]
$\delta(\hat{\underline{\Omega}})$	“función” Delta de Dirac
$H(\hat{\underline{\Omega}})$	función escalón unitario o función de Heaviside
$\hat{\underline{\Omega}}$	vector unitario que describe la dirección de movimiento
$\hat{\underline{n}}$	vector unitario normal a una superficie
μ	coseno del ángulo polar θ , $\cos(\theta)$
k	fracción de la radiación solar que es de naturaleza directa
$(\hat{\underline{x}} \cdot \hat{\underline{y}})$	producto escalar entre los vectores unitarios $\hat{\underline{x}}$ y $\hat{\underline{y}}$
h	altura en el reactor [m]
Q	flujo de fotones [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]
Q_v	flujo de fotones volumétrico [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]
$Q_{V,Max}$	flujo de fotones volumétrico sobre el reactor de laboratorio, producto de operar el módulo LED al 100% de su capacidad [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]
[P]	pantalla del módulo de iluminación LED
C	caras del módulo de iluminación LED
r_{FBR}	radio del reactor [m] [cm]
V_{FBR}	volumen del reactor [L]
$r_{PAR}(r, t)$	velocidad volumétrica local de absorción de fotones PAR [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]
$\langle r_{PAR} \rangle$	velocidad volumétrica promedio de absorción de fotones PAR, obtenida con MC [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]
$\langle r_{PAR}^{SP} \rangle$	velocidad específica promedio de absorción de fotones PAR, obtenida con MC [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]
$\langle q_{FBR} \rangle$	densidad de flujo de fotones promedio sobre la pared del reactor
A_{FBR}	área del vaso del reactor (cilindro)
Q_{LEDs}	flujo de fotones emitido por el módulo LED operando al 100%
f_p	fracción de fotones que pegan en la pared del reactor
$q_{FBR}(\underline{r})$	densidad de flujo de fotones alrededor de la posición \underline{r}
$n_{VIS}(r, \hat{\underline{\Omega}}, t)$	intensidad de radiación VIS asociada a un haz de fotones [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{sr}^{-1}$]
α_{λ}	coeficiente de absorción espectral [mm^{-1}]
ε_{λ}	coeficiente de <i>scattering</i> / dispersión espectral [mm^{-1}]
$B(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}})$	función de fase de <i>scattering</i> / dispersión

Capítulo (6)

(M)	células móviles y zoosporas, sin distinción
(NM)	células no móviles, comúnmente denominadas “palmellas”
(A)	aplanosporas
L:O	ciclo diurno de luz / fotoperíodo, luz: oscuridad
t	tiempo [hs] [días]
Q_v	flujo de fotones volumétrico [$\mu\text{mol hs}^{-1} \text{L}^{-1}$]
$Q_{v,Max}$	mayor valor de flujo de fotones volumétrico [$\mu\text{mol hs}^{-1} \text{L}^{-1}$]
μ	velocidad de crecimiento específica de la biomasa [día^{-1}]
r_x	velocidad de crecimiento de la biomasa [$\text{mg L}^{-1} \text{día}^{-1}$]
\bar{x}	promedio temporal de la concentración de biomasa [mg L^{-1}]
C/N	relación carbono - nitrógeno
N/P	relación nitrógeno - fósforo
rNO_3^-	velocidad de consumo de nitrato [$\text{mg L}^{-1} \text{día}^{-1}$]

Resumen

La biotecnología aplicada al cultivo de microalgas crece a pasos agigantados, producto de que la composición de la biomasa puede ser adaptada a fines específicos, entre los más destacados, alimentación humana y abastecimiento de energía para garantizar la seguridad social. Si bien se cultivan microalgas a escala industrial, las productividades y eficiencias alcanzadas se encuentran muy por debajo de las teóricas, y las obtenidas en laboratorio. La energía radiante es considerada el factor más influyente en el crecimiento de organismos fotosintéticos, y es utilizada como parámetro en las etapas de síntesis y escalado de bioprocesos.

En la presente Tesis se propone estudiar los efectos de la calidad, la cantidad y la distribución de la radiación sobre la conducta de suspensiones de microalgas en fotobiorreactores. A través de ensayos de laboratorio, en condiciones de iluminación diseñadas y controladas, se puede obtener información (experimental y computacional, producto del modelado del campo de energía radiante) acerca de la conducta de las microalgas en sistemas de cultivo *outdoor*. Se dedica especial atención al desarrollo de herramientas predictivas, basadas en simulación computacional y cultivo en laboratorio, de la performance de reactores de mayor escala iluminados con luz solar, una energía renovable de costo nulo. Contar con metodologías de laboratorio rápidas y precisas, para estimar la productividad de cepas de microalgas en reactores varios, permite evitar gastos de tiempo y dinero asociados al diseño, puesta en funcionamiento y escalado de bioprocesos.

Abstract

Microalgae biotechnology has achieved significant advances over the last years, due to its interest as a source of molecules used in pharmaceutical, cosmetic and food industry, or alternative energy production. Although microalgae are grown at industrial scale at present, the productivity and efficiency achieved are well below than the theoretical ones, and those obtained at laboratory scale. Radiant energy is considered the most important factor for photosynthetic organism growth, and it is used as a key parameter in the scaling up stage of bioprocesses.

We studied the effect of light quality, quantity and distribution on microalgae growth inside photobioreactors. Under controlled lighting conditions, we could obtain experimental and computational information (by modelling of radiant energy field) about the behavior of microalgae in outdoor culture systems. We specially focused at predictive tools development to improve the large-scale reactors performance illuminated with sunlight. Fast and precise laboratory methodologies to estimate the productivity of microalgae strains in photobioreactors avoids spending time and money for design, commissioning, and scaling up of bioprocesses.

INTRODUCCIÓN

(1).- MICROALGAS

Las microalgas fueron evolutivamente los primeros organismos en adquirir la capacidad de realizar fotosíntesis, y tuvieron un rol principal en la creación de las condiciones de la atmósfera terrestre actual. Son uno de los productores primarios más importantes en la cadena trófica, contribuyendo con el 50% de la fotosíntesis del planeta [1, 2], por lo que se las considera agentes del equilibrio planetario. Las microalgas pueden habitar, colonizar y propagarse en una amplia variedad de sitios, entre los cuales se destacan agua dulce y salada, rocas, desiertos, zonas polares, etc. La cualidad de que una misma especie habite sitios de la biósfera con condiciones ambientales muy diferentes implica una marcada capacidad de adaptación.

La Ficología (del griego ficos = alga) o Algología, es la disciplina de la Botánica que estudia las algas, tanto macroscópicas como microscópicas. En una primera instancia las algas son clasificadas por su organización celular, en eucariotas y procariotas. Las procariotas carecen de organelas dotadas de membranas. Actualmente, para la clasificación de las algas eucariotas se utilizan diversos criterios [3], entre ellos:

- Bioquímicos: naturaleza y cantidad de pigmentos fotosintéticos presentes, naturaleza química de las sustancias de reserva y composición de la pared celular.
- Citológicos: presencia, tipo y posición de los flagelos.
- Ultraestructurales: caracteres estrechamente relacionados con los procesos de evolución de las células: estructura y número de membranas de los cloroplastos y aspectos relacionados con la división celular.
- Moleculares: comparación y análisis de secuencias de DNA y ARN que permiten construir árboles filogenéticos que muestren las relaciones de parentesco entre los grupos.

(2).- FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA EN EUCARIOTAS

En algas eucariotas la fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos, que son plástidos especializados dotados de vesículas membranosas denominadas tilacoides (ver la Fig. (1A)), sitio donde se ensambla el aparato fotosintético (denominadas “supercomplejos”). Para que se realice fotosíntesis activa, la microalga debe contar con agua (H_2O), cuya función es el suministro de electrones (e^-), con dióxido de carbono (CO_2) como fuente de carbono (C) y con la energía de la luz.

(2.1).- Reacciones de captación de energía radiante

Las reacciones de luz fotosintéticas de plantas superiores y algas tienen lugar en los fotosistemas I (PSI) y II (PSII), los cuales se componen de un centro de reacción (CR), y de complejos de pigmentos de captación de luz / antenas (LHCs), inmersos en la membrana tilacoidal.

La absorción de fotones involucra cromóforos (clorofilas (Chls), y carotenoides (Car) como luteína, violaxantina, neoxantina, zeaxantina, etc.), unidos a polipéptidos / proteínas específicas (cromóforo + polipéptido = pigmento). Las proteínas, codificadas en el genoma nuclear y sintetizadas en el citosol,

alteran las propiedades de absorción de los cromóforos (respecto a su estado libre), y facilitan la transferencia de la energía de excitación del fotón absorbido (excitón) a un complejo de pigmentos del CR, donde tiene lugar la transformación de la energía del excitón en energía química (ver la Fig. (1B)). Las antenas actúan como un embudo, permitiendo una gran superficie de captación de fotones al servicio del CR. El transporte energético, denominado transferencia de energía de excitación por resonancia (Förster), depende de la cercanía de los pigmentos (10-100 Å), la orientación (momentos dipolares) y los niveles de excitación-emisión de los donantes y aceptores. Dentro de las antenas, las Chls que absorben fotones de mayor energía (menor λ , ecuación de Planck) se ubican en las zonas más periféricas. Esta disposición asegura que la transferencia de energía sea unidireccional, hacia el CR. Se estima que el tiempo medio de transferencia de un excitón al CR es del orden de 10^{-10} s, con una eficiencia del 90%. Las Chls de las antenas no tienen la capacidad de liberar un e^- cuando absorben un fotón.

Se distinguen dos tipos de antenas del PSII, de acuerdo a la posición y distancia respecto al CR: i) periféricas / externas, las cuales se componen de Chl a y Chl b en una relación de 1.35 y de 4 complejos (LHC-IIa, LHC-IIb; LHC-IIc y LHC-IId). Son las más extensas, y abundan polipéptidos LHC-IIb arreglados en forma de trímeros, algunos con la capacidad de moverse y servir de fotones al PSI, tal que regular la distribución de energía (flujo) que recibe cada PS; ii) internas (CP43, CP47), conformadas principalmente por Chls (10-15), con una relación Chl a/Chl b de aprox. 4.

El PSI también cuenta con sus propias antenas, con una organización similar a las del PSII y compuestas por la misma superfamilia de proteínas.

La alteración de los LHCs, en términos de su composición y organización, producto de diferentes calidades y cantidades de luz absorbida, se analiza y fundamenta en los Capítulos (3) y (4) de la presente Tesis.

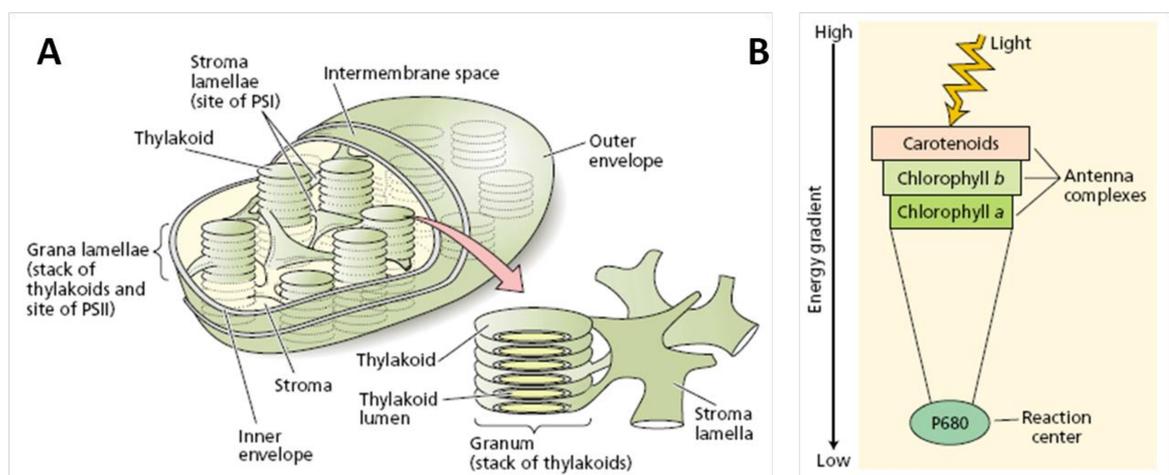


Figura (1). A) Organización de las membranas tilacoides dentro del cloroplasto. B) Esquemización de la organización del aparato fotosintético de algas verdes y plantas superiores (Figuras modificadas de Taiz y Zeiger, 2003 [4]).

Los CRs absorben fotones con longitudes de onda λ mayores que los LHCs. En el caso de la fotosíntesis oxigénica, los CRs usan el pico de absorción en la región roja del espectro visible (VIS) de la Chl a, a 680 nm en el PSII (P680), y a 700 nm en el PSI (P700). Esto produce una pérdida del 20-21% de la energía contenida por haces de luz con longitudes de onda λ más cortas [5]. El CR está conformado por polipéptidos (D1, D2) que unen pocos cromóforos, y una cantidad considerable de cofactores. Entre los cromóforos se destacan dos moléculas de Chl a, íntimamente ligadas, tanto que sus orbitales moleculares se solapan (“par especial de Chls”). Las Chls a pueden captar fotones directamente, pero suelen ser energizadas indirectamente por las antenas. La molécula de Chl a excitada en el CR rápidamente dona un e^- a un compuesto intermediario aceptor de electrones, como lo es la plastoquinona (PQ) para el PSII y la ferredoxina (Fd) para el PSI. Una carga positiva (+) neta resultante acompaña a la Chl del par especial. Como el sistema debe ser eléctricamente neutro, la carga + es suprimida por e^- provenientes del H_2O . La Chl P680 es el compuesto biológico más oxidante que se conoce, de ahí su capacidad de extraer e^- del H_2O (fotólisis del agua), con la consecuente generación de oxígeno (O_2) mediante un complejo asociado al PSII.

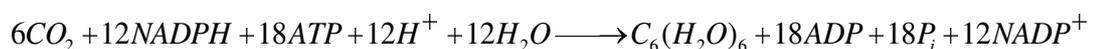
El flujo lineal de e^- entre los dos PSs produce la generación de una fuerza protón motriz, que resulta en la síntesis de ATP y en la conversión de la forma oxidada de $NADP^+$ a la reducida de la coenzima, NADPH. La Fig. (2A) muestra detalladamente los intermediarios presentes en la etapa lumínica de la fotosíntesis.

(2.2).- Reacciones de fijación de CO_2

La reacción que fija CO_2 en los carbohidratos es catalizada por la enzima Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa (RubisCO), localizada en el estroma de los cloroplastos. La enzima añade CO_2 al azúcar de cinco carbonos ribulosa 1,5 bisfosfato, resultando dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Dado que la velocidad de la reacción es lenta, se necesitan múltiples copias de la enzima para fijar suficiente CO_2 . El destino del 3-fosfoglicerato es complejo, una parte se convierte en sacarosa o almidón y el resto se utiliza para la regeneración del azúcar de partida de cinco carbonos. Las reacciones involucradas en la fijación de CO_2 , y en la generación y conversión de azúcares, se las suele denominar como “Ciclo de Calvin-Benson”. Para dicho proceso se utiliza el ATP y NADPH, previamente generados en presencia de energía radiante. Muchas de las enzimas del ciclo son reguladas por la calidad y cantidad de la luz absorbida.

Por último, cabe destacar que el fenómeno fotosintético puede verse acompañado de un proceso denominado fotorespiración, en el cual una molécula de O_2 es unida a la ribulosa 1,5 bisfosfato, resultando en una molécula de 3-fosfoglicerato y una de fosfoglicolato. La fotorespiración conduce a un derroche de energía, ya que consume ATP, O_2 y genera CO_2 .

La ecuación global de la fotosíntesis oxigénica resulta ser:



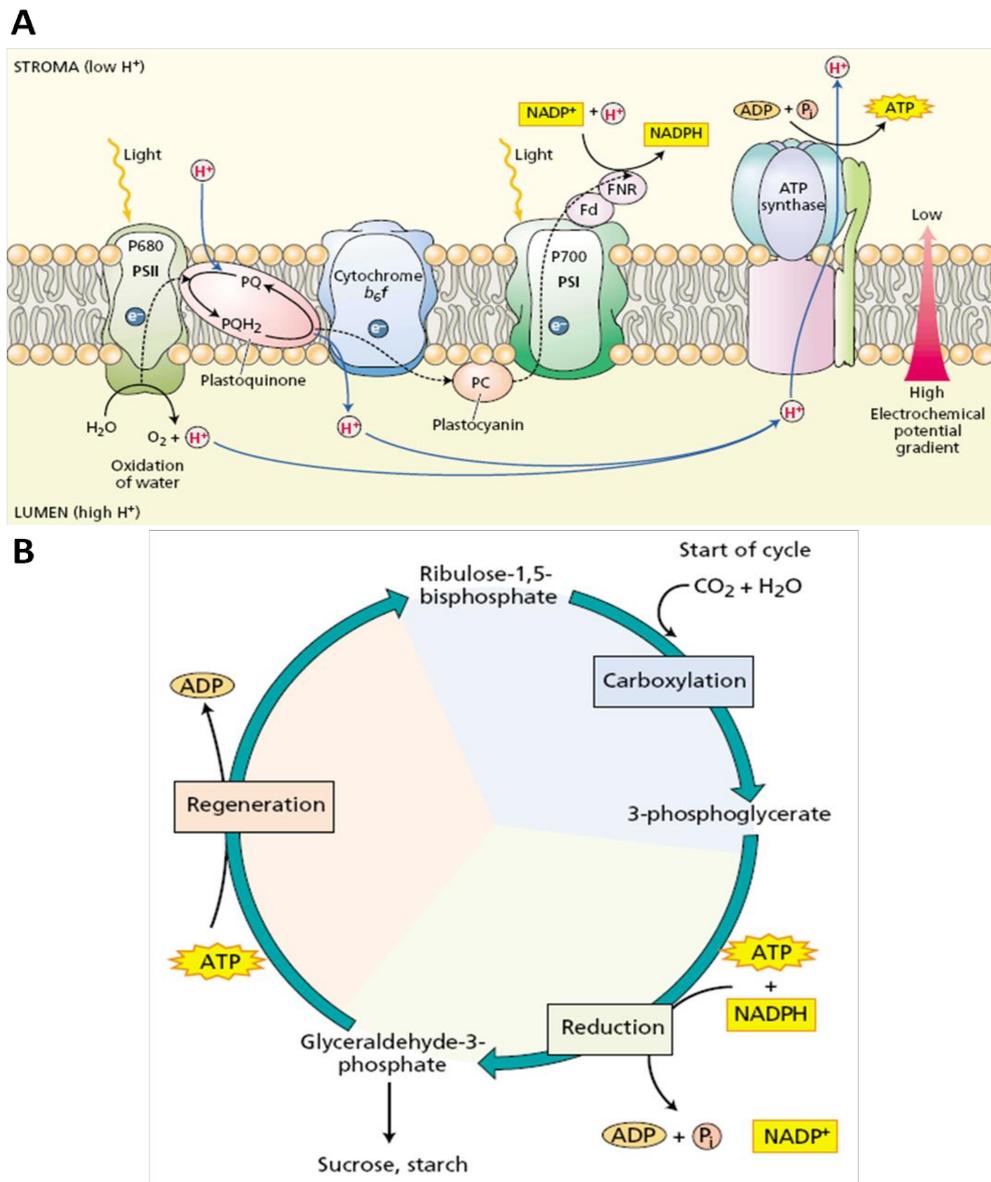


Figura (2). A] Esquema general que resume los eventos más importantes en la etapa lumínica de la fotosíntesis. B] Ciclo de Calvin-Benson (Figuras modificadas de Taiz y Zeiger, 2003 [4]).

(3).- USOS Y APLICACIONES DE MICROALGAS

Dada la amplia diversidad de algas, y la alta capacidad de adaptación a las condiciones ambientales (ej. a través de la producción de metabolitos), han aparecido nuevas aplicaciones y usos, de índole social, biotecnológica e industrial. A continuación se muestran los más frecuentes y se destaca el potencial para desarrollar nuevas tecnologías en base a sus cualidades:

(3.1).- Alimentación para consumo animal y humano

El cultivo a gran escala de microalgas comenzó en la década de 1960 en Japón, donde se utilizó *Chlorella* sp. como aditivo alimentario, dada la composición de la biomasa (30-60% peso seco (ps) de

proteínas, 20-40% ps de carbohidratos). Además, esta microalga puede ser enriquecida en selenio a través de cambios en las condiciones de cultivo, lo que permite la incorporación de este mineral en la dieta humana en formas menos tóxicas para el organismo.

Un alga verde-azulada de especial interés en alimentación humana es *Spirulina* (*Arthrospira*). dado que su biomasa se caracteriza por un elevado contenido de proteínas (60-70% ps), y es también una fuente de vitaminas (tiamina (B1), riboflavina (B2), cobalamina (B12)), aminoácidos esenciales, minerales, ácidos grasos (α -linolénico) y pigmentos antioxidantes [6]. La industria alimentaria también ha empleado *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* y *Phaeodactylum tricornutum*, para producir proteínas.

Las presentaciones comerciales para consumo humano al día de hoy son muy diversas, incluyendo polvos, harinas, aceites, cápsulas, tabletas, líquidos, etc. El trabajo de Camacho y col. [7] contiene una lista de alimentos (quesos, pastas, tartas, sopas, etc.) preparados a partir de microalgas que contienen metabolitos funcionales. La principal desventaja del uso de microalgas en alimentación humana es el alto contenido de ácidos nucleicos, por lo que deben desarrollarse procesos que permitan su remoción, sin alterar las propiedades del resto de los componentes.

En lo que respecta a alimentación animal, pueden ser incorporadas a la dieta de animales de granja (cerdos, rumiantes, aves de corral), de peces, de mascotas, y tienen la ventaja de que pueden ser producidas durante todo el año, no como algunos alimentos tradicionales (estacionales). En aves de corral, se ha demostrado que *Chlorella* sp. aumenta la diversidad microbiana en el tracto digestivo [8]. En la acuicultura, las cepas deben ser de pequeño tamaño, y tener paredes celulares poco rígidas, tales de que sean fáciles de digerir. Se utilizan principalmente cepas como *Tretaselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, etc.

(3.2).- Remoción de CO₂ desde gases de emisión industrial (*flue gas*)

El *flue gas* contiene de 3-15% de CO₂ (v/v) dependiendo de la materia prima del combustible y el tipo de operación, y otros 100 componentes más (SO_x, NO_x, HF, metales pesados, etc.), algunos que inhiben el crecimiento de la biomasa algal. Las microalgas muestran una buena performance en concentraciones de CO₂ de 10-20%, independientemente de la fuente [9]. La industria del cemento es responsable de aprox. el 4-5% de las emisiones de CO₂ globales, lo que la ha convertido en un blanco de la biotecnología de algas.

En 1997 Yamaha Motor, con el fin de reducir el impacto ambiental producto de la emisión de gases de efecto invernadero, comenzó a desarrollar tecnologías para la biofijación de CO₂ a través de la fotosíntesis de algas. En el 2006, fue la pionera en establecer un nuevo modelo de negocio (*life science business*), iniciando la venta de astaxantina (ver la Sección (3.4)) de alta calidad procedente de cultivos *indoor* de *Haematococcus pluvialis* (20 ton ps/año), utilizando sus efluentes gaseosos, y un FBR basado en una tecnología avanzada de control de fluidos (*Yamaha High efficiency Bio Reactor*) [10].

(3.3).- Biorremediación ambiental y tratamiento de efluentes

Las microalgas son capaces de consumir nitrógeno (N), fósforo (P) y amonio (NH_4^+), los cuales son los principales causantes de la eutrofización de los cuerpos de agua, y producir O_2 , que permite el crecimiento de bacterias heterotróficas.

Las aguas residuales urbanas o de industrias, como metalúrgicas y papeleras, contienen plomo (Pb), cromo (Cr), cadmio (Cd), cobre (Cu), mercurio (Hg) y zinc (Zn) [11], que persisten en el ambiente, sufren biotransformaciones, o se acumulan en la cadena alimentaria. Las algas, especialmente cepas de *Chlorella* y *Scenedesmus*, se usan para la biosorción de cationes metálicos tóxicos y radiactivos, así como para recuperar oro (Au) y plata (Ag).

Los cuerpos de agua rural contienen altas cantidades y tipos de pesticidas, producto de la agricultura. Existen antecedentes de remoción por microalgas de lindano, pentaclorobenceno, clorpirifós y alacloro [12].

Algunos químicos activos farmacéuticamente están presentes en efluentes urbanos, entre ellos antiinflamatorios, antibióticos, antidepresivos y antiepilépticos [13]. Las microalgas son indicadores vitales para el monitoreo de la calidad del agua y la toxicidad ecológica debido a estos contaminantes [14].

Se ha observado que las microalgas en consorcio con bacterias, son capaces de eliminar contaminantes del petróleo crudo [15]. La tecnología se está desarrollando en vista de procesos de remediación *in situ* en mares y océanos.

(3.4).- Productos bioactivos

Existen productos extraídos de microalgas con actividad biológica y que tienen alto valor comercial [16], entre ellos:

- Astaxantina: es un ceto-carotenoide responsable del color rosado-rojizo de truchas y salmones, y un súper-antioxidante. *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) es una especie que ha demostrado su potencialidad para su producción (ver el Capítulo (6)).
- β -caroteno: es el precursor de la vitamina A, y es acumulado en grandes cantidades por la microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta).
- Luteína: es un pigmento amarillo perteneciente a las xantofilas. Dado que los animales no producen luteína, se incluye en complementos alimentarios como antioxidante.
- Fucoxantina: es un epoxi-carotenol presente en algas pardas y diatomeas. Es utilizada en nutrición, debido a que presenta la capacidad de acelerar la quema de grasa abdominal y de ingresar glucosa a los tejidos [17].
- Ficocianina: es una biliproteína que se extrae de algas verde-azuladas (cianobacterias) como *Spirulina maxima* y *S. platensis*. Es utilizada como colorante en múltiples procesos industriales, y en el ámbito de la salud, como antioxidante y cicatrizante de heridas [18].

- Micosporinas (MAAs): son compuestos aminoácidos presentes en microalgas fitoplanctónicas, generalmente metabolitos secundarios, y con el potencial de disipar la radiación UV [19].
- Ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6): Tiene un rol importante en el desarrollo y la función del sistema nervioso, en el órgano visual en el feto y el recién nacido. Es producido por la microalga *Isochrysis galbana* [20].

Muchos de los componentes aquí descritos son incorporados en productos de la industria cosmética, como cremas (regenerativas, *anti aging*, refrescantes, protección solar UV-VIS, cuidado del cabello), en la alimenticia y nutracéutica para la generación de alimentos funcionales (barras proteicas-cereales para deportes de alto impacto, batidos de recuperación muscular, energizantes, etc.), y en la farmacéutica para la prevención y el tratamiento de enfermedades (Parkinson, Alzheimer).

(3.5).- Bioenergía

Las microalgas son consideradas una materia prima prometedora para la producción de biocombustibles de tercera generación (3G), ya que presentan algunas ventajas potenciales en comparación con los cultivos de plantas convencionales, como: i) una productividad mayor de biomasa y aceite (4-5) por unidad de superficie y tiempo; ii) la falta de competitividad para el uso de la tierra o con el mercado de alimentos, ya que pueden cultivarse en tierras no cultivables; iii) una mejor economía del H₂O y los nutrientes, por reciclaje o reutilización; iv) la posibilidad de utilizar residuos de industrias como fuente de nutrientes económicos.

(3.5.1).- Bioaceite (*Bio-oil*)

El *bio-oil* es un líquido orgánico comúnmente de color negro, que tiene un valor calorífico de 31-39 MJ kg⁻¹, y es principalmente obtenido por licuefacción hidrotérmica (HTL) de la biomasa de algas, en condiciones de temperatura y presión sub-críticas (280-380 °C, 7-30 MPa). Contiene compuestos fenólicos, ácidos grasos de cadena larga y orgánicos, ésteres, nitrogenados, poliaromáticos, alcanos, alquenos, derivados de fitol y colesterol, etc. [21].

El proceso de HTL comúnmente se lleva a cabo en tanques de acero inoxidable, y en forma de lotes (*batch*), con tiempos de retención de hasta 1 h. El producto de la HTL se compone de tres fases, líquida, sólida, y gaseosa. La sólida, recuperada por filtración y secada para su estabilización, se denomina “biocarbón”, y se utiliza en la agricultura como fertilizante debido a su alto contenido de N. Por su parte, la líquida puede ser extraída con un solvente orgánico (ej. dietil éter), rindiendo dos fases, una acuosa y otra no acuosa. La fase no acuosa es recuperada, y posteriormente se elimina el solvente por evaporación, resultando el biocrudo, que puede ser transformado en combustible.

El H₂O, con un rol de catalizador y reactivo, tiene varias ventajas sobre los solventes químicos, ya que es ambientalmente benigno, no tóxico, barato, fácilmente disponible, etc. El proceso no requiere de biomasa seca, evitando los costos de secado.

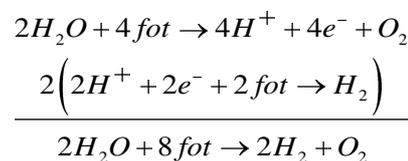
(3.5.2).- Biohidrógeno (H₂)

El H₂ es un combustible limpio que genera sólo vapor de H₂O en una combustión, y tiene el mayor contenido de energía por unidad de peso (122 KJ gr⁻¹) respecto a otros combustibles. Entre las principales desventajas se destacan la dificultad de su almacenamiento y distribución, y el costo asociado a su generación, al día de hoy inviable para comercialización.

En lo que respecta a algas, se utiliza principalmente *Chlamydomonas reinhardtii*, y existen dos vías de producción fotosintéticas:

i. Biofotólisis directa / vía dependiente del PSII

La fotoproducción de H₂ se logra mediante la transferencia lineal de e⁻, que involucra a ambos PSs. En condiciones anaeróbicas y en ausencia de CO₂, la Fd puede dirigir los e⁻ a hidrogenasas. La reacción se combina con la fotólisis del H₂O, de la siguiente forma:



Se utilizan ocho fotones porque participan ambos PSs. La biofotólisis directa contribuye con aprox. el 90% del flujo total de e⁻. Una desventaja relevante es la incompatibilidad de la producción simultánea de H₂ y O₂, ya que las hidrogenasas de algas son fuertemente inhibidas por el O₂.

ii. Biofotólisis indirecta de H₂ / vía independiente del PSII

Consisten en vías que usan e⁻ del NADPH, los cuales se transfieren directamente al pool de PQ, sin pasar por el PSII, y es un proceso mediado por enzimas NDA2 (NADH deshidrogenasa tipo II). La fuente más común de reductores del pool de PQ es la degradación glucolítica de la glucosa o el almidón. La vía permite separar la producción de O₂ y H₂, ya que no implica actividad del PSII. Las tasas de producción de H₂ son aprox. 10 veces más bajas que las de la vía dependiente de PSII.

Para una descripción detallada de la generación de hidrógeno a través de microalgas se recomienda el trabajo de Dubini y González-Ballester [22].

(3.5.3).- Biometano (CH₄, biogás)

La producción CH₄ es muy simple, y no requiere demasiada infraestructura. Se realiza en un digestor anaeróbico que contiene poblaciones microbianas que convierten, en forma sinérgica y concertada, los compuestos orgánicos de macro / micro algas (lípidos, proteínas, carbohidratos) en CH₄ y CO₂. El pre-tratamiento de la biomasa algal es necesario para la obtención de rendimientos elevados. Para una descripción detallada de los procesos de producción de biogás, y los rendimientos alcanzados, se recomienda el trabajo de Ramaraj [23].

(3.5.4).- Bioetanol

Existen microalgas que acumulan almidón y celulosa en cantidades mayores al 40% ps, cuando son sometidas a estrés (ej. limitación de N) [24]. Estos polímeros son más fácilmente convertidos a monosacáridos, en comparación con los materiales vegetales, debido a la ausencia de lignina. La biomasa algal es hidrolizada por tratamientos químicos (ácidos o alcalinos), fisicoquímicos, o enzimáticos, para liberar los monosacáridos, los cuales son anaeróbicamente fermentados por levaduras (ej. *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Zymomonas mobilis*). El etanol es recuperado del medio a través de destilación.

Por su parte, las paredes celulares de microalgas intactas, o los restos de pared, producto de los procesos de *downstream*, pueden ser una potencial materia prima para la generación de azúcares fermentables, dado que se componen de una matriz de polisacáridos y glicoproteínas (pectinas, quitina agar, alginatos, celulosa, hemicelulosa, polímeros alifáticos como el algaenan, etc.) [25, 26].

(3.5.5).- Biodiésel

El biodiésel se obtiene por trans-esterificación de grasas animales o aceites vegetales. El biodiésel derivado a partir de lípidos de microalgas tiene ventajas técnicas respecto al biodiésel *IG*, entre ellas, un mayor valor calorífico (29-30 MJ kg⁻¹), y una viscosidad y densidad más bajas [27]. Al día de hoy no existen tecnologías disponibles que sean lo suficientemente maduras para ser aplicadas a escala comercial.

Los contenidos de lípidos de microalgas reportados varían mucho, y dependen en gran medida de la cepa y de las condiciones de cultivo. Los géneros más extensamente estudiados, como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus*, *Neochloris*, producen un contenido de 20-50% ps [28]. Condiciones de estrés como limitación de N, luz, o CO₂, disparan la biosíntesis de lípidos, pero afectan negativamente la producción de biomasa y, por lo tanto, la productividad de los lípidos [29]. Los principales componentes de los aceites de microalgas son lípidos neutros, polares y cierta cantidad de hidrocarburos, esteroides, ceras y pigmentos [30].

La Tesis de Maestría en Gestión Ambiental de Zannol contiene un estudio detallado de la factibilidad económica de la producción de biodiésel de algas en Argentina [31].

(4).- REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los principales componentes de la biomasa de microalgas son el C (30-50% ps), O (30-50% ps), H (3-7% ps), N (4-9% ps), fósforo (P) (3% ps), y cantidades menores de azufre (S), potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca), sodio (Na), etc. Esto resulta en una fórmula mínima próxima a $C_{0.48}H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01}$ [32]. En principio, un medio de cultivo debería componerse de los elementos principales citados, a los que se le pueden sumar cantidades trazas de cobalto (Co), hierro (Fe), Zn, Cu, etc. Los metales tienden a precipitar, por lo que suele adicionarse un agente quelante (ej. EDTA).

Para cepas exigentes es necesario adherir al medio promotores de crecimiento (ej. vitaminas). Los componentes deben suministrarse en forma disuelta, ya que las microalgas crecen en medios acuosos. Las microalgas se pueden cultivar en condiciones fotoautotróficas, heterotróficas y mixotróficas, utilizando diversas fuentes de C, como CO₂, metanol, acetato, glucosa, glicerol u otros compuestos orgánicos. El crecimiento fotoautotrófico es soportado por C inorgánico (ej. CO₂ o bicarbonatos). El N puede suministrarse como urea, NO₃⁻ o NH₄⁺. El NH₄⁺ es termodinámicamente más favorable que el NO₃⁻, pero existe la posibilidad de que se torne tóxico (< 100 mg L⁻¹) [33].

Los valores óptimos de pH se encuentran en el rango de 7-10. El pH de los cultivos varía como resultado de las reacciones involucradas en el consumo de C y N. Valores de pH en el rango 9-12 conducen a la formación de hidróxidos cargados de Mg⁺² u otros metales (ej. Fe, Aluminio (Al)), que neutralizan las cargas negativas de las microalgas, conduciendo a la sedimentación de las células o fróculos [34]. El método más utilizado en el control del pH es la inyección de CO₂ (1-5%), que puede constituir hasta el 30% del costo total de producción de microalgas [35].

La temperatura óptima para el crecimiento varía de 20-35 °C, y en un proceso de cultivo puede variar producto de la radiación absorbida (solar o artificial), y en el caso de sistemas *outdoor* también por las condiciones meteorológicas diurnas.

La luz es uno de los factores más relevante en el cultivo de microalgas, y en condiciones de operación típicas es el “nutriente” limitante. Debe asegurarse de que se distribuya en cantidad (intensidad) y calidad (distribución espectral) en la suspensión. La luz puede ser suministrada en forma continua, o mediante un fotoperiodo, definido como las horas durante la cual se ilumina una suspensión, en una base de 24 h. Todos los aspectos relevantes a la energía radiante en cultivos de microalgas serán abordados en la presente Tesis Doctoral, especialmente en los Capítulos (1)-(5).

(5).- SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE ALGAS

En la actualidad existen dos sistemas de producción de algas a gran escala, abiertos y cerrados (fotobiorreactores (FBRs)). Los sistemas abiertos están destinados a *commodities*, aunque su uso está restringido a un número relativamente pequeño de especies "robustas", como *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Nannochloropsis*, que crecen rápidamente, o *Arthrospira* y *Dunaliella*, que se propagan en condiciones muy selectivas (ej. alta salinidad). Por su parte, los sistemas cerrados son utilizados para la generación de biomasa de alta calidad (ej. consumo humano) y productos alto valor comercial, acumulados por cepas que no toleran la dinámica de las variables ambientales (sensibles).

Una descripción detallada de los sistemas de producción, y diseños característicos de cada tipo, se encuentra a continuación.

(5.1).- Sistemas abiertos

(5.1.1).- *Open y raceway ponds*

Consisten en piletones expuestos al ambiente, construidos sobre suelo compacto cubierto con membranas, y con una profundidad de 0.1-0.5 m. La mayoría de las unidades a nivel industrial (1000-5000 m²) se basan en el diseño de estanques de canalización propuesto por Oswald (*raceway ponds*) [36] (ver la Fig. (3A)), de 2 o 4 canales con terminaciones curvas. La longitud de cada canal es proporcional al ancho de éstos, con relaciones de 10-20. Existen también *ponds* con diseños circulares (ver la Fig. (3B)). Todos comparten una relación área iluminada-volumen (A/V) relativamente baja, de 5-10 m⁻¹, lo que requiere de grandes extensiones de tierra. La suspensión de algas es recirculada en forma continua, a velocidades de 0.1-0.3 m s⁻¹ que evitan la sedimentación de las formaciones celulares (las microalgas comúnmente se encuentran floculadas). La recirculación se efectúa a través de una rueda de paletas, un propulsor, o un brazo giratorio [37], con consumos de potencia reportados de 0.5-1.2 W m⁻². El suministro de CO₂ y la remoción de O₂ se efectúan principalmente en las regiones donde se encuentran los dispositivos de impulsión de líquido, pero también pueden realizarse a través de sumideros localizados a lo largo de los canales. Entre sus beneficios se destacan los bajos costos de construcción (un orden de magnitud menor que los sistemas cerrados) [38], mantenimiento (ej. limpieza) y operación, y la facilidad de escalamiento sin modificaciones en el diseño [39]. La inversión para una escala de 100 ha varía de 0.13 a 0.37 M€ ha⁻¹. Los *ponds* pueden ser estratégicamente localizados cerca de plantas de tratamiento de aguas residuales o instalaciones agrícolas, tal de lograr el aprovechamiento de los nutrientes presentes en los efluentes [40].

Entre sus principales desventajas se destacan las bajas productividades y las concentraciones de biomasa de trabajo, de 0.5 a 1 gr L⁻¹, que dificultan y encarecen los procesos de *downstream* de cosecha y deshidratación. Esto es debido a varios aspectos, entre ellos la transferencia de energía radiante en el interior del medio de cultivo y la transferencia de materia gas-líquido en la superficie del cultivo. En lo que respecta a la luz sobre la superficie del *pond*, esta es altamente variable en el día, pudiendo ser limitante en las primeras horas de la mañana o al atardecer, y fotoinhibitoria al mediodía, dependiendo de la ubicación geográfica. Dentro del propio cultivo, las células están expuestas a diferentes densidades de energía a medida que circulan desde la superficie hasta las profundidades del cultivo (fotoinhibitorias y limitantes). La frecuencia con la que las algas circulan entre las zonas iluminadas y oscuras del reactor, y el tiempo que pasan en cada una de ellas, está regulada por la velocidad de mezclado. La distribución de luz depende de la geometría del reactor, la densidad celular y las propiedades ópticas de la suspensión de algas. Los *ponds* se caracterizan por tener una gran fracción del volumen del reactor a oscuras.

Respecto a la transferencia gas-líquido, producto de que los dispositivos de agitación están sectorizados, se han observado valores de saturación de O₂ de 115-450% [41]. Cuando se burbujea CO₂ en un canal poco profundo, el tiempo de contacto entre el gas y el líquido es muy bajo, y el 80-90% del CO₂ inyectado se pierde en la atmósfera [42].

Otros aspectos que pueden reducir las posibilidades de éxito en los *ponds* son la contaminación por algas competidoras, el colapso del cultivo por insectos herbívoros, hongos, y patógenos de la microalga de interés [37], la dilución por eventos climáticos (ej. lluvias), la presencia de polvo o contaminantes dispersos en el aire, etc.

Más del 95% de la producción de microalgas a nivel mundial ha sido efectuada utilizando *raceway ponds*. En la actualidad muchas empresas de biotecnología de algas han comenzado a utilizar *raceways ponds* para procesos de cultivo *indoor* (luz artificial LED o fluorescente) de cepas no robustas (ver la Fig. (3C)).

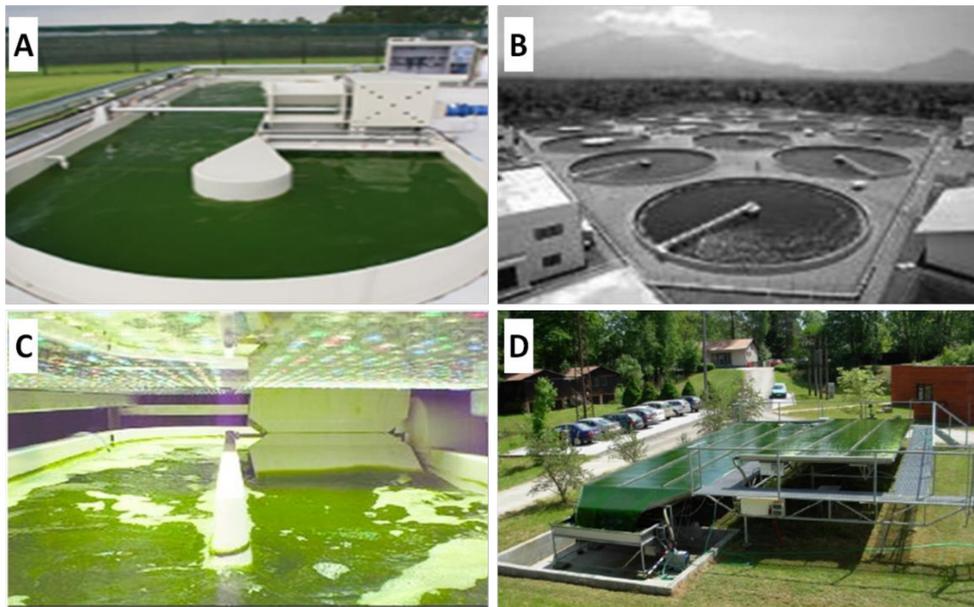


Figura (3). A] *Raceway pond* en AlgaePARC Wageningen University (Figura modificada de Bosma y col., 2014 [44]); B] *Pond* circular con recirculación de tipo brazo giratorio en Yaeyama, Japan. (Figura modificada de Da Fonseca y col., 2016 [45]); C] *Raceway pond* de fibra de vidrio para cultivo *indoor* (Figura modificada de Huesemann y col., 2017 [46]); D] Reactor *thin layer cascade* de última generación del Instituto de Microbiología de Treboñ (Figura modificada de Acién Fernández y col., 2017 [47]).

(5.1.2).-Reactores de capa delgada en cascada (*thin layer cascades*)

Comúnmente se componen de dos secciones: i) fotosintética, que consiste en placas de acero inoxidable o plástico por las que circula el cultivo (en capas de 0.06-4 cm) [43], bajo flujo turbulento por la impulsión con bombas (velocidad $\geq 0.5 \text{ m s}^{-1}$, potencia requerida $1-10 \text{ W m}^{-2}$). El paso de luz reducido y las relativamente altas relaciones A/V ($25-180 \text{ m}^{-1}$) permiten disminuir el volumen oscuro de la suspensión ($<10\%$), incrementar la concentración de biomasa de trabajo ($4-20 \text{ gr L}^{-1}$), y maximizar la eficiencia en la utilización de la luz. Las plataformas pueden ser ajustables verticalmente, respecto a la superficie, en ángulos de $0.5-3^\circ$; ii) transferencia de materia gas-líquido, que consiste en un tanque o receptáculo donde se inyecta aire con el fin de desorber el O_2 disuelto. El CO_2 es comúnmente suministrado en forma pura, separado de la aireación, debido a que mejora la eficiencia del proceso de transferencia. En el tanque de mezcla también se localizan el sistema de monitoreo y control de variables.

Las dimensiones necesarias varían de acuerdo a la profundidad del cultivo, existiendo instalaciones de producción de 400-900 m². La Fig. (3D) muestra un reactor *thin layer cascade* de exhibición de última generación, con espesor de líquido variable de 0.5-1.5 cm, un área de 90 m² y un volumen variable de 500-1500 L.

(5.2).- Sistemas cerrados: Fotobiorreactores (FBRs)

Los FBRs se pueden definir como sistemas de cultivo en los que los fotones no inciden directamente en la suspensión del microorganismo fotosintético, sino que deben atravesar las paredes transparentes del reactor [48]. El aislamiento respecto al ambiente circundante permite un control riguroso de las condiciones de operación, como temperatura, pH, agitación (mecánica o neumática), aireación, alimentación, O₂ disuelto, etc. La ocurrencia de contaminación es disminuida significativamente, lo que permite cultivos prolongados. Los FBRs se clasifican en base a su diseño / geometría, siendo algunos de ellos:

(5.2.1).- FBRs tubulares

Los FBRs tubulares son el diseño más común a escala industrial [49]. El costo es significativamente más alto que el de los sistemas abiertos, con costos de inversión de 0.51 M€ ha⁻¹ a escala de 100 ha [50].

Estos reactores, al igual que los *thin layer cascades*, se componen de dos secciones principales: i) fotosintética, que consiste en tubos de vidrio o plástico con diámetros de 0.03-0.1 m, en los que el cultivo circula impulsado por bombas o corrientes de aire (*airlift*), a velocidades de 0.1-0.8 m s⁻¹. La potencia necesaria oscila entre 10-100 W m⁻². Tienen relaciones A/V de hasta 80 m⁻¹, lo que permite trabajar con cultivos de altas densidades. Los tubos pueden ser dispuestos en forma vertical, horizontal e inclinada, de acuerdo a la cantidad de luz solar que se desee colectar. Existen diseños en los cuales se pegan cintas negras sobre los tubos, con una longitud y espaciado particular, para crear ciclos de luz-oscuridad convenientes para las condiciones operativas de interés; ii) transferencia de materia gas-líquido, que consiste en un tanque o receptáculo donde se inyecta aire a velocidades de 0.01-0.1 vvm, con el fin de desorber el O₂ disuelto. El CO₂ es suministrado en forma pura en otro sitio del receptáculo.

Los métodos típicos para el mantenimiento de temperatura, especialmente por enfriamiento, son la pulverización de agua en la superficie del tubo, el sombreado (ej. mediante la superposición de los tubos), o la inmersión del sistema en un baño de agua con control de temperatura [51].

Existen diversos tipos de FBRs tubulares, a saber:

- (5.2.1.1).- FBRs tubulares de tipo serpiente

La Fig. (4A) muestra un FBR tubular de tipo serpiente vertical, que consiste en unidades formadas por tubos de Plexiglas® ensamblados mediante codos de tipo U. La transferencia de gases y el control

de temperatura, comúnmente a través de un intercambiador de calor de acero inoxidable, se efectúan en la columna de burbujeo vertical localizada en el extremo del sistema. La cosecha se efectúa por rebalse en la parte superior de dicha columna.

La Fig. (4B) muestra un FBR tubular de tipo serpentina horizontal, con un diámetro atípico de 0.38 m, el cual es utilizado para el cultivo de *H. pluvialis* en estado vegetativo (ver la Sección (5.2.4) del Capítulo (6)). El control de la temperatura del cultivo se logra mediante la inmersión del FBR en un estanque de agua.

- **(5.2.1.2).- FBRs tubulares de tipo colector (*manifold*)**

Consisten en una serie de tubos paralelos, en arreglo vertical u horizontal (ver la Fig. (4C y 4D)), conectados al final por dos colectores, uno para distribución y otro para cosecha.

Las principales ventajas respecto a los reactores serpentina son la reducción de las pérdidas de carga (evitan los codos U) y las concentraciones más bajas de O₂ disuelto, dos factores que facilitan el escalamiento [51].

- **(5.2.1.3).- FBRs tubulares helicoidales**

Consiste en tubos flexibles de diámetro pequeño (0.03 m) enrollados alrededor de un cilindro vertical, o un cono, que le brindan sostén (ver la Fig. (5A)). La versión cónica ha sido sugerida debido a que expone un área mayor a la luz solar, incrementando así la relación A/V. El sistema de intercambio de gases se encuentra por fuera del reactor, al igual que el de control de temperatura. Han sido testeados a escalas de 1000 L, pero en la actualidad han dejado de implementarse debido a la dificultad de su limpieza, y al estrés hidrodinámico que sufren las microalgas, producto de las condiciones de operación requeridas para evitar la adherencia de la biomasa en las paredes.

- **(5.2.2).- FBRs de placas planas (*flat panels*)**

El diseño básico consiste en dos paneles paralelos de PVC, policarbonato, metacrilato de polimetilo, vidrio o polietileno, con una capa delgada de suspensión de microalgas fluyendo entre ellos [52] (ver la Fig. (5B)). Se caracterizan por relaciones A/V de 16-80 m⁻¹, productividades volumétricas de 2 gr L⁻¹ d⁻¹ y areales de 5-15 gr m⁻² d⁻¹. El mezclado de la suspensión y la transferencia de gases pueden llevarse a cabo por una corriente de aire comprimido (0.4-1 vvm) desde la base, a través de un difusor poroso. Otros diseños contemplan un sistema de intercambio de gases externo, abierto a la atmósfera.

- **(5.2.3).- FBRs columna de burbujeo, *airlift* y bolsa**

Las columnas de burbujeo consisten en cilindros verticales con diámetros (D) de 20-50 cm y alturas (H) de 1.5-2.5 m (H>2D, comúnmente de 4-8), construidos con materiales rígidos (ej. acrílico, vidrio), y mezclados a través de una corriente de aire que atraviesa un difusor poroso en la base (ver la Fig. (5C)). Tienen relaciones A/V de 4-10 m⁻¹, consideradas bajas. Si bien esto podría ser un inconveniente

para el cultivo de cepas robustas, podría ser de utilidad para cepas sensibles a las condiciones de iluminación (ej. *H. pluvialis* en estadio vegetativo móvil). Entre sus principales ventajas se destacan la ausencia de partes internas (permite aprovechar mejor el volumen del dispositivo), la ausencia de partes móviles y condiciones de operación típicas que no conducen a estrés hidrodinámico (*shear stress*), y la alta transferencia de materia. Un reactor columna de burbujeo puede transformarse en un sistema *airlift* a través del agregado de un cilindro interno o un baffle, lo que da lugar a la generación de dos zonas, *riser* y *downcomer*. Esto permite la generación de una corriente de retorno que interactúa con las paredes del reactor, (evitando la deposición de la biomasa), y de ciclos luz oscuridad.

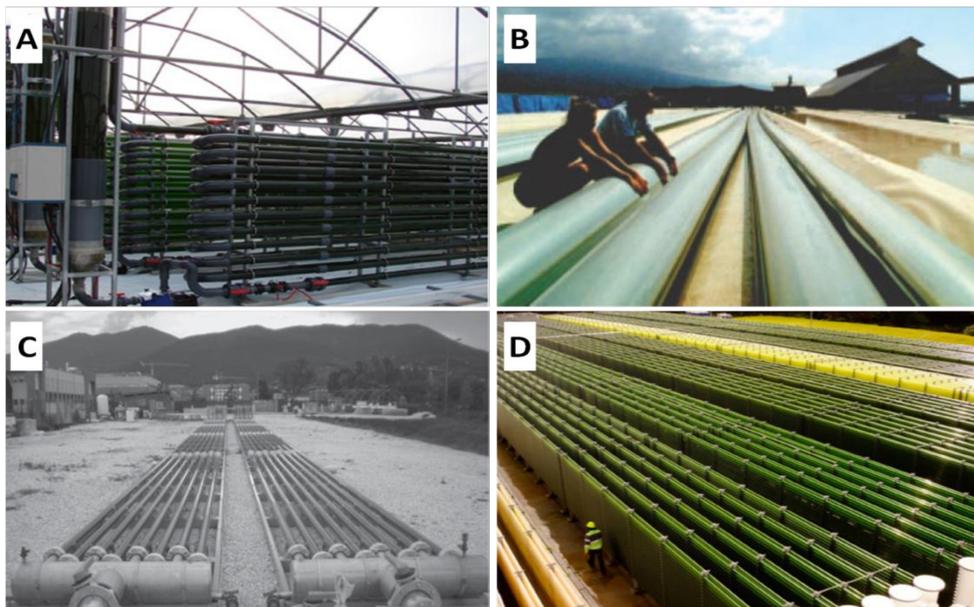


Figura (4). A] Reactor tubular serpentina vertical del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería (España), ubicado en la estación experimental de Cajamar “Las Palmerillas” (Figura modificada de Ación Fernández y col., 2017 [47]); B] Reactor tubular serpentina horizontal “*Mera Growth Module*” de Mera Pharmaceuticals (Hawái), utilizado para el cultivo de *H. pluvialis* (Figura modificada de Olaizola y Huntley, 2003 [53]); C] Reactor tubular *manifold* horizontal (Figura modificada de Zittelli y col., 2013 [54]); D] Reactor tubular *manifold* vertical (Figura modificada de Ación Fernández y col., 2017 [47]).

Las principales desventajas de ambos sistemas son el desgaste del material rígido del vaso, producto de la limpieza (rayones, y cambios en el color), y su costo. Esto fue el disparador a la búsqueda de reactores que imiten el funcionamiento de una columna de burbujeo, pero se construyan con materiales flexibles, asociados con un bajo costo (ej. bolsas de polietileno). En los reactores de tipo bolsa (ver la Fig. (5D)), a veces denominados “mangas” para las geometrías tipo V (ver la Fig. (5E)), las bolsas (50-500 L) son suspendidas de un marco o una estructura de tipo perchero, y la aireación se efectúa desde la base mediante un difusor. La principal ventaja es el ya comentado bajo costo, permitiendo su descarte y recambio, y el principal inconveniente es el pegado de la biomasa a la pared interna de la bolsa. Generalmente estos sistemas son utilizados en cultivo *indoor* bajo iluminación artificial.

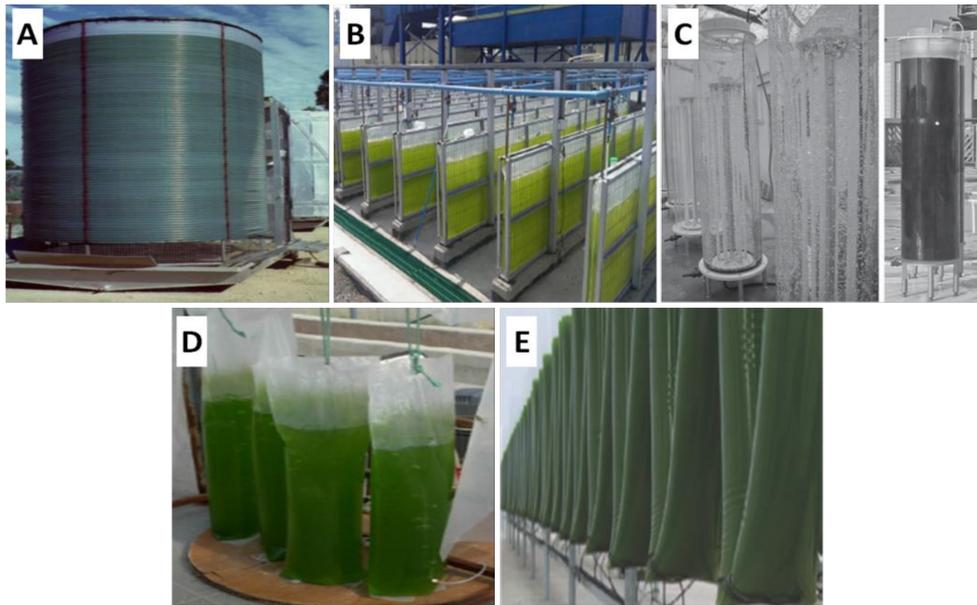


Figura (5). A] Reactor tubular helicoidal (Figura modificada de Nwoba y col., 2019 [55]); B] Instalación piloto de reactores *flat panel* en una planta de generación de energía termoeléctrica en Tocopilla (Chile) (Figura modificada de Acién Fernández y col., 2017 [47]); C] Reactor columna de burbujeo (Figura modificada de Zittelli y col., 2013 [54]); D] Reactor de bolsa vertical (Figura modificada de Masojídek y Torzillo, 2008 [56]); E) Reactor de manga (geometría V) (Figura modificada de Huang y col., 2017 [57]).

Objetivos

Objetivo general

Desarrollo, generación, construcción y validación de conocimientos científicos-tecnológicos aplicables al diseño, caracterización, operación, simulación, funcionamiento y optimización de fotobiorreactores, destinados al cultivo de algas unicelulares, y a la obtención de metabolitos derivados de su biomasa.

Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de producción de compuestos de interés biotecnológico a partir de cepas disponibles en el laboratorio del grupo de investigación, considerando la posibilidad de adquirir nuevas cepas productoras de dichos metabolitos.
- Seleccionar las condiciones más favorables de cultivo (medio de cultivo e iluminación) para la propagación de microalgas y la síntesis de metabolitos, en base a reportes o antecedentes bibliográficos.
- Describir la energía radiante emitida por las fuentes de luz más comúnmente utilizadas en el cultivo de microalgas.
- Desarrollar herramientas de simulación que permitan obtener la distribución del campo de energía radiante en suspensiones de microalgas creciendo en fotobiorreactores, y conocer cuan eficientemente se utiliza la luz absorbida para la generación de biomasa.
- Analizar el efecto de las longitudes de onda de la luz más absorbibles en la fotosíntesis de microalgas, sobre la conducta de crecimiento de la biomasa y la productividad de FBRs de escala laboratorio.
- Analizar el efecto de diferentes distribuciones de luz sobre la conducta de crecimiento de las microalgas y la productividad de FBRs de escala laboratorio.
- Diseñar, desarrollar y construir simuladores de laboratorio (computacionales y experimentales) que permitan predecir la performance de cepas de microalgas en reactores *outdoor* de mayor escala.

CAPÍTULO (1)

Caracterización de una fuente artificial de energía radiante: Diodos emisores de luz (LEDs)

(1).- RESUMEN

El conocimiento de las características de la fuente de radiación elegida para un sistema de cultivo de microalgas, y de la energía radiante emitida por ella, se torna un aspecto crucial en las etapas de diseño, caracterización y optimización de un fotobiorreactor (FBR) en términos de luz. Las características más importantes de una fuente son: i] la cantidad de fotones por unidad de tiempo que emergen de su superficie (flujo de fotones), ii] las direcciones que adoptan dichos fotones (función de distribución direccional de fotones), y iii] la composición de la población de fotones en términos de la longitud de onda λ (función de distribución espectral de fotones).

A lo largo del Capítulo se encuentran estas propiedades para los LEDs utilizados en la presente Tesis. En primera instancia, se adopta y describe un modelo para el intercambio de radiación entre superficies y se derivan las expresiones útiles para el cálculo de las propiedades mencionadas. En segunda instancia, se detalla la metodología experimental y de simulación computacional implementada en el cálculo.

De los resultados se puede concluir que los LEDs tienen una emisión de tipo isotrópica, y que LEDs de diferente “color” tienen asociados diferentes flujos de fotones y funciones de distribución espectral.

(2).- INTRODUCCIÓN

La composición de la biomasa de microalgas puede alterarse debido a cambios en las condiciones ambientales de cultivo, a la velocidad de crecimiento, a las fases del ciclo de vida, etc. La calidad y cantidad de luz suministrada, natural o artificial, son parámetros importantes para organismos fototróficos, ya que son requeridos para la fotosíntesis y para cambios morfológicos [58].

Aunque la luz solar es la fuente de energía radiante más rentable para cultivar microalgas, la luz artificial es una alternativa económicamente viable cuando la biomasa se utiliza como materia prima para la generación de productos de alto valor agregado, tales como alimentos funcionales, suplementos dietarios (ej. carotenoides y ácidos grasos poli-insaturados), nutraceuticos, etc [55]. La luz artificial permite evitar las fluctuaciones de la luz solar (producto de la geografía, el clima, las horas del día, el día del año, la presencia de objetos, etc.), controlar la cantidad de luz suministrada por unidad de tiempo, las horas de iluminación y el espectro, lo que en ciertos casos podría trasladarse a ganancias en la productividad y en la calidad de la biomasa.

Entre las fuentes artificiales de luz más comunes se encuentran lámparas fluorescentes, incandescentes, halógenas, LEDs, etc. Al día de hoy, la biotecnología de microalgas ha migrado al uso de LEDs, debido a su larga vida útil (50000-100000 [hs], vs 12000-20000 [hs] de lámparas fluorescentes, y 1000 [hs] de lámparas incandescentes), emisión estable, tamaño reducido en relación a la energía radiante suministrada, amplia variedad de presentaciones comerciales (en relación a la potencia entregada y a las disposiciones de los diodos), instalación sencilla, adaptabilidad a soportes varios, espectros amplios o de ancho de banda acotado (20-40 [nm]), cantidad de luz emitida regulable, alta eficiencia de conversión fotoeléctrica, respuesta de emisión rápida (escala de

nanosegundos) que permite una operación intermitente (*flashes*), capacidad de operar sumergidos en medios líquidos, opción multicolor con selección independiente (RGB), elevada resistencia mecánica debida a la ausencia de filamentos, menor contaminación ambiental y modelos enteramente ecológicos, capacidad de que la luz emitida sea transferible por fibra óptica, etc. Para información más detallada del funcionamiento y de las características recientemente citadas recurrir a los trabajos de Schulze y col. [59] y de Glemser y col. [60].

La tecnología LED aún se encuentra en vías de desarrollo, existiendo al día de hoy empresas que ofrecen la posibilidad de un diseño personalizado del espectro de emisión del LED, a través de la elección de los componentes de la cubierta y de la proporción de cada uno de ellos. Un ejemplo con potencial disruptivo en el área de la biotecnología de algas ha sido la creación de LEDs de alta potencia que simulan el espectro de la luz solar que alcanza la superficie terrestre [61], algo imposible de lograr con los LEDs convencionales debido a la forma de sus espectros. Si bien este tipo de dispositivos al día de hoy tienen un elevado costo económico, su uso en el ámbito científico-tecnológico permitiría reducir la brecha entre las predicciones de productividad efectuadas con información generada a escala laboratorio, de las observadas en sistemas de cultivo *outdoor*.

Durante la realización de los ensayos experimentales a lo largo de la presente Tesis, se utilizaron diferentes tipos y combinaciones de LEDs, con el fin de diseñar distintas condiciones de iluminación externas, en términos de cantidad y calidad de radiación. Los LEDs seleccionados, de espectro amplio y acotado, emiten energía radiante contenida en la región visible del espectro electromagnético, $400 \leq \lambda \leq 700$ [nm], energía que resulta ser fotosintéticamente activa (PAR) para las microalgas.

(3).- OBJETIVOS

- Incorporar un modelo para el intercambio de radiación y derivar las propiedades de la energía radiante emitida por los LEDs elegidos para el desarrollo de la presente Tesis.
- Diseñar experiencias y desarrollar algoritmos computacionales *ad hoc* que permitan encontrar las propiedades de interés.

(4).- MATERIALES Y MÉTODOS

(4.1).- LEDs

Los diodos seleccionados corresponden a la marca DEMASLED (Dled), y a los modelos SMD 35x38 en color rojo y azul, y SMD 50x60 en color blanco frío. Los LEDs 35x38 y 50x60 utilizados en las experiencias presentes en los Capítulos (3) y (4) fueron dispuestos en tiras sobre la pared del reactor, y conectados a la red eléctrica mediante un transformador de 12 V, sin control del flujo de fotones que emiten. Para la determinación de las propiedades de la emisión de estos LEDs se construyeron placas de un único color compuestas por 9 LEDs, distribuidos en 3 tiras de 3 LEDs. Las tiras fueron dispuestas en forma regular, e igualmente espaciadas sobre una base plástica transparente semirrígida como se esquematiza en la Fig. (1A).

Los mismos LEDs 50x60, en las experiencias presentes en los Capítulos (5) y (6), fueron dispuestos en placas rígidas y adheridas a un soporte metálico, conformando un módulo de iluminación LED. Dicho dispositivo fue operado a través de un computador Raspberry Pi, que permite el control del flujo de fotones a través de la metodología de “Modulación de Ancho de Pulso (PWM)”, con una señal cuadrada de 0 a 100%. Para la determinación de las propiedades de la emisión de estos LEDs se utilizaron placas compuestas por 48 LEDs, distribuidos en 4 tiras de 12 LEDs, y dispuestas en forma regular e igualmente espaciadas como muestra la Fig. (1B).

(4.2).- Medición de la radiación emitida por los LEDs

Para registrar la radiación emitida por los arreglos de LEDs se utilizó un radiómetro SKYE Detector Par quantum sensor SKP 215 [62]. El dispositivo brinda la lectura de la cantidad de fotones que alcanzan la superficie de detección del radiómetro por unidad de tiempo [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$], pero no la distribución espectral de la población de fotones (λ). La Fig. (1C) muestra el perfil de respuesta del radiómetro en función de la longitud de onda λ de la radiación.

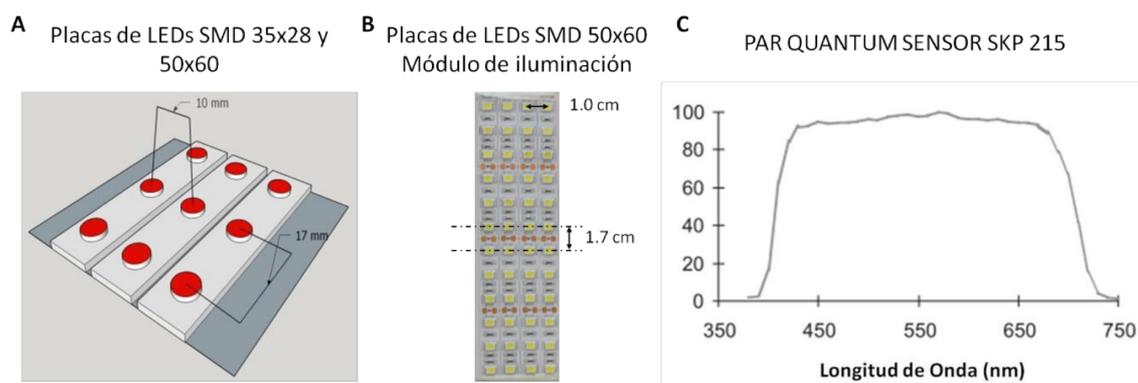


Figura (1). Esquematización de las placas de LEDs. A] Modelo 35x28 y 50x60. B] Modelo 50x60 Módulo de iluminación. C] Perfil de respuesta en términos de λ (%) del detector Par quantum sensor SKP 215.

(4.3).- Distribución direccional de emisión

Para encontrar la función de distribución direccional de los fotones emitidos por los LEDs es necesario contar con medidas de radiación correspondientes a distintos puntos situados sobre la superficie de una semi-esfera, que contiene en su centro a los LEDs. Dicho de otro modo, se requieren medidas de radiación para distintos ángulos θ y φ (coordenadas esféricas), respecto a la placa de LEDs. Para ello, se utilizó un dispositivo diseñado y construido *ad hoc*, el cual consiste en una carcasa metálica con interior de color negro (para evitar fenómenos de reflexión, refracción, y radiación ambiental), dotada de un sitio de fijación circular de vidrio en la base que permite el centrado de las placas de LEDs, Fig. (2C). Un eje de rotación situado en la base permite el movimiento angular del dispositivo (rotación alrededor del eje z en el plano xy), con una variación no regulable de 5° , resultando en valores de φ contenidos en el rango $[0^\circ-90^\circ]$. Para lograr la variación angular en θ , el detector se traslada sobre la

esfera alcanzando distintas alturas respecto a la base, partiendo de una altura fija de 17 [cm] determinada por la construcción.

Se registraron lecturas con el radiómetro barriendo θ (desde $\theta=0^\circ$ hasta $\theta=90^\circ$ con $\Delta\theta=5^\circ$) y φ (desde $\varphi=0^\circ$ hasta $\varphi=90^\circ$ con $\Delta\varphi=10^\circ$), para una única placa de LEDs, dado que todos los diodos pertenecen al mismo modelo (SMD).

(4.4).- Distribución espectral de emisión

Se utilizó un espectrofotómetro portátil de fibra óptica Ocean Optics USB 2000 [63], el cual contiene un sistema de espejos y redes de difracción que lo hacen capaz para fraccionar el haz de fotones en los fotones que lo componen (λ), y registrarlos en forma individual mediante un detector CCD. Los detectores CCD, al igual que las células fotovoltaicas, se basan en el efecto fotoeléctrico y la conversión espontánea de la luz recibida en corriente eléctrica. La respuesta medida por el equipo brinda la distribución espectral de la densidad de energía radiante proveniente de los LEDs en [Joule $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{nm}^{-1}$].

La distribución espectral de emisión es independiente del valor del flujo de fotones al que operan los LEDs. Es por esto que las experiencias fueron efectuadas con placas de LEDs 35x28 y 50x60 compuestas por 9 LEDs, posicionando el detector del espectrofotómetro, de tipo fibra óptica, a una distancia tal que se evite la saturación del equipo.

(4.5).- Flujo de fotones

Las experiencias para medir el flujo de fotones de los modelos 35x28, 50x60, y 50x60 módulo de iluminación fueron diferentes:

- Para LEDs 35x28 se utilizó el dispositivo *ad-hoc* descrito en la Sección (4.3) y esquematizado en la Fig. (2C). La placa de LEDs se encontró a una distancia de 17 [cm] del radiómetro y el centro del detector coincidió con el LED del centro de la placa.
- Para LEDs 50x60 se utilizó otro dispositivo *ad-hoc*, que consiste en un cilindro plástico de color negro con dos agujeros en sus extremos. El primero de ellos, de mayor diámetro y dispuesto en la parte superior permite introducir y fijar el radiómetro, mientras que el restante permite aislar el LED central de la placa, y así registrar sólo la radiación proveniente de éste. En esta configuración el centro del detector coincidió con el LED situado en el centro de la placa, separados por una distancia de 5 [cm]. La Fig. (2A) esquematiza el dispositivo utilizado para estos LEDs.
- Para LEDs 50x60 módulo de iluminación el radiómetro fue localizado a distintas distancias y orientaciones respecto al centro de una placa de LEDs, como se muestra en la Fig. (2B). La placa fue operada al 100% de su capacidad de emisión. Para evitar radiaciones externas, y fenómenos ópticos de reflexión y refracción en materiales cercanos, las placas fueron situadas sobre una tela de color negra, y las medidas efectuadas en una sala a oscuras.

En todos los casos, antes de efectuar las mediciones se esperó el tiempo suficiente para lograr la estabilización de la emisión.

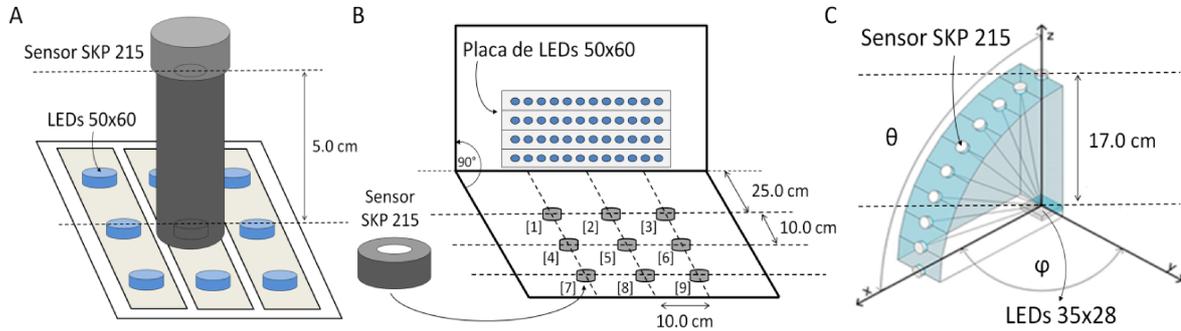


Figura (2). A) Esquema del dispositivo construido *ad hoc* para el cálculo del flujo de fotones de LEDs 50x60. B) Posiciones y orientaciones adoptadas por la placa de LEDs y el detector para el cálculo del flujo de fotones de LEDs 50x60 módulo de iluminación. C) Esquema del dispositivo utilizado para la determinación de la función de distribución direccional de emisión y el flujo de fotones de LEDs 35x28. En el centro del sistema de coordenadas (x, y, z), (0, 0, 0), se posiciona el LED central de la placa, y en los diferentes ángulos θ y φ , se posiciona el radiómetro.

(4.6).- Algoritmos computacionales

Para el cálculo de la intensidad y del flujo de fotones de cada modelo de LED se utilizó Force 2.0 como compilador de lenguaje de programación Fortran 90. El algoritmo de cálculo implementado se detalla en la Sección (5.4) de Resultados y Discusión.

(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(5.1).- La transferencia de energía radiante

La transferencia radiativa es el fenómeno físico de transferencia de energía en forma de radiación electromagnética. La potencia procedente de un elemento de superficie, real o virtual dA_1 , que incide sobre un elemento de superficie, también real o virtual dA_2 , ambos en un medio transparente a la radiación de longitud de onda λ (esto es, un medio “no participativo” para dicha λ), puede representarse por la siguiente expresión:

$$dN_{\lambda}^{(1,2)} = n_{\lambda}^{(1,2)}(\underline{r}_1, \underline{\hat{\Omega}}_{1,2}, t) d\lambda dt \frac{(\underline{\hat{n}}_1 \cdot \underline{\hat{\Omega}}_{1,2}) dA_1 (\underline{\hat{n}}_2 \cdot \underline{\hat{\Omega}}_{2,1}) dA_2}{r_{1,2}^2} \quad (1)$$

En la Ec. (1), $dN_{\lambda}^{(1,2)}$ [μmol] es el número infinitesimal de fotones con longitud de onda λ [nm] procedentes de la superficie elemental dA_1 [m^2] que inciden sobre la superficie elemental dA_2 [m^2] durante el lapso dt [s]; $n_{\lambda}^{(1,2)}(\underline{r}_1, \underline{\hat{\Omega}}_{1,2}, t)$ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{sr}^{-1}$] es la intensidad de radiación monocromática con longitud de onda λ asociada al haz de fotones emergentes de la superficie elemental dA_1 , que se propagan en la dirección $\underline{\hat{\Omega}}_{1,2}$ en el instante t ; dA_1 es una superficie elemental (real o virtual) ubicada en la posición \underline{r}_1 ; dA_2 es una superficie elemental (real o virtual) ubicada en la posición \underline{r}_2 ; $\underline{\hat{n}}_1$ es un vector unitario normal a la cara expuesta al intercambio radiante de dA_1 con

dA_2 ; \hat{n}_2 es un vector unitario normal a la cara expuesta al intercambio radiante de dA_2 con dA_1 ; $\hat{\Omega}_{1,2}$ es un vector unitario que une las superficies elementales en situación de intercambio de fotones, orientado desde la superficie dA_1 hacia dA_2 ; $\hat{\Omega}_{2,1}$ es un vector unitario que une las superficies, orientado desde la superficie dA_2 hacia dA_1 ; y $r_{1,2} = r_{2,1}$ [m] es la distancia entre las superficies dA_1 y dA_2 . En la Fig. (3A) se esquematiza el intercambio de fotones entre dos superficies elementales.

En el miembro de la derecha de la Ec. (1) pueden definirse dos grupos de términos, uno denominado “factor energético” y el otro “factor geométrico, de forma, o de visión”:

$$dN_{\lambda}^{(1,2)} = \underbrace{n_{\lambda}^{(1,2)}(r_1, \hat{\Omega}_{1,2}, t) d\lambda dt}_{\text{"factor energético"}} \underbrace{\frac{(\hat{n}_1 \cdot \hat{\Omega}_{1,2}) dA_1 (\hat{n}_2 \cdot \hat{\Omega}_{2,1}) dA_2}{r_{1,2}^2}}_{\text{"factor geométrico"}} \quad (1)$$

El “factor geométrico” permanece inalterado ante una permutación de índices, sin embargo, ante la misma operación el factor “energético” cambia el significado del intercambio de fotones.

Definimos un elemento de ángulo sólido alrededor $\hat{\Omega}_{1,2}$ de la siguiente forma:

$$d\hat{\Omega}_{1,2} = (\hat{n}_2 \cdot \hat{\Omega}_{2,1}) dA_2 / r_{1,2}^2 \quad (2)$$

En la Ec. (2) el producto escalar de vectores unitarios $(\hat{n}_1 \cdot \hat{\Omega}_{1,2})$ es equivalente al coseno del ángulo que forman dichos vectores, Fig. (3A). El término $(\hat{n}_1 \cdot \hat{\Omega}_{1,2}) dA_2$ corresponde a la proyección de la superficie dA_2 , cuya normal es \hat{n}_2 , sobre el plano perpendicular a la dirección $\hat{\Omega}_{2,1}$, siendo $\hat{\Omega}_{2,1} = -\hat{\Omega}_{1,2}$.

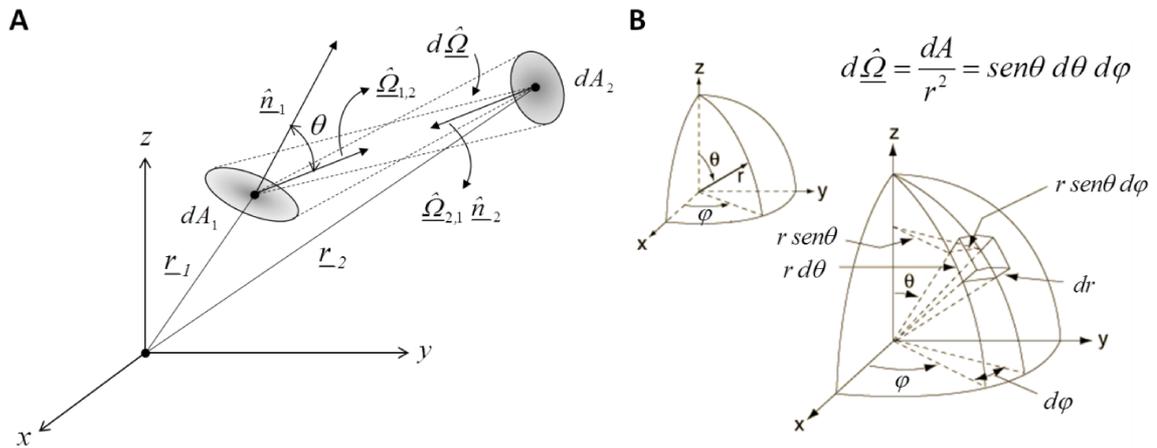


Figura (3). A] Esquemización del intercambio de energía radiante entre dos superficies elementales dA_1 y dA_2 . B] Definición del diferencial de ángulo sólido $d\hat{\Omega}$ en un sistema de coordenadas esféricas.

Incorporando la definición de $d\hat{\Omega}_{1,2}$ la ecuación de transferencia de energía radiante en términos del número de fotones, Ec. (1), puede escribirse como:

$$dN_{\lambda}^{(1,2)} = n_{\lambda}^{(1,2)}(r_1, \hat{\Omega}_{1,2}, t) \cos \theta_1 d\hat{\Omega}_{1,2} dA_1 d\lambda dt \quad (3)$$

La expresión para el elemento de ángulo sólido, $d\hat{\Omega}_{1,2}$, alrededor de la dirección $\hat{\Omega}_{1,2}$ en un sistema de coordenadas esféricas, como función de los ángulos θ y φ , resulta ser:

$$d\hat{\Omega}_{1,2} = \text{sen } \theta_1 d\theta_1 d\varphi = -d(\cos \theta_1) d\varphi = -du_1 d\varphi \quad (4)$$

donde u_1 es el coseno del ángulo entre los vectores unitarios \hat{n}_1 y $\hat{\Omega}_{1,2}$, $\cos \theta_1$.

Adoptando la definición alternativa para $d\hat{\Omega}_{1,2}$, la Ec. (3) puede escribirse como:

$$dN_\lambda^{(1,2)} = n_\lambda^{(1,2)}(\underline{r}_1, \hat{\Omega}_{1,2}, t) \cos \theta_1 \text{sen } \theta_1 d\theta_1 d\varphi dA_1 d\lambda dt \quad (5)$$

$$dN_\lambda^{(1,2)} = -n_\lambda^{(1,2)}(\underline{r}_1, \hat{\Omega}_{1,2}, t) u_1 du_1 d\phi_1 dA_1 d\lambda dt \quad (6)$$

La cantidad de fotones intercambiados entre las superficies dA_1 y dA_2 , para una dada superficie dA_2 , será la misma siempre y cuando su proyección sobre el plano transversal a la dirección $\hat{\Omega}_{1,2}$ sea proporcional al cuadrado de la distancia entre ambas superficies elementales, $r_{1,2}^2$, Ec. (2). La consecuencia más importante de definir un elemento de ángulo sólido $d\hat{\Omega}$ alrededor de la dirección $\hat{\Omega}_{1,2}$, es que torna innecesaria la superficie elemental dA_2 .

Sobre la superficie elemental dA_1 ubicada en la posición \underline{r}_1 , el número infinitesimal de fotones con longitud de onda λ que se propagan en la dirección $\hat{\Omega}$ durante el lapso dt es:

$$dq_{\lambda, \hat{\Omega}}^{(1,2)} = \frac{dN_\lambda^{(1,2)}}{dt d\lambda dA_1} = n_\lambda^{(1,2)}(\underline{r}_1, \hat{\Omega}_{1,2}, t) (\hat{n}_1 \cdot \hat{\Omega}_{1,2}) d\hat{\Omega} \quad (7)$$

Considerando todas las direcciones posibles $\hat{\Omega}$ obtenemos la contribución infinitesimal a la densidad espectral de flujo de fotones, $dq_\lambda^{(1,2)}$ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{nm}^{-1}$], Ec. (8).

$$dq_\lambda^{(1,2)} = \int_{\hat{\Omega}} dq_{\lambda, \hat{\Omega}}^{(1,2)} d\hat{\Omega} = \int_{\hat{\Omega}} n_\lambda^{(1,2)}(\underline{r}_1, \hat{\Omega}_{1,2}, t) (\hat{n}_1 \cdot \hat{\Omega}_{1,2}) d\hat{\Omega} \quad (8)$$

La contribución infinitesimal a la densidad de flujo de fotones, considerando sólo los fotones comprendidos en la región visible del espectro electromagnético, $dq_{VIS}^{(1,2)}$ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$], se obtiene por integración de $dq_\lambda^{(1,2)}$ en el rango $400 \leq \lambda \leq 700$ [nm], Ec. (9).

$$dq_{VIS}^{(1,2)} = \int_{VIS} dq_\lambda^{(1,2)} d\lambda = \int_{VIS} \int_{\hat{\Omega}} n_\lambda^{(1,2)}(\underline{r}_1, \hat{\Omega}_{1,2}, t) (\hat{n}_1 \cdot \hat{\Omega}_{1,2}) d\hat{\Omega} d\lambda \quad (9)$$

Es importante remarcar que la intensidad del haz de fotones puede depender de $\hat{\Omega}$ y λ .

Consideremos la emisión de energía radiante por una superficie elemental dA_1 . La intensidad de la radiación emitida por la superficie elemental puede reescribirse como $n_\lambda^{(1,2)}(\underline{r}_1, \hat{\Omega}_{1,2}, t) = n_\lambda^{(1,2)}(\underline{r}_1, \hat{\Omega}_{1,2}, t) dA_1$. Luego, la contribución infinitesimal al flujo espectral de fotones, definido como la cantidad infinitesimal de fotones emitidos por la superficie elemental, por unidad de tiempo y por unidad de longitud de onda, dQ_λ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{nm}^{-1}$], contenidos en el conjunto de direcciones $d\hat{\Omega}$ alrededor de la dirección $\hat{\Omega}$, resulta ser:

$$dQ_\lambda = n_\lambda^{(1,2)}(r_1, \hat{\underline{\Omega}}_{1,2}, t) dA (\hat{n}_1 \cdot \hat{\underline{\Omega}}_{1,2}) d\hat{\underline{\Omega}} = n_\lambda^{(1,2)}(r_1, \hat{\underline{\Omega}}_{1,2}, t) (\hat{n}_1 \cdot \hat{\underline{\Omega}}_{1,2}) d\hat{\underline{\Omega}} \quad (10)$$

Es posible ver que dQ_λ depende de la dirección de emisión $\hat{\underline{\Omega}}$ a través del producto escalar $(\hat{n} \cdot \hat{\underline{\Omega}})$. El flujo infinitesimal resulta ser máximo cuando los vectores $\hat{\underline{\Omega}}$ y \hat{n} están orientados de forma paralela, y disminuye a medida que se incrementa el ángulo formado entre dichos vectores. Cuando $\hat{\underline{\Omega}}$ y \hat{n} son perpendiculares, el flujo infinitesimal emitido por la superficie elemental es nulo.

El flujo de fotones, considerando todas las posibles direcciones $\hat{\underline{\Omega}}$, y los fotones comprendidos en la región visible del espectro electromagnético, Q_{VIS} [$\mu\text{mol s}^{-1}$], se obtiene de:

$$Q_{VIS} = \int \int_{VIS \hat{\underline{\Omega}}} dQ_\lambda = \int \int_{VIS \hat{\underline{\Omega}}} n_\lambda^{(1,2)}(r_1, \hat{\underline{\Omega}}_{1,2}, t) (\hat{n}_1 \cdot \hat{\underline{\Omega}}_{1,2}) d\hat{\underline{\Omega}} d\lambda \quad (11)$$

Las propiedades deducidas a partir de la adopción de un modelo para el intercambio de energía radiante entre superficies serán de utilidad para el entendimiento de los resultados de las experiencias efectuadas.

(5.2).- Distribución direccional de emisión

La Fig. (4A) muestra los valores de densidad de flujo de fotones q_{VIS} registrados con el radiómetro, correspondientes a diferentes ángulos θ y φ (ver Fig. (2C)). En la Fig. (4B) se comparan las medidas experimentales de q_{VIS} con la función $\cos(\theta)$. Como puede observarse, q_{VIS} se mantiene constante para todos los ángulos φ de cada ángulo θ , lo que nos permite concluir que la emisión en φ es independiente de θ . Sin embargo, a medida que aumenta θ se evidencia una disminución en el valor de q_{VIS} . La forma en la que se produce el decaimiento es proporcional a $\cos(\theta)$. A partir de esto, y teniendo en cuenta la expresión para el flujo de fotones emitidos por una superficie elemental, Ec. (11), es posible concluir que la intensidad de los LEDs es independiente de la dirección de emisión $\hat{\underline{\Omega}}(\theta, \varphi)$. Una emisión con éstas características se conoce como “emisión isotrópica”.

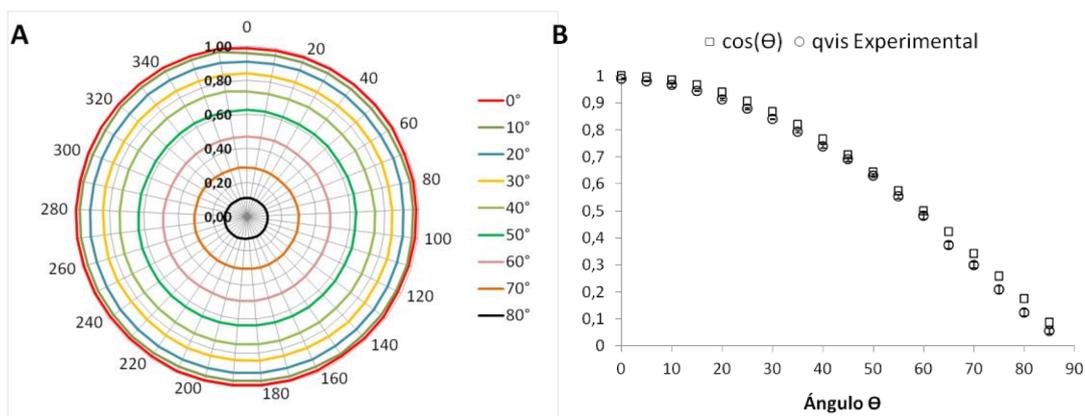


Figura (4). A] Cada curva describe el valor de q_{VIS} para un ángulo θ y sus correspondientes ángulos φ . θ (desde 0° hasta 90° con variación de 10°), φ (desde 0° hasta 360°, cada 20°). B] Medidas de q_{VIS} y $\cos(\theta)$ para diferentes θ (desde $\theta=0^\circ$ hasta $\theta=90^\circ$ con $\Delta\theta=5^\circ$). En ambas Figs. las mediciones se normalizaron a 1 con el valor más grande registrado para q_{VIS} ($\theta=0^\circ$).

A partir de la información obtenida de las medidas experimentales de q_{VIS} , es posible definir la función de distribución direccional de los fotones emitidos por los LEDs. Por un lado, φ puede tomar valores entre $0 \leq \varphi \leq 2\pi$, siendo todos ellos igualmente probables e independientes de θ ; mientras que θ puede tomar valores entre $0 \leq \theta \leq \pi/2$, cuya distribución está relacionada a $\cos(\theta)$. Las funciones de distribución para θ y φ , E_θ y E_φ , quedan definidas de acuerdo a:

$$\int_0^{2\pi} E_\varphi d\varphi = E_\varphi \int_0^{2\pi} k d\varphi = 1 \quad (12)$$

$$E_\varphi = \frac{1}{2\pi} \quad (13)$$

$$\int_0^{\pi/2} E_\theta d\theta = \int_0^{\pi/2} k \cos(\theta) d\theta = k \int_0^{\pi/2} \cos(\theta) d\theta = 1 \quad (14)$$

En la Ec. (14), k es una constante de normalización para que el área bajo E_θ , en todo el rango posible de valores de θ , sea 1.

$$k \sin(\theta) \Big|_0^{\pi/2} = 1 \quad ; \quad k = 1 \quad (15)$$

$$E_\theta = \cos(\theta) \quad (16)$$

La función de distribución direccional de emisión de los LEDs, $E_{\theta,\varphi}$, siendo que las funciones de distribución de θ y φ son independientes, puede expresarse de la siguiente manera:

$$E_{\theta,\varphi} = E_\varphi E_\theta = \frac{1}{2\pi} \cos(\theta) \quad (17)$$

(5.3).- Distribución espectral de emisión

La absorción de energía radiante en los fotosistemas es dependiente de la longitud de onda λ de la radiación, por ello se torna importante conocer cómo se compone la luz que “alimenta” al reactor.

Esta caracterización puede realizarse a través de una función de distribución espectral de energía, $E_{\lambda,w}(\lambda)$ [nm^{-1}], o de fotones, $E_{\lambda,f}(\lambda)$ [nm^{-1}].

Las funciones de distribución $E_{\lambda,w}(\lambda)$ y $E_{\lambda,f}(\lambda)$ deben cumplir con la siguiente condición:

$$\int_{\lambda} E(\lambda) d\lambda = 1 \quad (18)$$

El espectrofotómetro Ocean Optics USB 2000 registra la densidad espectral de energía, $q_{\lambda,w}$ [$\text{Joule m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{nm}^{-1}$], considerando rangos estrechos de longitudes de onda λ (± 0.36 [nm]). Los fotones de emitidos por los LEDs alrededor de una dirección $\hat{\underline{\Omega}}$ corresponden a todo el espectro que emiten los diodos, es decir, no existe una distribución de longitudes de onda λ como función de la dirección de emisión $\hat{\underline{\Omega}}$.

La medida de $q_{\lambda,w}$ depende de la posición relativa de la fuente de emisión respecto al detector del espectrofotómetro. La función de distribución espectral debe ser independiente de las posiciones relativas de los dispositivos, y para lograr esto es necesaria una normalización, Ec. (19).

$$E_{\lambda,w}(\lambda) = q_{\lambda,w} \int_{VIS} d\lambda \quad (19)$$

Para encontrar la función de distribución en términos del número de fotones, $E_{\lambda,f}(\lambda)$, la densidad de flujo espectral $q_{\lambda,w}$ puede ser definida a través de $E_{\lambda,w}(\lambda)$, como describe la Ec. (20).

$$q_{\lambda,w} E_{\lambda,w}(\lambda) = \frac{hc}{\lambda} q_{\lambda,f} E_{\lambda,f}(\lambda) \quad (20)$$

donde h es la constante de Planck y c es la velocidad de la luz en el vacío.

Integrando la Ec. (20) en λ , recordando que $q_{\lambda,w}$ y $q_{\lambda,f}$ no son función de λ , y que las integrales de $E_{\lambda,w}(\lambda)$ y $E_{\lambda,f}(\lambda)$ cumplen ciertos requisitos (Ec. (18)), se obtiene la expresión matemática del factor que permite la conversión de energía a fotones (Ec. (21)).

$$\frac{q_{\lambda,w}(\underline{r}, t)}{hc} \int_{\lambda} \lambda E_{\lambda,w}(\lambda) d\lambda = q_{\lambda,f}(\underline{r}, t) \underbrace{\int_{\lambda} E_{\lambda,f}(\lambda) d\lambda}_1 \quad (21)$$

$$q_{\lambda,f}(\underline{r}, t) = \frac{q_{\lambda,w}(\underline{r}, t)}{hc} \int_{\lambda} \lambda E_{\lambda,w}(\lambda) d\lambda \quad (22)$$

Conociendo los valores de $q_{\lambda,w}$ podemos encontrar $E_{\lambda,f}(\lambda)$ a través de la Ec. (23).

$$E_{\lambda,f}(\lambda) = q_{\lambda,f} \int_{VIS} d\lambda \quad (23)$$

La Fig. (6A) muestra $E_{\lambda,f}(\lambda)$ para los diferentes modelos de LEDs.

(5.4).- Flujo de fotones

Para la determinación del flujo de fotones se llevaron a cabo una serie de experiencias que consistieron en registrar con un radiómetro, localizado en diferentes posiciones, la energía radiante proveniente de un arreglo de LEDs (modelos 35x28 y 50x60 módulo de iluminación) o de un único LED (modelo 50x60) (ver Figs. (2)). La medida provista por el detector corresponde a la densidad de flujo de fotones sobre el detector, considerando los fotones incluidos en la región de $400 \leq \lambda \leq 700$ [nm], q_{VIS} [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$].

A fines del modelado, se considerará que cada LED es una unidad indivisible con un área lo suficientemente pequeña para considerarlo una superficie elemental, ΔA_i . Dicho LED intercambia fotones con el detector, y el área de éste resulta ser grande en comparación al LED, y por lo tanto, la cantidad de fotones intercambiados varía con la posición sobre el detector. Es por ello que se divide la superficie del radiómetro en elementos de superficie más pequeños, ΔA_j , y se calcula el número de fotones intercambiados entre cada LED, y cada uno de los ΔA_j .

El número de fotones intercambiados por unidad de tiempo, $\Delta N/\Delta t$ [$\mu\text{mol s}^{-1}$], entre un LED “i” y un elemento de superficie “j” del detector, es:

$$\frac{\Delta N_\lambda}{\Delta t} = n_\lambda(r, \hat{\Omega}_{i,j}, t) \Delta\lambda \frac{(\hat{n}_i \cdot \hat{\Omega}_{i,j}) \Delta A_i (\hat{n}_j \cdot \hat{\Omega}_{j,i}) \Delta A_j}{r_{j,i}^2} \quad (24)$$

En la Ec. (24), ΔN_λ refiere al número de fotones [μmol] con longitud de onda λ que llegan a un elemento de superficie “j” del detector, ΔA_j , provenientes de un LED “i” de la placa, ΔA_i , y n_λ a la intensidad espectral del haz de fotones [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{sr}^{-1}$]. Dado que el LED se asume como una superficie elemental, la intensidad espectral del haz de fotones por LED puede ser reescrita como:
 $n_\lambda(\hat{r}, \hat{\Omega}, t) = n_\lambda(\hat{r}, \hat{\Omega}, t) \Delta A_i$.

La intensidad n'_λ puede expresarse en términos de $E_\lambda(\lambda)$ [nm^{-1}] de la siguiente manera:

$$n'_\lambda = n'_{VIS} E(\lambda) \quad (25)$$

siendo:

$$n'_{VIS} = \int_{VIS} n'_\lambda d\lambda \quad (26)$$

Luego, la densidad de flujo de fotones q_{VIS} sobre la superficie del detector es el resultado del número de fotones por unidad de tiempo que intercambian cada ΔA_j sobre el detector, con cada uno de los LEDs, dividido el área del detector, A_D .

$$q_{VIS} = \frac{1}{A_D} \sum_{LED_i} \sum_{\Delta A_j} \sum_{\lambda} \left(\frac{\Delta N_\lambda}{\Delta t} \right) \quad (27)$$

$$q_{VIS} = \frac{1}{A_D} \sum_{LED_i} \sum_{\Delta A_j} \sum_{\lambda} \left(n'_\lambda \Delta\lambda \frac{(\hat{n}_i \cdot \hat{\Omega}_{i,j}) (\hat{n}_j \cdot \hat{\Omega}_{j,i}) \Delta A_j}{r_{j,i}^2} \right) \quad (28)$$

Incorporando a la Ec. (29) la relación que existe entre n'_λ y n'_{VIS} dada por la Ec. (25), resulta:

$$q_{VIS} = \frac{1}{A_D} \sum_{LED_i} \sum_{\Delta A_j} \sum_{\lambda} \left(n'_{VIS} E(\lambda) \Delta\lambda \frac{(\hat{n}_i \cdot \hat{\Omega}_{i,j}) (\hat{n}_j \cdot \hat{\Omega}_{j,i}) \Delta A_j}{r_{j,i}^2} \right) \quad (29)$$

La función de distribución $E_\lambda(\lambda)$ es independiente de la dirección de emisión y de la superficie receptora, y cumple con la condición establecida en la Ec. (18).

$$q_{VIS} = \frac{1}{A_D} \sum_{LED_i} \sum_{\Delta A_j} \left(n'_{VIS} \frac{(\hat{n}_i \cdot \hat{\Omega}_{i,j}) (\hat{n}_j \cdot \hat{\Omega}_{j,i}) \Delta A_j}{r_{j,i}^2} \right) \quad (30)$$

Considerando una emisión de tipo isotrópica resulta:

$$n'_{VIS} = \frac{q_{VIS} A_D}{\sum_{LED_i} \sum_{\Delta A_j} \left(\frac{(\hat{n}_i \cdot \hat{\Omega}_{i,j}) (\hat{n}_j \cdot \hat{\Omega}_{j,i}) \Delta A_j}{r_{j,i}^2} \right)} \quad (31)$$

En la Ec. (31), n'_{VIS} es la intensidad en términos del número de fotones considerando el rango $400 \leq \lambda \leq 700$ [nm], A_D es el área del radiómetro [m^2] y es una magnitud conocida, q_{VIS} es la medida registrada por el radiómetro, y el término en el denominador es el factor geométrico (ver Ec. (1)), y puede calcularse en forma numérica. La metodología de cálculo adoptada para la resolución numérica fue implementada en lenguaje de programación Fortran 90, y se esquematiza en la Fig. (5). Los datos relevantes se detallan en la Tabla (1).

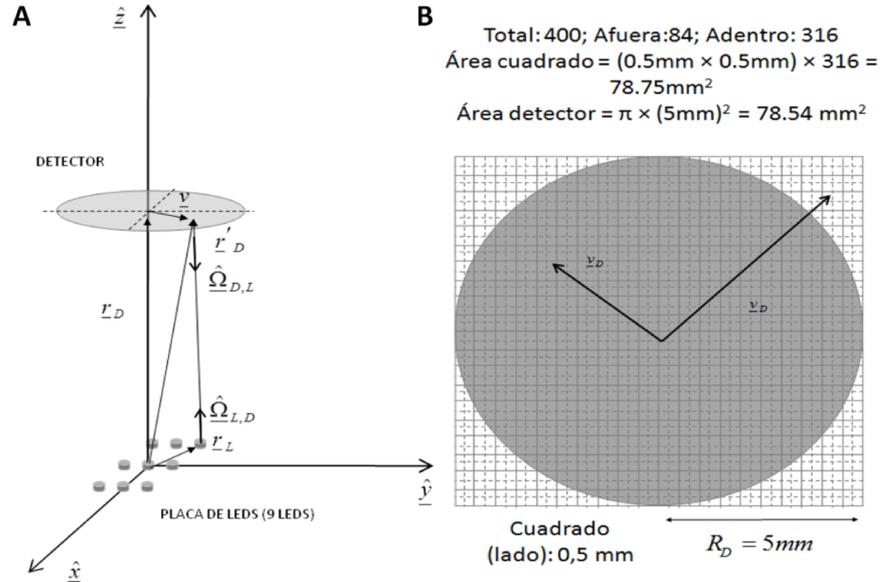


Figura (5). A) Metodología de cálculo numérica para el factor geométrico de la Ec. (31). B) División del área circular del detector en elementos de superficie cuadrados, ΔA_j , de 0.5 mm de lado, con la finalidad de simular todos los intercambios de energía radiante entre éstos elementos y los “i” LEDs de la placa, ΔA_i , considerados superficies elementales.

Tabla (1). Detalles de la metodología de cálculo numérica para el factor geométrico de la Ec. (31), en el sistema esquematizado en la Fig. (5A).
*La posición del detector es: r_D
*Las posiciones de los elementos de superficie sobre el detector, ΔA_j , son: $r'_D = r_D + \underline{v}$
*Existe un vector \underline{v} para cada posición sobre el detector:
$\begin{pmatrix} -R_D + \Delta x_D / 2 < v_x < R_D - \Delta x_D / 2 \\ -R_D + \Delta z_D / 2 < v_y < R_D - \Delta z_D / 2 \\ v_z = 0 \end{pmatrix}$ $\Delta x = 0.5mm ; \Delta y = 0.5mm$
*Si el módulo del vector \underline{v} , $ \underline{v} $, es mayor que R_D (5 [mm]) no se considera el aporte de esa posición al intercambio de energía radiante. Siendo $ \underline{v} = \sqrt{v_x^2 + v_y^2 + v_z^2}$.
*El área de cada ΔA_j , es: $\Delta A_D = \Delta A_x \Delta A_y$.
*El vector normal a cada ΔA_j , \hat{n}_D , es igual para todas las posiciones: $\hat{n}_D = (0\hat{x}, 0\hat{y}, -1\hat{z})$
*Las posiciones de los 9 LEDs sobre la placa son: $r_L = (x_i\hat{x}, y_i\hat{y}, z_i\hat{z})$.
*El vector normal a la superficie de los “i” LEDs, \hat{n}_L , es el mismo para todos: $\hat{n}_L = (0\hat{x}, 0\hat{y}, 1\hat{z})$.

La expresión para el flujo total de fotones que emergen de un LED, considerando los fotones con longitudes de onda λ contenidas en el rango $400 \leq \lambda \leq 700$ [nm], y teniendo en cuenta todas las direcciones de emisión posibles para un LED, resulta ser:

$$Q_{VIS} = \int_{\Omega} n'_{VIS} d\hat{\Omega} \quad (32)$$

Incorporando la expresión de $d\hat{\Omega}$ presente en la Ec. (4) resulta:

$$Q_{VIS} = - \int \int_{\phi u} n'_{VIS} u d\phi du = - \int_0^{2\pi} \int_1^0 n'_{VIS} u d\phi du = -n'_{VIS} \int_0^{2\pi} d\phi \int_1^0 u du \quad (33)$$

$$Q_{VIS} = n'_{VIS} \pi \quad (34)$$

Las Tablas (2) y (3) muestran los valores medidos de q_{VIS} , y los calculados de n_{VIS} y Q_{VIS} para los modelos de LEDs de interés.

Tabla (2). Valores de q_{VIS} , n_{VIS} y Q_{VIS} para LEDs 35x28 y 50x60.			
LED	q_{VIS} [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$]	n_{VIS} [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{nm}^{-1} \text{sr}^{-1} \text{LED}^{-1}$]	Q_{VIS} [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{LED}^{-1}$]
35x28 azul	3.30	1.05×10^{-2}	3.29×10^{-2}
35x28 rojo	2.20	7.64×10^{-3}	2.40×10^{-2}
50x60 blanco frio	10.30	3.14×10^{-2}	9.87×10^{-2}

Tabla (3). Valores de q_{VIS} , n_{VIS} y Q_{VIS} para LEDs 50x60 módulo de iluminación. *Para el cálculo de n_{VIS} y Q_{VIS} se efectuó un promedio de los valores correspondientes a las 9 posiciones consideradas, Fig. (2B).									
Distancia del detecto al centro de la placa [cm]	25			35			45		
Capacidad de emisión: 100 %	Posición del detector, Fig. (2B).								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
q_{VIS} [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$]	48.0	58.7	48.2	28.6	32.0	29.1	18.4	19.9	19.1
n_{VIS} [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{nm}^{-1} \text{sr}^{-1} \text{LED}^{-1}$]	8.59×10^{-2}								
Q_{VIS} [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{LED}^{-1}$]	0.27								

La función de distribución espectral del flujo de fotones, o flujo espectral de fotones, [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{nm}^{-1} \text{LED}^{-1}$], puede obtenerse multiplicando Q_{VIS} [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{LED}^{-1}$] por la función $E_{\lambda,f}(\lambda)$ [nm^{-1}], Fig. (6).

Los LEDs descriptos aquí tienen fabricación industrial en serie, es decir que todos son construidos con el mismo proceder. Para las experiencias presentes en Capítulos de Tesis posteriores se supone que el flujo de fotones, la distribución angular de emisión y la distribución espectral de emisión, son idénticas para todos los LEDs correspondientes a un mismo modelo.

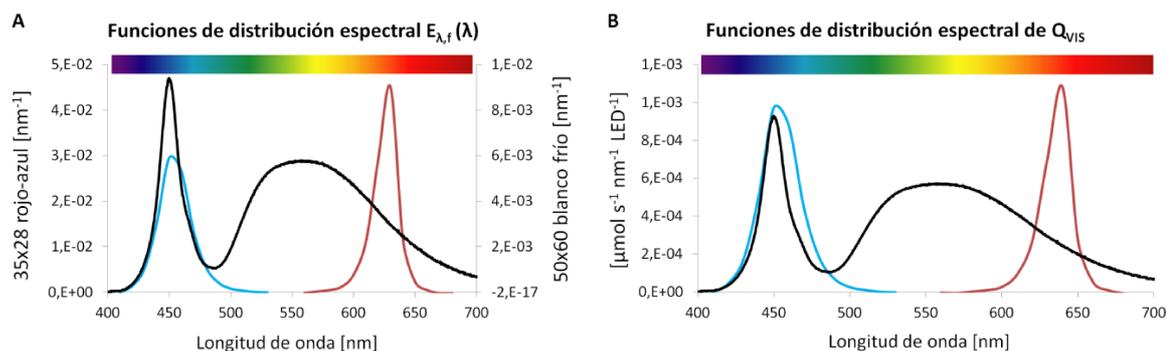


Figura (6). A] Funciones de distribución espectral $E_{\lambda,f}(\lambda)$ [nm^{-1}] para LEDs 35x28 azules y rojos, y LEDs 50x60 blanco frío. B] Funciones de distribución espectral del flujo de fotones para LEDs 35x28 azules y rojos, y LEDs 50x60 blanco frío.

(6).- CONCLUSIONES

En el presente Capítulo se efectuó la caracterización exhaustiva de la energía radiante emitida por los LEDs elegidos para diseñar y construir fuentes de radiación, con el fin de efectuar cultivos de microalgas en FBRs.

De las experiencias se puede concluir que los LEDs emiten en forma isotrópica, es decir, la intensidad no depende del ángulo de emisión, o lo que es lo mismo, el flujo de fotones se mantiene constante en todos los ángulos φ para un mismo ángulo θ , y se evidencia una disminución proporcional a $\cos(\theta)$ en el valor del flujo de fotones a medida que aumenta el ángulo θ . La intensidad es una propiedad escalar, y al igual que la función de distribución espectral, varía según el modelo de LED.

CAPÍTULO (2)

**Modelado físico-matemático del campo de radiación en suspensiones de microalgas:
Simulación a través de la metodología de Monte Carlo**

(1).- RESUMEN

El conocimiento del campo de radiación (CER) en un sistema de cultivo de microalgas, en parte producto de la interacción entre la luz y las células del microorganismo, es un aspecto esencial en el contexto de estudios biológicos, y en las etapas de diseño, optimización y escalado de fotobiorreactores (FBRs).

En el presente Capítulo se desarrollan algoritmos computacionales para la simulación del CER dentro de suspensiones de microalgas, en lenguaje de programación Fortran 90 y basados en la metodología de Monte Carlo (MC), un método de cálculo fundamentado en la generación de números aleatorios para la determinación de probabilidades. Los algoritmos contemplan las características de la fuente de energía radiante, la geometría del reactor, la orientación y disposición de la configuración fuente de luz-FBR, los fenómenos físicos de reflexión y refracción de luz en las fronteras del reactor, y los fenómenos de absorción y *scattering* dentro de la suspensión de microalgas.

(2).- INTRODUCCIÓN

El conocimiento del campo de radiación (CER) en un sistema de cultivo de microalgas permite: i) la búsqueda de expresiones cinéticas para el crecimiento de biomasa y acumulación de metabolitos, basadas en propiedades locales del CER [64-66], o en los valores promedio de la distribución de dichas propiedades, ej. velocidad de absorción de fotones de longitud de onda λ [67]; ii) el cálculo de rendimientos en términos de la luz suministrada o absorbida; iii) el análisis y entendimiento de los resultados de ensayos efectuados bajo determinadas condiciones operativas, ej. velocidad de crecimiento específica, productividad, composición de la biomasa (proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, pigmentos, etc.); iv) la elección de la fuente de radiación y el reactor, la política de iluminación (en términos de la cantidad de luz a suministrar y la duración), la metodología de *scaling up*, etc.

Cultivos sumergidos típicos de microalgas son suspensiones no homogéneas, que consisten en una nube de células de algas dispersas en todo el volumen de una solución salina. Una corriente de gas burbujeante, generalmente aire atmosférico, es utilizada como un medio para entregar CO₂ y agitar la suspensión. Si el medio de cultivo es transparente a la luz visible, cada haz de luz puede ser absorbido o dispersado mientras viaja a través de la suspensión.

La resolución de la Ecuación de Transferencia Radiativa (ETR) para un sistema de interés permite conocer la distribución espacial y direccional de la intensidad de radiación [68]. Para resolver la RTE dentro del FBR, las propiedades radiativas espectrales de la suspensión de microalgas son requeridas (coeficiente de absorción espectral, α_λ [mm⁻¹], coeficiente de *scattering* espectral; ε_λ [mm⁻¹], y los parámetros de la función de fase $B(\hat{\Omega} \cdot \hat{\Omega}')$ elegida. Estas propiedades pueden ser estimadas ya sea con métodos experimentales [69-71] o con enfoques teóricos (ej. la teoría de Mie [72]).

Debido a la complejidad de la ETR, la resolución analítica es posible solamente en sistemas muy sencillos. Para la mayoría de los FBRs utilizados para el cultivo de microalgas es necesario la

aplicación de diversos métodos que implican simplificaciones, a fin de poder resolver la ETR, ej. la Ley de Lambert-Beer, la aproximación de dos flujos y el método de la ordenada discreta [73-76]. Una alternativa a la resolución de la ETR y sus inherentes complicaciones, es la simulación física de la distribución del CER. En este sentido, un método normalmente utilizado es el de Monte Carlo (MC) [77-81], que tiene la ventaja de que no requiere la imposición de simplificaciones al sistema, con el fin de una resolución analítica.

(3).- OBJETIVOS

- Construir algoritmos computacionales basados en la metodología de MC para la simulación del CER en FBRs iluminados con luz LED, que permitan el cálculo de la distribución espacial en el FBR de la densidad de fotones y de la velocidad volumétrica de absorción de fotones de longitud de onda λ .

(4).- MATERIALES Y MÉTODOS

(4.1).- Algoritmos computacionales e *inputs*

Los algoritmos se implementaron en lenguaje de programación Fortran 90 y se compilaron con el programa Force 2.0.

Las propiedades ópticas de suspensiones de *Scenedesmus quadricauda*, necesarias para la simulación del CER en el interior de los FBRs, fueron extraídas del trabajo de Heinrich y col. [78].

(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(5.1).- Fundamentos de la simulación MC y estructura de los algoritmos computacionales

Consideramos al CER como un conjunto de fotones moviéndose a la velocidad de la luz. Cada fotón se asume como una partícula, y entonces el CER como un fluido no uniforme de fotones moviéndose a la velocidad de la luz.

Para incluir simultáneamente los fenómenos de absorción y dispersión de energía radiante en el seno de la solución, el medio de cultivo será tratado como una suspensión homogénea y continua, con centros de absorción y dispersión distribuidos al azar dentro de la suspensión. Bajo estas condiciones, las algas pierden identidad como partículas, y la suspensión se considera como un medio continuo con centros de absorción y dispersión de fotones homogéneamente distribuidos en toda la suspensión.

El método de MC es un método de simulación numérico basado en números aleatorios, que permite calcular estadísticamente el valor final de una secuencia de sucesos no deterministas, es decir sujetos a variabilidad. El error absoluto de la estimación decrece como $1/\sqrt{N}$, siendo N el número de veces que se repite el procedimiento, concluyendo que un incremento de N conduce a resultados con mayor exactitud.

En la simulación del CER mediante MC, la trayectoria de cada fotón desde la fuente de radiación hasta que se absorbe, o abandona el cultivo a través de los límites del FBR, se describe sobre una base

probabilística. Aunque los fotones se disparan sucesivamente durante el tiempo de computación, para los fines de la simulación del CER, todos los fotones se consideran como si se emitieran simultáneamente. Al repetir la simulación para un gran número de fotones, se construye un campo continuo de propiedades de radiación, distribuidas de manera desigual en el espacio y en la longitud de onda λ .

La densidad del número local de fotones con longitud de onda λ , con trayectoria a través de la posición \underline{r} en la dirección $\hat{\underline{\Omega}}$, $p_{\lambda, \hat{\underline{\Omega}}}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$, es la propiedad del CER sobre la cual un algoritmo de simulación MC puede ser construido. Si se conoce $p_{\lambda, \hat{\underline{\Omega}}}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$, la densidad espectral local de fotones, $e_{\lambda}(\underline{r}, t)$, puede obtenerse como:

$$e_{\lambda}(\underline{r}, t) = \int_{\hat{\underline{\Omega}}} p_{\lambda, \hat{\underline{\Omega}}}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) d\hat{\underline{\Omega}} \quad (1)$$

A partir de $e_{\lambda}(\underline{r}, t)$, es posible obtener la velocidad volumétrica espectral local de absorción de fotones, $r_{\lambda}(\underline{r}, t)$, la cual permite comprender de qué forma la luz, dentro el FBR, está localmente siendo absorbida por las microalgas, Ec. (2).

$$r_{\lambda}(\underline{r}, t) = c \alpha_{\lambda} e_{\lambda}(\underline{r}, t) \quad (2)$$

En la Ec. (2) c representa la velocidad de la luz.

Para encontrar las relaciones entre las propiedades del CER de interés, consideremos un elemento de volumen inmerso en el CER en la posición \underline{r} , que recibe radiación debido a los haces que lo atraviesan en todas las direcciones $\hat{\underline{\Omega}}$ posibles. Este volumen elemental contiene en cualquier instante t cierta cantidad de energía radiante residente en el mismo, producto de la presencia de fotones de longitud de onda λ . Si consideramos uno de esos haces monocromáticos, como el que se muestra en la Fig. (1A), la cantidad de fotones por unidad de área y por unidad de tiempo que atraviesan la proyección transversal a la dirección de propagación del haz $\hat{\underline{\Omega}}$ de una superficie elemental dA , ubicada en la posición \underline{r} , es:

$$dq_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = \frac{dN_{\lambda}}{dA \cos\theta \, d\lambda \, dt} = n_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) d\hat{\underline{\Omega}} \quad (3)$$

La Ec. (3) representa la contribución a la densidad de flujo local de fotones λ , debida al haz de fotones con intensidad $n_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$.

Ahora bien, el haz se propaga a una velocidad igual a la velocidad de la luz, aportando una cantidad $de_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ a la densidad de flujo local de fotones λ en la posición \underline{r} . De este modo, $dq_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ puede también ser escrita como:

$$dq_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = c \, de_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \quad (4)$$

De las Ecs. (3) y (4), inmediatamente surge que el aporte del haz considerado a la densidad espectral de fotones alrededor de la posición \underline{r} es:

$$de_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = \frac{I}{c} dq_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = \frac{I}{c} n_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) d\hat{\underline{\Omega}} \quad (5)$$

A partir de la Ec. (5), la densidad espectral local de fotones, $e_{\lambda}(\underline{r}, t)$, resulta ser:

$$e_{\lambda}(\underline{r}, t) = \int_{\hat{\underline{\Omega}}} de_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) d\hat{\underline{\Omega}} = \frac{I}{c} \int_{\hat{\underline{\Omega}}} n_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) d\hat{\underline{\Omega}} \quad (6)$$

Podemos definir la dirección de movimiento del fotón de acuerdo al ángulo polar θ y al ángulo acimutal φ , $\hat{\underline{\Omega}}(\theta, \varphi)$. Incorporando la definición de $d\hat{\underline{\Omega}}$ (ver la Ec. (4) del Capítulo (1)), la expresión para $e_{\lambda}(\underline{r}, t)$ resulta:

$$e_{\lambda}(\underline{r}, t) = \frac{I}{c} \int_0^{2\pi} d\varphi \int_{-1}^1 n_{\lambda}(\underline{r}, \mu, \varphi, t) d\mu \quad (7)$$

donde $\mu = \cos \theta$.

Es posible establecer la siguiente identidad respecto a las definiciones de la densidad espectral local de fotones $e_{\lambda}(\underline{r}, t)$, calculada a partir de la intensidad del haz de fotones $n_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$, y la densidad del número local de fotones $p_{\lambda, \hat{\underline{\Omega}}}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$:

$$e_{\lambda}(\underline{r}, t) = \frac{I}{c} \int_{\hat{\underline{\Omega}}} n_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) d\hat{\underline{\Omega}} = \int_{\hat{\underline{\Omega}}} p_{\lambda, \hat{\underline{\Omega}}}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) d\hat{\underline{\Omega}} \quad (8)$$

(5.1.1).- Elección del modelo de LED, la dirección y la longitud de onda λ del fotón emitido.

En el Capítulo (1) hemos encontrado las propiedades de la energía radiante emitida por los LEDs utilizados en la presente Tesis. Cabe recordar que los LEDs son considerados como superficies de emisión de energía radiante diferenciales. Es por ello que la emisión de fotones en las simulaciones se efectúa desde un punto en el espacio, coincidente con el centro del LED.

Para la elección del modelo de LED, en casos de arreglos compuestos por más de uno, se genera un número aleatorio $0 \leq \delta_{LED} \leq 1$, y se compara δ_{LED} con la fracción que cada modelo de LED aporta al flujo radiante total de la fuente. Para determinar la posición del LED que emitirá el fotón se genera un número aleatorio entero $1 \leq \delta_P \leq n_{LED}$, siendo n_{LED} el número de LEDs correspondientes al modelo que resultó seleccionado. Cada δ_P está asociado a un vector posición en un sistema de coordenadas principal de conveniencia.

Para la elección de la longitud de onda λ del fotón recurriremos a las funciones de distribución espectral propias de cada modelo de LED, $E_{\lambda, f}(\lambda)$, presentes en la Fig. (6A) del Capítulo (1). Hemos visto que la integral de $E_{\lambda, f}(\lambda)$ [nm^{-1}], considerando el rango $0 \leq \lambda < \infty$, adquiere el valor de 1. La magnitud de la integral de $E_{\lambda, f}(\lambda)$ en el intervalo $\lambda + d\lambda$ [nm], representa la probabilidad de que el fotón tenga una longitud de onda λ contenida en ese intervalo, Ec. (9).

$$P(\lambda) = \frac{\int_0^\lambda E_{\lambda,f}(\lambda') d\lambda'}{\int_0^\infty E_{\lambda,f}(\lambda) d\lambda} \quad (9)$$

El rango de $400 \leq \lambda \leq 700$ [nm], región en la que emiten los LEDs, fue dividido en intervalos $\Delta\lambda$ de 10 [nm], resultando así 31 valores para la longitud de onda λ . Para determinar la longitud de onda λ del fotón emitido se genera un número aleatorio $0 \leq \delta_\lambda \leq 1$, y se identifica el intervalo $\lambda + \Delta\lambda$ a través de la comparación de δ_λ con los valores que adopta la integral de $E_{\lambda,f}(\lambda)$. Las funciones de distribución acumulada, $P_{\lambda,f}(\lambda)$, para los LEDs descritos en el Capítulo (1) se muestran en la Fig. (1B).

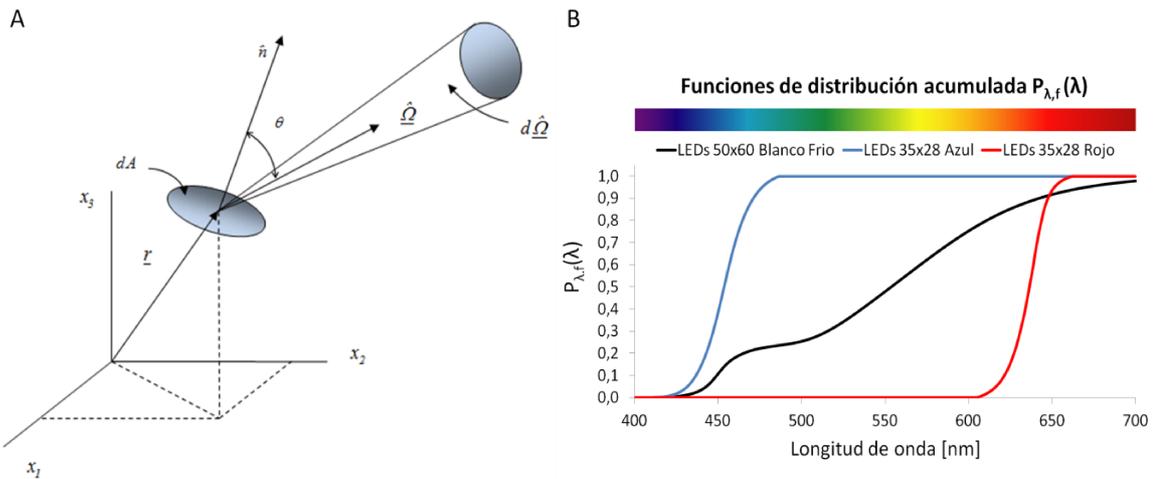


Figura (1). A]. Superficie elemental inmersa en el CER ubicada en la posición \underline{r} . B] Funciones de distribución acumulada $P_{\lambda,f}(\lambda)$ para LEDs 35x28 azules y rojos y 50x60 blanco frío.

Para la elección de la dirección del fotón emitido, $\hat{\underline{Q}}$, recurriremos a la función de distribución direccional de los LEDs, Ec. (10).

$$E_{\theta,\varphi} = E_\varphi E_\theta = \frac{1}{2\pi} \cos(\theta) \quad (10)$$

Por un lado, φ puede tomar valores entre $0 \leq \varphi \leq 2\pi$, siendo todos ellos igualmente probables, mientras que θ puede adquirir valores entre $0 \leq \theta \leq \pi/2$, cuya distribución está relacionada a la función $\cos(\theta)$. Las funciones de distribución de probabilidad acumulada, $P(\theta)$ y $P(\varphi)$, surgen de integrar las funciones de distribución direccional E_θ y E_φ (Ecs. (11) y (13)). En el contexto de MC dichas probabilidades son reemplazadas por número aleatorios, $0 \leq \delta_\theta, \delta_\varphi \leq 1$ (Ecs. (12) y (14)).

$$P(\varphi) = \int_0^\varphi E_\varphi d\varphi = \frac{1}{2\pi} \int_0^\varphi d\varphi = \frac{1}{2\pi} \varphi \quad (11)$$

$$\varphi = 2\pi P(\varphi) = 2\pi \delta_\varphi \quad (12)$$

$$P(\theta) = \int_0^\theta E_\theta d\theta = \int_0^\theta \cos(\theta) d\theta = \sin(\theta) \quad (13)$$

$$\text{sen}(\theta) = \delta_\theta \quad (14)$$

El vector unitario que describe la dirección del fotón, $\hat{\underline{\Omega}}(\theta, \varphi)$, en un sistema de coordenadas auxiliar ortonormal $\{\hat{\underline{e}}_1, \hat{\underline{e}}_2, \hat{\underline{e}}_3\}$ resulta ser:

$$\hat{\underline{\Omega}}(\theta, \varphi) = (\text{sen}(\theta) \cos(\varphi)) \hat{\underline{e}}_1 + (\text{sen}(\theta) \text{sen}(\varphi)) \hat{\underline{e}}_2 + (\cos(\theta)) \hat{\underline{e}}_3 \quad (15)$$

$$\hat{\underline{\Omega}}(\theta, \varphi) = (\delta_\theta \text{sen}(2\pi\delta_\varphi)) \hat{\underline{e}}_1 + (\delta_\theta \cos(2\pi\delta_\varphi)) \hat{\underline{e}}_2 + \left((1 - \delta_\theta^2)^{1/2} \right) \hat{\underline{e}}_3 \quad (16)$$

siendo $\hat{\underline{e}}_2, \hat{\underline{e}}_3$ vectores localizados sobre la superficie plana de emisión del LED y $\hat{\underline{e}}_3$ el vector unitario normal a la superficie, cuya posición coincide con el centro del LED.

Posteriormente, la dirección del fotón debe ser expresada en el sistema de coordenadas principal (transformación de coordenadas), lo cual se logra mediante proyecciones perpendiculares.

(5.1.2).- Reflexión y refracción del fotón en las fronteras del FBR

En el caso en que la fuente de energía radiante no esté en íntimo contacto con el FBR, es necesario evaluar si el fotón emitido impacta sobre las fronteras del FBR, ej. las paredes del vaso del reactor y la superficie de la suspensión en el caso de *ponds*. El impacto se evalúa a partir del conocimiento de la posición y la dirección del fotón emitido, y a través de expresiones que contemplan características del FBR, como la geometría y la orientación. En caso de impacto negativo, el fotón es eliminado del CER, mientras que un impacto positivo involucra dos posibles eventos ópticos, reflexión y refracción. La Fig. (2A) esquematiza la reflexión y refracción de los fotones para el caso de dos medios, 1 y 2. En la reflexión, el fotón que se propaga en el medio 1, con un ángulo de incidencia σ_1 definido respecto al vector normal a la superficie en el punto de impacto, $\hat{\underline{n}}$, adquiere una dirección $\hat{\underline{\Omega}}^{(R)}$ (igual ángulo σ_1 respecto a $\hat{\underline{n}}$). El fotón reflejado es eliminado del CER si es que no existen otras superficies que le permitan volver nuevamente a las fronteras. En la refracción, el fotón que se propaga en el medio 1 con un ángulo de incidencia σ_1 , ingresa al medio 2, adoptando una dirección $\hat{\underline{\Omega}}_2$.

La reflectividad, $\rho_{1,2}$, refiere a la fracción de la radiación incidente que es reflejada, y en la interface entre los medios 1 y 2 se determina de acuerdo a las ecuaciones de Fresnel, Ec. (17).

$$\rho_{1,2}(\hat{\underline{\Omega}}, \hat{\underline{\Omega}}_2, \hat{\underline{n}}) = \frac{1}{2} \left[\frac{n_1(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) - n_2(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}_2)}{n_1(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) + n_2(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}_2)} \right]^2 + \frac{1}{2} \left[\frac{n_1(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}_2) - n_2(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}})}{n_1(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}_2) + n_2(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}})} \right]^2 \quad (17)$$

En la Ec. (17), $\hat{\underline{\Omega}}$ y $\hat{\underline{\Omega}}_2$ son vectores dirección unitarios de incidencia y de refracción, n_1 y n_2 son los índices de refracción de los medios 1 y 2; y $\hat{\underline{n}}$ es el vector normal unitario a la interface, apuntando hacia cualquiera de los medios. La dirección $\hat{\underline{\Omega}}_2$ se construye a partir del ángulo σ_2 , el cual se obtiene a partir de la ley de Snell, Ec. (18).

$$n_1 \text{sen} \sigma_1 = n_2 \text{sen} \sigma_2 \quad (18)$$

Por su parte, la transmisividad, $T_{1,2}$, que refiere a la fracción de la radiación incidente que atraviesa la interface, se determina a partir de $\rho_{1,2}$ con la Ec. (19).

$$T_{1,2}(\hat{\Omega}, \hat{\Omega}_2, \hat{n}) = 1 - \rho_{1,2}(\hat{\Omega}, \hat{\Omega}_2, \hat{n}) \quad (19)$$

El caso de los medios 1 y 2 corresponde a reactores *ponds*, donde los fotones emitidos por la fuente alcanzan la superficie de la suspensión, es decir la interface aire-suspensión. La suspensión de microalgas se considera como un medio acuoso.

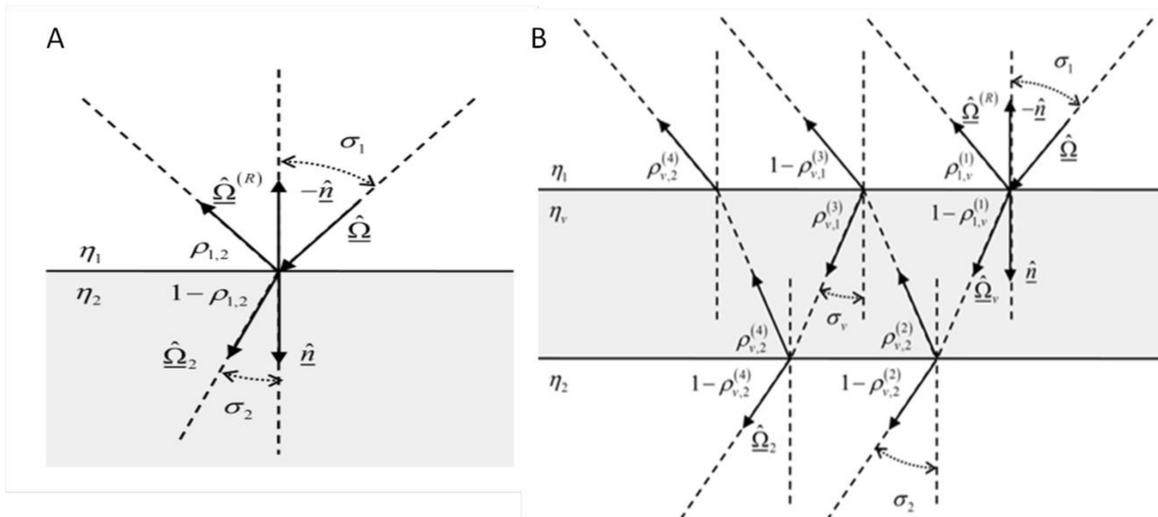


Figura (2). Representación del evento de reflexión o refracción sobre: A] Una interfase entre los medios 1 y 2, B] Una lámina de material transparente de espesor reducido que separa los medios 1 y 2.

En el caso de paredes de vidrio, acrílico, u otros materiales, el sistema puede componerse de tres fases, aire-material-agua (Fig. (2B)). El sistema es modelado como una doble película, aire-agua, asumiendo que el espesor del material es despreciable, y considerando la posibilidad de múltiples reflexiones internas.

La reflectividad para este tipo de sistemas, ρ_{Total} , se calcula con la Ec. (20).

$$\rho_{Total} = \rho_{1,V}^{(1)} + \rho_{2,V}^{(2)} \left(1 - \rho_{1,V}^{(1)}\right) \left(1 - \rho_{V,1}^{(3)}\right) + \rho_{V,1}^{(3)} \rho_{2,V}^{(2)} \rho_{2,V}^{(4)} \left(1 - \rho_{1,V}^{(1)}\right) \quad (20)$$

En el contexto de MC, para saber si el fotón se refleja o atraviesa la interface entre los medios, se genera un número aleatorio $0 \leq \delta_R \leq 1$, y se compara con el valor de ρ_{Total} . Si $0 \leq \delta_R \leq \rho_{Total}$ el fotón refleja, de lo contrario, el fotón se transmite a través de la frontera e ingresa a la suspensión de microalgas. El pseudocódigo de simulación para evaluar la reflexión y refracción de fotones en diversos sistemas se describe en forma detallada en la Tesis Doctoral de Heinrich [82].

(5.1.3).- Fotón dentro de la suspensión de microalgas

El fotón, en su movimiento dentro de la suspensión puede ser absorbido por las células de microalgas, a través de los pigmentos que componen el aparato fotosintético, o modificar la dirección de movimiento producto de la colisión con componentes celulares, fenómeno denominado *scattering* o

dispersión. La ocurrencia de los eventos de absorción y *scattering* de fotones, de longitud de onda λ y dirección $\hat{\underline{\Omega}}$, está relacionada a las propiedades ópticas de la suspensión de microalgas, a saber: i) el coeficiente de absorción espectral, α_λ [mm^{-1}]; y ii) el coeficiente de *scattering* espectral; ε_λ [mm^{-1}]. Los coeficientes α_λ y ε_λ para una suspensión de *S. quadricauda*, en función del contenido de clorofilas y la concentración de biomasa, fueron extraídos del trabajo de Heinrich y col. [78]. La única forma posible de que ocurra un evento de dispersión es producto del impacto del fotón con las microalgas, debido a que la composición del medio de cultivo implica especies inorgánicas y agua. Consideraremos un *scattering* de tipo elástico, es decir que no se altera la energía que porta el fotón luego de un evento de dispersión, por ende, no cambia la longitud de onda λ . También se considera que no existe emisión de energía radiante en el seno de la suspensión, es decir que no se contemplan fenómenos como la fluorescencia. En lo que respecta a la presencia de una corriente de gas en la suspensión, el fenómeno de interacción entre fotones y burbujas no ha sido modelado, debido a que las simulaciones del CER efectuadas contemplando o no el fenómeno son muy similares, y de esta forma se ahorra en tiempo de simulación computacional.

Por su parte, la función de fase de *scattering*, $B(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}')$, describe la forma en que la radiación dispersada es redistribuida en direcciones $\hat{\underline{\Omega}}'$ alrededor de la dirección original $\hat{\underline{\Omega}}$, y debe cumplir con la condición de normalización presente en la Ec. (21).

$$\frac{1}{4\pi} \int_{\hat{\underline{\Omega}}} B(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}') d\hat{\underline{\Omega}}' = 1 \quad (21)$$

Si consideramos que $B(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}')$ es axialmente simétrica respecto a la dirección original $\hat{\underline{\Omega}}$, donde todos los ángulos $0 \leq \varphi \leq 2\pi$ son igualmente probables, $B(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}')$ solo depende del producto punto $(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}' = \cos\theta = \mu)$, siendo θ el ángulo formado entre los vectores $\hat{\underline{\Omega}}$ y $\hat{\underline{\Omega}}'$. Adoptando una $B(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}')$ con estas características resulta:

$$\frac{1}{4\pi} \int_{\hat{\underline{\Omega}}} B(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}') d\hat{\underline{\Omega}}' = \frac{1}{2\pi} \left(\int_0^{2\pi} d\varphi \right) \frac{1}{2} \left(\int_{-1}^1 B(\mu) d\mu \right) = 1 \quad (22)$$

La función de fase $B(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}')$ para suspensiones de *S. quadricauda* fue extraída del trabajo de Heinrich y col. [78], donde se propone una expresión basada en una expansión en serie de polinomios de Legendre:

$$B(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}') = \sum_{n=0}^{\infty} c_n P_n(\hat{\underline{\Omega}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}') = \sum_{n=0}^{\infty} c_n P_n(\mu) \quad (23)$$

donde c_n corresponde al enésimo coeficiente que multiplica al enésimo polinomio de la serie, P_n .

La expresión para $P_n(\mu)$ resulta ser:

$$P_n(\mu) = \frac{1}{2^n n!} \frac{d^n}{d\mu^n} (\mu^2 - 1)^n \quad (24)$$

La serie de polinomios fue truncada al alcanzar el grado de precisión deseado, resultando un total de 5 coeficientes, c_5 .

La probabilidad de que un fotón con dirección $\hat{\Omega}$ modifique su dirección a $\hat{\Omega}'$ en un evento de dispersión resulta ser:

$$P(\varphi, \mu) = P(\varphi)P(\mu) = \left(\frac{\varphi}{2\pi}\right) \left(\frac{1}{2} \int_{-1}^{\mu} B(\mu') d\mu'\right) \quad (25)$$

Retomando, los tres eventos posibles para un fotón durante su paso en la suspensión son: absorción (A), dispersión (D), ninguno de los dos (NA , ND). Los eventos son complementarios y mutuamente excluyentes, por ello, la probabilidad de que ocurra alguno puede escribirse como:

$$P(A) + P(D) + P(NA, ND) = 1 \quad (26)$$

Las expresiones matemáticas para las probabilidades de estos eventos, Ecs. (27-29), fueron deducidas a partir de balances de radiación para un elemento de volumen localizado en medios puramente dispersivos ($P(D)+P(ND)=1$) y absorbentes ($P(A)+P(NA)=1$), y de expresiones constitutivas propuestas para la velocidad de absorción y de dispersión de energía radiante [19].

$$P(A) = \frac{\alpha_\lambda}{(\alpha_\lambda + \xi_\lambda)} \left[1 - e^{-(\alpha_\lambda + \xi_\lambda)\Delta S} \right] \quad (27)$$

$$P(D) = \frac{\xi_\lambda}{(\alpha_\lambda + \xi_\lambda)} \left[1 - e^{-(\alpha_\lambda + \xi_\lambda)\Delta S} \right] \quad (28)$$

$$P(NA, ND) = e^{-(\alpha_\lambda + \xi_\lambda)\Delta S} \quad (29)$$

En las Ecs. (27) a (29), ΔS es la distancia que avanza el fotón en cada movimiento dentro de la suspensión de microalgas.

La magnitud de ΔS para la simulación computacional del CER no puede ser elegida aleatoriamente, sino que debe hacerse de manera sistemática. Podemos asignar un valor para ΔS a partir del cálculo del camino medio esperable o camino libre medio, Ec. (30).

$$s_{LM} = \frac{1}{(\alpha_\lambda + \xi_\lambda)} \quad (30)$$

En los trabajos previos del grupo de investigación se utilizó una distancia ΔS igual a 1 [mm] para la simulación del CER [66, 79-81]. La estructura básica del algoritmo de simulación en la suspensión de algas, en dichos trabajos, consiste en calcular las probabilidades de los eventos (A), (D) y (NA , ND) cada distancias de 1 [mm], a través de la generación de un número aleatorio $0 \leq \delta_M \leq 1$. Si δ_M cumple con la condición $0 \leq \delta_M \leq P(A)$ el fotón se absorbe, y se registra la posición del mismo para la construcción de la distribución del CER. Si δ_M cumple con la condición $P(A) < \delta_M \leq P(D)$ el fotón sufre dispersión, asignándole una nueva dirección a través de la función de fase $B(\hat{\Omega} \cdot \hat{\Omega}')$. Para ello se requiere la generación de dos números aleatorios, $0 \leq \delta_\mu \leq 1$ y $0 \leq \delta_\varphi \leq 1$ (ver Ec. (25)). Por último, con la nueva dirección $\hat{\Omega}'$ el fotón avanza una nueva distancia ΔS igual a 1 [mm], y comienza

un nuevo ciclo de evaluación de eventos. En el caso que δ_M cumpla con la condición $\delta_M > P(A) + P(D)$ el fotón no sufre eventos de absorción ni *scattering*, es decir que mantiene la dirección de movimiento original $\widehat{\Omega}$ y continúa avanzando en la suspensión. En cada paso es necesario evaluar si el fotón se encuentra sobre las fronteras del FBR (superficie de medio de cultivo, la base, las paredes laterales, etc.). Si es así, se calculan las probabilidades de los eventos según la naturaleza de la frontera, ej. si el fotón alcanza las paredes laterales es necesario evaluar su reflexión, retornando a la suspensión, o refracción, dejando el FBR y siendo eliminado del CER (ver Sección (5.1.2)).

La metodología descrita para construir el CER en el interior de FBRs, que utiliza una distancia ΔS de 1 [mm], elegida en función del camino libre medio s_{LM} , involucra un gasto significativo de recursos computacionales y el tiempo de simulación es grande. Esto es producto de que en cada trayecto recorrido se deben evaluar las probabilidades de ocurrencia de los fenómenos considerados, y además chequear el impacto del fotón sobre las fronteras del FBR. Por otro lado, según sea la longitud de onda λ del fotón, el número de movimientos en la suspensión antes de que este sea absorbido puede ser grande.

En la presente Tesis hemos propuesto y aplicado una metodología de cálculo que permite reducir el tiempo de simulación computacional, logrando la misma calidad en los resultados, en lo que respecta a la simulación y la descripción visual del CER dentro del FBR. La propuesta surge del análisis de la Ec. (26), la cual puede ser reordenada de la siguiente forma:

$$P(A) + P(D) = 1 - P(NA, ND) \quad (31)$$

Si reemplazamos la Ec. (29) en la Ec. (31) resulta:

$$P(A) + P(D) = 1 - e^{-(\alpha_\lambda + \xi_\lambda)\Delta S} \quad (32)$$

Al despejar ΔS surge:

$$\Delta S = -\frac{\ln[1 - (P(A) + P(D))]}{(\alpha_\lambda + \xi_\lambda)} \quad (33)$$

Ahora, ΔS es la distancia que debe recorrer el fotón con dirección $\widehat{\Omega}$ para sufrir un evento de absorción o *scattering*. En el contexto de MC reemplazamos el término $P(A) + P(D)$ por un número aleatorio $0 \leq \delta_{AD} \leq 1$.

$$\Delta S = -\frac{\ln(1 - \delta_{AD})}{(\alpha_\lambda + \xi_\lambda)} \quad (34)$$

Podría ocurrir que al recorrer esa distancia ΔS el fotón se encuentre fuera de los límites del FBR, por lo que es lógico contemplar el cálculo de las fronteras. Para ello se calculan todas las distancias ΔS a las fronteras del sistema considerado. El evento más probable es aquel que está asociado con la distancia ΔS positiva menor. Si la distancia resulta ser aquella que conduce a un evento de *scattering* o absorción, es necesario generar un número aleatorio $0 \leq \delta_\zeta \leq 1$ para ver si el fotón es absorbido o

CAPÍTULO (3)

**Modelado y simulación de la influencia de
las fracciones de luz azul y roja sobre el
crecimiento de la microalga *Scenedesmus
quadricauda***

(1).- RESUMEN

La composición espectral de la radiación suministrada a un cultivo de algas puede tener un gran impacto sobre la composición de la biomasa, la velocidad de crecimiento específica, la eficiencia en el uso de la energía radiante, y la productividad de un fotobiorreactor (FBR).

En el presente Capítulo, la microalga verde *Scenedesmus quadricauda* fue crecida en FBRs escala laboratorio iluminados con LEDs azules y rojos en diferentes proporciones. Con el fin de que los efectos sean producto de la composición espectral de la luz, y no de su cantidad, los diferentes arreglos de LEDs fueron construidos de forma tal que emitan el mismo número total de fotones por unidad de tiempo y por unidad de volumen de cultivo. Las distribuciones del campo de radiación (CER) en el medio de cultivo, en términos de la velocidad volumétrica local de absorción de fotones fotosintéticamente activos (PAR), fueron obtenidas mediante la metodología de Monte Carlo (MC). Se analizó el impacto de las distribuciones sobre la productividad del FBR, la cantidad de pigmentos fotosintéticos principales en la biomasa, y la eficiencia en el uso de la luz absorbida.

De los resultados experimentales y de simulación podemos concluir que la eficiencia en el uso de la radiación no es el resultado de la contribución independiente de cada fracción de fotones de diferente longitud de onda que alcanzan al FBR, sino que esas fracciones interfieren una con otra en los procesos de absorción de luz.

(2).- INTRODUCCIÓN

Las plantas superiores y las algas tienen la habilidad natural de adaptar la organización molecular de sus aparatos fotosintéticos de acuerdo a la irradiancia y a la naturaleza espectral de la luz absorbida [83]. Los procesos que involucran cambios bioquímicos causados por los niveles de irradiancia y el espectro de luz son colectivamente conocidos como “fotoaclimatación” [84], e involucran la presencia de mediadores de señalización específicos (ej. fotorreceptores) [85]. La definición no es lo suficientemente específica para distinguir inequívocamente los efectos producidos por la composición espectral de aquellos originados por la cantidad de radiación. El término “aclimatación cromática” fue introducido por Dubinsky y col. [86], con el fin de aumentar la especificidad del origen de los fenómenos de aclimatación. Esta nueva definición contempla todos los mecanismos puestos en juego por las algas para optimizar la captación de energía lumínica, en respuesta a cambios en la composición espectral de la luz absorbida.

Muchos estudios han sido llevados a cabo con el fin de elucidar los efectos de la calidad de luz sobre el crecimiento y la formación de metabolitos en microalgas y cianobacterias, mostrando que el impacto de la radiación depende de la genética del alga, y los efectos de un perfil de luz particular no son transferibles de una cepa de microalga a otras [87-91]. La Tesis de Schulze contiene una lista detallada de los efectos de la calidad de luz sobre diferentes especies de algas [92].

En el presente Capítulo de Tesis hemos centrado la atención en explorar los efectos de la luz azul y roja, dado que son las longitudes de onda más fuertemente absorbidas de la región PAR por algas

verdes. La absorción preferencial se debe a la elevada cantidad de moléculas de clorofilas (Chls) en los complejos antena de captación de luz de los aparatos fotosintéticos (LHCs), clorofila a (Chl a) y clorofila b (Chl b) [93-95]. Un trabajo de investigación desarrollado previamente en el GiiB ha mostrado que esos “colores” tienen diferente impacto sobre la eficiencia fotosintética, el contenido de pigmentos, y la distribución del CER dentro del FBR [81]. Los estudios fueron conducidos con arreglos de LEDs azules y rojos, sin considerar la mezcla de esos dos colores. Esto impidió la detección de eventuales efectos producto de la coexistencia de radiación de los diferentes colores, lo que ocurre cuando los cultivos de algas son iluminados con luz solar u otras fuentes artificiales de amplio espectro. La combinación de luz roja y azul en diferentes proporciones, manteniendo el mismo número total de fotones recibidos por los FBRs, permite explorar interacciones entre las regiones espectrales, las cuales pueden potencialmente disparar diversos procesos fotosintéticos y fotomorfogénicos.

(3).- OBJETIVOS

- Analizar el efecto de diferentes proporciones de luz azul y roja sobre el crecimiento de suspensiones de *S. quadricauda* en FBRs escala laboratorio.
- Simular el campo de energía radiante dentro de los FBRs, a partir de mediciones experimentales y de los algoritmos computacionales desarrollados *ad hoc* basados en la metodología de MC.
- Analizar el efecto de las distribuciones del CER sobre la absorción de energía, la eficiencia en el uso de la misma y la productividad del FBR.

(4).- MATERIALES Y MÉTODOS

(4.1).- Cepa e inóculos para ensayos en FBRs

La cepa de agua dulce *S. quadricauda* 276/21 (Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP) fue crecida en frascos Erlenmeyers de 500 ml con 250 ml de medio de cultivo Bold Basal Medium ajustado a pH 7.0 (BBM, nitrato de sodio (NaNO_3) 2.94 mM) [96], de uso frecuente para el cultivo de esta microalga [97, 98]. El cultivo fue sometido a iluminación continua proveniente de lámparas fluorescentes Phillips *Day Light* de 16W, a una densidad de flujo de fotones (PFD) de $70 \text{ } [\mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}]$. Se incubó el inóculo durante 14 días en condiciones de temperatura ambiente entre 25-30 °C, agitación orbital de 100 rpm, y ausencia de aireación. El pH del inóculo no fue controlado. Antes de la inoculación de los FBRs se llevó a cabo una etapa de aclimatación, que consistió en someter a los cultivos a las fracciones de luz azul y roja de cada condición experimental (Tabla (1)), hasta alcanzar una concentración de Chls constante (duración de aprox. 3 días). Posteriormente, cada FBR fue inoculado con 50 ml de aprox. 2.4 gr L^{-1} de concentración de biomasa.

(4.2).- FBRs y condiciones de cultivo

Se utilizaron FBRs cilíndricos de vidrio borosilicato, de 2 L de capacidad útil y un diámetro de 137 mm (Fig. (1A)). Cada FBR tiene 4 puertos de acceso lateral ubicados en la tapa, destinados a toma de muestra, salida de gases, reposición de medio de cultivo estéril, y registro de temperatura. En el centro de la tapa se dispone de un puerto de mayor tamaño, en el cual se instaló un difusor de aire de vidrio sinterizado. La toma de muestra y el agregado de medio de cultivo BBM fresco estéril se efectúan mediante un sistema de presiones, a través del cierre de la corriente de aire y el uso de jeringas plásticas. Para una mayor apreciación de los dispositivos descriptos ver la Fig. (1B).

Los FBRs con 2 L de medio de cultivo BBM fueron operados estériles en modalidad *batch*, e iluminados en forma continua bajo cinco condiciones de iluminación LED, guardando constante el número total de fotones suministrados a cada cultivo, pero variando las fracciones de luz roja y azul (Tabla (1) y Fig. (2)). La temperatura fue mantenida entre 25 ± 1 °C, el pH se dejó evolucionar libremente, y el caudal de aireación fue seteado en 0.4 vvm (0.034 % CO₂, esterilizado con un filtro de nylon de 0.4 micras). Los FBRs fueron cubiertos con bolsas negras impermeables para evitar radiaciones ambientales, y localizados en un baño de agua termostatzado con calentadores de tipo acuario (Fig. (1C)).

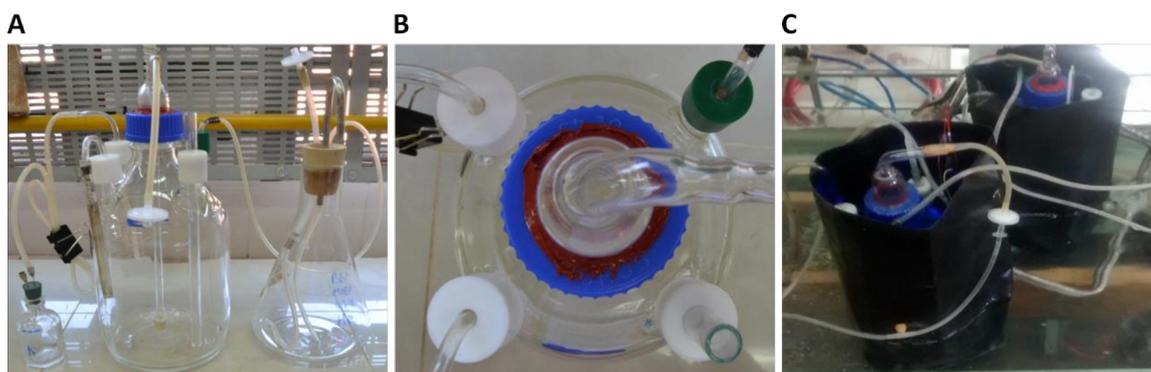


Figura (1). A) Fotografía que muestra los elementos que componen el sistema de cultivo utilizado. Frasco para muestreo de 50 ml (izquierda), reactor escala laboratorio de 2 L (centro) y Erlenmeyer de 1 L para reposición de medio de cultivo (derecha). B) Fotografía de una vista superior del reactor. C) Fotografía de los FBRs envueltos en bolsas negras impermeables, y dispuestos en un baño termostatzado.

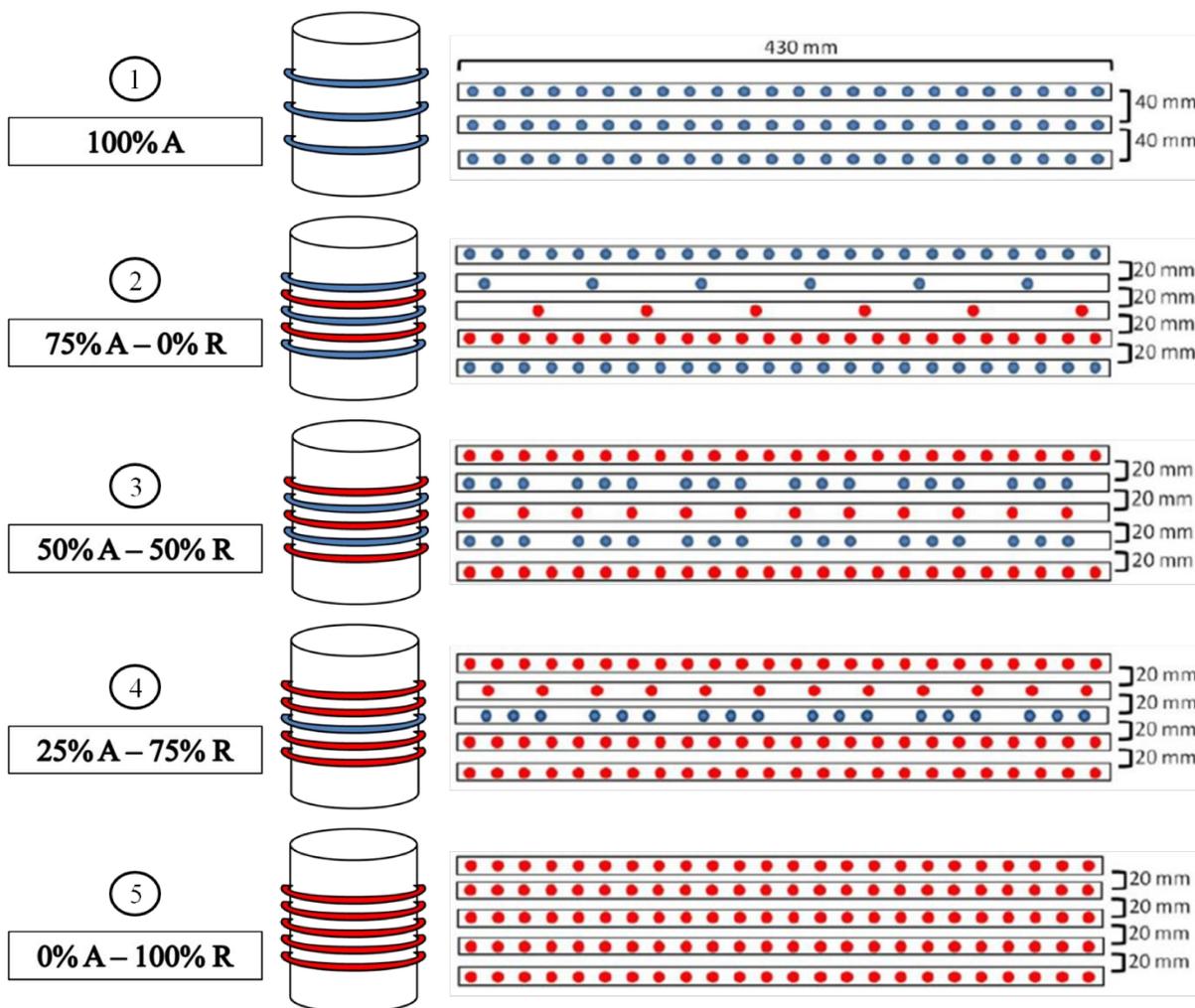
(4.3).- Fuente de radiación

Para construir los arreglos se utilizaron LEDs azules (A) y rojos (R) de la marca DEMASLED Modelo SMD 35x28 (ver la Sección (4.1) del Capítulo (1), y la Fig. (2)).

Cada LED azul emite isotrópicamente 3.27×10^{-2} [$\mu\text{mol s}^{-1}$], mientras que cada LED rojo emite 2.4×10^{-2} [$\mu\text{mol s}^{-1}$]. La composición de los arreglos de LEDs construidos y las características de su emisión se resumen en la Tabla (2). Las diferencias observadas en los valores de flujo de fotones volumétrico correspondiente a cada arreglo, Q_v [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$], se deben a las limitaciones físicas impuestas por el hecho de tener que trabajar con números enteros de LEDs.

Tabla (1). Descripción de los arreglos construidos con diferentes composiciones de LEDs azules (A) y rojos (R), tal que provean al FBR el mismo número de fotones, [μmol], por unidad de tiempo, [s], y por unidad de volumen de cultivo, [L].

Cultivo	Luz (A) (%)	Luz (R) (%)	Número de LEDs (A)	Número de LEDs (R)	Qv [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]	PFD [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$]
1	100% A	0% R	72	0	1.18	36.55
2	75% A	25% R	54	30	1.25	38.72
3	50% A	50% R	36	60	1.31	40.58
4	25% A	75% R	18	90	1.38	42.75
5	0% A	100% R	0	120	1.44	44.60



Cultivo	Luz azul (A) (%)	Luz roja (R) (%)	Altura tiras LEDs azules [mm]	Altura tiras LEDs rojos [mm]
1	100% A	0% R	40-80-120	-
2	75% A	25% R	40-80-120	60-100
3	50% A	50% R	60-100	40-120
4	25% A	75% R	80	40-60-100-120
5	0% A	100% R	-	40-60-80-100-120

Figura (2). Esquema de los FBRs y de la disposición de los arreglos de LEDs. Los valores promedio de PFD sobre la superficie iluminada se listan en la Tabla (2).

(4.4).- Determinaciones experimentales

Se tomó una alícuota del reactor de 50 ml cada 24 hs, y el volumen extraído fue repuesto con medio BBM fresco estéril.

La concentración de biomasa de algas se expresó en términos de la cantidad total de sólidos en suspensión (SST). Para esto, 30 ml de la muestra se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. Luego, el sedimento se lavó una vez con agua destilada y se secó a 80 °C durante 24 hs.

Las concentraciones de Chl a y Chl b se cuantificaron fotométricamente luego de una etapa de extracción con etanol 100 % [99]. Para ello, 1.5 ml de muestra colectada en un tubo Eppendorf se centrifugó a 15000 rpm durante 5 min, y el sedimento se resuspendió en 1 ml de etanol puro. Las células se rompieron en un vórtice durante 15 min usando perlas de vidrio, las cuales ocupan un volumen de aprox. de 500 µl. La extracción de pigmentos se realizó incubando el tubo en oscuridad durante la noche. Después, la muestra se centrifugó a 5000 rpm y se diluyeron 400 µl del sobrenadante con 800 µl de etanol puro (1/3). Finalmente, la blancura del sedimento se tomó como una indicación de una buena extracción de pigmentos. Se utilizó una cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico para la medida en un espectrofotómetro BOECO UV-VIS. Las concentraciones de Chls se correlacionaron con las medidas de densidad óptica (DO_{λ}) de la siguiente manera:

$$Chl\ a\ [mg\ L^{-1}] = (-5.2007\ DO_{649} + 13.5275\ DO_{665}) / \text{paso óptico} \quad (1)$$

$$Chl\ b\ [mg\ L^{-1}] = (22.4327\ DO_{649} - 7.0741\ DO_{665}) / \text{paso óptico} \quad (2)$$

La interacción entre la radiación PAR y la biomasa se interpreta en términos de Chls totales, obtenida a partir de la suma de las concentraciones de Chl a y Chl b.

El contenido de NO_3^- en el medio de cultivo se cuantificó diariamente midiendo la absorción de la muestra a 220 nm [100]. Para esto, se centrifugó una alícuota de 1 ml de muestra durante 15 min a 15000 rpm para eliminar los materiales en suspensión, y luego se diluyó con 15 ml de agua destilada. La concentración total de NO_3^- en el cultivo se calculó comparando la absorción de la muestra con la de una solución estándar de 1 gr L^{-1} de $NaNO_3$. La concentración inicial de NO_3^- en las experiencias fue de 2.940 mM (250 mg L^{-1} de $NaNO_3$).

(4.5).- Modelado y simulación del CER en la suspensión de algas

La simulación del CER dentro del FBR fue efectuada utilizando la metodología de MC, previamente desarrollada en el Capítulo (2). Respecto a las propiedades ópticas de la suspensión de *S. quadricauda*, se utilizaron los coeficientes espectrales de absorción, α_{λ} [nm^{-1}], y de scattering, ϵ_{λ} [nm^{-1}], presentes en el trabajo de Heinrich y col. [78]. Estos coeficientes tienen una funcionalidad con el contenido de Chls, y la concentración de biomasa, ambos valores obtenidos a partir de determinaciones experimentales efectuadas con las muestras periódicamente extraídas del FBR. La forma de la función de fase $B(\hat{\Omega} \cdot \hat{\Omega}')$ y el valor de sus coeficientes fueron también extraídos de dicho trabajo.

(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(5.1).- Crecimiento y contenido de pigmentos fotosintéticos

En cultivos fotoautotróficos la luz es la fuente de energía utilizada por las microalgas, por lo tanto, su velocidad de crecimiento en un FBR depende de la naturaleza de la luz que ilumina el cultivo. En cuanto a la iluminación, las características más importantes son: i) el número de fotones entregados al cultivo por unidad de tiempo (flujo de fotones), ii) la fracción de fotones de cada longitud de onda que comprende la luz incidente (composición espectral), y iii) la disponibilidad de la luz en el medio de cultivo (distribución espacial).

En nuestro caso particular, con el fin de evidenciar efectos sobre la absorción y la eficiencia en el uso de la energía absorbida, hemos elegido iluminar los FBRs con bajas irradiancias, tal que la disponibilidad de luz controle la cinética de crecimiento de la biomasa. Se utilizaron PFDs menores a $50 [\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}]$ (Tabla (1)), valores muy por debajo de los que provocan fenómenos de fotoinhibición y fotodaño [101, 102]. Al final de los cultivos (250 hs), para todas las condiciones experimentales ensayadas, la concentración de NO_3^- fue superior a 80 mg L^{-1} (0.940 mM), lo que evita posibles cambios metabólicos producto de la falta de nitrógeno. Se supuso que la concentración de fosfatos y microelementos no fueron limitantes en el crecimiento celular, debido a que *S. quadricauda* en el medio BBM y bajo otras condiciones de iluminación ha alcanzado densidades celulares del orden de 1.2 gr L^{-1} [66].

En las Figs. (3A) a (3E) se muestra la evolución temporal de las concentraciones de biomasa y Chls, para cultivos iluminados con diferentes fracciones de luz azul y roja, tal como se describe en la Tabla (1). Como podemos ver, las concentraciones de biomasa y Chls crecen linealmente con el tiempo en todos los cultivos.

Para un reactor discontinuo, la dinámica de propagación celular resulta ser:

$$\frac{dx}{dt} = r_x \quad (3)$$

Considerando que r_x es independiente de la concentración de biomasa, la expresión para r_x puede encontrarse por integración de la Ec. (3), resultando las Ecs. (4) y (5).

$$\int_{x(t_0)}^{x(t)} dx' = r_x \int_{t_0}^t dt' \quad (4)$$

$$x(t) - x(t_0) = r_x(t - t_0) \quad (5)$$

donde $x(t)$ representa la biomasa a un tiempo t particular y $x(t_0)$ la correspondiente al inicio de la corrida experimental.

Entonces, el valor de r_x para cada cultivo corresponde a la pendiente de una regresión lineal de los valores de concentración experimental de biomasa [mg L^{-1}] frente al tiempo [hs]. El mismo procedimiento permite obtener el valor para la velocidad de acumulación de Chls, r_{Chls} .

Si consideramos a las Chls como un metabolito con concentración celular constante, el cambio en la concentración de Chls en un reactor *batch*, y en condiciones de nitrógeno no limitantes es:

$$\frac{dChl}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} \quad (6)$$

donde α es una constante de proporcionalidad que refiere a la cantidad de Chls por unidad de biomasa.

Integrando la Ec. (6) resulta:

$$\int_{Chls(t_0)}^{Chls(t)} dChls' = \alpha \int_{x(t_0)}^{x(t)} dx' \quad (7)$$

$$Chls(t) - Chls(t_0) = \alpha(x(t) - x(t_0)) \quad (8)$$

donde $Chls(t)$ es la concentración de Chls en un tiempo t particular y $Chls(t_0)$ la concentración de Chls inicial presente en la suspensión de microalgas. La constante α puede encontrarse efectuando una regresión lineal de $Chls(t) - Chls(t_0)$ vs $x(t) - x(t_0)$.

En la Fig. (3F), se muestra la productividad (r_x) obtenida para cada una de las cinco condiciones de iluminación, junto con el contenido intracelular de Chls. La tendencia observada es que r_x aumenta casi linealmente a medida que aumenta la fracción de fotones de luz azul que iluminan el cultivo. También se puede observar que el contenido intracelular de Chls disminuye a medida que se reduce la fracción de luz azul. Las diferencias en el contenido total de Chls en la biomasa cuando el cultivo se lleva a cabo sólo bajo luz azul o roja ya han sido documentadas [103, 104]. El mecanismo de fotorregulación propuesto en estos estudios implica la actividad antagonista de dos fotorreceptores: uno activo en la región azul, que estimula la síntesis de Chls, y otro con acción represora sobre la síntesis, activo en la región rojo/violeta [96]. Estudios efectuados a nivel de transcritos han proporcionado resultados concluyentes acerca de la actividad represora del receptor rojo/violeta sobre la transcripción de los genes "*cab*", genes que codifican proteínas para el anclaje de moléculas de Chl a y Chl b en los LHCs. Esta represión conduce a un PSII de menor tamaño. Las consecuencias del tamaño del PSII sobre la absorción de energía radiante y su utilización son discutidas en la Sección (5.2).

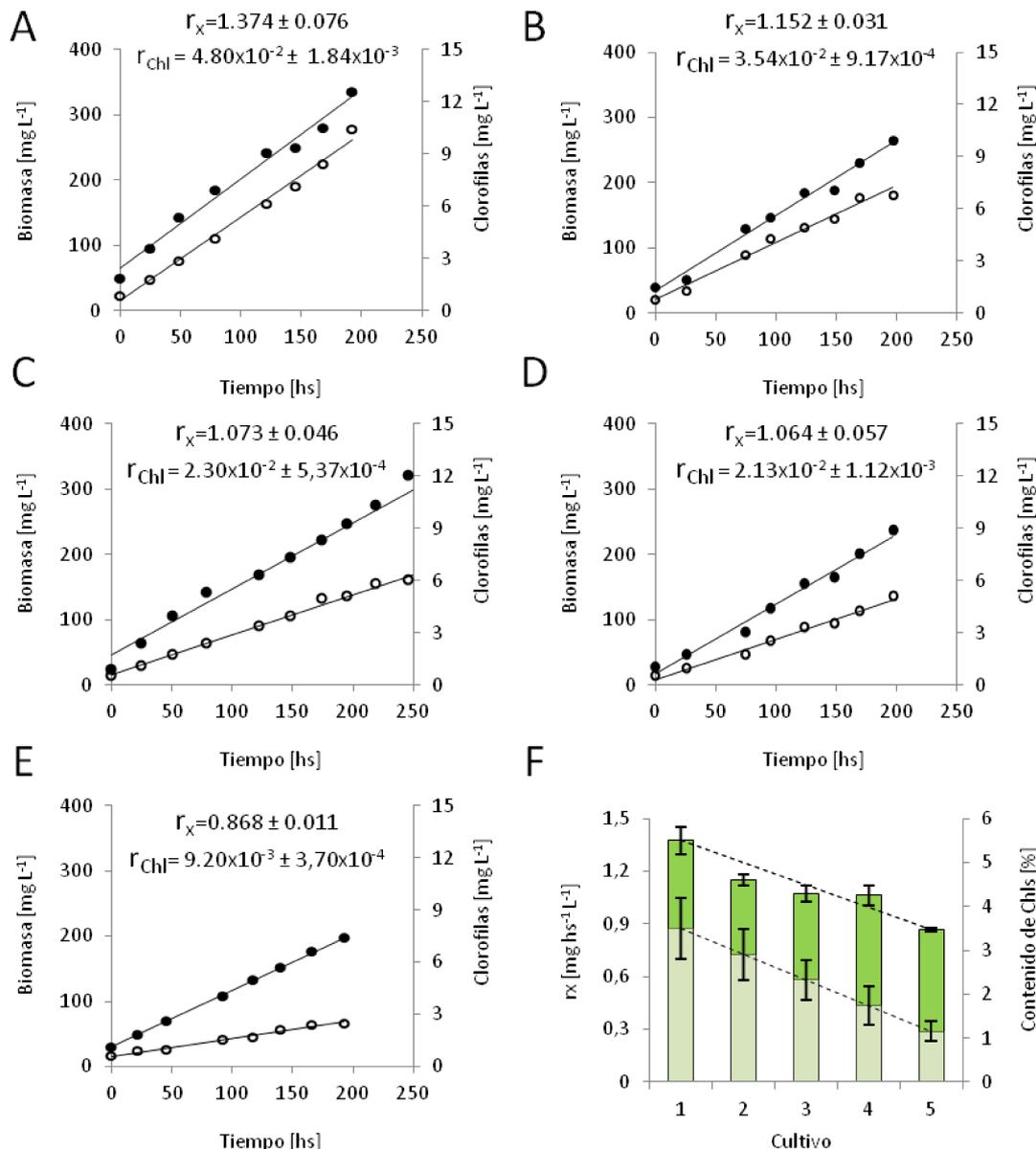


Figura (3). Concentraciones de biomasa (●) y clorofilas (Chls) (○) vs tiempo, para los diferentes arreglos de LEDs. (A) 100% azul / 0% rojo. (B) 75 azul / 25% rojo. (C) 50% azul / 50% rojo. (D) 75% azul / 25% rojo. (E) 0% azul / 100% rojo. (F) r_x [mg hs⁻¹ L⁻¹] (■) y contenido porcentual de Chls en la biomasa [%] (■).

(5.2).- Análisis del CER en el FBR

La velocidad volumétrica local de absorción de fotones PAR, $r_{PAR}(r, t)$, se puede calcular por integración de $r_\lambda(r, t)$ a lo largo de las longitudes de onda λ que componen el rango visible (VIS):

$$r_{PAR}(r, t) = \int_{VIS} r_\lambda(r, t) d\lambda \quad (9)$$

El valor de r_{PAR} [$\mu\text{mol dia}^{-1} \text{L}^{-1}$] en diferentes posiciones del FBR se muestra en la Fig. (4), para tres concentraciones de biomasa (150, 225 y 300 mg L⁻¹) y tres fracciones diferentes de LEDs azules y rojos (100% azul, 50% azul / 50% rojo y 100% rojo). Dada la simetría del problema, la posición

dentro del FBR se expresa en coordenadas cilíndricas (R, H), siendo R la distancia radial desde cualquier punto al eje de simetría (centro del reactor), y H la distancia a la base.

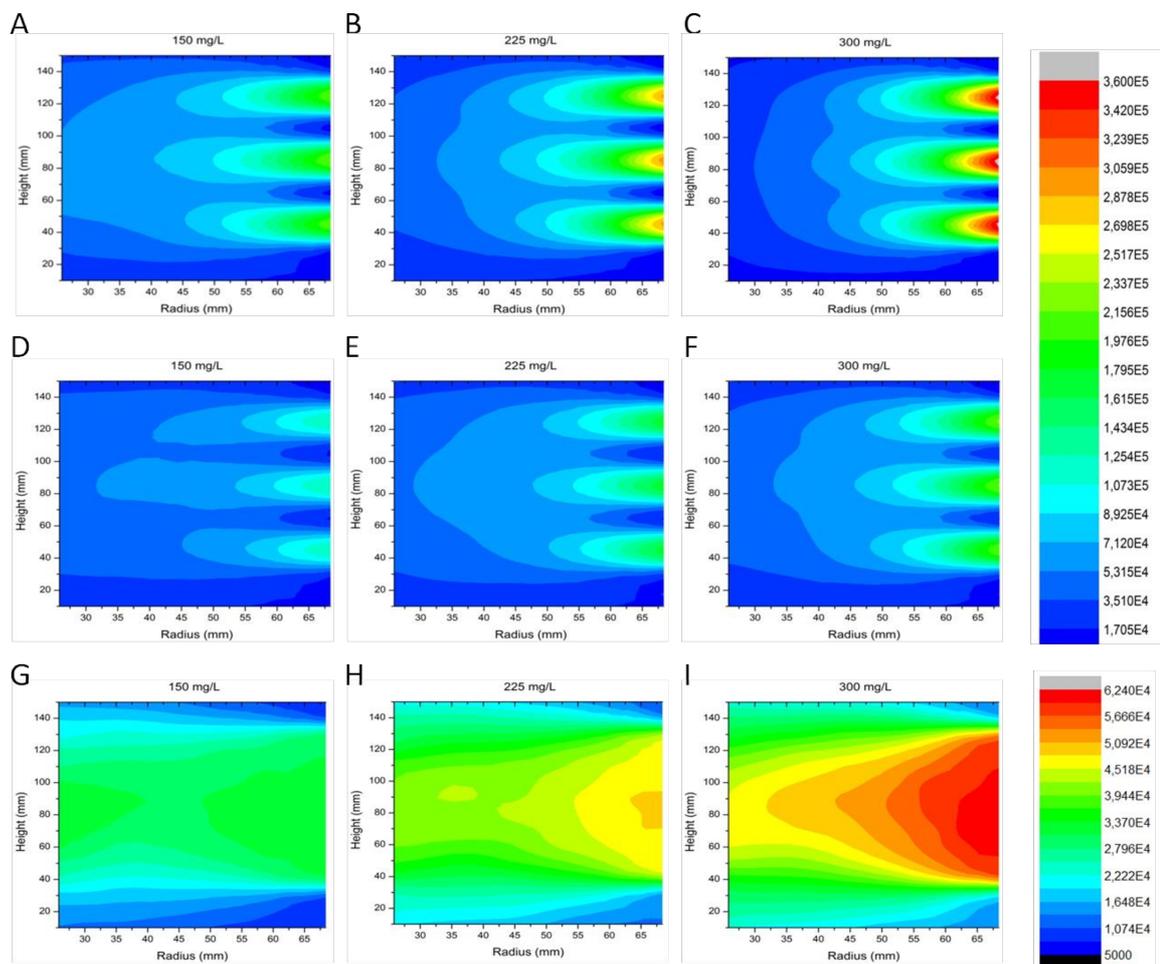


Figura (4). r_{PAR} [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$] como función del radio, R, y la altura, H, del FBR. La correspondencia entre los colores y los valores discretizados de r_{PAR} se detalla en el margen derecho de la imagen. Las etiquetas de trazado A, B, C corresponden a la irradiación con 100% de luz azul; las etiquetas D, E, F corresponden a 50% de azul / 50% de luz roja; y las etiquetas G, H, I corresponden a 100% de luz roja.

En cultivos iluminados únicamente con luz azul (Figs. (4A), (4B) y (4C)), r_{PAR} es muy alta en la cercanía de los LEDs, lo que significa que los haces de luz pierden una gran fracción de la radiación que portan en áreas cercanas a la pared del reactor, y en consecuencia, la densidad de energía radiante y la velocidad local de absorción de fotones en zonas más profundas son menores. Introducimos el término “estratificación” para referir a la inhomogeneidad en las propiedades del campo de radiación (ej. distribución espacial de r_{PAR}). Podemos decir que bajo estas condiciones de iluminación la estratificación de luz es un fenómeno notable, y se torna aún más significativo en cultivos de alta densidad celular. Un análisis detallado de la estratificación de la radiación dentro de un FBR, su cuantificación y la evaluación de los efectos sobre la productividad de un cultivo de microalgas, se encuentran presentes en el Capítulo (4).

En cultivos iluminados con luz roja (Figs. (4G), (4H) y (4I)), la absorción de energía radiante ocurre a un ritmo menor, resultando que los haces de luz alcancen zonas más profundas del reactor con una cantidad considerable de la radiación que originalmente portaban.

En cultivos irradiados con una combinación de luz roja y azul, el resultado obtenido es una situación intermedia, que se parece más a una de las dos irradiaciones de un único color, dependiendo de la fracción de luz azul y roja que compone la radiación que alimenta la suspensión de algas.

Además, dado que para *S. quadricauda* el coeficiente de absorción α_λ de la luz azul es mayor que el de la luz roja, la contribución relativa de la luz roja y azul a la energía total de los haces de radiación cambia a medida que éstos alcanzan posiciones más profundas en el cultivo. Esto provoca el enriquecimiento del haz en luz roja menos absorbible, a expensas de luz azul más absorbible, lo que resulta en una iluminación más homogénea en las zonas más profundas del cultivo, aunque menos intensa. La concentración intracelular de Chls aumenta a medida que la iluminación desde el exterior de la suspensión de algas se enriquece en su fracción de luz azul, mejorando así la absorción de ambos colores de la luz en la mezcla de radiación. Estos efectos se vuelven más evidentes con el aumento de las concentraciones de algas. Las Figs. (4D), (4E) y (4F) ilustran estas características para cultivos irradiados con 50% de azul / 50% de luz roja en el ingreso a la suspensión de algas.

El número de fotones externamente entregados al cultivo por unidad de tiempo y por unidad de volumen, Q_v [$\mu\text{mol hs}^{-1} \text{L}^{-1}$], se mantiene constante durante el tiempo de crecimiento, con los valores que se muestran en la Tabla (1). El rendimiento Φ_{FBR} [$\text{mg } \mu\text{mol}^{-1}$], definido como la biomasa producida por fotón entregado al cultivo, se puede expresar como la relación entre la velocidad de crecimiento de la biomasa r_x [$\text{mg hs}^{-1} \text{L}^{-1}$] y el número de fotones por unidad de tiempo y por unidad de volumen administrado a la suspensión de algas, Q_v . La Fig. (5) muestra el valor de Φ_{FBR} para las condiciones operativas ensayadas.

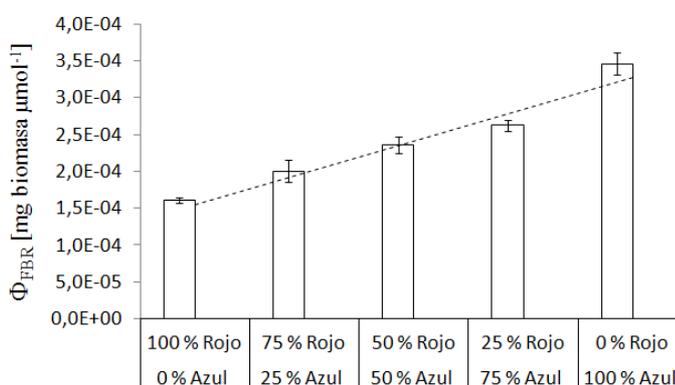


Figura (5). Rendimiento Φ_{FBR} como función de las fracciones azules y rojas que componen la luz que ilumina cada cultivo. Línea punteada: regresión lineal de Φ_{FBR} para diferentes fracciones de luz azul y roja entregadas al cultivo.

Como se observa en la Fig. (5), el valor de este parámetro se incrementa casi linealmente con la fracción de luz azul entregada al cultivo (línea punteada).

La velocidad volumétrica promedio de absorción de fotones PAR en el FBR, $\langle r_{PAR} \rangle$, se obtiene como:

$$\langle r_{PAR} \rangle (t) = \frac{1}{V} \int_{\underline{r}} r_{PAR}(\underline{r}, t) d\underline{r} \quad (10)$$

La velocidad $\langle r_{PAR} \rangle(t)$, que depende de la concentración de biomasa del cultivo, se muestra en la Fig. (6) en formato de gráfico de barras, para todas las condiciones de iluminación ensayadas.

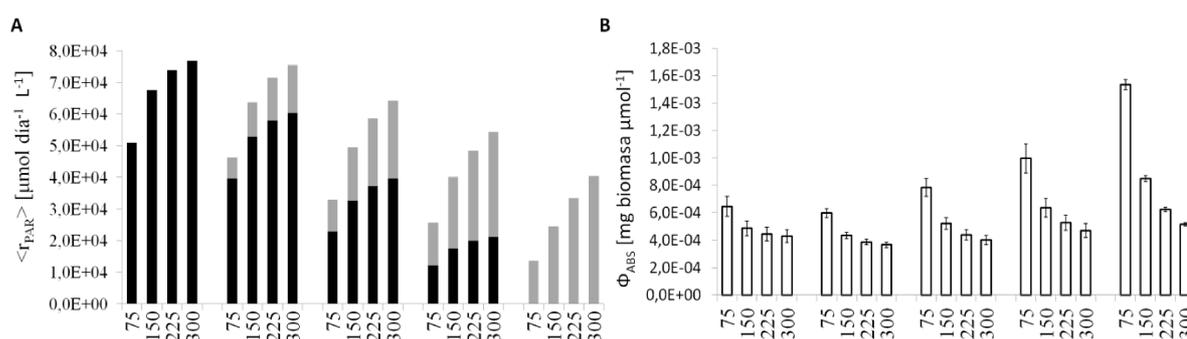


Figura (6). A] Velocidad volumétrica promedio de absorción de fotones PAR en el FBR, $\langle r_{PAR} \rangle$ [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$], para fotones azules (gris) y rojos (negro), y en función de la concentración de biomasa, x [mg L^{-1}]. B] Rendimiento Φ_{ABS} [$\text{mg } \mu\text{mol}^{-1}$], en términos de la biomasa producida por la cantidad de fotones absorbidos, como función de la concentración de biomasa, x [mg L^{-1}] (\circ). Etiquetas de datos de izquierda a derecha para ambas imágenes: 100% azul; 75 azul / 25% rojo; 50% azul / 50% rojo; 75% azul / 25% rojo; 100% rojo.

Mientras que $\langle r_{PAR} \rangle$ aumenta con el tiempo siguiendo la tendencia de la concentración de biomasa, en cultivos iluminados con luz 100% roja apenas alcanza, para una concentración de biomasa de 300 [mg L^{-1}], el valor de 4.0×10^4 [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$]. En cultivos iluminados con luz 100% azul, y para la misma concentración de biomasa, alcanza el valor de 7.8×10^4 [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$]. Si bien los valores crecientes de $\langle r_{PAR} \rangle$ en el reactor van de la mano con el aumento de las concentraciones de biomasa, la biomasa crece a una velocidad constante (ver Fig. (3)), mientras que $\langle r_{PAR} \rangle$ aumenta a un ritmo más pequeño a medida que se incrementa la biomasa (ver Fig. (6)). También observamos que, en cultivos iluminados con mezclas de azul y rojo, la composición del total de los fotones absorbidos por la biomasa cambia con el incremento de la misma, enriqueciéndose en luz roja. Estos cambios no alteraron el contenido de Chls en la biomasa de cada condición ensayada.

A partir de r_x y de $\langle r_{PAR} \rangle$ es posible calcular el rendimiento Φ_{ABS} [$\text{mg } \mu\text{mol}^{-1}$], definido como la cantidad de biomasa producida en función del número de fotones absorbidos en el cultivo. En la Fig. (6B) se muestra cómo Φ_{ABS} cambia con la concentración de biomasa, para todas las condiciones de iluminación analizadas. La eficiencia en el uso de fotones para producir biomasa en suspensiones de *S. quadricauda* disminuye fuertemente al aumentar la biomasa, para todas las combinaciones de luz azul y roja. Una razón para este comportamiento puede ser que existen cerca de la fuente de emisión regiones de altas tasas de absorción, donde la cantidad de fotones absorbidos puede exceder la

capacidad de procesamiento de la cadena de transporte de electrones, favoreciendo los procesos de extinción de energía radiante no fotoquímicos, entre ellos, el ciclo de las xantofilas [105].

En cultivos iluminados con luz 100% azul, debido al alto valor que adopta el coeficiente de absorción α_λ , el fenómeno de estratificación es significativo incluso a muy bajas concentraciones de biomasa y, por lo tanto, el valor de Φ_{ABS} permanece siempre bajo. En cultivos iluminados con luz 100% roja, debido al bajo valor de α_λ , el fenómeno de estratificación comienza a tener relevancia cuando la concentración de biomasa es más alta. El valor de Φ_{ABS} para diferentes cultivos y para bajas concentraciones es mayor cuando se irradia con luz 100% roja, y disminuye constantemente con fracciones crecientes de luz azul. Se puede concluir que cuando la concentración de biomasa es baja, fotones con longitud de onda λ en la región roja del espectro visible son más eficientes que sus contrapartes azules. Cuando la concentración de biomasa es alta, los valores de Φ_{ABS} son siempre bajos, creciendo ligeramente a medida que la luz incidente se enriquece en la fracción roja.

Consideremos el caso hipotético en el cual Φ_{ABS} es una constante para cada longitud de onda λ individual, independientemente de la composición espectral de la luz que ilumine el cultivo. Entonces, la velocidad de crecimiento r_x en cultivos iluminados con mezclas de luz azul y roja podría expresarse como la suma de las contribuciones de cada longitud de onda λ . Además, cada una de estas contribuciones podría expresarse como la velocidad de absorción de fotones para esa longitud de onda λ , $\langle r_{PAR} \rangle_\lambda$, multiplicada por el rendimiento correspondiente a cultivos iluminados con luz pura 100% azul, Φ_{ABS}^A , o 100 % roja, Φ_{ABS}^R . Como puede verse en la Fig. (6B) Φ_{ABS} es una función de la concentración de biomasa, x . Por lo comentado recientemente, la expresión para r_x , predicha a partir de los datos de velocidad de absorción de fotones para cada λ , y a partir de los rendimientos Φ_{ABS} de los cultivos puros, es:

$$r_x^{TEO} = \Phi_{ABS}^A(x) \langle r_{PAR} \rangle_A + \Phi_{ABS}^R(x) \langle r_{PAR} \rangle_R \quad (11)$$

La Fig. (7) muestra la diferencia entre r_x predicha asumiendo un modelo de absorción de radiación sin interacción entre los diferentes colores de luz, r_x^{TEO} , y r_x medida experimentalmente, desde ahora r_x^{EXP} . Como se muestra en la Fig. (7), para la condición 2 (75% azul / 25% rojo), el valor de r_x en la situación hipotética en la que Φ_{ABS} es una constante para cada longitud de onda individual, independientemente de la composición espectral de la luz que ilumine el cultivo, es mayor que el valor experimental, $r_x^{TEO} > r_x^{EXP}$. Esto significa que el rendimiento total de fotones Φ_{ABS} , considerando los fotones rojos y azules como un total, es menor en cultivos iluminados con una mezcla de 75% azul y 25% de luz roja, que en cultivos irradiados con 100% de luz roja o 100% de luz azul. En el caso de las condiciones 3 y 4 (50% azul / 50% rojo, 75% azul / 25% rojo) también existen diferencias entre r_x^{TEO} y r_x^{EXP} , pero estas diferencias son menores.

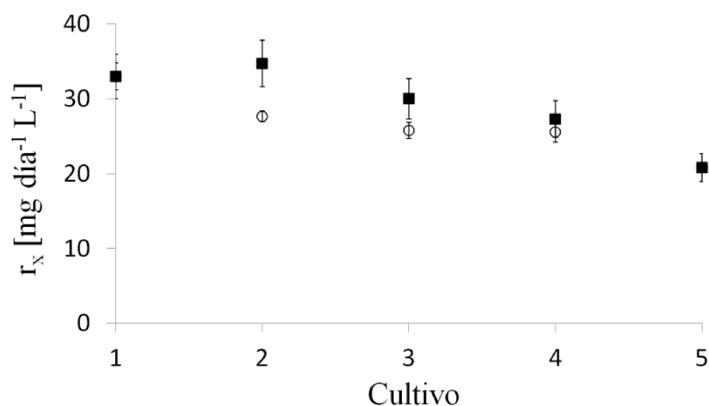


Figura (7). Velocidades de crecimiento r_x [mg día⁻¹ L⁻¹] experimentales, r_x^{EXP} (○), y teóricas, r_x^{TEO} (■) (calculadas con la Ec. (11)). Etiquetas: (1) 100% azul, (2) 75 azul / 25% rojo, (3) 50% azul / 50% rojo, (4) 75% azul / 25% rojo, (5) 100% rojo.

La tendencia observada es que la diferencia entre r_x^{TEO} , predicha asumiendo un modelo de absorción sin interacción, y r_x^{EXP} , se reduce a medida que la fracción de luz roja aumenta en cultivos iluminados con mezclas de los dos colores. Por lo tanto, podemos concluir que la eficiencia en el uso de la luz no es el resultado de la contribución independiente de cada fracción de fotones de diferentes longitudes de onda λ que llegan al reactor, sino que estas fracciones interfieren entre sí en el proceso de absorción. En otras palabras, el rendimiento de fotones Φ_{ABS} para cada longitud de onda individual es función de la concentración de biomasa y también de la luz que ilumina el cultivo.

La estratificación de la luz en el medio de cultivo es la causa principal de la ineficiencia en el uso de los fotones absorbidos. Además de la configuración del reactor, el grado de estratificación depende de forma no lineal del coeficiente de absorción espectral α_λ , que a su vez es una función del contenido de Chls en la biomasa. Este ciclo de dependencias físicas se cierra al reconocer que el contenido de Chls en las células está determinado por la composición espectral de la luz utilizada para iluminar el reactor, que de hecho es la condición límite que restringe la solución del problema de transferencia de radiación en el cultivo.

La disminución en la diferencia entre r_x^{TEO} y r_x^{EXP} a medida que se reduce la fracción de luz azul podría deberse al efecto de esta sobre el tamaño de los LHCs. Melis y col. mostraron que en cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* la luz azul estimula la vía de síntesis de Chls, aumentando el contenido de Chl b y LHC-II, lo que da como resultado un PSII con un tamaño de antena más grande [106]. Si bien la diferencia no es tan marcada como en el caso del contenido de Chls en la biomasa, en el presente estudio se han observado valores para la relación Chl a/Chl b de aprox. 1.5 en cultivos iluminados con 100% y 75% de luz azul, y valores de aprox. 1.8 para el resto de las proporciones de luz azul analizadas (Datos no mostrados).

Por su parte, algunas cepas de microalgas con LHCs más pequeños mostraron mayores eficiencias en el uso de la luz, independientemente de la longitud de onda λ de la luz utilizada para alimentar la suspensión [107]. Estos resultados se explican considerando que un tamaño de LHC menor resulta en

una menor r_{PAR} , lo que evita la saturación de los mecanismos implicados en el proceso de transferencia de electrones aguas abajo del centro de reacción, reduciendo así la disipación térmica de la energía radiante absorbida. En otras palabras, microalgas con tamaños de LHCs reducidos requieren un flujo mayor de energía radiante para saturarse, y es por ello que operan más eficientemente.

La reducción del tamaño de los LHCs, y el contenido de pigmentos en células de microalgas (ej. por deficiencia en las proteínas que unen Chl a y Chl b), puede efectuarse en forma permanente a través de herramientas de ingeniería genética [108-112]. Estas algas con tamaño de antena truncado, que expresan constitutivamente menores contenidos de pigmentos, son consideradas una tecnología prometedora para reducir el grado de estratificación en el FBR, producto de una menor absorción por célula, y así evitar pérdidas en la productividad de suspensiones de microalgas de altas densidades celulares [113-115]. La tecnología aún se encuentra en vías de desarrollo, ya que algunas cepas con sistemas de captación alterados genéticamente muestran una alta sensibilidad a elevadas irradiancias, y baja aptitud para aclimatarse a cambios bruscos en la cantidad de luz que reciben. Esto se atribuye a que muchas de las proteínas que forman los LHCs periféricos tienen funciones regulatorias involucradas en la distribución, conversión y disipación de energía radiante, todos ellos considerados como mecanismos protectivos o de aclimatación.

(6).- CONCLUSIONES

En este Capítulo se evaluó la influencia de la composición espectral de la luz que alimenta un cultivo de *Scenedesmus quadricauda*, sobre la velocidad de crecimiento de la biomasa, el contenido de clorofilas, las distribuciones de luz en el interior del medio de cultivo, y la eficiencia en el uso de la energía radiante. Se utilizaron FBRs escala laboratorio y arreglos de LEDs con distintas proporciones de luz azul y roja, manteniendo constante en el tiempo, y entre las condiciones operativas ensayadas, el flujo de fotones volumétrico.

De los resultados experimentales se concluye que la velocidad de crecimiento de la biomasa, el contenido de clorofilas, y el rendimiento de fotones, dependen fuertemente de la composición espectral de la luz que alimenta el reactor. Con respecto a la velocidad de crecimiento de la biomasa y el contenido de clorofilas en las células, se observó que ambas propiedades aumentan cuando la fracción de luz azul aumenta, y permanecen constantes durante el período de cultivo. De los resultados de simulación del campo de radiación, fue posible determinar que el rendimiento de los fotones disminuye a medida que la concentración de biomasa aumenta, debido a la estratificación de luz, y la reducción resulta ser independientemente de la composición espectral de la luz suministrada. Finalmente, al comparar cultivos de microalgas realizados bajo diferentes fracciones de luz azul y roja, fue posible determinar el impacto de la luz azul sobre el contenido intracelular de clorofilas, y su relación con los valores más bajos de eficiencia fotosintética observados en cultivos irradiados con luz azul.

CAPÍTULO (4)

**Influencia de la estratificación de luz sobre
el crecimiento de *Scenedesmus quadricauda***

(1).- RESUMEN

En el presente Capítulo se analiza el efecto de diferentes grados de estratificación de la luz sobre la productividad de una suspensión de *Scenedesmus quadricauda* creciendo en un fotobiorreactor (FBR) escala laboratorio, y se cuantifica el grado de estratificación mediante una expresión analítica propuesta para la función de distribución de velocidades volumétricas de absorción de fotones fotosintéticamente activos (PAR) en el FBR.

En los ensayos de cultivo el reactor fue operado en una modalidad que se aproxima a la operación continua, e iluminado con luz LED blanca, tal de aproximarnos a condiciones de cultivo de reactores *outdoor* iluminados con luz solar. Los diferentes niveles de estratificación se generaron ubicando los LEDs en distintas posiciones sobre la pared del reactor, y eligiendo distintas concentraciones de biomasa de trabajo. Para asegurar que los efectos observados sean solamente causados por la inhomogeneidad de las propiedades del campo de radiación (CER), los arreglos de LEDs emitieron el mismo número total de fotones por unidad de tiempo, y por unidad de volumen de cultivo. La evaluación de la disponibilidad de luz en el medio de cultivo se efectuó mediante la metodología de Monte Carlo (MC).

De los resultados experimentales y de simulación se puede observar que las distribuciones de luz ensayadas impactan sobre: la cantidad de radiación absorbida por unidad de biomasa, la velocidad de crecimiento específica, la productividad del reactor, el contenido de clorofilas (Chls) en las células, y la eficiencia en el uso de la radiación absorbida.

Los resultados resaltan la importancia de cuantificar sistemáticamente el grado de estratificación de la luz en el medio de cultivo, a los fines de escalado y optimización de FBRs.

(2).- INTRODUCCIÓN

En el Capítulo (3) hemos introducido el término “estratificación” para referir a la inhomogeneidad en las propiedades del CER, y observamos a través de ensayos de cultivo en FBRs de laboratorio, alimentados con luz roja y azul en diferentes proporciones, que la estratificación es la causa principal para la ineficiencia en el uso de los fotones, independientemente de la longitud de onda λ de la radiación. La magnitud de la estratificación depende de la composición espectral de la radiación suministrada, y de las propiedades ópticas inherentes de la suspensión residente en el reactor, a través de una dependencia no lineal con el coeficiente de absorción espectral α_λ , el cual puede expresarse como una función de la pigmentación de la biomasa (ej. contenido de pigmentos fotosintéticos principales como Chls). Es necesario aclarar que la cantidad de radiación suministrada, y el arreglo entre la fuente de luz y el FBR, también afectan las distribuciones de luz en el interior del medio de cultivo.

Pese a que la luz se entregue de la forma más homogéneamente posible, y que el paso de luz en el reactor sea reducido en forma significativa (ej. reactores *thin layer cascades*, *flat panels*), la estratificación igualmente existe, y puede tener efectos notorios sobre la performance de un FBR. Si

bien se conoce que una mayor estratificación de luz, en casos de sobresaturación de los aparatos fotosintéticos, conduce a una reducción en la eficiencia en el uso de la radiación absorbida, se desconoce a ciencia cierta el efecto sobre la productividad de un FBR. El efecto dependerá de la naturaleza de la microalga, principalmente de los mecanismos puestos en juego para la disipación de energía radiante a altas y bajas tasas de absorción, muchos de ellos considerados como mecanismos de fotoaclimatación.

En el presente Capítulo utilizaremos “estratificación” para referirnos a la inhomogeneidad en las propiedades del CER, “distribución espacial” para la distribución de velocidades volumétricas locales de absorción de fotones PAR como función de la posición en el FBR, y “distribución estadística” para la distribución estadística de una función que describe la ocurrencia de los valores de velocidad volumétrica local de absorción de fotones PAR a través del volumen de cultivo.

(3).- OBJETIVOS

- Analizar el efecto de diferentes grados de estratificación de la luz sobre la productividad de *S. quadricauda* en un FBR comercial escala laboratorio alimentado con luz LED de amplio espectro.
- Simular el CER dentro del FBR, a partir de mediciones experimentales y algoritmos computacionales desarrollados *ad hoc* basados en la metodología de MC.
- Encontrar una expresión analítica para la función de distribución de velocidades volumétricas locales de absorción de fotones PAR en el FBR.
- Analizar el efecto del grado de estratificación sobre la eficiencia en el uso de la energía radiante absorbida y la productividad del FBR.

(4).- MATERIALES Y MÉTODOS

(4.1).- Cepa e inóculo para ensayos en FBR

La cepa de agua dulce *S. quadricauda* CCAP 276/21 (Culture Collection of Algae and Protozoa) fue crecida en medio Bold Basal Medium (BBM, NaNO₃ 2.94 mM) ajustado a pH=7. Frascos Erlenmeyers con 250 ml de BBM fueron sometidos a iluminación continua de 70 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$], utilizando lámparas fluorescentes con emisión blanca fría, a temperatura ambiente (25-30 °C), y a agitación orbital durante 14 días. El pH se dejó evolucionar libremente. El inóculo fue propagado hasta alcanzar una densidad óptica a 750 nm de aprox. 2, la cual corresponde a una concentración de biomasa de 480 mg L⁻¹. El FBR fue inoculado con 150 ml de dicha suspensión.

(4.2).- FBR y condiciones de cultivo

Se utilizó un biorreactor comercial marca Infors HT modelo Labfors 3 conteniendo 3 L de medio de cultivo 3N-BBM (8.82 mM NaNO₃) (ver Figs. (1A) y (1B)). La fuente de radiación consistió en

arreglos de LEDs modelo SMD 50x60 blanco frío. La geometría y las dimensiones del reactor se describen en la Fig. (1C).

El alga *S. quadricauda* fue crecida bajo iluminación continua, a temperaturas entre 25.0 ± 0.1 °C, agitación constante de 150 rpm, y con un caudal de aireación de 0.33 vvm. El pH del cultivo se controló a 7.0 ± 0.1 , utilizando una solución de HCl 1.0 M. La concentración de NO_3^- en el medio se midió diariamente. Para mantener constante la concentración de NO_3^- en el medio de cultivo, y así evitar cambios metabólicos inducidos por el agotamiento de nitrógeno, el NO_3^- consumido se repuso utilizando una solución concentrada de NaNO_3 (176.5 mM).

El biorreactor se operó en dos concentraciones promedio de biomasa (0.5 y 1.0 gr L^{-1}), y cada una para dos configuraciones de la fuente de radiación (ver la Sección (4.3)). Los cultivos se realizaron operando el reactor en una forma aproximada a una operación continua, extrayendo diariamente un volumen de suspensión y agregando el mismo volumen de medio de cultivo fresco estéril.

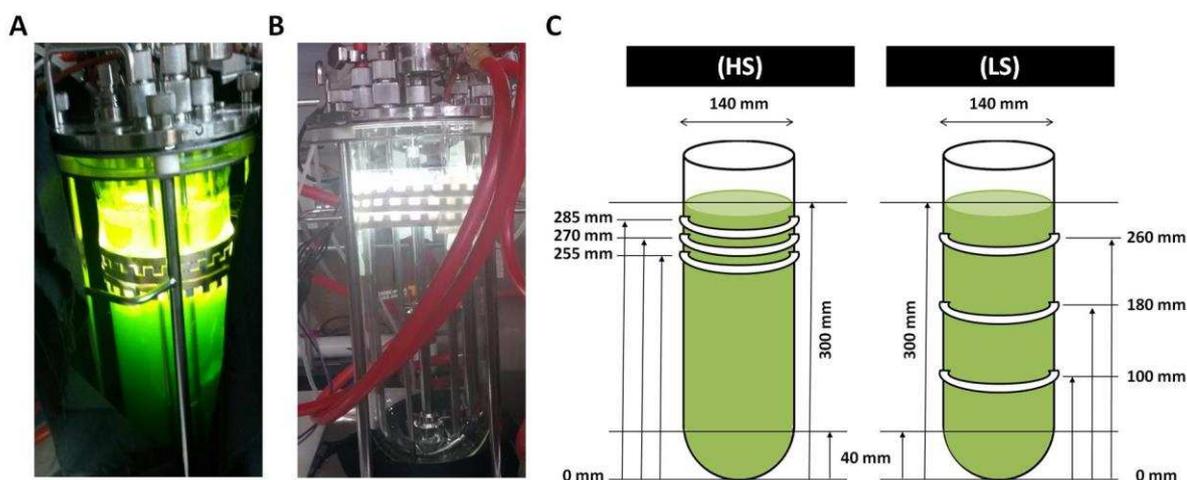


Figura (1). A, B] Fotografías del equipo utilizado. C] Geometría y dimensiones del reactor tanque agitado Labfors 3 (Infors HT), y los patrones adoptados por las tiras de LEDs. Izquierda: configuración de LEDs que induce una mayor estratificación de la luz (HS); Derecha: configuración de LEDs que induce una menor estratificación de la luz (LS).

(4.3).- Fuente de radiación

La fuente de radiación se compuso de 72 LEDs SMD 50x60 blanco frío, distribuidos en 3 tiras de 24 unidades cada una. Las tiras fueron dispuestas del lado externo de la pared del reactor en dos configuraciones: una que persiguió inducir una alta estratificación de luz a lo largo de la dirección axial del reactor (HS), y la otra concebida para alcanzar una menor estratificación en esa dirección (LS), como se muestra en la Fig. (1C). Cada LED emite isotrópicamente un flujo de fotones de 9.81×10^{-2} [$\mu\text{mol s}^{-1}$] (ver la Sección (5.4) del Capítulo (1)). Por lo tanto, el número total de fotones emitidos por unidad de tiempo y por unidad de volumen de cultivo fue de 2.35 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$], y este valor se mantuvo constante durante cada condición experimental.

(4.4).- Determinaciones experimentales

Muestras de la suspensión fueron periódicamente tomadas del FBR para determinar la concentración de biomasa, de Chls y de NO_3^- .

La biomasa fue cuantificada como sólidos suspendidos totales (SST). Para esto, un volumen de 20 ml se centrifugó a 5000 rpm por 10 min, y el pellet resultante fue lavado una vez con agua destilada y secado a 90 °C por al menos 12 hs. La cuantificación de Chls involucró una etapa de extracción con etanol, una medida fotométrica, y el uso de regresiones presentes en la literatura. La medición de NO_3^- consistió en una fotometría UV. Para una descripción detallada de las metodologías de cuantificación de Chls y NO_3^- ver la Sección (4.4) del Capítulo (3).

(4.5).- Modelado y simulación del CER en la suspensión de algas

La simulación del CER dentro del FBR fue efectuada utilizando la metodología de MC, previamente desarrollada en el Capítulo (2). Respecto a las propiedades ópticas de la suspensión de *S. quadricauda*, se utilizaron los coeficientes espectrales de absorción, α_λ [mm^{-1}], y de scattering, ε_λ [mm^{-1}], presentes en el trabajo de Heinrich y col. [78]. Estos coeficientes tienen una funcionalidad con el contenido de Chls, y la concentración de biomasa, ambos valores obtenidos a partir de determinaciones experimentales efectuadas con las muestras periódicamente extraídas del FBR. La forma de la función de fase $B(\underline{\hat{\Omega}} \cdot \underline{\hat{\Omega}})$ y el valor de sus coeficientes fueron también extraídos de dicho trabajo.

(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(5.1).- Crecimiento y contenido de pigmentos fotosintéticos

El cultivo fue conducido como una sucesión periódica de pasos, cada uno de duración Δt . En cada una de esas etapas el FBR fue operado en modo *batch*. El final de cada período, y el comienzo del siguiente en la secuencia, es marcado por la extracción de una alícuota de volumen de suspensión de algas, ΔV , y la simultánea adición del mismo volumen de medio de cultivo fresco estéril. Todas las etapas comienzan con la misma concentración inicial de biomasa, x_0 , y finalizan con la misma concentración final, x_1 .

Para cualquiera de las etapas en la secuencia, tenemos:

$$x_1 - x_0 = \int_0^{\Delta t} \frac{dx(t)}{dt} dt = \int_0^{\Delta t} r_x(t) dt \quad (1)$$

donde x_0 se relaciona con la concentración de biomasa al final de la etapa previa, x_1 , a través de:

$$x_0 = \frac{(V - \Delta V)}{V} x_1 = x_1 - \frac{\Delta V}{V} x_1 \quad (2)$$

En la Ec. (2) V es el volumen de medio de cultivo en el biorreactor, siendo 3 L.

Sustituyendo la Ec. (2) en la Ec. (1) resulta:

$$\frac{\Delta V}{V} x_1 = \int_0^{\Delta t} r_x(t) dt \quad (3)$$

De la Ec. (3) se deduce que:

$$\frac{1}{V} \left(\frac{\Delta V}{\Delta t} \right) x_1 = \frac{1}{\Delta t} \int_0^{\Delta t} r_x(t) dt = \bar{r}_x \quad (4)$$

donde x_1 es la concentración de biomasa de la muestra tomada al final de cualquiera de las etapas en la secuencia, justo antes de la dilución del medio de cultivo, y \bar{r}_x es el promedio temporal de la productividad de la biomasa r_x , tomado sobre la duración de cada etapa, Δt .

Un análisis de nuestros resultados experimentales sugiere que bajo condiciones de buena agitación y para el rango de concentraciones de biomasa involucrado, r_x es proporcional a x .

$$r_x = \mu x \quad (5)$$

donde μ es la velocidad de crecimiento específica de la biomasa microalgal, la cual varía con el patrón de iluminación adoptado. La sustitución de la Ec. (5) en la Ec. (4) resulta:

$$\bar{r}_x = \frac{1}{\Delta t} \int_0^{\Delta t} \mu x dt = \mu \frac{1}{\Delta t} \int_0^{\Delta t} x dt = \mu \bar{x} \quad (6)$$

donde \bar{x} es el promedio temporal de la concentración de biomasa sobre la duración de una etapa.

Con una única aproximación de tipo trapezoidal a la integral en la Ec. (6), resulta:

$$\bar{x} = \frac{1}{\Delta t} \int_0^{\Delta t} x(t) dt \approx \frac{1}{2} (x_1 + x_0) \quad (7)$$

Entonces, la expresión para el promedio temporal de r_x sobre la duración de una etapa es:

$$\bar{r}_x \approx \frac{\mu}{2} (x_1 + x_0) \quad (8)$$

La sustitución de las Ecs. (2) y (4) en la Ec. (8), seguido de reorganizaciones y cancelaciones, resulta:

$$\mu = \left(\frac{\Delta V}{\Delta t} \right) \left(V - \frac{\Delta V}{2} \right)^{-1} \quad (9)$$

De la Ec. (9) podemos concluir que μ puede ser calculada a partir de las mediciones experimentales de ΔV y $(\Delta V/\Delta t)$.

Los valores calculados de μ y \bar{r}_x , junto con el contenido porcentual de Chls promedio (% Chls), se muestran en la Fig. (2).

Los cultivos se iluminaron con LEDs alternativamente dispuestos en una de las dos configuraciones elegidas, a saber, (LS) y (HS). Como se muestra en la Fig. (2), mayores productividades de biomasa fueron alcanzadas con la fuente de luz en la configuración (LS), para ambas concentraciones de biomasa de trabajo. Por otro lado, cultivos llevados a cabo en concentraciones de biomasa de 0.5 gr L^{-1} alcanzaron los mayores valores de μ , tanto para configuraciones (LS) y (HS). Además, la concentración de Chls fue menor en cultivos con biomasa de 0.5 gr L^{-1} . Vale la pena resaltar que en condiciones de iluminación (HS) el incremento en la biomasa conduce a una reducción de la

productividad. Por el contrario, en la configuración (LS) un aumento en la biomasa conlleva a un incremento en la productividad.

Aunque en todas las condiciones experimentales el número total de fotones suministrados al biorreactor fue el mismo, la conducta y la composición de la biomasa de las microalgas en suspensión, así como también las performances obtenidas, fueron dependientes de la distribución de la radiación en el interior del FBR.

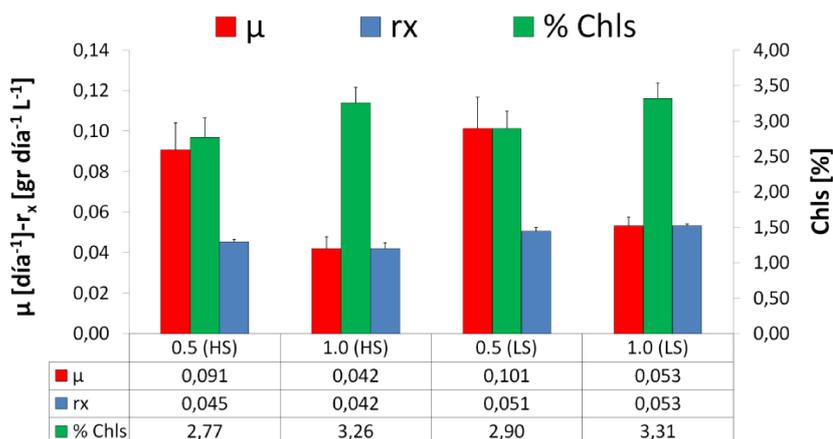


Figura (2). Productividad promedio de la biomasa, \bar{r}_x [gr día⁻¹ L⁻¹] (barras azules), velocidad de crecimiento específica μ [día⁻¹] (barras rojas) y contenido porcentual de Chls en la biomasa (% Chls) (barras verdes) para todas las condiciones ensayadas. Etiquetas, 0.5 (HS): 0.5 gr L⁻¹ alta estratificación; 1.0 (HS): 1.0 gr L⁻¹ alta estratificación; 0.5 (LS): 0.5 gr L⁻¹ baja estratificación; 1.0 (LS): 1.0 gr L⁻¹ baja estratificación.

(5.2).- Análisis del CER en el FBR

La Fig. (3) muestra los coeficientes de absorción y scattering espectrales en el rango de 400 a 700 [nm] (PAR), calculados a partir de las concentraciones de \bar{x} y Chls presentes en la Fig. (2), para concentraciones de biomasa de 0.5 y 1.0 gr L⁻¹ y la fuente de radiación en la disposición (HS).

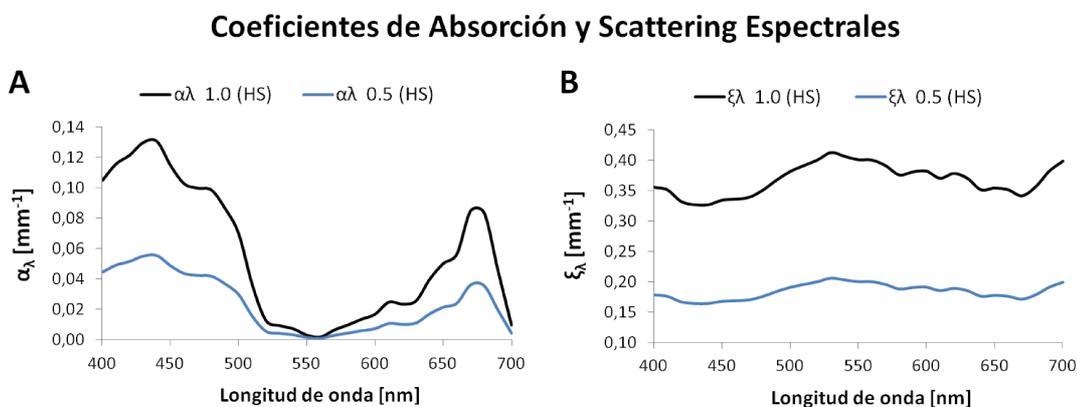


Figura (3). Coeficientes de absorción y scattering espectrales para cultivos 0.5 (HS) y 1.0 (HS). A) Coeficiente de absorción espectral, α_λ [mm⁻¹]. B) Coeficiente de scattering espectral, ξ_λ [mm⁻¹].

La velocidad volumétrica local de absorción de fotones PAR, r_{PAR} , se puede calcular por integración a lo largo de las longitudes de onda λ en el rango visible (VIS), $400 \leq \lambda \leq 700$ [nm]:

$$r_{PAR}(\underline{r}, t) = \int_{VIS} r_{\lambda}(\underline{r}, t) d\lambda \quad (10)$$

Por otra parte, la velocidad volumétrica promedio de absorción de fotones PAR en el FBR, $\langle r_{PAR} \rangle(t)$, se obtiene como:

$$\langle r_{PAR} \rangle(t) = \frac{1}{V} \int r_{PAR}(\underline{r}, t) d\underline{r} \quad (11)$$

En un cultivo continuo en estado estacionario, la concentración de x y Chls, así como r_{PAR} , son independientes del tiempo. De aquí en adelante expresaremos r_{PAR} en términos de la concentración de biomasa, $r_{PAR}(\underline{r}, x)$, teniendo en cuenta que r_{PAR} es producto del contenido porcentual de Chls en la biomasa (% Chls) (ver la Fig. (2)).

Las Figs. (4) y (5) muestran la distribución espacial de r_{PAR} [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$], para diferentes puntos del FBR (R, H), siendo R la distancia radial desde cualquier punto al eje de simetría, y H la distancia a la base.

Los gráficos de distribución espacial de la Fig. (4) muestran que para los experimentos realizados con la fuente de luz en la disposición (HS), el FBR se asemeja a un reactor *open pond* en lo que respecta a las condiciones de iluminación. La parte superior está intensamente iluminada, mientras que la mayor parte del volumen de cultivo, correspondiente a las zonas más bajas del FBR, se encuentra principalmente en las regiones más oscuras cerca de la base.

En las condiciones operativas que se utilizaron, el FBR tuvo un comportamiento ideal en términos de mezclado, pudiendo considerarse como un reactor tanque agitado con mezcla perfecta [81]. Bajo éste régimen, las algas se mueven al azar a través del medio de cultivo atravesando zonas con diferentes condiciones de iluminación. A lo largo de sus trayectorias visitan todos los puntos del biorreactor con la misma frecuencia. Debido a que solo una fracción del volumen se encuentra efectivamente iluminado, las algas permanecen la mayor parte del tiempo en zonas oscuras improductivas, lo que reduce el rendimiento de la biomasa. Al comparar los resultados obtenidos para cultivos de 0.5 gr L^{-1} , con aquellos de 1.0 gr L^{-1} , ambos para la configuración de la fuente de luz (HS), observamos que el impacto negativo de las condiciones de iluminación altamente estratificadas, sobre el rendimiento de la biomasa, aumenta a medida que crece la concentración de biomasa.

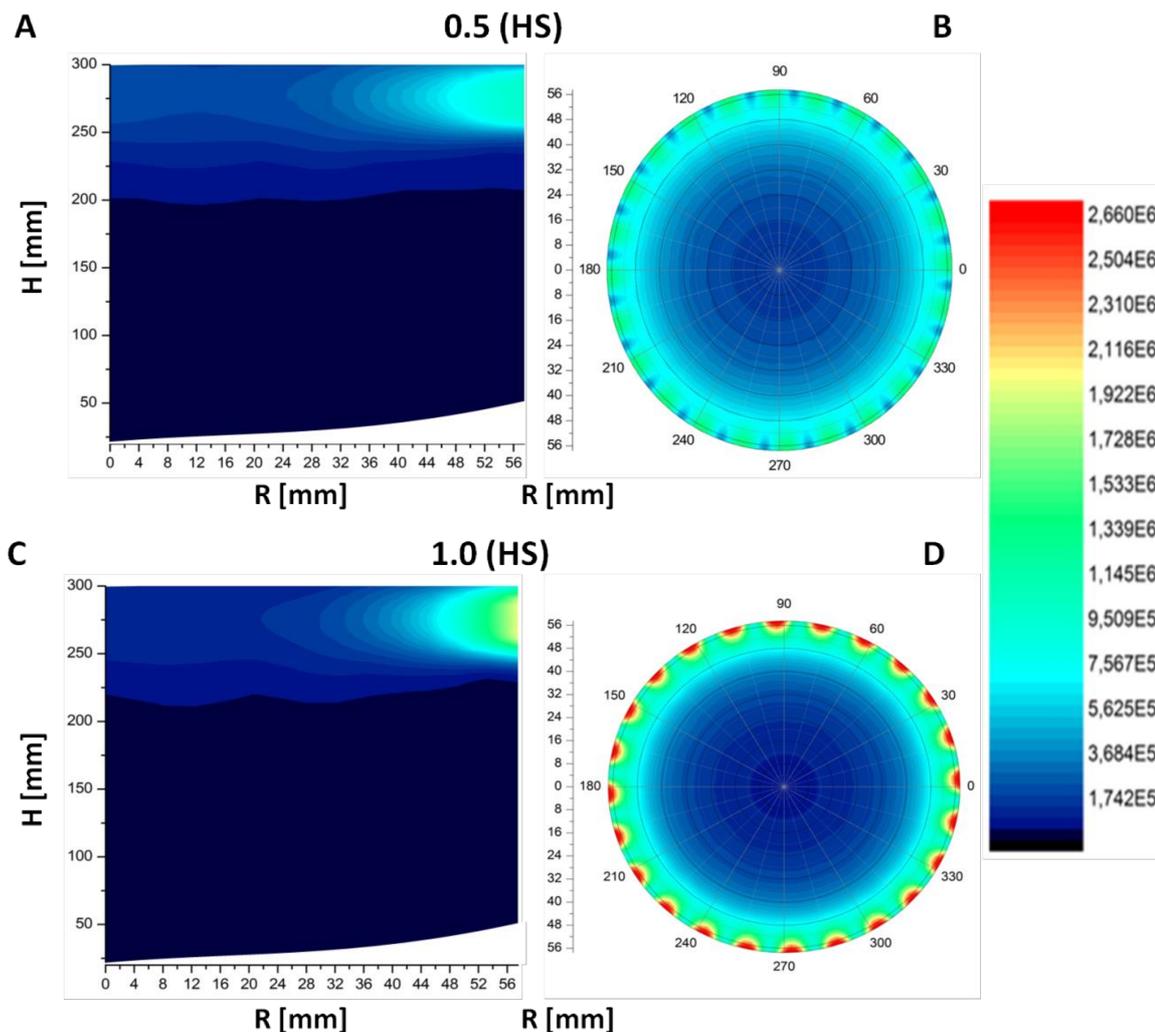


Figura (4). A y C] $r_{PAR}(r, x)$ [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$] como función del radio, R, y la altura, H, del FBR para cultivos 0.5 (HS) y 1.0 (HS). B y D] Perfiles de distribución de $r_{PAR}(r, x)$ correspondientes a un corte transversal del FBR ($H = 270$ mm, ver Fig. (1C)). El contenido de Chls de los cultivos se muestra en la Fig. (2).

En cambio, cuando las tiras de LED se colocaron en una configuración que induce un grado más bajo de estratificación a lo largo de la dirección axial del vaso (LS), el acceso de las algas a la luz mejora, disminuyendo el tiempo que pasan en las zonas más oscuras, Fig. (5). Este fenómeno, conocido como "light flashing effect" es de gran importancia cuando se diseñan FBRs [116-119].

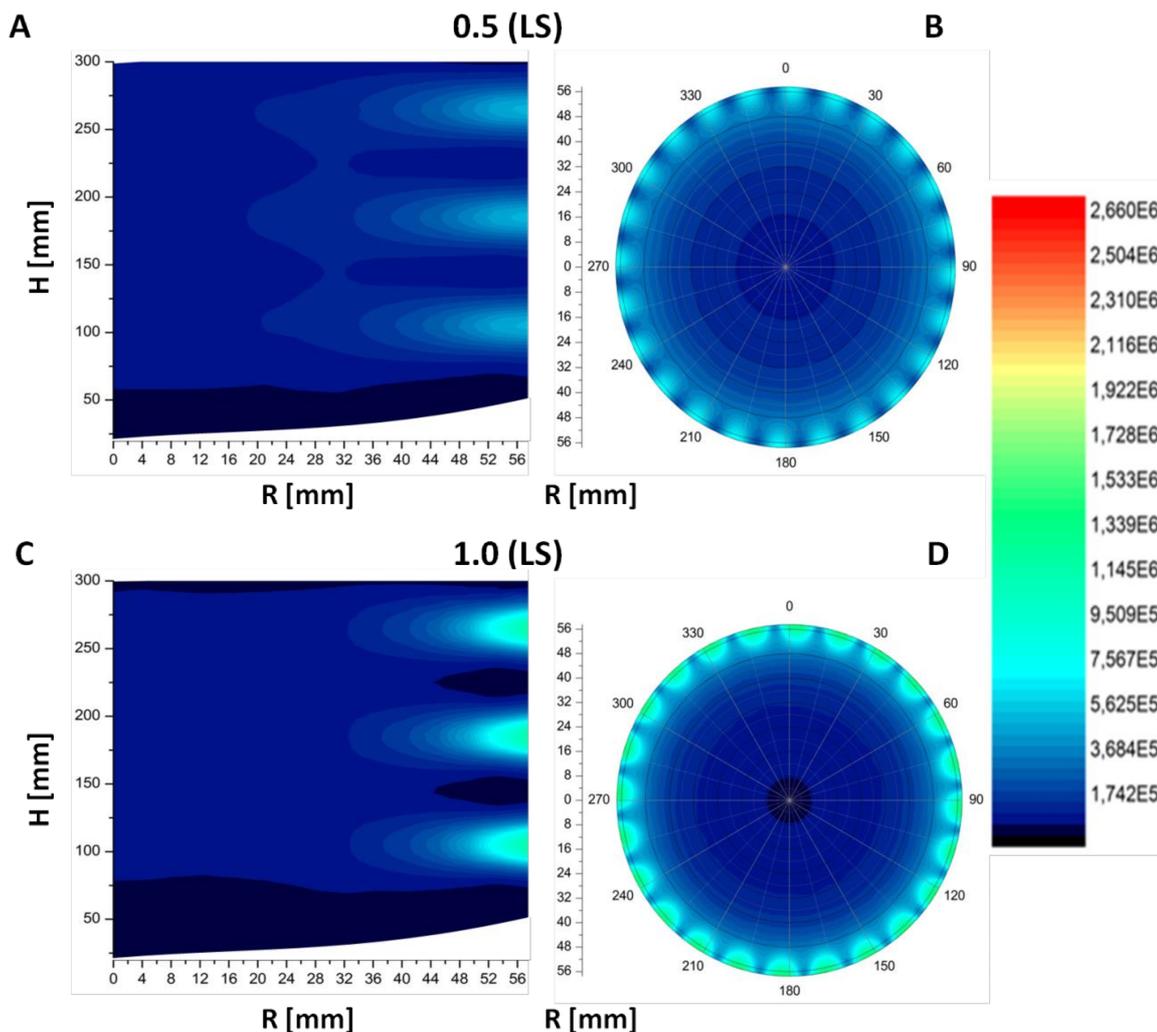


Figura (5). A y C] $r_{PAR}(\underline{r}, x)$ [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$] como función del radio, R, y la altura, H, del FBR para cultivos 0.5 (LS) y 1.0 (LS). B y D] Perfiles de distribución de $r_{PAR}(\underline{r}, x)$ correspondientes a un corte transversal del FBR ($H = 180$ mm, ver Fig. (1C)). El contenido de Chls de los cultivos se muestra en la Fig. (2).

Aunque los valores locales de r_{PAR} pueden ser predichos simulando el CER a través de MC, para el propósito de comparar la eficiencia en el uso de la luz en reactores, resulta mucho más útil conocer como el volumen total del reactor es distribuido en fracciones de volumen, cada una incluyendo puntos con valores locales para r_{PAR} , dentro del intervalo r_{PAR} y $r_{PAR} + dr_{PAR}$, con r_{PAR} en el rango $[0, \infty]$. Es por eso que se ha introducido la noción de distribución del volumen del reactor entre las velocidades de absorción de fotones PAR, $g(r_{PAR})$ [80].

La función $g(r_{PAR})$ es una medida de la frecuencia de ocurrencia de los valores de r_{PAR} en el FBR. Si un elemento de volumen del FBR es elegido al azar, siendo todas las posiciones \underline{r} igualmente probables de ser seleccionadas, la probabilidad diferencial $dG(r_{PAR})$ de que en ese elemento de volumen el valor de r_{PAR} esté dentro del intervalo diferencial r_{PAR} y $r_{PAR} + dr_{PAR}$, para $0 < r_{PAR} < \infty$, es:

$$dG(r_{PAR}) = g(r_{PAR}) dr_{PAR} \quad (12)$$

La probabilidad acumulada $G(r_{PAR})$ de que en un elemento de volumen elegido aleatoriamente el valor de r_{PAR} esté en el rango $[0, r_{PAR}]$, es la relación del volumen de todas las zonas con velocidades r_{PAR} en el rango $0 \leq r'_{PAR} \leq r_{PAR}$, y el volumen del cultivo, V , Ec. (13).

$$G(r_{PAR}) = \frac{V(r_{PAR})}{V} = \int_0^{r_{PAR}} g(r'_{PAR}) dr'_{PAR} \quad (13)$$

La función de probabilidad acumulada $G(r_{PAR})$ debe cumplir la siguiente condición de normalización:

$$\lim_{r_{PAR} \rightarrow \infty} G(r_{PAR}) = \lim_{r_{PAR} \rightarrow \infty} \frac{V(r_{PAR})}{V} = \lim_{r_{PAR} \rightarrow \infty} \int_0^{r_{PAR}} g(r'_{PAR}) dr'_{PAR} = I \quad (14)$$

La función de distribución $g(r_{PAR})$ ofrece la posibilidad de comparar la performance en la absorción de fotones, de diferentes configuraciones de la fuente de radiación-reactor y diferentes condiciones de operación. Utilizar una función indicativa única facilita el reconocimiento de eventuales diseños incorrectos o la detección de condiciones de operación no aconsejables, en lo que respecta a la distribución de la energía radiante en el medio de cultivo.

El primer paso necesario para la construcción de la función de distribución $g(r_{PAR})$, de una configuración fuente-reactor particular y sus condiciones de operación, es simular el CER, tal de conocer los valores de r_{PAR} en cada nodo de la grilla computacional. Para esto hemos utilizado un algoritmo basado en la metodología estocástica de MC (ver el Capítulo (2)). A continuación, el volumen acumulado $V(r_{PAR})$ debe calcularse sumando todos los volúmenes elementales que encierran un nodo con un valor dado de r_{PAR} . Una vez completado esto, la probabilidad acumulada $G(r_{PAR})$ es conocida en su versión discreta:

$$G(r_{PAR}) = \frac{V(r_{PAR})}{V} \quad ; \quad 0 < r_{PAR} < \infty; \quad (15)$$

Los valores para $G(r_{PAR})$ así obtenidos se muestran en la Fig. (6) con puntos sólidos negros. Podemos observar que en todos los casos hay una fracción considerable del medio de cultivo que muestra valores bajos de r_{PAR} , ya que se obtienen valores grandes de $G(r_{PAR})$ para valores más bajos de r_{PAR} . Aunque se observa la misma tendencia en todos los casos, es más marcada para aquellos en los que se induce una mayor estratificación de la luz (HS), y la concentración de algas es mayor, 1.0 gr L⁻¹. Además, $V(r_{PAR})$ obtenido de la simulación MC tiende asintóticamente al valor constante V para los valores mayores de r_{PAR} .

De las tendencias observadas es posible inferir la estructura general de la función de distribución $g(r_{PAR})$. De las Ecs. (12) y (15) obtenemos:

$$\frac{d}{dr_{PAR}} G(r_{PAR}) = \frac{d}{dr_{PAR}} \left[\frac{V(r_{PAR})}{V} \right] = g(r_{PAR}) \quad (16)$$

De la Ec. (14), y los resultados que se muestran en la Fig. (6), llegamos a la conclusión de que en nuestro caso $g(r_{PAR})$ debe ser una función de aumento pronunciado para valores bajos de r_{PAR} ,

mientras que debe tender asintóticamente a cero en los valores mayores de r_{PAR} . Sobre esta base, la siguiente expresión de $g(r_{PAR})$ es propuesta:

$$g(r_{PAR}) = k\delta(r_{PAR} \rightarrow 0^+) + \beta(1-k)\exp(-\beta r_{PAR}) \quad (17)$$

donde $\delta(r_{PAR} \rightarrow 0^+)$ es la “función” Delta de Dirac, y β y k son parámetros que tienen que ser regresionados desde los resultados de la simulación del CER con MC. En particular, k representa la fracción del volumen de medio que no absorbe radiación, con valores en el intervalo [0, 1].

Una vez que $g(r_{PAR})$ es conocida, el valor promedio estadístico de r_{PAR} resulta ser:

$$r_{PAR}^{AV} = \int_0^{\infty} r_{PAR} g(r_{PAR}) dr_{PAR} = \frac{(1-k)}{\beta} \quad (18)$$

y la expresión para la varianza de r_{PAR} , $\sigma_{r_{PAR}}^2$, es:

$$\sigma_{r_{PAR}}^2 = \int_0^{\infty} (r_{PAR} - r_{PAR}^{AV})^2 g(r_{PAR}) dr_{PAR} = r_{PAR}^{AV} \frac{(1+k)}{\beta} = \frac{(1-k^2)}{\beta^2} \quad (19)$$

La desviación estándar $\sigma_{r_{PAR}}$ es una medida de la dispersión de los valores de r_{PAR} alrededor del promedio r_{PAR}^{AV} . La Tabla (1) resume los parámetros y propiedades estadísticas de la función $g(r_{PAR})$. Las deducciones de las expresiones contenidas en las Ecs. (18) y (19) se encuentran en el Apéndice (A4).

Tabla (1). Parámetros y propiedades estadísticas de la función $g(r_{PAR})$				
Cultivo	k	β [$\mu\text{mol}^{-1} \text{ día L}^{-1}$]	r_{PAR}^{AV} [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{ L}^{-1}$]	$\sigma_{r_{PAR}}$ [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{ L}^{-1}$]
0.5 (LS)	0.000	8.510×10^{-6}	1.175×10^5	1.175×10^5
1.0 (LS)	0.546	3.358×10^{-6}	1.352×10^5	2.495×10^5
0.5 (HS)	0.658	3.153×10^{-6}	1.085×10^5	2.388×10^5
1.0 (HS)	0.780	1.705×10^{-6}	1.290×10^5	3.670×10^5

El valor del parámetro k , en cada condición de iluminación, es una medida del tamaño de la fracción oscura del volumen de medio de cultivo en el FBR. De los valores indicados en la Tabla (1), podemos observar que k siempre aumenta con la concentración de x en el FBR, y que en condiciones de iluminación altamente estratificadas (HS), el volumen a oscuras es más grande.

La función $G(r_{PAR})$ obtenida a partir de las Ecs. (15) y (17), con los valores de los parámetros reportados en la Tabla (1), se muestra en la Fig. (6) para cada condición de cultivo (línea sólida azul). Como se puede observar existe una buena concordancia entre el ajuste y los resultados de la simulación MC (puntos sólidos negros).

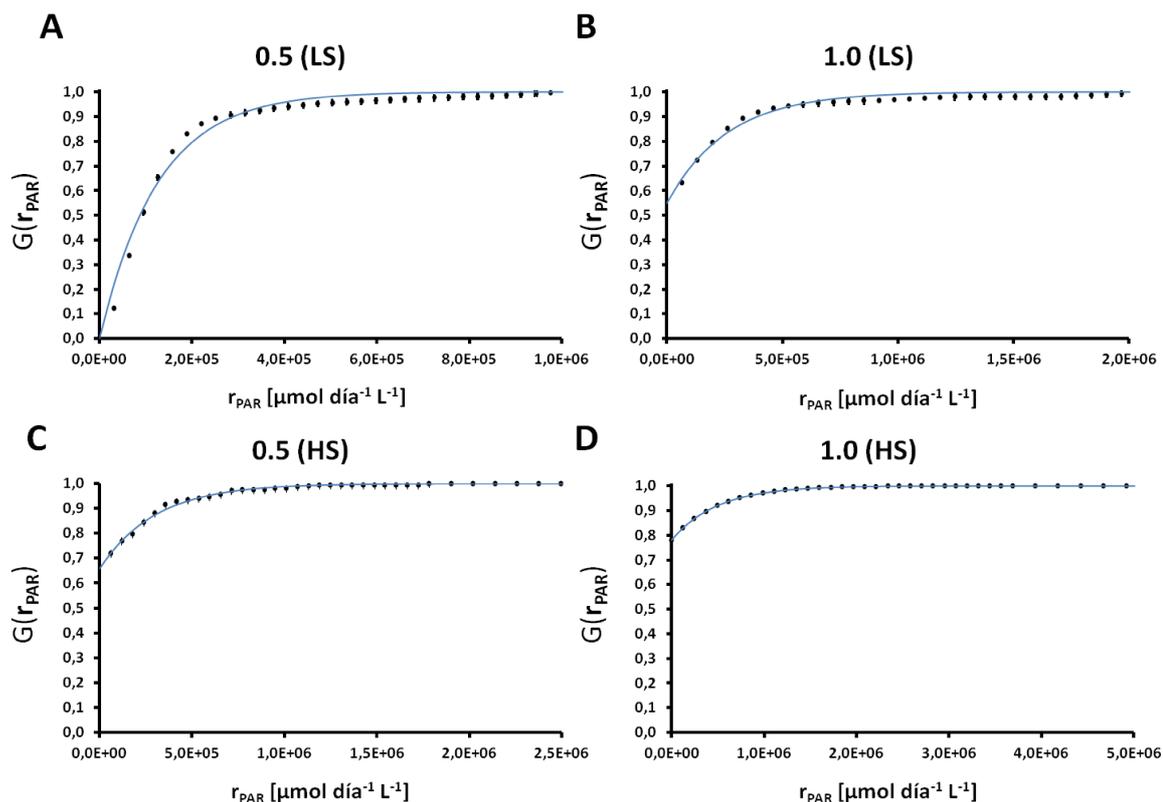


Figura (6). A, B, C, D] Función de probabilidad acumulada en términos de r_{PAR} [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$], $G(r_{PAR})$, experimental (●) y propuesta (línea sólida azul, obtenida de la Ec. (17)).

La distribución de los valores de r_{PAR} para cada condición de cultivo se muestra en la Fig. (7), en forma de gráfico de caja con escala logarítmica. Los valores que adopta r_{PAR}^{AV} se proporcionan en la Tabla (1).

Como se puede ver en la Fig. (7), los valores de r_{PAR}^{AV} en las condiciones operativas ensayadas difieren entre sí en una pequeña cantidad (ver la Tabla (1)). Sin embargo, la distribución de luz en el reactor para cada caso es muy diferente a la de cualquiera de los otros. Los cultivos irradiados con la fuente de luz (LS) muestran distribuciones más homogéneas de r_{PAR} . En ambos casos, se pueden encontrar valores superiores a 10^4 [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$] en más del 90% del volumen de cultivo. Por otro lado, con la configuración (HS) la estratificación de la luz en el cultivo es más fuerte, y para las concentraciones de biomasa de trabajo, la mayor fracción del volumen de cultivo incluye valores menores a 10^4 [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$], es decir, un orden de magnitud inferior al valor promedio. El mayor grado de estratificación se encontró con una concentración de biomasa de trabajo de 1.0 gr L^{-1} bajo una configuración de la fuente de luz (HS).

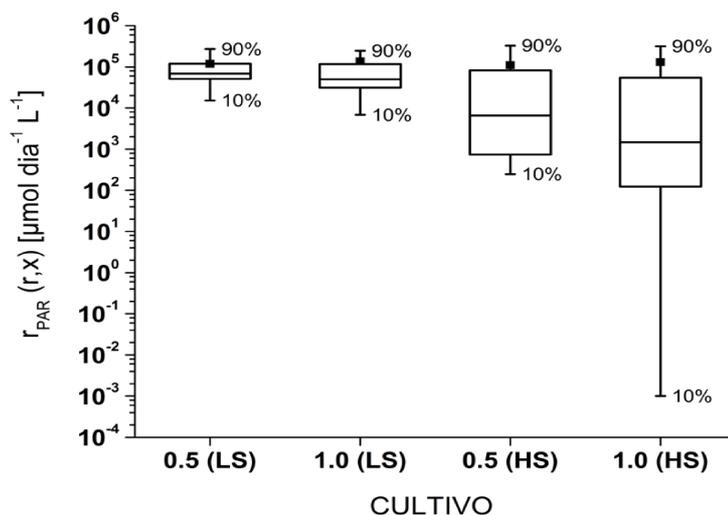


Figura (7). Distribución de valores de r_{PAR} correspondientes al 80.0% del volumen del FBR. (•) Valor promedio para la velocidad de absorción de fotones PAR, r_{PAR}^{AV} .

(5.3).- Análisis de la influencia del grado de estratificación de luz sobre el crecimiento

El objetivo del presente Capítulo es analizar cómo la estratificación de la radiación en la suspensión de algas afecta el crecimiento celular y la performance de un FBR. En todas las experiencias efectuadas la cantidad de radiación que ingresa al volumen de cultivo a través de las superficies iluminadas es la misma. Sin embargo, la forma en que se distribuye y absorbe la radiación dentro de la suspensión difiere de un caso a otro. Estos cambios en la distribución de la energía radiante dentro del volumen de cultivo se logran modificando la disposición de los LEDs unidos a las paredes del FBR o la concentración de x de la suspensión.

Los resultados muestran que la cantidad de radiación absorbida aumenta al incrementarse la concentración de x , para ambas configuraciones de la fuente de radiación. Sin embargo, cuando la luz es capturada por un mayor número de células, la cantidad de luz absorbida por unidad de x se reduce y viceversa. La velocidad específica promedio de absorción de fotones se puede calcular como la relación entre r_{PAR} , y \bar{x} , de la siguiente forma:

$$r_{PAR}^{AV,SP} = \frac{r_{PAR}^{AV}}{\bar{x}} \tag{20}$$

Los valores de r_{PAR}^{AV} se muestran en la Fig. (8A), de la cual podemos concluir que la velocidad específica de crecimiento μ decrece a medida que r_{PAR}^{AV} decrece. Una r_{PAR}^{AV} más baja también implica una menor cantidad de energía radiante disponible para cada célula individual, lo que reduce μ , y por lo tanto aumenta el tiempo de duplicación celular.

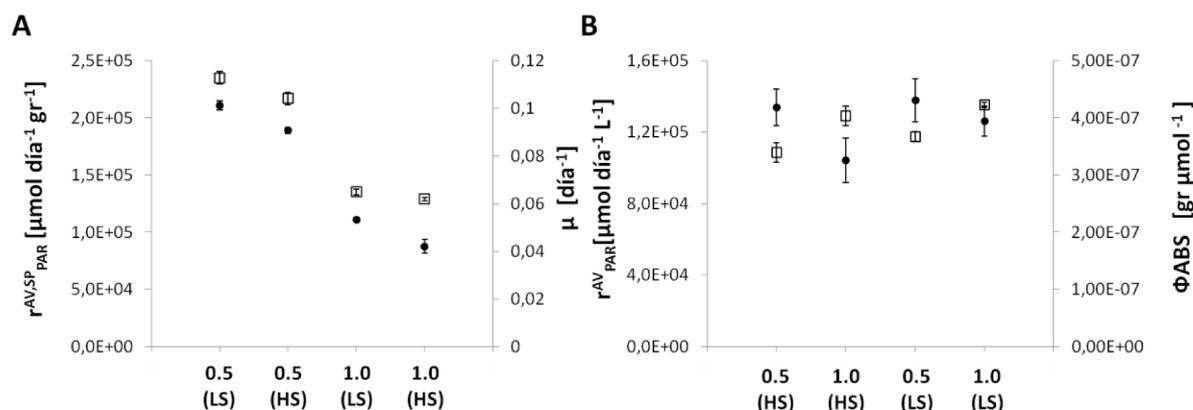


Figura (8). A] Velocidad específica promedio de absorción de fotones PAR, $r_{PAR}^{AV,SP}$ [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{gr}^{-1}$] (□) y velocidad de crecimiento específica, μ [día^{-1}] (●). B] Velocidad volumétrica promedio de absorción de fotones PAR, r_{PAR}^{AV} [$\mu\text{mol día}^{-1} \text{L}^{-1}$] (□), y eficiencia fotosintética, Φ_{ABS} [$\text{gr } \mu\text{mol}^{-1}$] (●).

Para evaluar la eficiencia del uso de la energía radiante absorbida es conveniente utilizar el rendimiento fotosintético, Φ_{ABS} , definido como la cantidad de biomasa generada por unidad de energía radiante absorbida, Ec. (21).

$$\Phi_{ABS} = \frac{r_{PAR}^{AV}}{\bar{F}_x} \quad (21)$$

A partir de la Fig. (8B) se puede concluir que, para ambas configuraciones de la fuente de luz, (HS) y (LS), el aumento en la concentración de x de 0.5 a 1.0 gr L^{-1} conduce a un aumento en el contenido de Chls intracelulares (ver la Fig. (2)), y a un decrecimiento de Φ_{ABS} .

Para ambas configuraciones de la fuente de luz, las células de *S. quadricauda* a concentraciones de 1.0 gr L^{-1} absorben cantidades más pequeñas de radiación por unidad de biomasa, y tienen un mayor contenido de Chls que las células cultivadas a 0.5 gr L^{-1} . Cambios en la pigmentación de microalgas verdes y cianobacterias, producto de las condiciones de iluminación, son considerados mecanismos de fotoaclimatación. La transformación fisiológica de las células contempla alteraciones transcripcionales, la biosíntesis de *novo* de pigmentos y complejos de proteínas, y una importante reorganización ultraestructural, que contempla cambios en la arquitectura y composición de los complejos antena de captación de luz (LHCs) [86, 120].

La microalga *S. obliquus* mostró menores contenidos de Chls en la biomasa a medida que la distribución de luz en el FBR se tornaba más uniforme [121]; *S. dimorphus* [122, 123] y *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) [124] incrementaron su contenido de Chls por peso unitario de x cuando fueron cultivadas a bajas densidades de flujo de fotones (PFDs). Senger y Fleischhacker demostraron que *S. obliquus* es capaz de adaptarse a diferentes niveles de luz blanca de una manera muy similar a la de las plantas superiores [125]. La cepa cultivada a bajas PFDs mostró cerca del doble del contenido de Chls en la biomasa que a altas PFDs. Posteriormente, Humbeck, Hoffmann y Senger propusieron un modelo para la adaptación del aparato fotosintético de *S. obliquus* a altas y bajas PFDs de luz blanca [104], considerando la concentración de los pigmentos fotosintéticos principales (Chl a, Chl b), de los

accesorios (carotenoides), y de los componentes de la cadena de transporte de electrones. Postularon que en condiciones de bajas irradiancias el número de fotosistemas (PS) por cadena de transporte de electrones aumenta, sin variar su tamaño.

Generalizando, en condiciones de bajas irradiancias las algas producen sistemas fotosintéticos con mayor capacidad para capturar fotones. Este aumento en la capacidad de captación de fotones se logra incrementando la biosíntesis de Chls. Además, en condiciones de altas irradiancias, no fotoinhibitorias, las microalgas destinan una parte más pequeña de sus recursos energéticos a la síntesis de pigmentos fotosintéticos, y asignan más energía a los procesos que siguen a la absorción de luz, como la fijación de carbono (ej. aumentando la síntesis de la enzima RuBP carboxilasa [126, 127]).

El menor contenido de Chls en la biomasa de cultivos de 1 gr L^{-1} puede deberse al hecho de que la cantidad de fotones absorbidos por unidad de biomasa es menor, en comparación a 0.5 gr L^{-1} . La fotoaclimatación de la que hemos sido testigos es principalmente originada por la cantidad de radiación absorbida y no por su composición espectral, como el caso de *S. quadricauda* creciendo en diversas proporciones de luz azul y roja (ver Capítulo (3)). Esta afirmación surge del análisis de la composición espectral de la luz absorbida, la cual resultó ser muy similar en todos los casos (datos no mostrados).

El rendimiento fotosintético depende del acoplamiento cinético entre la absorción de luz, el transporte de electrones y los procesos de fijación de carbono. Si la velocidad de absorción de fotones es mayor que la velocidad a la que se transportan los electrones generados en los centros de reacción, se produce un agotamiento de los portadores de carga disponibles, y la energía absorbida en exceso se disipa a través de diversos mecanismos [128]. Por otro lado, recordando las discusiones presentes en el Capítulo (3), la eficiencia en el uso de fotones está asociada con el tamaño de los LHCs de los PS. Perrine ha mostrado que cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* con LHCs más pequeños tienen mayores eficiencias fotosintéticas, y mayores μ [111].

Existen diseños y prototipos de FBRs que buscan explotar el fenómeno natural de fotoaclimatación para mejorar la productividad de un cultivo. Tal es el caso de una serie de turbidostatos con tiempos de residencia hidráulico e irradiancias diferentes, tal de lograr en cada uno distintas pigmentaciones [129], y el de un reactor de multicompartimentos que generan cambios en la pigmentación debido a diferentes niveles de radiación en cada compartimento [130].

Nuestros resultados muestran que en condiciones de iluminación altamente estratificadas (HS), un aumento en la concentración de x provoca un aumento en la cantidad de energía absorbida, pero la productividad del cultivo se reduce debido a una disminución en la eficiencia fotosintética. La reducción está relacionada con los mecanismos de adaptación discutidos en párrafos anteriores. Además, en condiciones de iluminación que inducen una baja estratificación (LS), el aumento en la concentración de x se acompaña nuevamente de un aumento en la cantidad de energía absorbida y de una disminución en la eficiencia fotosintética, pero la productividad del cultivo aumenta. Esto es

consecuencia de una iluminación más homogénea, la cual evita la presencia de zonas con elevadas r_{PAR} , donde, debido a la falta de capacidad de procesamiento, una fracción mayor de la energía absorbida se disipa como calor (derroche).

Tim de Moij y col. han observado a través de ensayos en FBRs *flat panel*, operados en modo turbidostato, en condiciones de iluminación *outdoor* y distribuciones de luz homogéneas en la pared, que la productividad es inversamente proporcional a la cantidad de radiación absorbida por las células de *C. reinhardtii* [131]. En nuestro caso, podemos afirmar que la distribución de energía radiante en el medio de cultivo es determinante en la productividad del FBR. Sin embargo, si el efecto sobre la productividad del cultivo va a ser favorable o desfavorable dependerá de si el impacto positivo de un aumento en r_{PAR}^{AV} es superado por el efecto negativo de una disminución en Φ_{ABS} . Los resultados muestran la importancia de llevar a cabo un análisis riguroso del CER y del nivel de estratificación de luz en el FBR, durante las etapas de síntesis, escalado y optimización.

(6).- CONCLUSIONES

En el presente Capítulo se analizó el impacto de diferentes grados de estratificación de la luz sobre la velocidad de crecimiento específica, la productividad promedio de la biomasa, el contenido de clorofilas y la eficiencia en el uso de la radiación absorbida, en cultivos de *Scenedesmus quadricauda*. Se lograron diferentes grados de estratificación ubicando los LEDs en diversas disposiciones sobre la pared del reactor y al elegir distintas concentraciones de biomasa de trabajo. En todos los experimentos, el flujo de fotones en la superficie del FBR fue el mismo, y se mantuvo constante durante el tiempo de cultivo. El grado de estratificación se caracterizó a través de una expresión analítica propuesta para la función de distribución de las fracciones de volumen de cultivo que operan sobre un rango de velocidades volumétricas de absorción de fotones PAR.

Los resultados experimentales muestran que un aumento de la concentración de biomasa se acompaña de una reducción en la energía absorbida por unidad de biomasa, lo que provoca una reducción de la velocidad de crecimiento específica, un aumento en la síntesis de clorofilas y una disminución de la eficiencia fotosintética. La distribución de luz dentro del medio de cultivo tiene un gran impacto en la productividad del FBR, y un aumento de la concentración de biomasa tiene un efecto positivo o negativo en el rendimiento del reactor dependiendo de si el aumento en la cantidad total de radiación absorbida es superado por la disminución de la eficiencia fotosintética.

APÉNDICE (A4): Propiedades de la función $g(r_{PAR})$

La expresión para el promedio estadístico de r_{PAR} , r_{PAR}^{AV} , se encuentra resolviendo la Ec. (A4.1).

$$r_{PAR}^{AV} = \int_0^{\infty} r_{PAR} g(r_{PAR}) dr_{PAR} \quad (A4.1)$$

Incorporando la expresión propuesta para la función de distribución $g(r_{PAR})$, Ec. (17), resulta:

$$r_{PAR}^{AV} = \int_0^{\infty} \left(r_{PAR} k \delta(r_{PAR} \rightarrow 0^+) + \beta(1-k) \exp(-\beta r_{PAR}) \right) dr_{PAR} \quad (A4.2)$$

$$r_{PAR}^{AV} = k \int_0^{\infty} r_{PAR} \delta(r_{PAR} \rightarrow 0^+) dr_{PAR} + \beta(1-k) \int_0^{\infty} r_{PAR} \exp(-\beta r_{PAR}) dr_{PAR} \quad (A4.3)$$

Para valores de $r_{PAR} \rightarrow 0^+$, donde la “función” Delta de Dirac es no acotada, el primer término de la Ec. (A4.3) adquiere el valor de 0. Por su parte, para valores de $r_{PAR} \rightarrow \infty$, la Delta de Dirac toma el valor de 0. Estos motivos conducen a que la Ec. (A4.3) se reduzca a:

$$r_{PAR}^{AV} = \beta(1-k) \int_0^{\infty} r_{PAR} \exp(-\beta r_{PAR}) dr_{PAR} \quad (A4.4)$$

La integral de la Ec. (A4.4) puede resolverse aplicando el método de integración por partes.

$$r_{PAR}^{AV} = \beta(1-k) \left[r_{PAR} \exp(-\beta r_{PAR}) + \frac{1}{\beta} \int_0^{\infty} \exp(-\beta r_{PAR}) dr_{PAR} \right]_0^{\infty} \quad (A4.5)$$

$$r_{PAR}^{AV} = \beta(1-k) \left[r_{PAR} \exp(-\beta r_{PAR}) - \frac{1}{\beta^2} \exp(-\beta r_{PAR}) \right]_0^{\infty} \quad (A4.6)$$

La expresión para el promedio estadístico de r_{PAR} resulta ser:

$$r_{PAR}^{AV} = \frac{(1-k)}{\beta} \quad (A4.7)$$

La expresión para la varianza de r_{PAR} , $\sigma_{r_{PAR}}^2$, se obtiene de resolver la Ec. (A4.8).

$$\sigma_{r_{PAR}}^2 = \int_0^{\infty} (r_{PAR} - r_{PAR}^{AV})^2 g(r_{PAR}) dr_{PAR} \quad (A4.8)$$

$$\sigma_{r_{PAR}}^2 = \int_0^{\infty} \left((r_{PAR})^2 - 2r_{PAR} r_{PAR}^{AV} + (r_{PAR}^{AV})^2 \right) g(r_{PAR}) dr_{PAR} \quad (A4.9)$$

$$\sigma_{r_{PAR}}^2 = \int_0^{\infty} (r_{PAR})^2 g(r_{PAR}) dr_{PAR} - 2r_{PAR}^{AV} \underbrace{\int_0^{\infty} r_{PAR} g(r_{PAR}) dr_{PAR}}_{r_{PAR}^{AV}} + (r_{PAR}^{AV})^2 \underbrace{\int_0^{\infty} g(r_{PAR}) dr_{PAR}}_1 \quad (A4.10)$$

$$\sigma_{r_{PAR}}^2 = \int_0^{\infty} (r_{PAR})^2 g(r_{PAR}) dr_{PAR} - (r_{PAR}^{AV})^2 \quad (A4.11)$$

Nuevamente, la resolución analítica de la integral presente en el primer término de la Ec. (A4.11) puede efectuarse mediante el método de integración por partes:

$$k \underbrace{\int_0^{\infty} (r_{PAR})^2 \delta(r_{PAR} \rightarrow 0^+) dr_{PAR}}_{\approx 0} + \beta(1-k) \int_0^{\infty} (r_{PAR})^2 \exp(-\beta r_{PAR}) dr_{PAR} = \quad (A4.12)$$

$$\beta(1-k) \int_0^{\infty} (r_{PAR})^2 \exp(-\beta r_{PAR}) dr_{PAR} = \quad (A4.13)$$

$$\beta(1-k) \left[-\frac{(r_{PAR})^2}{\beta} \exp(-\beta r_{PAR}) + \frac{2}{\beta} \int r_{PAR} \exp(-\beta r_{PAR}) dr_{PAR} \right]_0^{\infty} = \quad (A4.14)$$

$$\beta(1-k) \left[-\frac{(r_{PAR})^2}{\beta} \exp(-\beta r_{PAR}) + \frac{2}{\beta} \left[-\frac{r_{PAR}}{\beta} \exp(-\beta r_{PAR}) - \frac{1}{\beta^2} \exp(-\beta r_{PAR}) \right] \right]_0^{\infty} = \quad (A4.15)$$

$$\beta(1-k) \left[\frac{2}{\beta^3} \right] = (1-k) \left[\frac{2}{\beta^2} \right] = 2 \frac{(1-k)}{\beta} = \frac{2}{\beta} r_{PAR}^{AV} \quad (A4.16)$$

$$\int_0^{\infty} (r_{PAR})^2 g(r_{PAR}) dr_{PAR} = \frac{2}{\beta} r_{PAR}^{AV} \quad (A4.17)$$

Reemplazando la Ec. (A4.17) en la Ec. (A4.11) resulta:

$$\sigma_{r_{PAR}}^2 = \frac{2}{\beta} (r_{PAR}^{AV}) - (r_{PAR}^{AV})^2 \quad (A4.18)$$

$$\sigma_{r_{PAR}}^2 = r_{PAR}^{AV} \left(\frac{2}{\beta} - r_{PAR}^{AV} \right) = r_{PAR}^{AV} \left(\frac{2}{\beta} - \frac{1-k}{\beta} \right) = r_{PAR}^{AV} \frac{(1+k)}{\beta} \quad (A4.19)$$

$$\sigma_{r_{PAR}}^2 = r_{PAR}^{AV} \frac{(1+k)}{\beta} = \frac{(1-k)}{\beta} \frac{(1+k)}{\beta} = \frac{(1-k^2)}{\beta^2} \quad (A4.20)$$

CAPÍTULO (5)

Un enfoque para estimar la productividad de fotobiorreactores (FBRs) 1: Bases y Fundamentos

(1).- RESUMEN

La performance de un sistema de cultivo de microalgas depende de muchos factores, a saber, el tipo de reactor, la fuente de radiación, la cepa del microorganismo, las condiciones operativas, etc. La biotecnología de algas dedica grandes esfuerzos al desarrollo de herramientas teóricas y experimentales que permitan predecir la productividad de fotobiorreactores (FBRs), con el fin de reducir costos y evitar gastos de tiempo en procesos que podrían no satisfacer los objetivos que se persiguen.

En el presente Capítulo se propone y desarrolla una metodología para estimar la productividad de FBRs *outdoor* iluminados con luz solar, de escala de planta piloto o producción, reales o hipotéticos, utilizando un reactor de laboratorio y una fuente de luz artificial LED de amplio espectro. Las experiencias en laboratorio deben conducirse de forma tal de que se reproduzcan las condiciones de iluminación *outdoor*. En este primer enfoque, se mantienen constantes los efectos de la geometría y la orientación del reactor *outdoor*, entregando externamente al reactor laboratorio la misma cantidad de fotones PAR por unidad de volumen (flujo de fotones PAR volumétrico), y los relacionados a la geografía del lugar, como el ciclo día-noche (fotoperíodo) y la composición de la radiación solar en términos de luz directa y difusa. Se aplica la propuesta a un FBR *outdoor* de tipo columna de burbujeo, construido por integrantes del GiiB y localizado en la ciudad de Santa Fe (Argentina).

En una primera instancia se deducen las expresiones para el cálculo de la intensidad directa y difusa, utilizando registros históricos de radiación solar global sobre una superficie horizontal. Posteriormente se obtienen los perfiles horarios de radiación solar por unidad de tiempo y volumen de reactor, y se describe la emisión y el control del flujo radiante de un módulo de iluminación LED. Dado que la fuente de luz artificial no tiene la misma distribución espectral que el sol, se encuentran las condiciones de operación del módulo LED, que permiten igualar la cantidad de fotones fotosintéticamente activos (PAR) por unidad tiempo y volumen de cultivo que existe en el reactor *outdoor*. Por último, para observar los efectos que tiene la forma de suministrar la radiación en el reactor de laboratorio, respecto a la *outdoor*, se obtienen y comparan para varios escenarios (hora, día, concentración de biomasa y contenido de pigmentos fotosintéticos), las distribuciones del campo de energía radiante (CER) en el interior de los FBRs, utilizando el método de Monte Carlo (MC). La potencialidad de la propuesta surge de la comparación de las velocidades volumétricas promedio de absorción de fotones PAR, que resultaron ser muy similares entre ambos FBRs.

(2).- INTRODUCCIÓN

Las algas en FBRs *outdoor* pueden experimentar fluctuaciones en las condiciones ambientales, tales como cantidad y calidad de luz, pH, temperatura, CO₂, O₂, etc. Responden a los cambios en forma dinámica, ajustando las estrategias de captura y disipación de energía luminosa, los procesos fisiológicos y el control del ciclo celular. Por lo tanto, las respuestas biológicas que se desencadenan, producto de una combinación de condiciones ambientales, determinan la productividad de un cultivo.

A través de ensayos experimentales de cultivo se han evidenciado los efectos de los diferentes fenómenos que afectan el crecimiento de las algas, entre ellos la transferencia de energía radiante en las fronteras y el interior del FBR [78, 80, 132], la transferencia de materia entre fases (ej. gas-líquido en cultivos en suspensión, gas-sólido/líquido-sólido en cultivos en *biofilm*) [64, 133], el mezclado [134, 135], etc. Si bien los fenómenos pueden ser descriptos y caracterizados en forma independiente y rigurosa, aún no se ha podido encontrar una expresión cinética para la velocidad de crecimiento específica, μ , que integre todos los fenómenos, y sea independiente del dispositivo, y de las condiciones operativas que se utilizaron para su obtención. La limitación principal de las expresiones existentes es la baja capacidad de predicción del comportamiento de otros sistemas de cultivo, ej. estimación, a partir de una expresión cinética encontrada, de la performance de diferentes geometrías de FBRs, orientaciones, modos de operación, etc.

Al día de hoy, se ha desviado la atención a metodologías experimentales que permitan estimar la conducta de sistemas de cultivo mediante una reproducción fiel a escala laboratorio de las condiciones de cultivo *outdoor*. Lucker [136] y Huesemann [46] desarrollaron y testearon dispositivos *indoor* (ePBR y PNNL) que permiten reproducir las condiciones de iluminación, temperatura y mezclado, de reactores *raceways ponds*. El potencial de estas técnicas radica en la obtención de información en un tiempo relativamente corto comparado a los de instalación de un FBR, su puesta en funcionamiento y entrada en régimen. Otra ventaja potencial, y no de menor relevancia, es la reducción de los costos asociados a la construcción de un sistema de cultivo que no satisface las necesidades del proceso.

Por su parte, la luz solar es un tipo de energía radiante que no tiene costo asociado, es por ello el notable interés de su aprovechamiento en cultivos de gran escala *outdoor*. Debe tenerse en cuenta que este tipo de radiación sufre variaciones diarias y estacionales que dependen de la geografía y de las condiciones climáticas del lugar [137]. La radiación solar que llega a un FBR se compone de luz directa y difusa; la primera adopta una dirección que depende de la posición del sol, la cual varía durante el transcurso de un año y depende de la ubicación geográfica [138], mientras que la segunda se compone de múltiples direcciones, y es producto de la ocurrencia de fenómenos de *scattering*, refracción y reflexión en la atmósfera [139], también pudiendo variar a lo largo del año. La composición de la radiación (directa y difusa), la geometría, la orientación y los aspectos constructivos de un reactor tienen una gran influencia sobre la cantidad de energía radiante que puede coleccionar a través de sus fronteras, y esto podría trasladarse a su productividad.

(3).- OBJETIVOS

- Desarrollar algoritmos *ad hoc* que permitan, a través de datos de radiación solar de una región del planeta de interés, encontrar la cantidad de radiación horaria por unidad de volumen que alcanza a un determinado tipo de reactor.
- Abordar y discutir el caso de FBRs de tipo columna de burbujeo dispuestos verticalmente.

- Diseñar, construir, y caracterizar un sistema de iluminación que permita reproducir los valores de flujo de fotones volumétrico *outdoor*.
- A través de simulaciones del intercambio de luz entre un reactor de laboratorio y un módulo de iluminación, encontrar las condiciones de operación que permitan reproducir fielmente los valores de flujo de fotones volumétrico *outdoor*.
- Comparar y discutir, para diversos escenarios, el CER resultante en el reactor *indoor* de laboratorio y el *outdoor* de interés.
- Discutir posibles discrepancias entre los resultados de crecimiento de experiencias de simulación de condiciones de iluminación *outdoor* en el laboratorio, y las *outdoor* reales.

(4).- MATERIALES Y MÉTODOS

(4.1).- Radiación solar

Los registros de radiación solar colectados por un período de 5 años (2008-2013) fueron provistos por el Centro de Informaciones Meteorológicas (CIM) "Lic. Enrique Rodríguez" de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas (FICH) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL). El CIM se encuentra situado a una distancia de aprox. 700 m de la Ex planta piloto del Parque Tecnológico Litoral Centro (PTLC) (Latitud 31.634636 (S) y Longitud 60.672562 (O)), ubicación del reactor *outdoor*. Las medidas se efectuaron con un Adquisidor de Datos Meteorológicos Pegasus EP2000, equipado con un sensor de radiación TS-301, capaz de registrar la radiación solar global (directa+difusa) en el rango de $300 \leq \lambda \leq 3000$ [nm], y en unidades de energía por unidad de tiempo y área [$\text{Joule s}^{-1} \text{m}^{-2}$]. Las medidas corresponden al caso de una superficie horizontal.

Los registros se procesaron con el fin de construir perfiles de radiación horarios para un "año típico" de 365 días. El año típico es aquel que describe la conducta sistemática de la radiación solar global durante cada hora de cada día del año. Los criterios para la generación de un año típico y las bases estadísticas se encuentran descriptos en detalle en la Tesis de Maestría de Heinrich [140]. En el presente trabajo se utiliza el promedio horario de la radiación global sobre una superficie horizontal, Fig. (1).

La composición de la radiación solar en Santa Fe, en términos de directa y difusa, se obtuvo del trabajo de Albizzati y col. [141], el cual contiene registros de radiación solar sobre una superficie horizontal durante un período de 10 años.

Las funciones de distribución espectral solar, y la fracción de radiación fotosintéticamente activa (PAR), fueron obtenidas a partir de valores de densidad de flujo espectral solar de referencia ASTM G173-03, derivados de SMARTS v. 2.9.2 [142]. Se utilizaron datos contenidos en el mismo rango espectral en el que se encuentran los registros de radiación global del equipo Pegasus, $300 \leq \lambda \leq 3000$ [nm], espaciados cada 5.0 [nm].

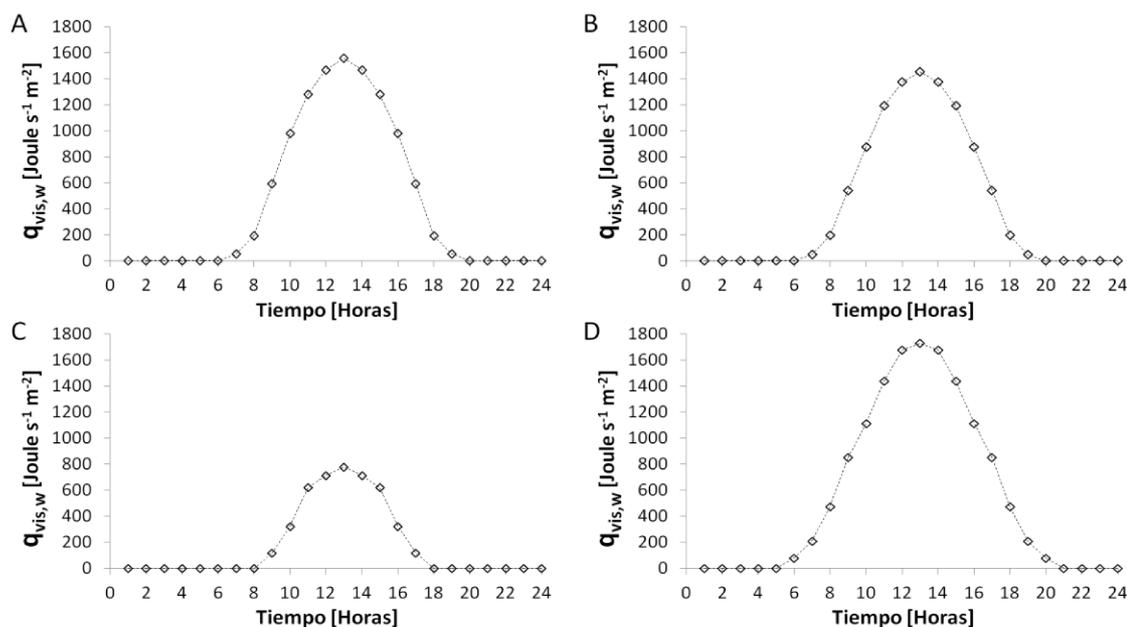


Figura (1). Perfiles de radiación promedio horaria para una superficie horizontal y para diferentes días típicos del año, A] 21 de Marzo (80), Otoño. B] 21 de Junio (172), Invierno. C] 21 de Septiembre (264), Primavera. D] 21 de Diciembre (355), Verano.

(4.2).- Reactor *outdoor* columna de burbujeo

El reactor fue diseñado y construido por integrantes del GiiB, con el fin de validar, a través de cultivos de microalgas *outdoor*, este primer enfoque para una metodología de estimación de la productividad de FBRs.

El reactor consiste en un vaso de acrílico transparente de 18 cm de diámetro y 115 cm de altura, sostenido por un soporte metálico (ver la Fig. (2)). Las dimensiones refieren a un volumen de trabajo de 30 L. Debajo del vaso se localiza una caja metálica aislada de la intemperie que contiene un aireador de pecera (Atman AT-702 3.5W), una bomba centrífuga de tipo lavarropas, y un controlador de temperatura (sonda y termostato digital Full Gauge Controls TIC17RGT). Dentro de las instalaciones de la ex planta piloto del PTLC se fijó a la pared una caja metálica que contiene el sistema eléctrico, el de control y una bomba peristáltica (FEMA PAKPUMP 1.7A). El sistema de aireación consiste en la bomba de pecera, un filtro de aire para combustible, y dos difusores de piedra situados en la base del reactor. El control de temperatura se efectúa a través de un intercambiador interno de aluminio del tipo serpentina, al cual se le efectuó una impresión para evitar la liberación de componentes del material al medio de cultivo. El líquido que circula por el intercambiador se encuentra a una temperatura controlada, por medio de un enfriador o de un calentador. El sistema de enfriamiento comercial consiste en un reservorio de agua fría (*c*/refrigerante), la cual es impulsada por la bomba peristáltica. El sistema de calefacción fue construido por los integrantes del GiiB, y consiste en un tambor plástico de 200 L recubierto con una lámina aislante, y una resistencia de 1W adherida a la tapa del tambor. El tambor fue instalado dentro de una estructura metálica de geometría cilíndrica,

de tipo *dispenser* de agua. El nivel de agua es mantenido constante con un sistema flotante de tipo sanitario, y la temperatura es seteada a partir de un controlador, que acciona sobre la resistencia.

El flujo de líquido en el reactor (recirculación) tiene como finalidad evitar la acumulación de células en la base, y se efectúa con la bomba centrífuga, a través de mangueras de sección diferente situadas debajo del vaso. El líquido atraviesa la base del reactor por un colector de 1 ½ pulgadas y entra nuevamente por la base a través de uno de ½. El tiempo de recirculación es controlado a través de un temporizador digital programable (Elindar SRL RR-VDU-01), que cuenta con múltiples opciones de operación (ON-OFF, y ciclos de tiempo en escala de segundos, minutos, horas).



Figura (2). Fotografías del reactor *outdoor* columna de burbujeo y de las partes que lo componen.



Figura (3). Izquierda] Fotografía del sistema de aireación. Equipamiento del sistema de cultivo *outdoor*; Centro] Sistema de enfriamiento comercial.; Derecha] Sistema de calefacción construido por integrantes del GiiB.

(4.3).- Reactor comercial de laboratorio

Las condiciones de iluminación *outdoor* se reproducen en un reactor comercial automatizado marca Infors HT modelo Labfors 3, con un volumen de trabajo de 3.0 L. El vaso del reactor es de geometría cilíndrica con base esférica, tiene un radio de 5.75 cm y una altura de 30 cm (ver la Fig. (4)). El

bioreactor permite el registro y el control preciso de las variables relevantes en el cultivo de microalgas (ej. agitación mecánica, caudal y composición de la corriente de gases, pH con CO₂ o ácidos/álcalis, O₂ disuelto, temperatura, nivel de líquido y espuma, etc.).



Figura (4). Reactor Infors HT Labfors 3. Izquierda] Vaso del reactor. Centro] Plataforma de control. Derecha] Reactor Infors HT con el módulo de iluminación LED construido.

(4.4).- Fuente de energía radiante

La fuente de radiación consiste en arreglos de LEDs de la marca DEMASLED (Dled) modelo SMD 50x60 blanco frío. Cada LED emite isotrópicamente, operando al 100% de la capacidad de emisión, un flujo de fotones de 0.27 ± 0.01 [$\mu\text{mol s}^{-1}$] (ver la Tabla (3) del Capítulo (1)). La descripción de los aspectos constructivos y operacionales del módulo de iluminación LED se encuentra en la Sección (5.5).

(4.5).- Simulación computacional

Para el cálculo de la posición del sol, y para cuantificar la cantidad de energía radiante proveniente del sol que llega al FBR *outdoor*, y de los LEDs al reactor Infors HT, se utilizaron algoritmos desarrollados *ad hoc* en lenguaje de programación Fortran 90. Como compilador de este lenguaje se utilizó el software Force 2.0.

El modelo físico y matemático en el que se basa la simulación del CER en el medio de cultivo, se llevó a cabo utilizando la metodología de MC (ver el Capítulo (2)). Respecto a las propiedades ópticas de la suspensión de *S. quadricauda*, se utilizaron los coeficientes espectrales de absorción, α_λ [mm^{-1}], y de scattering, ε_λ [mm^{-1}], presentes en el trabajo de Heinrich y col. [78]. La forma de la función de fase $B(\hat{\Omega} \cdot \hat{\Omega}')$ y el valor de sus coeficientes fueron también extraídos de dicho trabajo.

(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. (5) se muestra la secuencia de pasos que componen la metodología propuesta para la estimación de la productividad de FBRs. Como puede observarse, la metodología consta de dos etapas

principales, una centrada en el FBR *outdoor* de interés y en la región del planeta en la que se hipotéticamente se localizaría (Secciones (5.1) a (5.4)), y la otra focalizada en la simulación de las condiciones de iluminación *outdoor* en el laboratorio (Sección (5.5)). En lo que respecta a la radiación, ambas etapas requieren de un modelado riguroso del intercambio de energía radiante entre las fuentes de luz y los reactores.

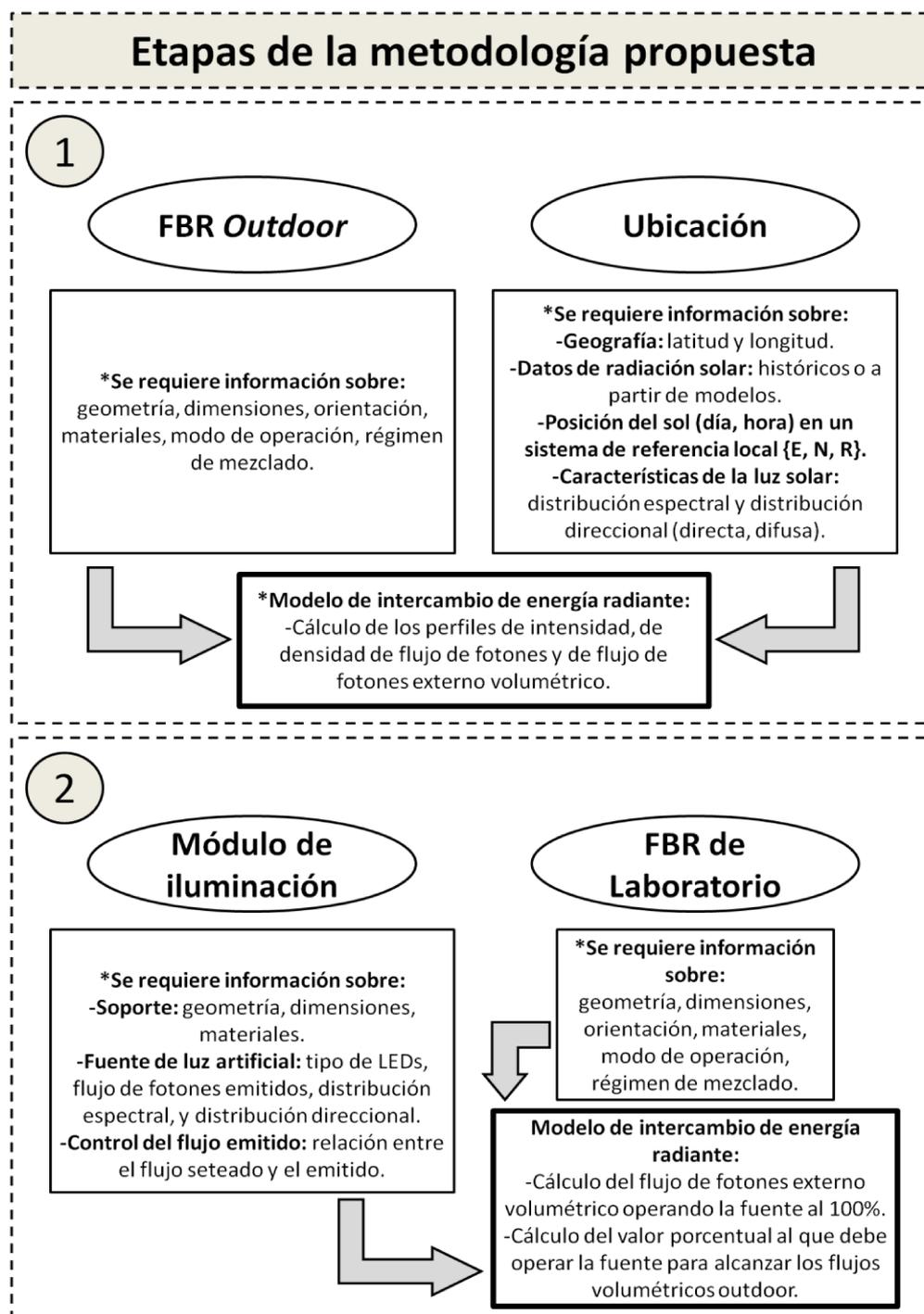


Figura (5). Etapas de la metodología propuesta para estimar la productividad de FBRs. Los recuadros con borde engrosado describen los principales resultados de cada etapa.

(5.1).- Posición del sol durante el transcurso del año

Dado que nuestro tratamiento contempla la luz solar directa, es necesario conocer la posición del sol en un sistema de referencia local, con centro en el sitio de ubicación del FBR. El sistema $\{N, E, R\}$ contempla los puntos cardinales de orientación (Este (E), Norte (N), y Radial (R)).

La posición del sol para un lugar del planeta con latitud γ y longitud L puede encontrarse con la Ec. (1).

$$\hat{s} = (\cos \alpha \sin \varphi) \hat{E} + (\cos \alpha \cos \varphi) \hat{N} + (\sin \alpha) \hat{R} \quad (1)$$

donde α es el “ángulo de elevación solar (altitud)”, y φ el “ángulo acimutal (azimut)”.

El ángulo α adopta valores comprendidos en el rango $[-0.5\pi, 0.5\pi]$, y los valores negativos se asocian con períodos de oscuridad, donde el sol aún no ha asomado en el horizonte. Por su parte, φ se define en sentido (N) \rightarrow (E) y adopta valores en el rango $[0, 2\pi]$.

Para el cálculo de φ , es necesario imponer restricciones de acuerdo al valor que adopte el “ángulo horario” ω :

$$\varphi = \cos^{-1} \left[\frac{\cos \gamma \sin \delta - \sin \gamma \cos \omega \sin \delta}{\cos \alpha} \right]; \omega < 0 \quad (2)$$

$$\varphi = 2\pi - \cos^{-1} \left[\frac{\cos \gamma \sin \delta + \sin \gamma \cos \omega \sin \delta}{\cos \alpha} \right]; \omega > 0 \quad (3)$$

En las Ecs. (2) y (3) δ es el “ángulo de declinación solar”.

El “ángulo cenital (zenit)” θ_z se encuentra a partir de α :

$$\theta_z = \frac{\pi}{2} - \alpha \quad (4)$$

Vale aclarar que para un reactor de tipo columna vertical basta con conocer θ_z , mientras que para otros reactores, con orientaciones e inclinaciones espaciales en el sistema $\{N, E, R\}$, es necesario conocer φ . El Apéndice (A5.1) contiene una descripción detallada de las hipótesis, la metodología y las convenciones utilizadas en el cálculo de \hat{s} . Con el set de expresiones presentes en el Apéndice (A5.1) se construyó un algoritmo de cálculo en Fortran 90, el cual permite obtener \hat{s} durante el año para cualquier sitio del planeta.

Las Figs. (6A), (6B), 6(C) y (6D) muestran la posición del sol en los equinoccios y solsticios del año para la ciudad de Santa Fe, Argentina. Los números seguidos a la fecha y dentro de paréntesis corresponden al día del año, de [1-365].

(5.2).- Radiación solar: conversión de unidades de energía a fotones y fracción PAR

La conversión de los valores de radiación desde unidades de energía [Joule $s^{-1} m^{-2}$] a número de fotones [$\mu\text{mol } s^{-1} m^{-2}$], resulta necesaria para: i) calcular la cantidad de radiación fotosintéticamente activa (PAR) que debe suministrarse a un reactor de laboratorio, dado que la fuente de radiación artificial elegida (LEDs de amplio espectro blanco frío) tiene una función de distribución espectral

diferente al espectro solar [143] (ver la Fig. (6A) del Capítulo (1), y la Fig. (6F)); y ii] para la simulación del CER en el interior de los reactores, incorporando las propiedades ópticas de la suspensión de microalgas. A continuación se describen los fundamentos y la metodología para la transformación de unidades de los registros de radiación solar históricos.

La energía solar que alcanza a una superficie horizontal localizada en una posición \underline{r} en un instante t , por unidad de tiempo y área, [Joule $s^{-1} m^{-2}$], puede escribirse como:

$$q_w(\underline{r}, t) = q_w^D(\underline{r}, t) + q_w^d(\underline{r}, t) \quad (5)$$

donde $q_w(\underline{r}, t)$ es la radiación solar global, $q_w^D(\underline{r}, t)$ es la radiación solar directa, y $q_w^d(\underline{r}, t)$ es la radiación solar difusa.

La densidad espectral de energía, $q_{\lambda,w}(\underline{r}, t)$, puede ser definida a través de la función de distribución espectral solar, $E_{\lambda,w}(\lambda)$, como describe la Ec. (6).

$$q_{\lambda,w}(\underline{r}, t) = q_w(\underline{r}, t) E_{\lambda,w}(\lambda) \quad (6)$$

La función $E_{\lambda,w}(\lambda)$ cumple con la condición:

$$\int_{\lambda} E_{\lambda,w}(\lambda) d\lambda = 1 \quad (7)$$

De forma análoga, la densidad espectral de flujo de fotones, $q_{\lambda,f}(\underline{r}, t)$, puede ser definida mediante una función de distribución espectral solar relacionada al número de fotones, $E_{\lambda,f}(\lambda)$. La función $E_{\lambda,f}(\lambda)$ satisface la condición expresada en la Ec. (7).

$$q_{\lambda,f}(\underline{r}, t) = q_f(\underline{r}, t) E_{\lambda,f}(\lambda) \quad (8)$$

Las densidades espectrales, en términos de energía y fotones, pueden relacionarse a través de la ecuación de Planck, la cual describe la energía que porta un fotón de longitud de onda λ .

$$q_{\lambda,w}(\underline{r}, t) = \frac{hc}{\lambda} q_{\lambda,f}(\underline{r}, t) \quad (9)$$

En la Ec. (9) h es la constante de Planck y c es la velocidad de la luz en el vacío.

Reemplazando $q_{\lambda,w}$ y $q_{\lambda,f}$ por las definiciones que involucran a $E_{\lambda}(\lambda)$, Ecs. (6) y (8), resulta:

$$q_{\lambda,w}(\underline{r}, t) E_{\lambda,w}(\lambda) = \frac{hc}{\lambda} q_{\lambda,f}(\underline{r}, t) E_{\lambda,f}(\lambda) \quad (10)$$

De la integración de la Ec. (10), en términos de λ , se obtiene la expresión matemática del factor que permite la conversión de unidades de energía a fotones, Ec. (11). Para la obtención de la Ec. (11) es necesario recordar que $q_{\lambda,w}$ y $q_{\lambda,f}$ no dependen de λ , y que las integrales de $E_{\lambda}(\lambda)$ cumplen ciertos requisitos (ver la Ec. (7)).

$$\frac{q_{\lambda,w}(\underline{r}, t)}{hc} \int_{\lambda} \lambda E_{\lambda,w}(\lambda) d\lambda = q_{\lambda,f}(\underline{r}, t) \underbrace{\int_{\lambda} E_{\lambda,f}(\lambda) d\lambda}_1 \quad (11)$$

$$q_{\lambda,f}(\underline{r},t) = \frac{q_{\lambda,w}(\underline{r},t)}{hc} \int_{\lambda} \lambda E_{\lambda,w}(\lambda) d\lambda \quad (12)$$

La distribución espectral de la energía solar que alcanza a una superficie puede variar durante el transcurso del año, del día, y con las condiciones climáticas. Aquí se consideró una distribución espectral única para todo momento del año, la cual fue obtenida a partir de tablas de referencia ASTM G173-03 derivados de SMARTS v. 2.9.2. Las referencias que hemos utilizado son consideradas la mejor opción para el cálculo de la distribución espectral solar [115, 144-146].

Para el caso particular, $E_{\lambda,w}(\lambda)$ fue calculada con la Ec. (13) en el rango de longitudes de onda λ de medida del sensor de radiación solar Pegasus, $300 \leq \lambda \leq 3000$ [nm].

$$E_{\lambda,w}(\lambda) = \frac{q_{\lambda,w}(\underline{r},t)d\lambda}{\int_{\lambda} q_{\lambda,w}(\underline{r},t)d\lambda} \quad (13)$$

La Fig. (6F) muestra las funciones $E_{VIS,f}(\lambda)$ y $E_{VIS,w}(\lambda)$.

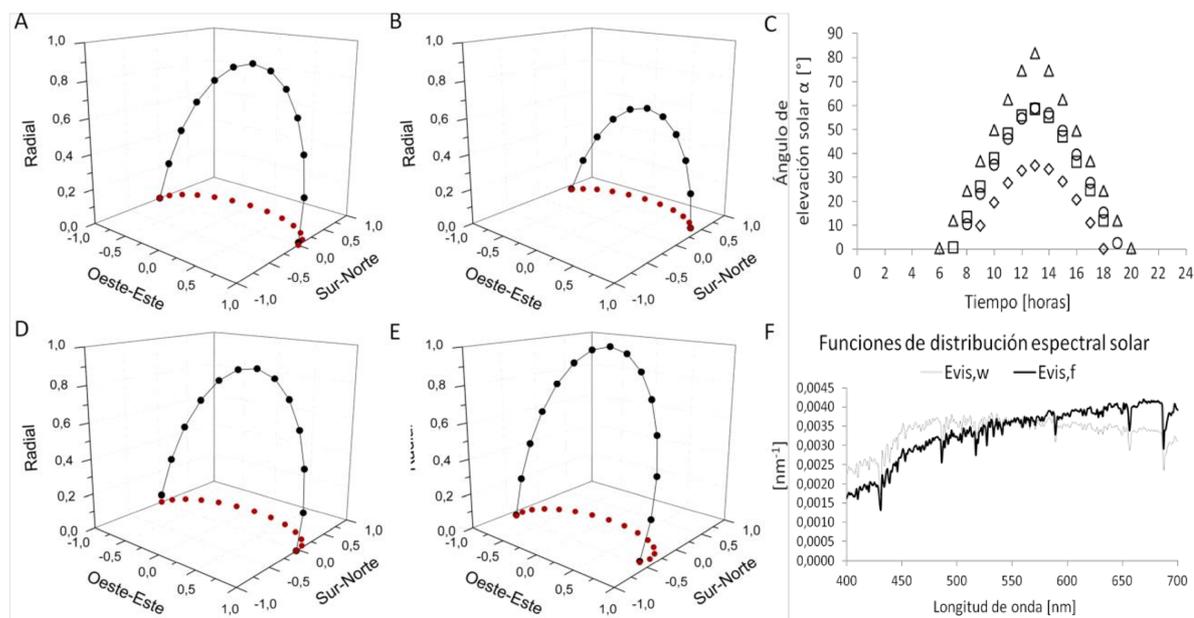


Figura (6). Posición del sol (\hat{s}) en la ciudad de Santa Fe, Argentina para: A] 21 de Marzo (80, Otoño); B] 21 de Junio (172, Invierno); D] 21 de Septiembre (264, Primavera); E] 21 de Diciembre (355, Verano). Referencias: (●) \hat{s} en el sistema de coordenadas local $\{N, E, R\}$, (●) Proyección de \hat{s} en el plano $\{N, E\}$. C] Ángulo de elevación solar (α) para los días típicos considerados. F] Funciones de distribución espectral solar $E_{VIS,w}(\lambda)$ y $E_{VIS,f}(\lambda)$.

La fracción de la radiación solar PAR suele limitarse al rango visible del espectro electromagnético (VIS), con λ en rango $400 \leq \lambda \leq 700$ [nm] [147, 148]. La fracción PAR de la radiación solar, f_{VIS} , dependerá del rango de las longitudes de onda λ de los registros utilizados. Para el caso particular:

$$f_{VIS} = \frac{\int_{VIS} q_{\lambda,w}(\underline{r},t)d\lambda}{\int_{300} q_{\lambda,w}(\underline{r},t)d\lambda} \quad (14)$$

De la Ec. (14), surge que el 41.98 % de la radiación registrada por el equipo Pegasus es PAR. El valor se encuentra dentro del rango de valores presentes en la literatura, para el rango de λ considerado [149-151].

La expresión para obtener la radiación PAR sobre una superficie horizontal a partir de registros de radiación global es:

$$q_{VIS,w}(\underline{r},t) = q_w(\underline{r},t) f_{VIS} = [q_w^D(\underline{r},t) + q_w^d(\underline{r},t)] f_{VIS} \quad (15)$$

La densidad de flujo de fotones sobre una superficie horizontal, $q_{VIS,f}$, se calcula a partir de la densidad de energía, $q_{VIS,w}$, de la siguiente forma:

$$q_{VIS,f}(\underline{r},t) = q_{VIS,w}(\underline{r},t) \left[\frac{\int_{VIS} \lambda E_{\lambda,w}(\lambda) d\lambda}{hc} \right] = q_{VIS,w}(\underline{r},t) 4.616 \left[\frac{\mu mol}{Joule} \right] \quad (16)$$

En la literatura se recomienda aplicar un factor de 4.6 para la conversión de valores de radiación en términos de energía a número de fotones [152].

(5.3).- Perfiles de intensidad de luz solar directa y difusa

Las intensidades de radiación solar directa y difusa son las propiedades de la fuente de radiación natural que nos interesan, dado que permiten calcular, incorporando la composición direccional de la luz solar, la cantidad de luz que llega a un determinado FBR. Las expresiones para dichas intensidades se calculan a partir de los registros históricos de radiación solar sobre una superficie horizontal.

La densidad de flujo de fotones espectral, $q_{\lambda,f}$, puede expresarse en términos de la intensidad de fotones espectral, I_{λ} , como:

$$q_{\lambda,f}(\underline{r},t) = \int_{\hat{\Omega}} \int_{\lambda} I_{\lambda}^D(\underline{r},\hat{\Omega},t) (\hat{n} \cdot \hat{\Omega}) d\lambda d\hat{\Omega} + \int_{\hat{\Omega}} \int_{\lambda} I_{\lambda}^d(\underline{r},\hat{\Omega},t) (\hat{n} \cdot \hat{\Omega}) d\lambda d\hat{\Omega} \quad (17)$$

En la Ec. (17), \hat{n} es un vector normal unitario a la superficie, $\hat{\Omega}$ es un vector dirección unitario, $d\hat{\Omega}$ es el elemento de ángulo sólido alrededor de la dirección $\hat{\Omega}$, $(\hat{n} \cdot \hat{\Omega})$ es el producto escalar de los vectores \hat{n} y $\hat{\Omega}$, que representa el coseno del ángulo formado entre ellos, I_{λ}^D y I_{λ}^d son las intensidades de fotones espectrales directa y difusa.

La intensidad correspondiente a la región VIS se obtiene de la siguiente forma:

$$I_{VIS}(\underline{r},\hat{\Omega},t) = \int_{VIS} I_{\lambda}(\underline{r},\hat{\Omega},t) d\lambda \quad (18)$$

La densidad de flujo de fotones en la región VIS, $q_{VIS,f}(\underline{r},t)$, resulta ser:

$$q_{VIS,f}(\underline{r},t) = \int_{\hat{\Omega}} I_{VIS}^D(\underline{r},\hat{\Omega},t) (\hat{n} \cdot \hat{\Omega}) d\hat{\Omega} + \int_{\hat{\Omega}} I_{VIS}^d(\underline{r},\hat{\Omega},t) (\hat{n} \cdot \hat{\Omega}) d\hat{\Omega} \quad (19)$$

Considerando que $I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = 0$ cuando $\hat{\underline{\Omega}} \neq \hat{\underline{\Omega}}_{SOL}$, y que $I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \neq 0$ para $\hat{\underline{\Omega}} = \hat{\underline{\Omega}}_{SOL}$, la expresión para la densidad de flujo de fotones producto de luz solar directa, $q_{VIS,f}^D(\underline{r}, t)$, resulta ser:

$$q_{VIS,f}^D(\underline{r}, t) = \int_{\hat{\underline{\Omega}}} \delta(\hat{\underline{\Omega}}) I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) d\hat{\underline{\Omega}} = I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) H(\hat{\underline{\Omega}}) \quad (20)$$

donde $\delta(\hat{\underline{\Omega}})$ es la “función” Delta de Dirac y $H(\hat{\underline{\Omega}})$ es la función escalón unitario o función de Heaviside.

Análogamente, a partir de las Ecs. (17) y (18) es posible calcular la densidad de flujo de fotones producto de la luz solar difusa, $q_{VIS}^d(\underline{r}, t)$ (ver Ec. (21)). Debido a que no contamos con datos de radiación solar directa y difusa, cuantificadas en forma independiente, asumimos que la energía radiante difusa tiene una distribución isotrópica. Esto conlleva a que $I_{\lambda}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ sea independiente de $\hat{\underline{\Omega}}$.

$$q_{VIS,f}^d(\underline{r}, t) = I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \int_{\hat{\underline{\Omega}}} (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) d\hat{\underline{\Omega}} \quad (21)$$

Para el caso de una superficie horizontal la expresión para $q_{VIS,f}$ resulta ser:

$$q_{VIS,f}(\underline{r}, t) = I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) + I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \int_{\hat{\underline{\Omega}}} (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) d\hat{\underline{\Omega}} \quad (22)$$

$$q_{VIS,f}(\underline{r}, t) = I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) + I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \int_{\hat{\underline{\Omega}}} \cos \theta_z d\hat{\underline{\Omega}} \quad (23)$$

Incorporando a las Ecs. (22) y (23) la expresión para $d\hat{\underline{\Omega}}$, Ec. (24),

$$d\hat{\underline{\Omega}} = \text{sen } \theta_z d\theta_z d\phi = -d(\cos \theta_z) d\phi = -du d\phi \quad (24)$$

resulta:

$$q_{VIS,f}(\underline{r}, t) = I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) - I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \int \int_u du d\phi \quad (25)$$

$$q_{VIS,f}(\underline{r}, t) = I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) + \pi I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \quad (26)$$

En el caso de *open y raceway ponds, thin layer cascades*, etc., reactores comúnmente con disposición horizontal, la composición de la radiación solar en términos de luz directa y difusa, afecta el grado de reflexión y refracción de la luz, dado que éstos fenómenos ópticos dependen de la dirección de los haces. Esto impacta sobre la cantidad de energía radiante que efectivamente ingresa al FBR. Para reactores con otras geometrías, como tubulares, columnas de burbujeo/*airlift*, etc., la composición de la radiación solar también modifica los fenómenos ópticos en las fronteras, pero tiene un impacto más significativo sobre la cantidad total de radiación que podría coleccionar el FBR (ver el Apéndice (A5.2)).

Abordemos el caso del reactor columna de burbujeo con disposición vertical descrito previamente en la Sección (4.2). Desde que el sol se asoma sobre el horizonte, en el (E), hasta que se esconde en el (O) (conducta del sol en el hemisferio sur), en todo momento del día el FBR expone la mitad de su geometría al sol. La superficie del reactor orientada al sol, desde ahora “cara expuesta”, recibe tanto

haces de luz directos como difusos. Por su parte, la “cara no expuesta”, también se encuentra iluminada, con la diferencia que los haces de luz que impactan son de naturaleza difusa. Consideremos los dos escenarios extremos respecto a la composición de la radiación solar: i] radiación 100% directa: bajo este régimen, la cara expuesta del FBR recibe todo el flujo radiante, mientras que la cara no expuesta se encuentra totalmente a oscuras. En la cara expuesta, producto de la curvatura del vaso del reactor, el centro del vaso resulta ser la región más iluminada y la cantidad de luz se reduce hacia los lados, resultando en una distribución de densidades de flujo de fotones; ii] radiación 100% difusa isotrópica: toda la superficie del FBR se encuentra igualmente iluminada, por lo que existe un único valor para la densidad de flujo de fotones (iluminación homogénea sobre la superficie).

Dado que la composición influye sobre la cantidad total de energía radiante en las paredes del reactor, es necesario contemplar y definir la naturaleza de la luz solar. Para ello, podemos definir $q_{VIS,f}^D$ y $q_{VIS,f}^d$ a través de un parámetro k , que refiere a la fracción de luz solar directa, y que adopta valores en el intervalo $0 \leq k \leq 1$. Por su parte, el término $(1 - k)$ hace referencia a la fracción de luz solar difusa.

$$q_{VIS,f}^D(\underline{r}, t) = k q_{VIS,f}(\underline{r}, t) = I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{Q}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{Q}}) \quad (27)$$

$$q_{VIS,f}^d(\underline{r}, t) = (1 - k) q_{VIS,f}(\underline{r}, t) = \pi I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{Q}}, t) \quad (28)$$

Las expresiones para I_{VIS}^D y I_{VIS}^d , deducidas a partir de expresiones para la cantidad de radiación solar directa y difusa sobre una superficie horizontal, resultan ser:

$$I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{Q}}, t) = \frac{k}{(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{Q}})} q_{VIS,f}(\underline{r}, t) \quad (29)$$

$$I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{Q}}, t) = \frac{(1 - k)}{\pi} q_{VIS,f}(\underline{r}, t) \quad (30)$$

Para el caso de la ciudad de Santa Fe los valores de k varían mensualmente [141]. Se adoptó un valor de k de 0.75 para ángulos de elevación solar α mayores o iguales a 0.10π (5.73°), y de 0 para el resto, lo que implica radiación 100% difusa en las primeras y últimas horas de sol del día. La Fig. (7) muestra los valores promedio horarios de I_{VIS}^D y I_{VIS}^d para los 4 días representativos de un año típico.

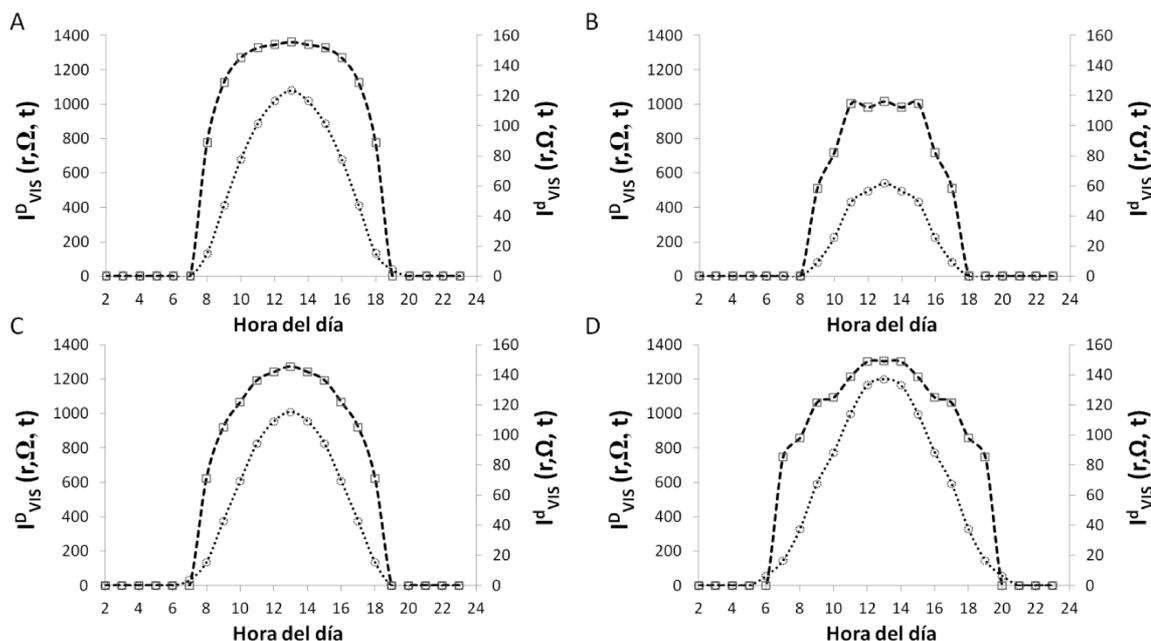


Figura (7). Intensidad horaria promedio directa, I_{VIS}^D (-□-), y difusa, I_{VIS}^d (•◊•), expresadas en $[\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{sr}^{-1}]$. A] 21 de Marzo (80), Otoño. B] 21 de Junio (172), Invierno. C] 21 de Septiembre (264), Primavera. D] 21 de Diciembre (355), Verano.

Como se observar de la Fig. (7), los valores mayores de intensidad, para una superficie horizontal localizada en Santa Fe, ocurren durante todo el año a las 13:00 hs. En este momento el sol alcanza la posición más elevada en el cielo (ver la Fig. (6)). Por otra parte, en días de verano, el sol se encuentra más elevado en el cielo que en días de invierno, hecho que podría afectar notoriamente las distribuciones de radiación sobre superficies no horizontales. Las curvas de intensidad muestran pequeñas perturbaciones producto de que han sido obtenidas utilizando datos de radiación solar históricos, y un modelo para el cálculo de la posición del sol respecto a un sitio de la tierra de interés.

(5.4).- Radiación solar que llega al FBR

En esta Sección se describe el cálculo de la cantidad de radiación solar que llega al FBR *outdoor* por unidad de tiempo y unidad de volumen de medio de cultivo, $Q_V(t)$, utilizando los valores previamente calculados para I_{VIS}^D y I_{VIS}^d .

La densidad de flujo de fotones sobre la pared del FBR *outdoor*, en la posición \underline{r} , resulta ser:

$$q_{FBR}(\underline{r}, t) = \int_{\hat{\Omega}} \delta(\hat{\Omega}) I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\Omega}, t) (\hat{n}_{FBR} \cdot \hat{\Omega}) d\hat{\Omega} + I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\Omega}, t) \int_{\hat{\Omega}} (\hat{n}_{FBR} \cdot \hat{\Omega}) d\hat{\Omega} \quad (31)$$

Dada la geometría del FBR, es conveniente expresar \underline{r} en coordenadas cilíndricas, a través de una altura h en el rango $[0, h_{FBR}]$, y de un ángulo ϕ en el intervalo $[0, 2\pi]$. Cualquier punto sobre la pared del FBR estará a una distancia al centro de coordenadas igual al radio del reactor, r_{FBR} .

El flujo de fotones, $Q(t)$, definido como la cantidad de fotones por unidad de tiempo que alcanzan al reactor en un instante t , se obtiene con la Ec. (32).

$$Q(t) = \int_A q_{FBR}(r, t) dA = r_{FBR} \int_h \int_{\phi} q_{FBR}(\phi, h, t) d\phi dh \quad (32)$$

El flujo de fotones volumétrico, $Q_v(t)$, que debe ser igual para un reactor *outdoor* y uno de laboratorio, se obtiene con la Ec. (33).

$$Q_v(t) = \frac{Q(t)}{V_{FBR}} = \frac{r_{FBR}}{V_{FBR}} \int_h \int_{\phi} q_{FBR}(\phi, h, t) d\phi dh \quad (33)$$

Debido a la forma en la que el dispositivo Pegasus registra la radiación solar, asumimos que la cantidad de radiación difusa que impacta sobre la pared del reactor corresponde a la mitad de la radiación difusa que alcanza a una superficie horizontal. En esta situación los fotones tienen direcciones contenidas en $[0 \leq \theta \leq \pi/2]$ y $[0 \leq \phi \leq \pi]$. La Fig. (8) muestra los perfiles horarios de $Q_v(t)$ para los 4 días considerados.

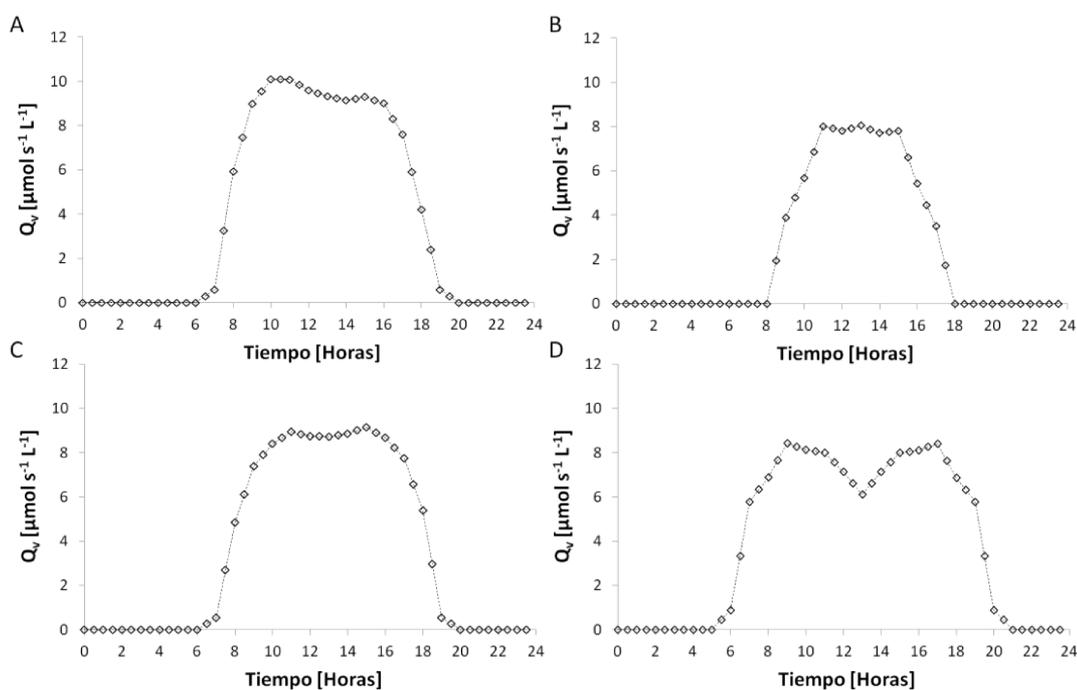


Figura (8). Flujo de fotones volumétrico horario, $Q_v(t)$ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$] para un reactor columna de burbujeo vertical. A) 21 de Marzo (80), Otoño. B) 21 de Junio (172), Invierno. C) 21 de Septiembre (264), Primavera. D) 21 de Diciembre (355), Verano.

El $Q_v(t)$ para un reactor columna vertical difiere, en términos de composición direccional, al de una superficie horizontal, como muestra la Tabla (1).

Tabla (1). Composición porcentual del flujo de fotones volumétrico, $Q_v(t)$ (% de luz solar directa) para un reactor columna vertical de 30 L.

Hora	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
6	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.89	0.90
8	0.91	0.00	0.80	0.81
9	0.82	0.92	0.71	0.72
10	0.73	0.84	0.63	0.62
11	0.65	0.79	0.56	0.50
12	0.58	0.75	0.54	0.35
13	0.54	0.73	0.57	0.21
14	0.55	0.74	0.64	0.35
15	0.62	0.78	0.72	0.50
16	0.70	0.84	0.81	0.62
17	0.78	0.91	0.90	0.72
18	0.88	0.00	0.00	0.81
19	0.00	0.00	0.00	0.90
20	0.00	0.00	0.00	0.00

(5.5).- Simulación de las condiciones de iluminación *outdoor* a escala laboratorio

(5.5.1).- Aspectos constructivos del módulo de iluminación

La fuente de energía radiante se compone de LEDs 50x60 blanco frío (ver la Sección (4.4)), cuyo espectro de emisión se muestra en la Fig. (6) del Capítulo (1). El diseño que puede adoptar un módulo de iluminación está limitado por la geometría del vaso del reactor Infors HT, y por la torre de control que lo sostiene. La configuración elegida consiste en una estructura compuesta por doce caras, y que desde una vista superior se aprecia un polígono regular de doce lados (dodecágono), Fig. (10A). El módulo resulta de la unión de 3 pantallas (P1-P2-P3), cada una formada por 4 caras (C1-C2-C3-C4), construidas con placas de aluminio Temple H14 de 0.8 mm de espesor (ver la Fig. (9A)). Cada pantalla tiene una longitud de 5 cm de lado, 30 cm de altura y presenta dos pestañas de 2 cm a lo largo de toda su extensión, cuya función es brindar rigidez al módulo. Las dimensiones y la disposición del módulo respecto al reactor Infors HT se especifican en la Figs. (9B) y (10A). Las uniones se originan entre las caras (C4[P1]-C1[P2], C4[P2]-C1[P3], C4[P3]-C1[P1]).

Los LEDs fueron pegados sobre placas plásticas, y éstas adheridas a las caras de las pantallas (C1-C2[P1], C1-C3-C4[P2], C3[P3]). Cada placa está compuesta por 4 tiras de 12 LEDs dispuestas verticalmente, y unidas lateralmente unas a otras sin espacios. Como se mencionó, no todas las caras del soporte poseen placas de LEDs adheridas. Si las caras C3[P1], C2[P2], y C1-C4[P3] emitieran radiación la luz sería bloqueada o desviada por los barrotes metálicos de la torre del reactor (ver Fig. (10A)). Esto conduciría no sólo a un uso ineficiente de la energía radiante, sino a un aspecto aún más importante para nuestro estudio, que es la dificultad en el modelado de los fenómenos ópticos. Esto último podría dar lugar a cálculos imprecisos de la cantidad de luz que alcanza las paredes del reactor. La Fig. (9B) muestra un esquema de la arquitectura de una pantalla, de una placa de LEDs y del reactor Infors HT.

Resumiendo, en el módulo construido sólo 8 de las 12 caras emiten radiación: 6 caras con 48 LEDs, lo que corresponde a un total de 288 LEDs (aprox. 3.0 m de la presentación comercial en tiras).

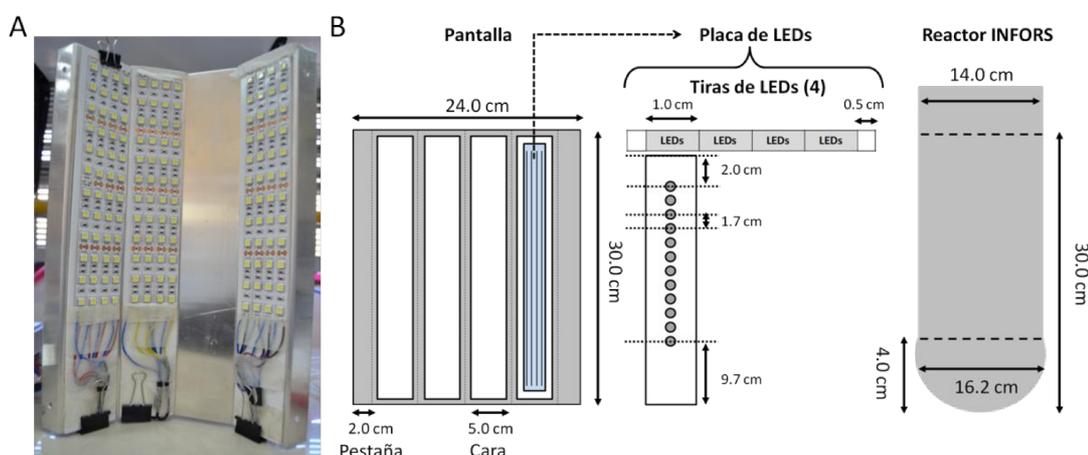


Figura (9). A) Fotografía de una pantalla del módulo de iluminación LED. B). Esquemización de una pantalla y medidas representativas.

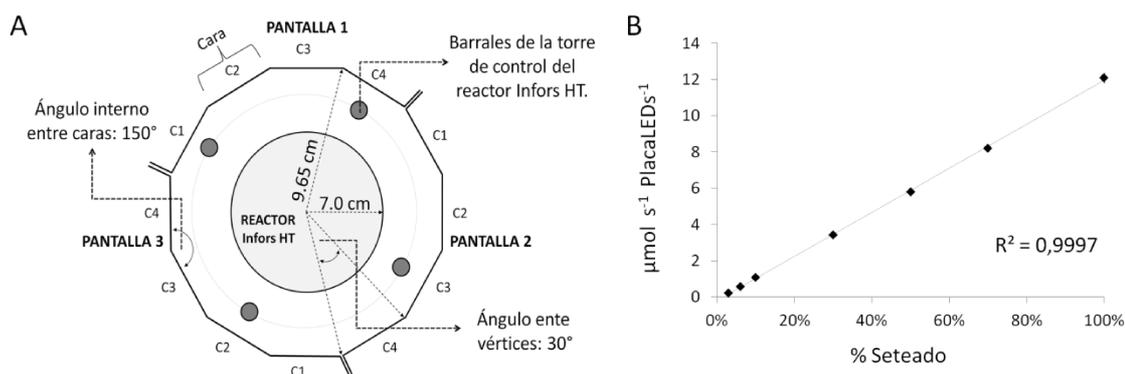


Figura (10). A). Esquemización del módulo de iluminación LED. Vista superior del reactor Infors HT y el soporte. B) Flujo de fotones emitidos por una placa de LEDs 50x60 blanco frío (48 LEDs) bajo diversos flujos establecidos en la rutina de control.

(5.5.2).- Aspectos del control de la luz emitida por el módulo LED

El sistema de iluminación tiene como finalidad reproducir cualquier perfil de $Q_v(t)$ de interés. Para lograrlo, el requisito indispensable es que permita el control del flujo radiante emitido por la fuente, en nuestro caso LEDs. El núcleo del controlador del módulo consiste en un computador de placa reducida modelo Raspberry Pi 2 (rPi), diseñado para controlar el flujo de radiación de 12 canales de modo independiente, y a la vez, que cada canal pueda seguir un perfil cronogramado. Los LEDs son alimentados con una fuente de tensión de 12.0 V DC /29A, y en la configuración actual cada placa de LEDs localizada sobre una cara es un canal independiente. El control de la iluminación se implementó a través de la metodología de “Modulación de Ancho de Pulso (PWM)” adoptando una señal cuadrada entre 0 y 100% [153-155]. El software fue implementado en lenguaje compilado C++ debido a que

minimiza el uso de recursos. La implementación electrónica y del programa del módulo de luz LED fue efectuada por el Dr. Esteban Osella, Investigador del CONICET.

La luz emitida por una placa de LED, operando bajo diversos porcentajes de emisión, fue cuantificada con el fin de evidenciar la respuesta del control implementado (ver la Fig. (10B)). El flujo de fotones emitidos por una placa de LEDs 50x60 del módulo, para cada valor porcentual de emisión seteado, fue calculado como se detalla en el Capítulo (1).

La Fig. (10B) muestra que existe una correlación lineal entre el flujo establecido en la rutina de control y el flujo emitido por la placa de LEDs. La Ec. (34) permite calcular el valor en el que debe operar el módulo para alcanzar un valor deseado de Q_v

$$\%Q_{V,Max} = \frac{Q_v}{Q_{V,Max}} 100 \quad (34)$$

donde $Q_{V,Max}$ es el flujo de fotones volumétrico para el reactor Infors HT cuando los LEDs operan al 100% (ver la Sección (5.5.3)).

El control de la iluminación por parte del usuario se efectúa a través del administrador de procesos secundarios del sistema operativo Windows, “cron”. Para ello se ingresan en un archivo de texto, “crontab”, los valores de $\%Q_{V,Max}$ para cada tiempo, en una escala de minutos, horas y días.

(5.5.3).- Intercambio de radiación: módulo LED-Infors HT

Un perfil de $Q_v(t)$ de interés puede reproducirse en el reactor Infors HT operando el módulo LED en diferentes configuraciones, ej. variando el número de placas prendidas o modificando el flujo de cada placa, lo que conduce a diferentes distribuciones de radiación sobre la pared del reactor. Abordaremos el caso donde todas las placas del módulo se encuentran prendidas, y emiten el mismo flujo de fotones. Esta forma de operar conlleva a que la luz se distribuya sobre la pared del Infors HT de la forma más homogéneamente posible.

Si el módulo de radiación idealmente entregara al reactor el total de los fotones emitidos por los 288 LEDs, operando al 100%, se alcanzaría un valor de $Q_{V,Max}$ de 22.10 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]. Dado que el módulo y el vaso del reactor no están en íntimo contacto, sólo una fracción de los fotones alcanza las paredes. Dicha fracción es independiente del flujo de fotones que emite la placa, y depende de la forma en la que emiten los LEDs, es decir su distribución direccional (ver el Capítulo (1)), la orientación entre la fuente y el reactor, y la distancia que los separa. Para conocer la cantidad de fotones que alcanzan el vaso del reactor Infors HT se utiliza el modelo de intercambio de energía radiante descrito y detallado en el Capítulo (1), el cual fue implementado en un algoritmo desarrollado *ad hoc* en lenguaje Fortran 90. El Apéndice (A5.3) contiene las bases y fundamentos del cálculo de la cantidad de fotones que pegan por unidad de tiempo en el reactor Infors HT, respecto al total de emitidos por los LEDs.

De la simulación de los intercambios de radiación resulta que el 58% de los fotones emitidos por el módulo alcanzan las paredes, lo que se traduce en un valor de $Q_{V,Max}$ de 12.82 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]. Este valor satisface la demanda de energía radiante necesaria para alcanzar los valores máximos de Q_v en los días del año y el reactor *outdoor* elegidos (ver la Fig. (8)).

(5.6).- CER: Reactor *outdoor* vs reactor laboratorio

Como ya hemos descrito, el suministro de luz se efectúa con una configuración del módulo LED que rinde la distribución de luz más homogénea sobre la pared del reactor Infors HT. Las distribuciones de radiación dentro de los FBRs *outdoor* e *indoor* podrían ser diferentes debido a: i] las fuentes de luz presentan diferencias en la distribución direccional y espectral, ii] pese a la geometría similar, sus diámetros y longitudes de vaso difieren, iii] las fuentes de luz y los reactores están orientados de formas diferentes.

De las experiencias del Capítulo (4), en un reactor tanque agitado con mezcla ideal, hemos visto que la distribución de energía radiante en el interior del medio de cultivo puede determinar la productividad del reactor, y que resultó ser mayor cuando las distribuciones eran más homogéneas. Concluimos que el efecto de las distribuciones sobre la productividad puede ser positivo o negativo, lo que dependerá de la cantidad de energía radiante absorbida, y de la eficiencia con la que se utilice, ambas función del grado de pigmentación de la suspensión. Los efectos sobre las microalgas, originados por diferencias en la distribución de luz, pueden ser reducidos a través de condiciones operativas. En tanques agitados con mezcla perfecta, las algas pueden acceder a todo el volumen del dispositivo, y por una modificación en la agitación del cultivo se logra alterar la frecuencia de acceso a la luz, y así el tiempo que dura cada etapa del ciclo de luz-oscuridad, "*light flashing effect*".

En principio podemos pensar que, si la cantidad de radiación absorbida por las microalgas es muy diferente, las productividades también podrían serlo. Para observar los efectos sobre la absorción de la energía radiante, producto de la forma en la que se suministra luz en el reactor *indoor*, y la que recibe el *outdoor* del sol, se evaluaron ambos en dos concentraciones de biomasa de la microalga *S. quadricauda* (0.5 y 2.0 gr L^{-1} con un contenido de clorofilas del 3.0 %), en diferentes horas (9:00 y 13:00 hs) y días del año (21 de Junio (invierno) y 21 de Diciembre (verano)). Los días y las horas se eligieron debido a sus marcadas diferencias en la composición de $Q_v(t)$ en el reactor *outdoor*, en lo que respecta a la cantidad de luz directa y difusa (ver la Tabla (1)).

Las Figs. (11) y (12) muestran los perfiles de r_{PAR} [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$], como función del radio del reactor, R [cm]. Para el Infors HT, el corte transversal corresponde a una altura igual a la mitad de la altura del vaso, donde la densidad de flujo de fotones en la pared adquiere sus mayores valores (ver la Fig. (A5.3.2) del Apéndice (A5.3)). Para el reactor *outdoor*, todos los cortes transversales efectuados a una distancia levemente desplazada de los extremos (base y tapa) resultan ser idénticos.

21 de Junio (Invierno)

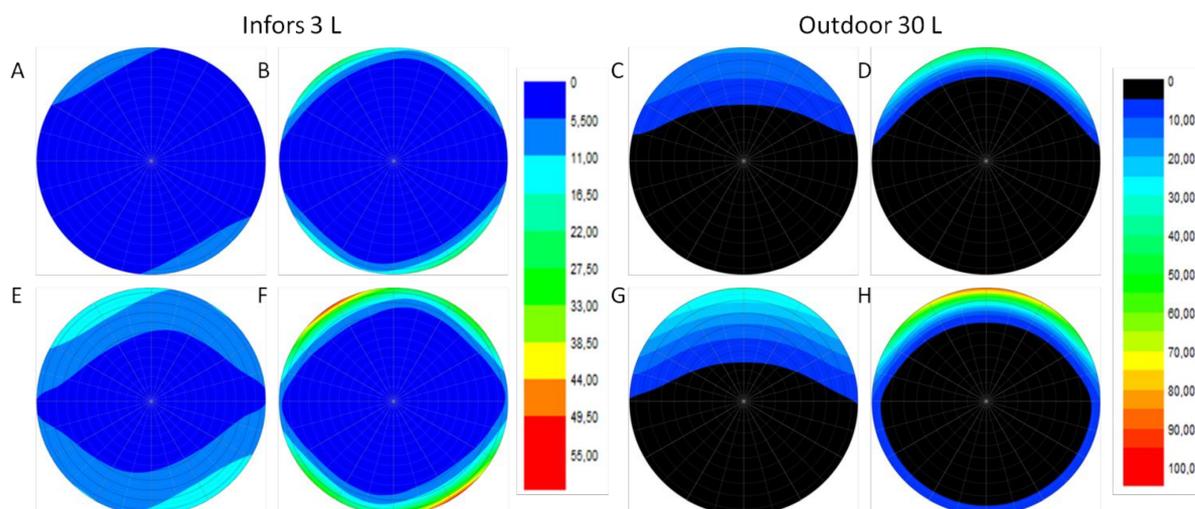


Figura (11). Perfiles de $r_{PAR}(r, x)$ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$] para el día 21 de Junio (Invierno), como función del radio R. Izquierda] Infors HT ($R=5.7$ cm). Derecha] *Outdoor* ($R=9.0$ cm). A-C] 9:00 hs 0.5 gr/L. B-D] 9:00 hs 2.0 gr/L. A-C] 13:00 hs 0.5 gr/L. B-D] 13:00 hs 2.0 gr/L.

21 de Diciembre (Verano)

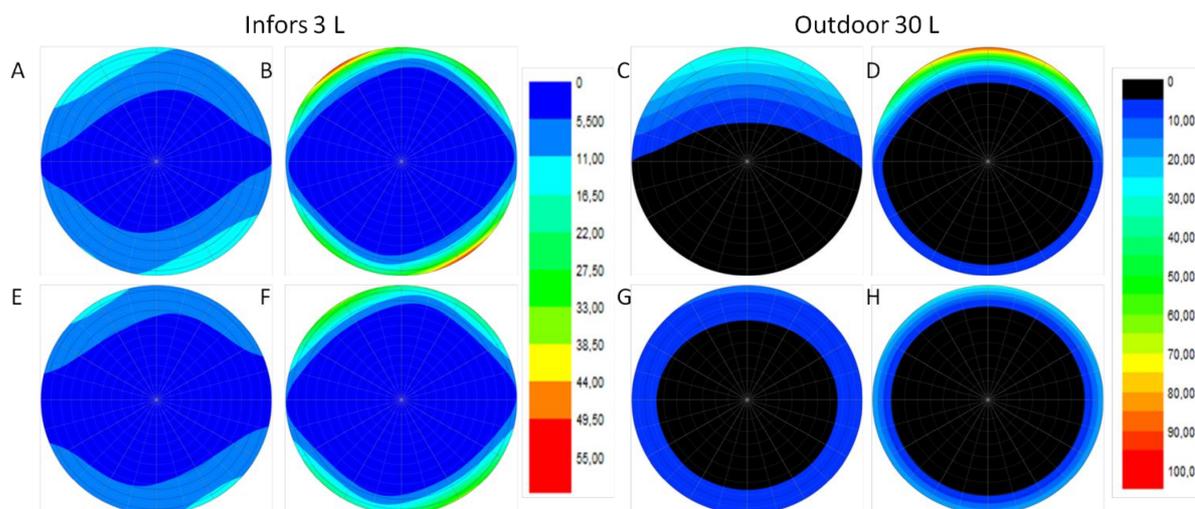


Figura (12). Perfiles de $r_{PAR}(r, x)$ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$] para el día 21 de Diciembre (Verano), como función del radio R. Izquierda] Infors HT ($R=5.7$ cm). Derecha] *Outdoor* ($R=9.0$ cm). A-C] 9:00 hs 0.5 gr/L. B-D] 9:00 hs 2.0 gr/L. A-C] 13:00 hs 0.5 gr/L. B-D] 13:00 hs 2.0 gr/L.

La Fig. (13) muestra la distribución de valores de r_{PAR} en forma de gráfico de caja, y la Tabla (2) resume los valores de la velocidad volumétrica promedio de absorción de fotones PAR, $\langle \Gamma_{PAR} \rangle$, para todas las condiciones simuladas.

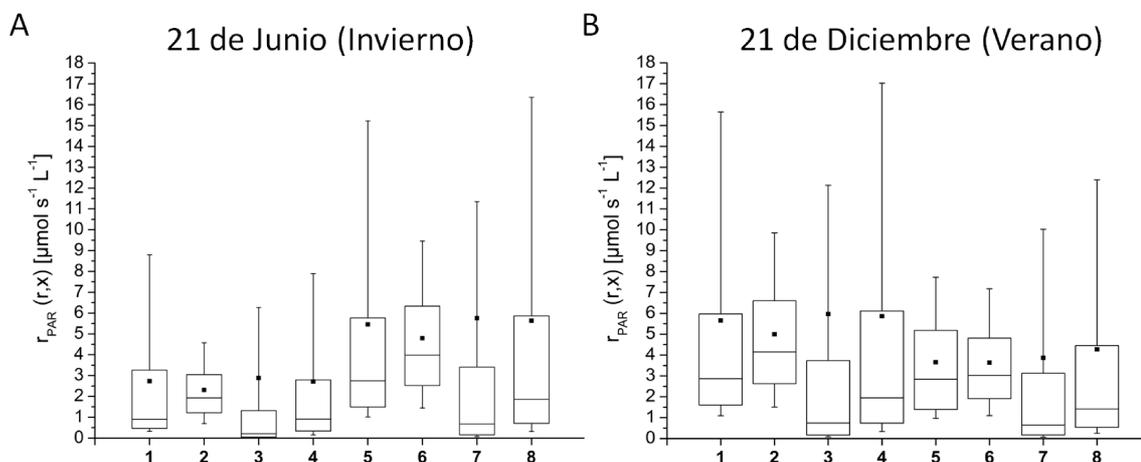


Figura (13). Distribución de valores de r_{PAR} correspondientes al 80.0 % del volumen de cada FBR (1^{er} cuartil, mediana y 3^{er} cuartil). (•) Velocidad volumétrica promedio de absorción de fotones PAR, $\langle \Gamma_{PAR} \rangle$ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]. Referencias: los valores se muestran de a pares, *outdoor* vs Infors HT. 1-2] 9:00 hs, 0.5 gr L⁻¹. 3-4] 13:00 hs, 0.5 gr L⁻¹. 5-6] 9:00 hs, 2.0 gr L⁻¹. 7-8] 13:00 hs, 2.0 gr L⁻¹.

Día	x [gr L ⁻¹]	Hora	$\langle \Gamma_{PAR} \rangle$ [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]	
			<i>Outdoor</i>	Infors HT
21 de Junio (Invierno)	0.5	9:00	2.83	2.28
		13:00	5.62	4.75
	2.0	9:00	3.00	2.68
		13:00	5.94	5.57
21 de Diciembre (Verano)	0.5	9:00	5.82	4.95
		13:00	3.67	3.59
	2.0	9:00	6.15	5.81
		13:00	3.88	4.22

De la Fig. (13) se observa que las distribuciones de r_{PAR} son diferentes, una conclusión anticipada por la composición de la luz solar en Santa Fe. En el reactor *outdoor* existen valores de r_{PAR} de aprox. el doble que en el *indoor*, sin embargo, el volumen del reactor que opera en las mayores r_{PAR} es muy reducido (ver las Figs. (11) y (12)). Las mayores diferencias en $\langle \Gamma_{PAR} \rangle$ ocurren para casos en donde el flujo directo es una fracción muy predominante del flujo que recibe el reactor *outdoor* (ver las Tablas (1) y (2)). Cuando ocurre lo opuesto, las diferencias se reducen, y se debe principalmente a que la iluminación en el Infors HT se asemeja a luz solar difusa isotrópica.

Pese a las diferencias en las distribuciones de r_{PAR} , y a la composición de la radiación espectral de las fuentes de energía radiante solar y artificial, las $\langle \Gamma_{PAR} \rangle$ son muy similares. Es por este motivo que las

velocidades de absorción específicas, relacionadas a la concentración de biomasa, $\langle r_{\text{PAR}}^{\text{SP}} \rangle$, también serán muy similares.

(6).- CONCLUSIONES

En este Capítulo de Tesis Doctoral hemos sentado las bases y fundamentos de las etapas necesarias para estimar la productividad de FBRs, a través de ensayos a escala de laboratorio. El estudio incluye desde la descripción de la luz solar que llega a un FBR real o hipotético, hasta el cálculo de la cantidad de luz PAR que debe suministrarse a un reactor de laboratorio, tal que la cantidad de fotones suministrados por unidad de tiempo y de medio de cultivo sea igual en ambos. Se utilizó como caso de aplicación, para este primer enfoque, un reactor *outdoor* columna vertical construido por integrantes del GiiB y localizado en la ex planta piloto del PTLC (Santa Fe, Argentina). Para los ensayos a escala laboratorio se utilizó un reactor comercial automatizado Infors HT, tal de alcanzar un control preciso de las variables involucradas en el cultivo de microalgas.

Las expresiones para la intensidad directa, como función de la posición del sol, y la difusa, suponiendo una distribución isotrópica, fueron encontradas a partir de radiación histórica que llega a una superficie horizontal. Se dedujeron las expresiones y se obtuvieron los valores de flujo volumétrico horario Q_v para diversos días típicos del año. Los perfiles resultaron ser muy diferentes en términos de los valores de Q_v y composición direccional.

Por otro lado, se describieron los aspectos geométricos, constructivos, de emisión y de control de un módulo de iluminación basado en 288 LEDs de amplio espectro (blanco frío). Se observó una relación lineal entre el flujo establecido en la rutina de control y el flujo emitido por la fuente. De los resultados de simulación del intercambio de energía entre los LEDs y el reactor, operando los LEDs al 100%, se observó que el 58% de los fotones impacta en las fronteras del Infors HT, lo que equivale a un flujo volumétrico de $12.82 \text{ } [\mu\text{mol s}^{-1} \text{ L}^{-1}]$.

Los principales aspectos de la iluminación que podrían conducir a que la productividad obtenida, aplicando la presente propuesta, difiera de la real del reactor considerado, fueron analizados. Se simuló el CER radiante en los FBRs para diferentes escenarios (horas, días y biomasa). La potencialidad de la propuesta resulta del análisis de las velocidades volumétricas promedio de absorción de fotones PAR, las cuales son similares entre el reactor *outdoor* y el de laboratorio, pese a las diferencias entre las distribuciones direccionales y espectrales de las fuentes de radiación, y a la forma de suministrar la energía. Si bien la metodología aún no ha sido validada experimentalmente a través de la comparación de cultivos efectuados en reactores *outdoor* y de laboratorio, este primer enfoque presenta un análisis riguroso de las etapas y los aspectos que deben ser tenidos en cuenta para lograr predicciones acerca de la performance de FBRs.

APÉNDICE (A5.1): Posición del sol durante el año para un sitio de la tierra de interés

En su movimiento de translación alrededor del sol, la tierra se mueve siguiendo una trayectoria elíptica inclinada de baja excentricidad ($\xi \cong 0.016$) [156, 157], de modo que se puede asumir un movimiento circular (ver la Fig. (A5.1.1)).

En el sistema de referencia ecuatorial $\{e_1, e_2, e_3\}$, que considera un observador ubicado en el centro de la tierra, el plano $e_1 e_2$ corresponde al plano ecuatorial de la tierra. En el sistema de referencia de la eclíptica, $\{e'_1, e'_2, e'_3\}$, que describe la posición del sol respecto a la tierra durante un año de 365 días, la tierra rota alrededor de e_3 en sentido anti horario. El ángulo ε , que vincula ambos sistemas de coordenadas, adopta el valor de 0.409π (23.45°). La posición del sol se expresa a través de un vector unitario que une el centro de la tierra y el sol, \hat{s} . La Fig. (A5.1.1) ilustra los sistemas de referencia utilizados para la descripción de \hat{s} .

En el sistema $\{e'_1, e'_2, e'_3\}$, \hat{s} se expresa a través del ángulo ϕ , definido a partir de e'_1 , como:

$$\hat{s} = (\cos \phi) \hat{e}'_1 + (\sin \phi) \hat{e}'_2 \quad (\text{A5.1.1})$$

El ángulo ϕ adopta el valor de 0 en el equinoccio de primavera, y varía paulatinamente hasta alcanzar el valor de 2π un año después. Los sistemas $\{e_1, e_2, e_3\}$ y $\{e'_1, e'_2, e'_3\}$ pueden relacionarse a través de una matriz de rotación ortogonal $\mathbb{R}(\varepsilon)$ en términos de ε , Ec. (A5.1.2).

$$\mathbb{R}(\varepsilon) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \varepsilon & \sin \varepsilon \\ 0 & -\sin \varepsilon & \cos \varepsilon \end{bmatrix}; \begin{bmatrix} \hat{e}'_1 \\ \hat{e}'_2 \\ \hat{e}'_3 \end{bmatrix} = \mathbb{R}(\varepsilon) \begin{bmatrix} \hat{e}_1 \\ \hat{e}_2 \\ \hat{e}_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \varepsilon & \sin \varepsilon \\ 0 & -\sin \varepsilon & \cos \varepsilon \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{e}_1 \\ \hat{e}_2 \\ \hat{e}_3 \end{bmatrix} \quad (\text{A5.1.2})$$

La expresión para \hat{s} en el sistema $\{e_1, e_2, e_3\}$ resulta:

$$\hat{s} = (\cos \phi) \hat{e}_1 + (\sin \phi \cos \varepsilon) \hat{e}_2 + (\sin \phi \sin \varepsilon) \hat{e}_3 \quad (\text{A5.1.3})$$

La posición del sol en el sistema ecuatorial puede describirse en términos de los ángulos δ y β , como se muestra en la Fig. (A5.1.1B). El ángulo que forma \hat{s} con el plano ecuatorial, δ , recibe el nombre de “ángulo de declinación solar”, y varía a medida que la tierra recorre su órbita. La tasa de variación horaria de δ es baja, por lo que se asume que éste cambia en una escala de tiempo diaria. Bajo este supuesto, δ puede ser matemáticamente modelado con la ecuación propuesta por Cooper, Ec. (A5.1.4) [158], la cual es ampliamente utilizada en la literatura [64, 160].

$$\delta = 0.409 \sin \left(\frac{2\pi}{365} (d + 284) \right) \quad (\text{A5.1.4})$$

En la Ec. (A5.1.4) d refiere al día del año, en el rango $1 \leq d \leq 365$.

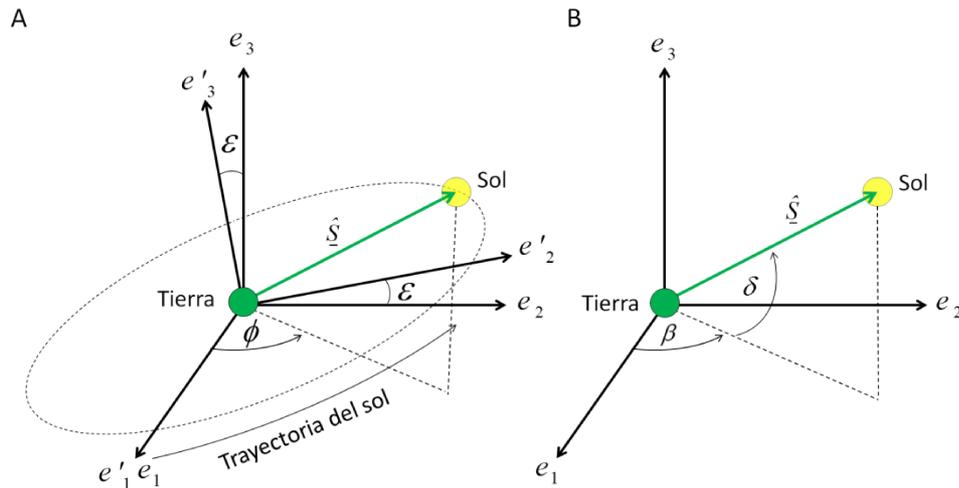


Figura (A5.1.1). A) Posición del sol en el sistema de referencia ecuatorial, $\{e_1, e_2, e_3\}$, y su relación con el sistema de referencia de la eclíptica, $\{e'_1, e'_2, e'_3\}$. B) Sistema de referencia de la eclíptica, e interpretación del ángulo de declinación solar δ .

El vector $\underline{\hat{s}}$ en el sistema $\{e_1, e_2, e_3\}$, considerando los ángulos δ y β , resulta ser:

$$\underline{\hat{s}} = (\cos \beta \cos \delta) \underline{\hat{e}}_1 + (\sin \beta \cos \delta) \underline{\hat{e}}_2 + (\sin \delta) \underline{\hat{e}}_3 \quad (\text{A5.1.5})$$

La Ec. (A5.1.5) describe $\underline{\hat{s}}$ durante el transcurso de un año, tomando como referencia el centro de la tierra. Sin embargo, nuestro objetivo radica en conocer $\underline{\hat{s}}$ para un determinado lugar del planeta, con latitud γ y longitud L . Para ello, consideremos un sistema de referencia $\{x_1, x_2, x_3\}$, en el cual $\{x_1, x_2\}$ se encuentran en el plano ecuatorial y x_3 coincide con e_3 , y un sistema de referencia local $\{N, E, R\}$, con centro en el sitio de la tierra de interés (γ, L) . El sistema $\{N, E, R\}$ contempla los puntos cardinales de orientación, Este (E), Oeste (O), Norte (N) y Sur (S). Los versores asociados están orientados en sentido (S)-(N), tangente al meridiano en el sitio, (O)-(E), tangente al paralelo, y en la dirección del radio de la esfera terrestre, como se muestra en la Fig. (A5.1.2).

El “ángulo horario” ω es función de L , como muestran las Ecs. (A5.1.6) a (A5.1.8).

$$\omega = 15 \frac{\pi}{180} (TLA - 12) \quad (\text{A5.1.6})$$

$$TLA = TLM + Et \quad (\text{A5.1.7})$$

$$TLM = h + 4(L_R - L) \quad (\text{A5.1.8})$$

En las Ecs. (A5.1.6) a (A5.1.8), TLA es el tiempo local aparente, TLM es el tiempo local medio, Et es la denominada “ecuación del tiempo”, y L_R es la longitud correspondiente al uso horario del lugar con longitud L .

El vector $\underline{\hat{E}}$ en $\{x_1, x_2, x_3\}$ sólo es función de ω , mientras que $\underline{\hat{R}}$ es función de ω y γ . Dado que el sistema $\{N, E, R\}$ es ortogonal, la expresión para $\underline{\hat{N}}$ surge del producto vectorial entre $\underline{\hat{R}}$ y $\underline{\hat{E}}$, $(\underline{\hat{R}} \otimes \underline{\hat{E}})$.

Las expresiones para $\underline{\hat{E}}$, $\underline{\hat{R}}$ y $\underline{\hat{N}}$ resultan ser:

$$\underline{\hat{E}} = (-\sin \omega) \underline{\hat{x}}_1 + (\cos \omega) \underline{\hat{x}}_2 \quad (\text{A5.1.9})$$

$$\hat{R} = (\cos \gamma \cos \omega) \hat{x}_1 + (\cos \gamma \sin \omega) \hat{x}_2 + (\sin \gamma) \hat{x}_3 \quad (\text{A5.1.10})$$

$$\hat{N} = (-\sin \gamma \cos \omega) \hat{x}_1 + (\cos \gamma \sin \omega) \hat{x}_2 + (\cos \gamma) \hat{x}_3 \quad (\text{A5.1.11})$$

El vector \hat{s} en el sistema $\{x_1, x_2, x_3\}$ está definido en el plano $\{x_1, x_3\}$ a través de δ :

$$\hat{S} = (\cos \delta) \hat{x}_1 + (\sin \delta) \hat{x}_3 \quad (\text{A5.1.12})$$

Las componentes de \hat{s} en $\{N, E, R\}$ se obtienen a partir del producto escalar entre \hat{s} en $\{x_1, x_2, x_3\}$ y en $\{N, E, R\}$, Ec. (A5.1.13).

$$\hat{S} = S_E \hat{E} + S_N \hat{N} + S_R \hat{R} = (\hat{S} \cdot \hat{E}) \hat{E} + (\hat{S} \cdot \hat{N}) \hat{N} + (\hat{S} \cdot \hat{R}) \hat{R} \quad (\text{A5.1.13})$$

$$\hat{S} = \begin{pmatrix} -\sin \omega \cos \delta \\ \cos \gamma \sin \delta - \sin \gamma \cos \omega \cos \delta \\ \cos \gamma \cos \omega \cos \delta + \sin \gamma \sin \delta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{E} \\ \hat{N} \\ \hat{R} \end{pmatrix} \quad (\text{A5.1.14})$$

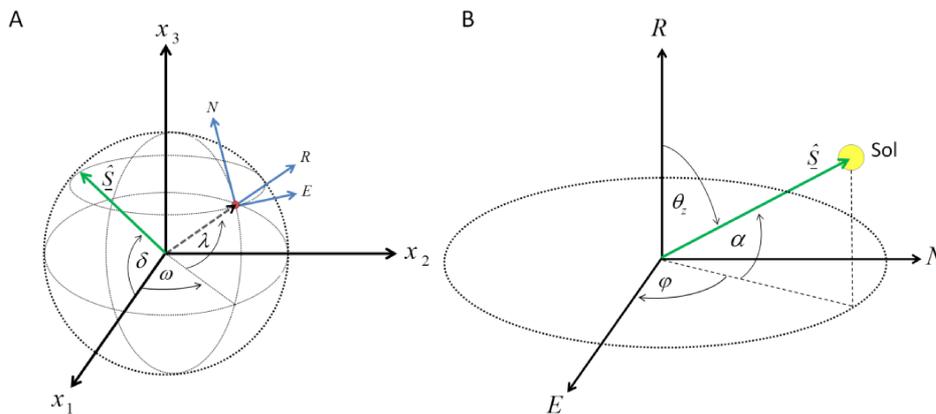


Figura (A5.1.2). A) Sistema de referencia local $\{N, E, R\}$, con centro en el sitio de la tierra con latitud γ y longitud L . B) Definición del ángulo de elevación solar α y del ángulo acimutal φ en $\{N, E, R\}$.

El vector \hat{s} en $\{N, E, R\}$ puede expresarse en términos del “ángulo de elevación solar o altitud” α y del “ángulo acimutal o azimut” φ , Ec. (A5.1.15) y Fig. (A5.1.2B).

$$\hat{S} = (\cos \alpha \sin \varphi) \hat{E} + (\cos \alpha \cos \varphi) \hat{N} + (\sin \alpha) \hat{R} \quad (\text{A5.1.15})$$

Las expresiones para α y φ surgen de igualar las Ecs. (A5.1.12) y (A5.1.14), dos expresiones para \hat{s} en $\{N, E, R\}$.

$$\sin \alpha = \cos \gamma \cos \omega \cos \delta + \sin \gamma \sin \delta \quad (\text{A5.1.16})$$

$$\cos \varphi = \frac{\cos \lambda \sin \delta + \sin \lambda \cos \omega \sin \delta}{\cos \alpha} \quad (\text{A5.1.17})$$

El ángulo α adopta valores en el rango $[0, \pi/2]$, siendo > 0 cuando el sol se encuentra por sobre la línea del horizonte, y < 0 cuando se encuentra por debajo de ésta. El valor de 0 ocurre para los dos momentos del día en los que se alcanza la línea del horizonte, el amanecer y la puesta del sol.

Por su parte, φ se define en sentido (N)-(E), y adopta valores en el rango $[0, 2\pi]$. Para el cálculo de φ es necesario imponer restricciones de acuerdo al valor que adopte ω :

$$\varphi = \arccos \left[\frac{\cos \gamma \sin \delta - \sin \gamma \cos \omega \sin \delta}{\cos \alpha} \right]; \omega < 0 \quad (\text{A5.1.18})$$

$$\varphi = 2\pi - \arccos \left[\frac{\cos \gamma \sin \delta + \sin \gamma \cos \omega \sin \delta}{\cos \alpha} \right]; \omega > 0 \quad (\text{A5.1.19})$$

Si φ está en el rango $[0, \pi]$, el sol está al (E) del observador, lo que corresponde a horas entre medianoche y mediodía, en las que $\omega < 0$; mientras que si φ está en $[\pi, 2\pi]$ significa que el sol está al (O) del observador, correspondiente a horas entre mediodía y medianoche, para las cuales $\omega > 0$.

El “ángulo zenit” θ_z se encuentra a partir de α :

$$\theta_z = \frac{\pi}{2} - \alpha \quad (\text{A5.1.20})$$

APÉNDICE (A5.2): Efecto de la composición direccional de la luz solar

La Fig. (A5.2.1) muestra los perfiles de $Q_v(t)$ para los 4 días típicos del año, considerando distintas composiciones de la luz solar que alcanza al FBR columna vertical (100% Directa, 50% Directa/50% Difusa, 100% Difusa).

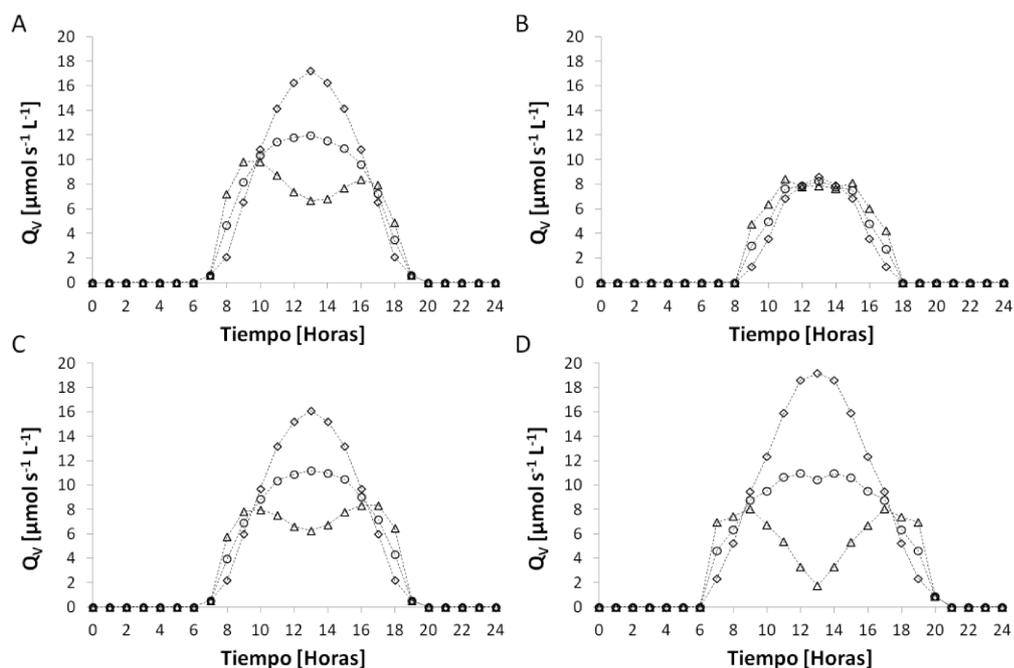


Figura (A5.2.1). Flujo de fotones volumétrico horario, $Q_v(t)$, para diversas composiciones direccionales de la luz solar [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]. A) 21 de Marzo (80), Otoño. B) 21 de Junio (172), Invierno. C) 21 de Septiembre (264), Primavera. D) 21 de Diciembre (355), Verano. Referencias: (Δ) Luz solar 100% Directa, (\circ) Luz solar 50% Directa/50% Difusa y (\diamond) Luz solar 100% Difusa.

De la Fig. (A5.2.1) se observa que la radiación que colecta el FBR, dependiendo el día del año, es muy diferente según la composición de la luz solar. En invierno no hay cambios significativos en la forma de los perfiles ni en los valores de $Q_v(t)$, mientras que para el resto de los días, son notorios los cambios en la forma y en los valores de $Q_v(t)$.

Conocer en forma precisa la composición direccional de la luz solar en el sitio de interés, resulta ser un requisito para lograr estimaciones confiables de la cantidad de luz que impacta el dispositivo de cultivo.

APÉNDICE (A5.3): Distribución de radiación en la pared del Infors HT y Qv

La cantidad de fotones que recibe un elemento de superficie j de área dA_j , ubicado sobre la pared del Infors HT en la posición $\underline{r}(\varphi, h)$ (ver las Figs. (A5.3.1A) y (A5.3.1B)), depende de la forma en la que se producen los intercambios de radiación con cada i LED que compone el módulo de iluminación.

La cantidad de fotones PAR que llegan al elemento j , por unidad de área y de tiempo; provenientes del i -ésimo LED, es:

$$q_{FBR}^{j,i}(\varphi, h) = \frac{dN_{VIS}}{dt dA_j} = n'_{VIS}(\underline{r}_i, \underline{\hat{\Omega}}_{i,j}, t) (\hat{n}_j \cdot \underline{\hat{\Omega}}_{j,i}) d\hat{\Omega} \quad (A6.3.1)$$

donde $n'_{VIS}(\underline{r}_i, \underline{\hat{\Omega}}_{i,j}, t)$ es la intensidad de los LEDs, considerados como superficies de emisión isotrópica diferenciales, \hat{n}_j es un vector unitario normal al elemento de superficie j , $\underline{\hat{\Omega}}_{j,i}$ es un vector unitario que une el elemento j con el LED i , y $d\hat{\Omega}$ es el conjunto de direcciones incluidas entre el LED i y el elemento j .

La densidad de flujo de fotones sobre la posición $\underline{r}(\varphi, h)$, es producto de los intercambios de radiación que existen entre el elemento j y cada uno de los 288 LEDs del módulo.

$$q_{FBR}(\varphi, h) = \sum_{i=1}^{288} q_{FBR}^{j,i}(\varphi, h) = \sum_{i=1}^{288} \int_{\underline{\hat{\Omega}}} n'_{VIS}(\underline{r}_i, \underline{\hat{\Omega}}_{i,j}, t) (\hat{n}_j \cdot \underline{\hat{\Omega}}_{j,i}) d\hat{\Omega} \quad (A6.3.2)$$

El intercambio de radiación de un elemento j con algunos LEDs será nulo, producto de que el elemento j está situado en una región de la pared del reactor no expuesta a los LEDs. En esta situación el ángulo formado entre los vectores \hat{n}_j y $\underline{\hat{\Omega}}_{j,i}$ es mayor a 90° , y el término $(\hat{n}_j \cdot \underline{\hat{\Omega}}_{j,i})$, que representa el coseno del ángulo entre los vectores es negativo.

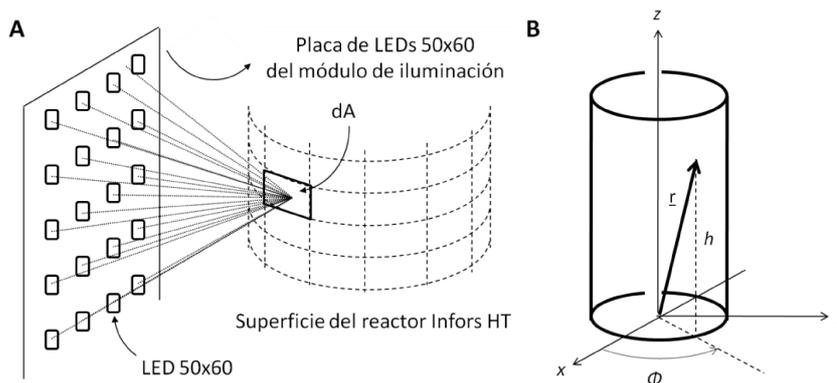


Figura (A5.3.1). A) Esquema del intercambio de energía radiante entre un elemento de superficie j sobre la pared del reactor Infors HT y los i LEDs del sistema de iluminación. B) Posición \underline{r} sobre la pared del reactor en coordenadas cilíndricas, a través de un ángulo φ y una altura h .

Se desarrolló un algoritmo de cálculo en lenguaje Fortran 90 para hallar la distribución de la densidad de flujo de fotones sobre el FBR. Como puede observarse en la Fig. (A5.3.2A), existe al menos una

condición de simetría en el módulo LED. Las distribuciones de radiación para los cuadrantes 1 y 2, ($0^\circ \leq \varphi \leq 180^\circ$), serán las mismas que para los cuadrantes 3 y 4, ($180^\circ \leq \varphi \leq 360^\circ$).

La distribución de radiación en términos de la densidad de flujo de fotones se muestra en la Fig. (A5.3.2B), para los cuadrantes 1 y 2, y para el caso en el que los LEDs 50x60 emiten al 100%.

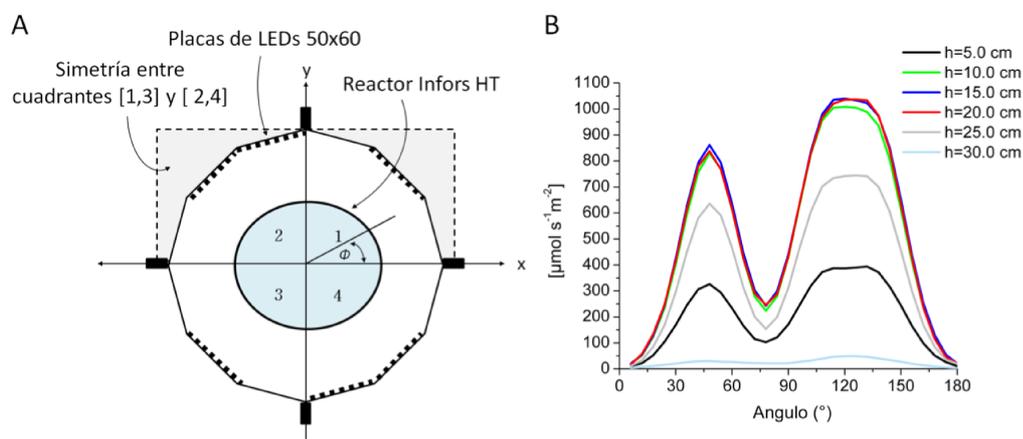


Figura (A5.3.2). A] Esquematación de la vista superior del módulo de iluminación, del sistema de coordenadas elegido para la simulación de los intercambios de radiación, de la configuración utilizada en el cálculo computacional, y de las simetrías existentes. B] Distribución de densidad de flujo de fotones [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$] en la pared del reactor Infors HT como función del ángulo φ ($0^\circ \leq \varphi \leq 180^\circ$) y para distintas alturas h [cm] (5-10-15-20-25-30).

Puede observarse de la Fig. (A5.3.2B) que las mayores densidades de flujo de fotones se encuentran en alturas h comprendidas entre 10 y 20 cm, y en ángulos φ cercanos a 120° .

El valor de la densidad de flujo de fotones promedio se encuentra con la Ec. (A5.3.3).

$$\langle q_{FBR} \rangle = \frac{1}{A_{FBR}} \int_A q_{FBR}(\underline{r}) dA = \frac{r_{FBR}}{A_{FBR}} \int_0^h \int_0^\varphi q_{FBR}(\varphi, h) d\varphi dh \quad (\text{A5.3.3})$$

donde A_{FBR} es el área del vaso del reactor y r_{FBR} su radio.

La densidad de flujo de fotones promedio, con los LEDs operando al 100%, resulta ser de $362.5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Dado que existe una dependencia lineal entre el valor seteado en la rutina de control y el valor de flujo emitido por los LEDs, podemos encontrar con la Ec. (A5.3.4), la densidad de flujo de fotones para cualquier valor porcentual de operación en el rango [0-100%].

$$\langle q_{FBR} \rangle_x = \langle q_{FBR} \rangle \left(\frac{x}{100} \right) \quad (\text{A5.3.4})$$

El flujo de fotones, Q , y el flujo de fotones volumétrico, Q_v , se calculan con las Ecs. (A5.3.5) y (A5.3.6).

$$Q = \int_A q_{FBR}(\underline{r}) dA = r_{FBR} \int_0^h \int_0^\varphi q_{VIS}(\varphi, h) d\varphi dh \quad (\text{A5.3.5})$$

$$Q_V = \frac{1}{V_{FBR}} \int_A q_{FBR}(\underline{r}) dA = \frac{r_{FBR}}{V_{FBR}} \int_0^h \int_0^\varphi q_{VIS}(\varphi, h) d\varphi dh \quad (A5.3.6)$$

El flujo volumétrico cuando los LEDs operan al 100%, $Q_{V,Max}$, puede obtenerse como:

$$Q_{V,Max} = Q_{LEDs} f_p \quad (A5.3.7)$$

donde Q_{LEDs} es el flujo emitido por los 288 LEDs 50x60 operando al 100%, y f_p es la fracción de fotones que pegan en la pared del total de fotones emitidos.

El valor de Q_{LEDs} es de 22.10 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]. De los resultados de la simulación de los intercambios de radiación podemos concluir que el valor de $Q_{V,Max}$ es de 12.82 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]. Este resultado refleja que el 58% de los fotones emitidos por el módulo de iluminación alcanzan las paredes del reactor Infors HT.

CAPÍTULO (6)

**Un enfoque para estimar la productividad
de fotobiorreactores (FBRs) 2:
Haematococcus pluvialis en condiciones de
iluminación *outdoor***

(1).- RESUMEN

En el Capítulo (5) hemos propuesto una metodología para estimar la performance de FBRs *outdoor*, reales o hipotéticos, localizados en cualquier lugar del planeta. La propuesta se basa en la reproducción de los perfiles de radiación del sitio, en términos del flujo de fotones volumétrico (Q_v , luz fotosintéticamente activa (PAR) por unidad de tiempo y de volumen de medio contenido en el reactor), a través de un módulo LED de amplio espectro y un FBR comercial de laboratorio. La metodología fue aplicada al caso de un reactor columna vertical de 30 L, construido por los integrantes del GiiB, iluminado con luz solar, y localizado en una explanada en las cercanías de la ex planta piloto del Parque Tecnológico Litoral Centro (PTLC).

En el presente Capítulo se aplica dicha metodología para analizar el crecimiento fotoautotrófico de una cepa de *Haematococcus pluvialis*, una microalga verde con actual interés comercial, industrial, y biotecnológico, por su capacidad de acumular grandes cantidades de astaxantina. La cepa nativa *H. pluvialis* FAUBA 57 fue cultivada a escala laboratorio en el reactor Infors HT, operado en forma *batch*, y sometido a las condiciones de iluminación correspondientes al reactor *outdoor*. Se eligieron días típicos de invierno, verano y otoño de Santa Fe (Argentina), debido a que difieren en el ciclo día-noche (fotoperíodo), en la cantidad de luz diaria que alcanza al reactor, y en los valores de Q_v .

De los resultados experimentales se observa que el perfil de iluminación tiene un gran impacto sobre la productividad de la biomasa y de carotenoides totales, la duración del ciclo de vida de la microalga, la cantidad de biomasa producida y el contenido de pigmentos.

(2).- INTRODUCCIÓN

H. pluvialis es en la actualidad una de la microalgas con mayor interés industrial, comercial y biotecnológico. El potencial de esta cepa radica en que es considerada la principal fuente natural del pigmento astaxantina (3,3-dihydroxy- β,β carotene-4,4-dione; $C_{40}H_{52}O_4$) [161-164], uno de los antioxidantes más poderosos de la naturaleza, con una actividad antioxidante 10 veces superior al β -caroteno, cantaxantina, zeaxantina y luteína, y al menos 100 veces superior al α -tocoferol [165]. El mercado más importante lo comprenden áreas relacionadas a la acuicultura, ya que el carotenoide se usa como aditivo alimenticio para brindar el color rojo/rosado característico a salmónidos, camarones y peces ornamentales crecidos en criaderos [166].

La síntesis química, de naturaleza petroquímica, domina más del 95% del mercado mundial. El proceso plantea un debate acerca de cuestiones de seguridad alimentarias, como toxicidad del producto, funcionalidad, actividad, etc., y medioambientales, como contaminación y sostenibilidad. De hecho, hasta la fecha, la astaxantina sintética puede solo utilizarse para la alimentación de peces y no ha sido aprobado para consumo humano directo, a través de alimentos o suplementos [165]. Estos aspectos han potenciado la búsqueda y el uso de fuentes naturales. Entre ellas se encuentran crustáceos, levaduras (*Phaffia rhodozyma*), bacterias (*Agrobacterium aurantiacum*) y microalgas [167]. Éstas últimas reciben la mayor atención debido al bajo requerimiento nutricional y los costos

asociados a los medios de cultivo (ej. fertilizantes de acuaponía, efluentes, etc. [168]). La astaxantina derivada de algas corresponde aprox. al 1% del mercado mundial, el cual ha sido estimado ser para 2020 de \$ 1.5 billones (dólares) [167]. De las especies de microalgas verdes (Chlorophyta) reportadas como potenciales productoras, ej. *Chlorella zofingiensis* [169], *Scenedesmus obliquus* [170], *Chlorococcum* sp. [171], *H. pluvialis* excede a cualquier especie conocida, alcanzando contenidos porcentuales mayores al 4% [172].

Para la producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis* se barajan dos estrategias principales, clasificadas de acuerdo al número de etapas que componen el proceso. Una denominada “two stage process”, que consiste en un sistema de producción secuencial que separa en el tiempo la producción de biomasa de la del pigmento [172]. Las condiciones para el crecimiento celular son muy diferentes a las de acumulación del carotenoide, la cual se logra exponiendo a las microalgas a condiciones ambientales adversas (estrés). Este sistema permite optimizar de forma independiente cada etapa, permitiendo el uso de diferentes tipos de FBRs y modos de operación. La otra, aunque no muy frecuentemente utilizada, es conocida como “one stage process”. Es una metodología restringida a cultivos continuos en estado estacionario, donde las microalgas son sometidas a altas irradiancias y limitación de nitrógeno, lo que produce una división celular asincrónica que coexiste con la acumulación de astaxantina [173, 174]. Esta estrategia rinde un menor contenido de astaxantina final en la biomasa, pero permite alcanzar mayores productividades. Para una comparación de ambas tecnologías, en términos de la productividad de la biomasa, de carotenoides y de astaxantina, ver la comunicación de Aflalo y col. [172].

Otra de las características de la microalga es que cuenta con muchos de los requisitos necesarios para desarrollar una biorrefinería [175], dado que acumula un producto de alto valor comercial que puede absorber los costos de su cultivo. La biomasa residual de *H. pluvialis* posee excelentes propiedades nutricionales [176], como un alto contenido de triglicéridos, producto de que su biosíntesis está estrechamente relacionada a la forma en la que se acumula la astaxantina en las células (principalmente esterificada) [177]. Los restos de medio de cultivo enriquecidos con metabolitos extracelulares son utilizados como agentes antimicrobianos [178].

H. pluvialis ha sido cultivada en diversos FBRs, condiciones de cultivo y de operación, naturaleza del metabolismo, etc. En cuanto al FBR, podemos citar los siguientes tipos: tubulares [172, 179, 180], columnas de burbujeo [180], *airlift* [181], *open raceway ponds* [182], *flat panels* [183], semi-esfera [162], etc. La elección del reactor tiene una gran influencia sobre la performance del cultivo, y este aspecto se traslada al precio de la biomasa y de la astaxantina [184].

Dado que la luz solar es una fuente de energía de costo cero, que la elección del FBR tiene un gran impacto sobre la productividad y el precio, y que el pigmento no es producido en Argentina a escalas significativas para el mercado nacional, comenzamos analizando el crecimiento fotoautotrófico de *H. pluvialis* FAUBA 57 en un reactor columna de 30 L operado en forma *batch*, en días de invierno, verano y otoño de Santa Fe (Argentina).

(3).- OBJETIVOS

- Realizar cultivos de *H. pluvialis* a escala laboratorio, simulando las condiciones de iluminación de un reactor columna *outdoor*, operando *batch*, y localizado en Santa Fe (Argentina).
- Analizar el efecto de los diferentes flujos de radiación, fotoperíodos, y cantidades de luz diarias sobre la duración del ciclo de vida, la productividad de la biomasa y de los carotenoides totales.
- Discutir aspectos relacionados al reactor, que permitan efectuar un escalamiento de la producción, o mejorar la performance de *H. pluvialis* en condiciones de iluminación *outdoor*.

(4).- MATERIALES Y MÉTODOS

(4.1).- Perfiles de radiación *outdoor*

Se utilizaron los perfiles de Q_v [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$] obtenidos para el reactor *outdoor* de 30 L (ver la Sección (4.2) del Capítulo (5)), considerando que la luz solar en Santa Fe se compone de un 75% de luz directa, y que en las primeras horas del día, y al anochecer, la luz que alcanza al reactor es 100% difusa isotrópica. La Fig. (2) muestra los perfiles de Q_v para días de otoño, invierno y verano. El perfil de Q_v correspondiente a la estación de primavera no fue ensayado debido a la similitud que tiene con el perfil de otoño (ver la Fig. (8) del Capítulo (5)).

(4.2).- Fuente de iluminación PAR

Se utilizó el módulo LED diseñado, construido, y caracterizado en el Capítulo (5). El dispositivo fue operado con las 6 placas de LEDs prendidas, todas emitiendo el mismo número de fotones por unidad de tiempo, lo que conduce a que la luz se distribuya sobre la pared del reactor de la forma más homogéneamente posible. El flujo que emitieron las placas de LEDs, y por ende el Q_v externo, fue configurado para cambiar en una escala de tiempo de 1 hora. La Fig. (2) muestra los perfiles horarios de Q_v para los días típicos elegidos, obtenidos con datos de radiación históricos, y los reproducidos con el módulo LED a través de la metodología de modulación de ancho de pulso (PWM).

(4.3).- Cepa, mantenimiento e inóculo para ensayos en FBR

La cepa de *H. pluvialis* FAUBA 57 fue adquirida del cepario de la Facultad de Agronomía (FA) de la Universidad de Buenos Aires (UBA) Argentina, y mantenida en tubos de ensayo con medio mBBM (Modified Bold Basal Medium, 2.94 mM de NaNO_3) [185, 186] en condiciones ambientales de laboratorio.

H. pluvialis FAUBA 57 tiene el potencial de acumular hasta un 2.7% de astaxantina, en cultivos aireados efectuados en frascos Erlenmeyers utilizando una estrategia de estrés secuencial, que consiste en una etapa de insuficiencia de NO_3^- seguida de una irradiancia moderada de 110 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$] [185].

Los inóculos para ensayos en FBR consistieron en suspensiones concentradas de *H. pluvialis* en estadio de aplanospora. Para ello, un tubo de ensayo con 10 ml de suspensión de *H. pluvialis* en

estadío vegetativo fue vertido en un Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de mBBM, y crecido a temperatura ambiente en una cámara de cultivo bajo iluminación continua de 40 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$], producto de focos LEDs de 20W con perfil de emisión blanco frío. El inóculo no fue agitado ni aireado, y el crecimiento se mantuvo hasta alcanzar el estadío vegetativo móvil en fase de crecimiento exponencial (aprox. 6-8 días). Luego, 6 frascos Erlenmeyers de 1 L conteniendo 200 ml de mBBM fueron inoculados con 20 ml de células en fase exponencial, y se dejaron crecer durante 10 días en las condiciones previamente detalladas. Para obtener el estadío de aplanospora, el día 10 se incrementó la iluminación a 150 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$], y se incubó durante 10 días. Transcurrido dicho tiempo, se descartó el sobrenadante de los 6 Erlenmeyers por vertido y se colectó toda la biomasa en un único recipiente. Esto es posible debido a la alta velocidad de sedimentación de las células de aplanospora, y a que el pellet resultante es lo suficientemente compacto para no ser arrastrado con el líquido. La suspensión concentrada fue lavada 3 veces con el medio de cultivo utilizado en los ensayos en FBR (ver la Sección (4.4)). El FBR fue inoculado con un volumen tal que permita alcanzar una concentración inicial de biomasa de aprox. 200 mg L⁻¹. Las etapas que componen la metodología de preparación de inóculos, destinados a experiencias en FBR, se muestran en la Fig. (1A).

La elección de iniciar el cultivo en estado de aplanospora radica en testear la capacidad que tienen éstas células de reactivarse a estados reproductivos en cortos períodos de tiempo (aprox. 2-3 días) [187]. De ésta forma se evitaría la necesidad de producir un inóculo en estado reproductivo, lo que implica un tiempo de aprox. 10 a 15 días.

(4.4).- Cultivo de *H. pluvialis* en FBR

Se utilizó un reactor comercial de la marca Infors HT (ver la Fig. (1B)), conteniendo 3.0 L de medio 3N-mBBM (8.82 mM de NaNO₃, pH inicial de 6.4). El FBR fue operado en forma *batch*, con temperatura controlada entre 25.0 ± 0.1 °C, pH libre, caudal de aireación de 0.33 vvm (0.034% CO₂), nivel de líquido constante mediante el agregado de H₂O destilada en forma automática, y agitación de 50 rpm con intervalos de 300 rpm (duración de 30 s y espaciados cada 30 min). Esta política de agitación busca evitar tanto la sedimentación de células no móviles y aplanosporas, como la formación de *biofilms* sobre las partes internas del reactor.

Se tomó un volumen de cultivo de 50-100 ml cada 48-72 hs para cuantificar el crecimiento celular, y dicho volumen fue recuperado con medio mBBM fresco, que no contiene NaNO₃. La fuerza iónica del medio original fue conservada mediante una solución acuosa de NaCl de 2.5 gr L⁻¹ (206 ml/L mBBM). Aplicar un estrés salino es una estrategia comúnmente utilizada para inducir la carotenogénesis en *H. pluvialis* [188]. La concentración de NaCl en el medio de cultivo, al final de la experiencia más extensa (aprox. 36 días) y suponiendo que el compuesto no es consumido por las microalgas, es de aprox. 3 mM. Este valor es de 40 a 100 veces menor que las concentraciones citadas en la literatura como inductoras de la biosíntesis del pigmento [189].

Cada condición operativa fue ensayada por duplicado y las determinaciones experimentales destinadas a cuantificar el crecimiento celular y la composición de la biomasa fueron efectuadas por triplicado.



Figura (1). A) Metodología de preparación de un inóculo de *H. pluvialis* en estado de aplanospora para los ensayos en FBR. Fotografías efectuadas a 40X de los tipos celulares presentes en cada etapa de la preparación de inóculos. B) Dispositivos utilizados para la reproducción de las condiciones de iluminación de un FBR *outdoor*.

(4.5).- Determinaciones experimentales

Respecto al ciclo de vida de *H. pluvialis*, se adoptó el ciclo celular y las definiciones propuestas por Zhang [190]. En el presente trabajo se reconocen tres estadios principales: (M) células móviles y zoosporas sin distinción, (NM) células no móviles comúnmente denominadas “palmellas”, y (A) aplanosporas. Los diversos tipos celulares fueron identificados y contabilizados microscópicamente con una cámara de conteo BOECO modelo Improved Neubauer bajo una resolución de 40X. Para el conteo de (M) se efectuó una inmovilización con una solución de $\text{I}_2\text{-KI}$, en una relación de 1/100 con la muestra.

La concentración de biomasa fue cuantificada como sólidos suspendidos totales (SST). Para ello, un volumen de muestra de 20 ml fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 min, el pellet fue lavado con agua destilada y secado a 90 °C durante al menos 24 hs.

Las concentraciones de clorofila a (Chl a) y clorofila b (Chl b) se determinaron con una técnica fotocolorimétrica utilizando etanol 100% como agente de extracción [99], mientras que los carotenoides totales (Car) se cuantificaron con el mismo principio usando etanol 95% [191]. Para ambas determinaciones, 1.5 ml de muestra fueron centrifugados en un tubo Eppendorf (10000 rpm, 5 min) y el sedimento se resuspendió en 1 ml de etanol. La suspensión fue sometida a disrupción mecánica con *beadbeater glass mill* durante 30 min. La extracción de pigmentos se realizó incubando en oscuridad durante la noche, y al día siguiente, la muestra fue centrifugada (10 min, 5000 rpm) antes de la medición en espectrofotómetro, con el fin de retirar una cuota del sobrenadante.

Las concentraciones de Chls y Car se calcularon con las siguientes regresiones:

$$\text{Chl a [mg L}^{-1}\text{]} = \left(-5.2007 \text{DO}_{649 \text{ nm}} + 13.5275 \text{DO}_{665 \text{ nm}} \right) / \text{paso óptico} \quad (1)$$

$$\text{Chl b [mg L}^{-1}\text{]} = \left(22.4327 \text{DO}_{649 \text{ nm}} - 7.0741 \text{DO}_{665 \text{ nm}} \right) / \text{paso óptico} \quad (2)$$

$$Car [mg L^{-1}] = \left(1000 DO_{470 nm} - 2.1300 Chl a - 97.5400 Chl b \right) / (209 \text{ paso óptico}) \quad (3)$$

El NO_3^- en el medio de cultivo se cuantificó por medición de la absorción a 220 nm [100]. Para ello, 1 ml de muestra fue centrifugado durante 15 min a 15000 rpm para retirar los materiales suspendidos. La concentración de NO_3^- se calculó comparando la absorción de la muestra con la absorción de una solución estándar de 11.76 mM de $NaNO_3$.

(5).- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(5.1).- Simulación de las condiciones de iluminación *outdoor*

En condiciones ambientales la posición del sol cambia durante el día en forma continua, lo que produce perfiles de Q_v continuos en el tiempo. Es necesario elegir, con fines de alcanzar una buena reproducción de las condiciones de iluminación *outdoor*, una escala de tiempo de operación del módulo LED. Si bien el dispositivo puede configurarse para modificar el Q emitido por los LEDs en una escala de segundos o minutos, hemos evaluado la calidad de la reproducción para cambios efectuados cada 1 hora. La Fig. (2) muestra los perfiles de Q_v calculados a partir de la radiación horaria sobre una superficie horizontal (ver el Capítulo (5)), y los reproducidos utilizando el módulo LED en las condiciones descriptas y el reactor Infors HT.

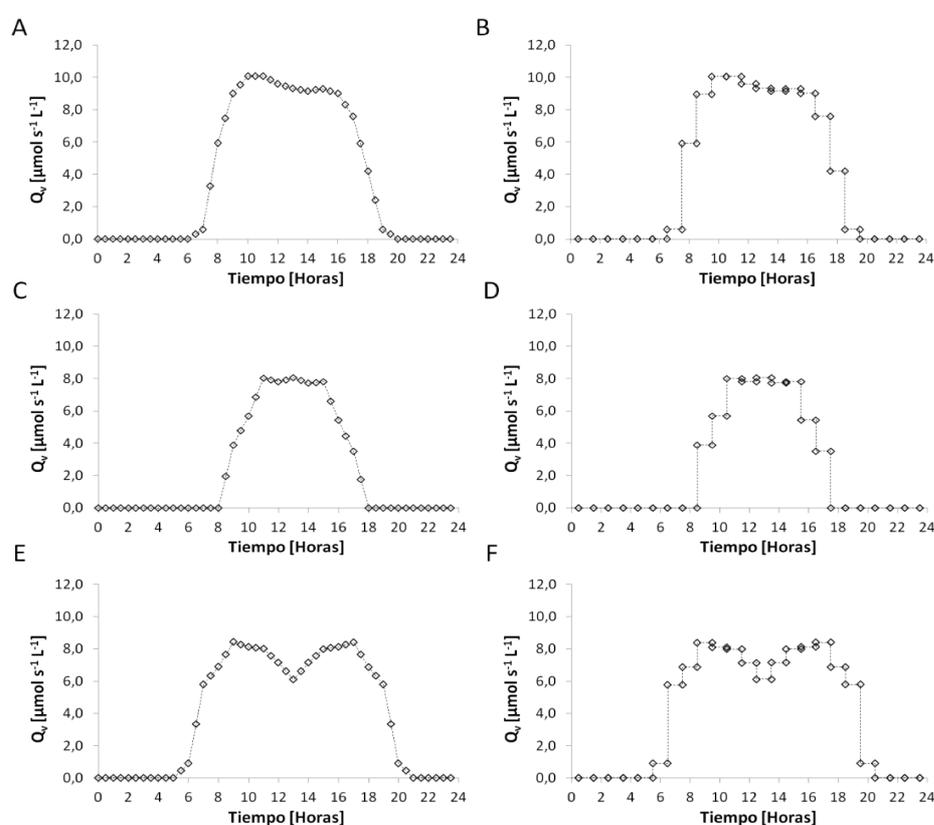


Figura (2). Perfiles horarios de Q_v [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$]. Izquierda] Perfiles para un reactor *outdoor* columna vertical de 30 L, derivados de datos de radiación históricos. Derecha] Perfiles reproducidos con el módulo LED en el laboratorio, con cambios en el flujo emitido cada 1 hora. A-B] Otoño (21 de Marzo). C-D] Invierno (21 de Junio). E-F] Verano (21 de Diciembre).

La cantidad de horas de luz para cada día considerado puede obtenerse por observación directa del perfil de Q_v , mientras que la cantidad de radiación PAR diaria que recibe externamente el FBR, debe obtenerse por integración numérica (ver la Tabla (1)).

De los resultados presentes en la Tabla (1) podemos concluir que la escala de tiempo de 1 hora permite alcanzar una excelente reproducción de los perfiles de Q_v , y también de la cantidad de luz solar diaria que recibe externamente el FBR.

Los días de otoño se caracterizan por fotoperíodos en los que predomina la iluminación, con valores de Q_v similares al $Q_{v,Max}$ en 8 de las 13 hs en las que el FBR está iluminado. En verano los fotoperíodos son aún más favorecidos en cuanto a horas de iluminación, pero con un $Q_{v,Max}$ menor al de otoño. La cantidad diaria de fotones que alcanzan al FBR en ambos casos es muy similar. Por su parte, en invierno gobiernan los fotoperíodos con pocas horas de luz, con un $Q_{v,Max}$ similar al de verano, y cantidades diarias de fotones cerca de 1.6 veces menores a otoño y verano.

Un resultado importante del Capítulo (5), que no fue abordado ahí, es que el Q_v calculado para un FBR columna de 30 L es igual que para otros reactores columna de mayor o menor volumen, siempre y cuando el radio se mantenga constante. Este hecho permite considerar un escalamiento de la producción de biomasa y carotenoides, a través de un incremento en la longitud de los reactores, manteniendo la geometría, y ya conociendo el comportamiento de *H. pluvialis*.

Tabla (1). Descripción de los perfiles de Q_v . L: luz; O: oscuridad				
Día	Radiación diaria <i>outdoor</i> [$\mu\text{mol día}^{-1}$]	Radiación diaria laboratorio [$\mu\text{mol día}^{-1}$]	Fotoperíodo (L:O)	$Q_{v,Max}$ Laboratorio
Otoño	8.15×10^6	8.16×10^6	13:11	10.06
Invierno	4.99×10^6	5.00×10^6	9:15	8.05
Verano	8.32×10^6	8.33×10^6	15:9	8.39

(5.2).- Cultivos de *H. pluvialis* bajo condiciones de iluminación *outdoor*

En cultivos de *H. pluvialis* la luz juega un rol importante en el crecimiento de la biomasa, en la acumulación de carotenoides, y en la regulación del ciclo celular [192].

En los procesos de producción a gran escala se observan notables diferencias mensuales en la productividad de la biomasa de *H. pluvialis*, de la astaxantina, y en la duración del ciclo de producción [193], debido principalmente a las fluctuaciones de las condiciones de cultivo (ej. temperatura, calidad y cantidad de luz, horas de luz, pH, presencia de microorganismos, etc.). Esas variaciones inducen mecanismos de adaptación, que van desde el ajuste de la cantidad de luz absorbida, producto de cambios en el contenido y la naturaleza de los pigmentos que componen las antenas de captación de luz [194], activación de mecanismos de disipación del exceso de energía radiante, etc., hasta la diferenciación celular. La transición a un nuevo estadio celular involucra grandes cambios en la ultraestructura y en la fisiología celular [195]. La demanda de luz y la habilidad para fotoadaptarse

difiere entre cepas de *H. pluvialis*, pero también varía significativamente con los tipos celulares que componen el ciclo de vida [196].

(5.2.1).- Crecimiento y ciclo de vida

En condiciones de iluminación de otoño y verano la concentración de biomasa comenzó a decaer luego de transcurridos 20 y 26 días de iniciada la experiencia (datos no mostrados). En esos momentos del cultivo había una cantidad importante de nitrógeno respecto al inicial, y se observó la generación de estados vegetativos a partir de células de aplanosporas. No se han encontrado las razones para la conducta observada. El análisis de resultados se limita a tiempos previos a la reducción en la concentración de biomasa.

La Fig. (3) muestra la evolución en el tiempo de la biomasa [mg L^{-1}], de la velocidad de crecimiento específica μ [día^{-1}], y de la población de células que componen el ciclo de vida de *H. pluvialis* [%].

La productividad durante un intervalo de tiempo $t_{1,2}$, $r_x(t_{1,2})$ [$\text{mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$], fue calculada a partir de los datos de biomasa medidos experimentalmente, con la Ec. (4).

$$r_x(t_{1,2}) = \frac{x(t_2) - x(t_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (4)$$

En la Ec. (4) $x(t_2)$ es la biomasa presente en el reactor al tiempo t_2 y $x(t_1)$ la correspondiente a t_1 .

La velocidad de crecimiento específica μ durante $t_{1,2}$, fue calculada con la Ec. (5).

$$\mu(t_{1,2}) = \frac{r_x(t_{1,2})}{\bar{x}(t_{1,2})} \quad (5)$$

donde $\bar{x}(t_{1,2})$ es la concentración de biomasa promedio para $t_{1,2}$.

De la Fig. (3) podemos concluir que el perfil de iluminación tiene un gran impacto sobre la conducta de crecimiento de *H. pluvialis*, y la forma que adoptan las curvas de crecimiento son producto de las células de la microalga presentes en la suspensión.

Cuando células (NM) o (A) perciben condiciones favorables para el crecimiento se reproducen asexualmente con la formación de células móviles biflageladas. Primero se desarrolla el esporangio, y luego se produce su hinchazón y rotura, con la consecuente liberación de zoosporas. El proceso recibe el nombre de germinación, y depende de muchos factores, entre ellos: la ausencia o presencia de luz, de su composición espectral [197] y cantidad [198], de la biomasa [187], de la naturaleza y el contenido de pigmentos, de la temperatura [198], de la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno, etc. La formación del esporangio involucra el debilitamiento de la pared celular. Es por este motivo que la germinación es una estrategia implementada para incrementar la eficiencia de los sistemas de extracción de astaxantina [199, 200].

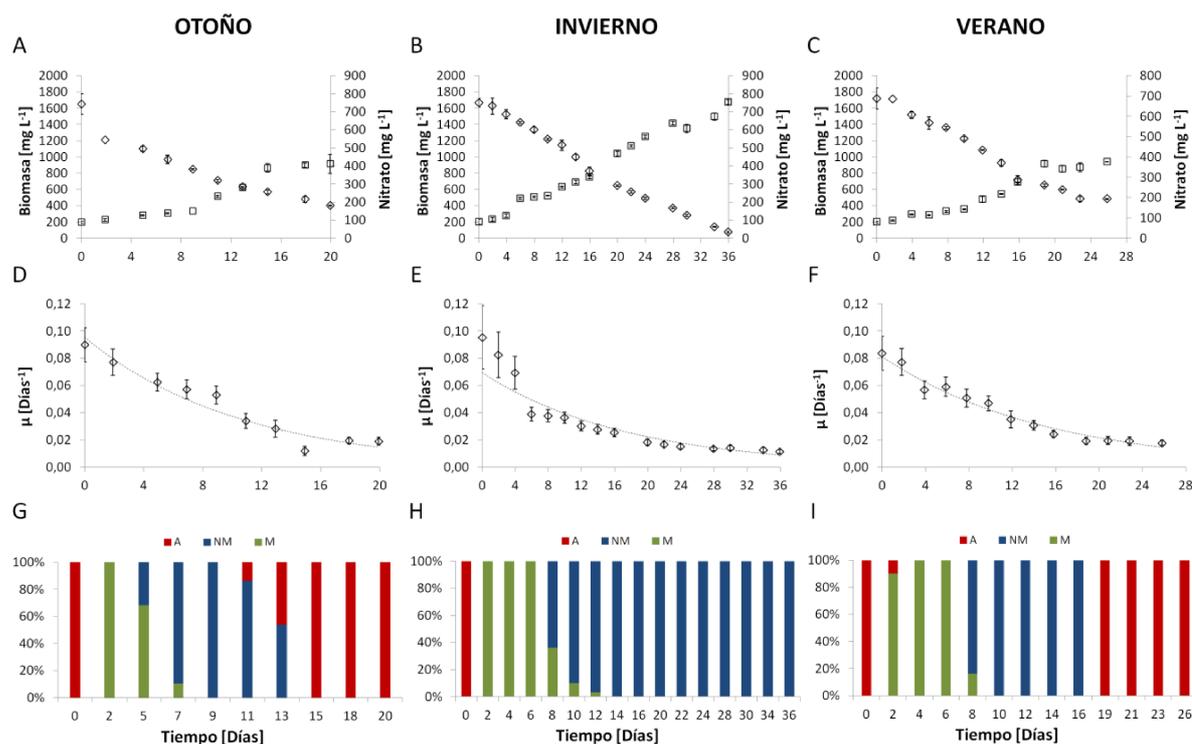


Figura (3). Evolución en el tiempo de: A, B, C] Concentración de biomasa y de nitrato (NO_3^-). □] Biomasa [mg L^{-1}], ◇] NO_3^- [mg L^{-1}]; D, E, F] Velocidad de crecimiento específica, μ [día^{-1}]. (---) Curva de tendencia exponencial para μ . G, H, I] Estadios de *H. pluvialis*. Rojo] Aplanosporas (A), Verde] Móviles y zoosporas (M), Azul] No móviles (NM).

La dinámica de la germinación es similar en todas las condiciones operativas ensayadas, como muestran las Figs. ((3G), (3H) y (3I)). Pese a las diferencias existentes entre los perfiles de iluminación, todos los cultivos culminaron la germinación desde (A) antes de las 48 hs de inoculado el FBR. Este resultado permitiría contemplar la posibilidad de iniciar un cultivo de *H. pluvialis* utilizando (A), producto principal de un proceso basado en una estrategia del tipo “two stage process”. Si las condiciones son adecuadas las zoosporas maduran a células móviles biflageladas, capaces de dividirse a través de reproducción vegetativa directa, resultando 2 células hijas, o mediante reproducción asexual con esporangio, formando 2, 4, u 8 zoosporas. En caso de existir condiciones no aptas para la reproducción, las zoosporas se convierten en (A) sin pasar por el estadio móvil.

En verano e invierno las células permanecieron móviles 4-5 días luego de culminada la germinación, mientras que en otoño 2-3 días. Durante este período, la mayor r_x fue para invierno, 19.09 [$\text{mg L}^{-1} \text{día}^{-1}$], mientras que para otoño y verano fue de 17.46 y 16.75 [$\text{mg L}^{-1} \text{día}^{-1}$]. La productividad de la biomasa muestra una relación inversa con la cantidad de luz diaria recibida externamente por el FBR y los valores de Q_v . A valores más altos de Q_v , y mayores cantidades entregadas de luz diaria, menores son las r_x . Las productividades de reactores batch se encuentran reportadas en el rango de 10-500 [$\text{mg L}^{-1} \text{día}^{-1}$] [165], y varían significativamente según el medio de cultivo, el contenido de nitrógeno (N) y fósforo (P), las relaciones C/N y N/P, la modalidad en la que suministra luz, la calidad y cantidad de luz, el tipo de FBR, el modo de operación, el pH, el caudal de CO_2 , la agitación, el O_2

disuelto, etc [165]. Las células (M) son muy sensibles a las condiciones de cultivo. Las bajas r_x encontradas podrían deberse a las variaciones bruscas en el pH del medio de cultivo durante las horas de luz, resultado del metabolismo del CO₂ y del consumo de NO₃⁻ [202]. El pH óptimo de crecimiento para (M) se encuentra reportado en el rango de 6-8 [181, 203-206]. Los pH fluctuaron entre 9-10.5, en todas las experiencias, lejos de la región óptima. El pH ha sido considerado como un factor de estrés que dispara la transición a un nuevo estadio celular [182], lo que explicaría el reducido tiempo de *H. pluvialis* como (M). Se ha observado que en algunos casos el agregado de vitaminas al medio aumenta significativamente r_x y la extensión de (M) [207-209]. Hemos descartado inicialmente el uso de vitaminas debido a que en reactores de mayor escala es más difícil mantener condiciones microbiológicas adecuadas para *H. pluvialis*, la cual es susceptible a colapsar frente a determinados organismos [210, 211]. No se detectó un número considerable de células muertas durante (M), por lo que se descarta que la diferenciación celular sea producto de un estrés hidrodinámico debido a agitación mecánica y aireación [212].

En todas las condiciones operativas ensayadas los cultivos sufrieron una transición de (M) a (NM), lo que indica al menos condiciones aptas. El color de la suspensión se tornó marrón (ver la Fig. (4A)). El aumento de la concentración de biomasa en el estadio (NM) puede deberse a división celular por brotación y posterior crecimiento, pero es más frecuente la pérdida de los flagelos y la acumulación de carotenoides [190]. *H. pluvialis* permaneció como (NM) 7-8 días en otoño y verano, mientras que en invierno al menos durante 36 días. La productividad r_x fue superior en otoño, con un valor de 56.45 [mg L⁻¹ día⁻¹], seguido por verano, 44.39 [mg L⁻¹ día⁻¹], e invierno, 42.66 [mg L⁻¹ día⁻¹]. En este estadio r_x muestra una relación directa con los valores de Qv. Cuanto más grandes son los Qv, mayores son las r_x , pudiendo deberse a que mayores Qv inducen más eficientemente la carotenogénesis (ver la Sección (5.2.2)).

El color de la suspensión en verano y otoño cambió de marrón a rojo brillante (ver la Fig. (4B)), hecho que coincide con la aparición de (A) (ver las Figs. ((3A), (3C)), (3G) y (3I)). Alcanzado (A) se observa un cese en el crecimiento de la biomasa.

Podemos definir la duración del ciclo celular como el tiempo que transcurre desde la inoculación del FBR, con (A), hasta que se alcanza nuevamente (A). Pese a que la cantidad de luz diaria recibida por el FBR en verano es similar a la de otoño, la duración del ciclo celular es muy diferente, de aprox. 14 y de entre 16-19 días respectivamente. Podemos concluir que los valores de Qv impactan significativamente en la duración del ciclo celular, producto de que inducen la diferenciación celular.

En cuanto al comportamiento global del cultivo, la cantidad máxima de biomasa producida es inversamente proporcional a la cantidad diaria de energía radiante suministrada, siendo en invierno al menos de 2520.0 [mg], en otoño de 2162.0 [mg] y en verano de 2055.0 [mg].

La velocidad específica de crecimiento de la biomasa, μ , disminuye en todas las condiciones ensayadas a medida que progresa el cultivo, siguiendo una tendencia de tipo exponencial, Figs. ((3D),

(3E) y (3F)). Los valores de μ presentes en la literatura son muy variados, en el rango de 0.1-0.6 [día⁻¹].

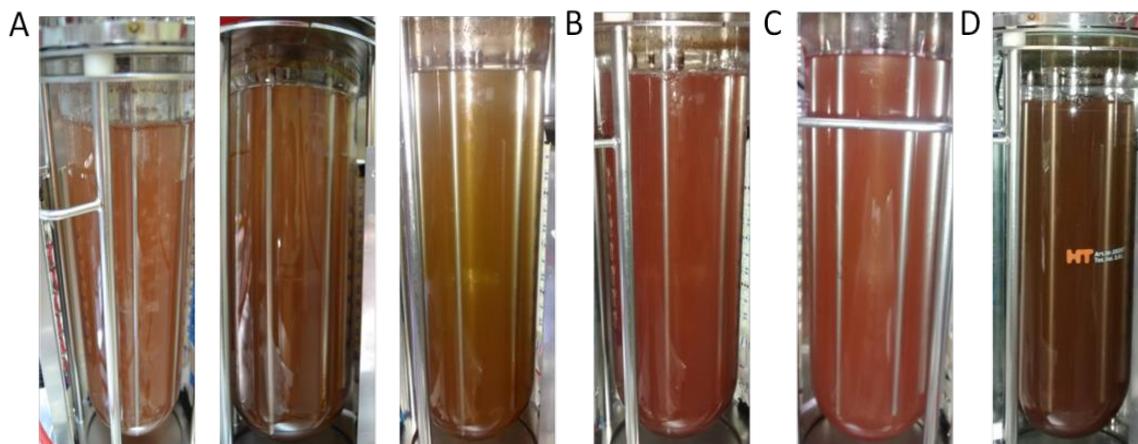


Figura (4). A) Aspecto de los cultivos de *H. pluvialis* durante la germinación de las aplanosporas. Tiempo correspondiente entre las 24-72 hs de inoculado el FBR. B, C, D) Aspecto de los cultivos durante el estadio de aplanospora en días de otoño y verano, y del estadio no móvil en días de invierno, respectivamente.

(5.2.2).- Clorofilas (Chls) y carotenoides (Cars)

El contenido, tipo, y composición de pigmentos difiere entre los estadios de *H. pluvialis*, y también dentro un mismo estadio, como una respuesta adaptativa a las fluctuaciones en las condiciones de cultivo. En sistemas de producción *outdoor*, la microalga sufre grandes cambios en un tiempo relativamente corto [180]. Chaumont y col. observaron en FBRs tubulares *outdoor* continuos, que el contenido de Car de (M) está bajo el control de la irradiancia, y se duplica en aprox. 4 hs [213]. Sarada y col. han observado que el contenido de Chls y Car es altamente dependiente de la evolución del pH del medio, y valores cercanos a la neutralidad mostraron los mayores contenidos de pigmentos en las células [205].

En lo que respecta a los estadios celulares, la fase vegetativa (M) se caracteriza por un elevado contenido de Chls, y la fracción de carotenoides se compone principalmente de luteína, β -caroteno, neoxantina, violaxantina y zeaxantina [204, 214]. Durante la transición de (M) a (NM) y (A) las Chls se reducen, los Car primarios se reemplazan por secundarios, y su cantidad aumenta. La relación Car/Chls [215] o la recíproca Chls/Car [179, 188], suelen ser utilizadas como indicadores de estadio celular. Valores para Car/Chls de 0.5 en (M), de 1.0 en (NM) y de entre 2-9 en (A) son comúnmente observados [165, 215]. Del análisis de los perfiles de Car de cultivos sometidos a diferentes condiciones de estrés, se ha observado que la astaxantina representa entre el 80-99 % de los Car secundarios [165, 172, 216, 217].

En el presente trabajo se han cuantificado las concentraciones volumétricas de Chls y Car totales durante la evolución de los cultivos, y en base a ellas se han obtenido las relaciones Car/Chls y Chl a/Chl b, que se muestran en la Figs. (5G), (5H) y (5I).

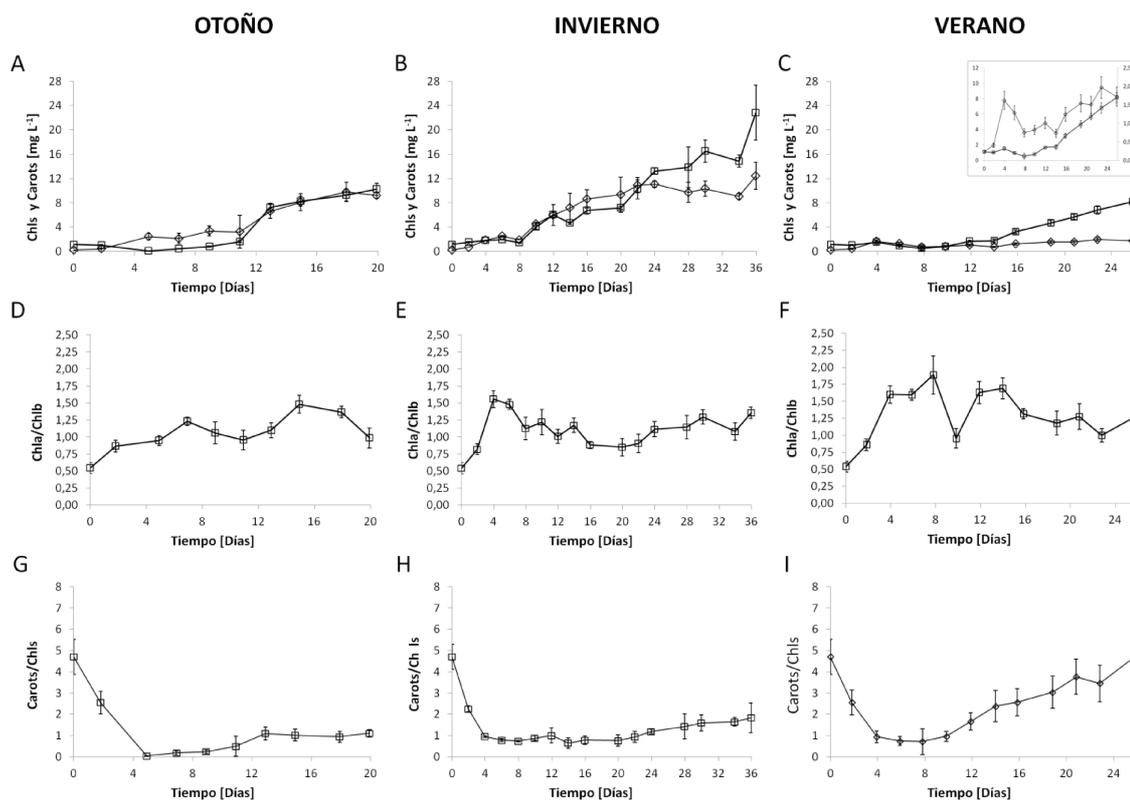


Figura (5). Evolución en el tiempo de: A, B, C) Concentración de clorofilas totales (Chls) y de carotenoides totales (Car). □) Chls [mg L⁻¹], ◇) Car [mg L⁻¹]. D, E, F) Relación entre Chl a y Chl b. G, H, I) Relación entre Car y Chls.

De las Figs. se observa que el contenido de Car decae durante el transcurso de la germinación, y es acompañado de un aumento en las Chls [215]. Para todos los casos, el contenido porcentual máximo de Chls en (M) es de aprox. 1.0%, y decae durante la transición de (M) a (NM) y (A). La relación Chl a/Chl b oscila durante el tiempo de cultivo, con un valor promedio de 1.15. Estos valores son bajos respecto a los presentes en la literatura, de 2-5% para Chls [214], y 2-4 para la relación Chl a/Chl b [218]. La relación Car/Chls es cercana a 1.0 para (M), siendo los valores de literatura cercanos a 0.2 [165]. Esta última diferencia podría deberse a un contenido residual de carotenoides y astaxantina producto de una degradación incompleta durante la germinación de (A). Cabe destacar que los valores de referencia de los indicadores descriptores refieren a cultivos *indoor* bajo condiciones no fluctuantes, e iniciados con (M) en fase de crecimiento exponencial.

Alcanzado (NM), en todos los casos comienza a aumentar el contenido de Car, aún con NO₃⁻ presente en altas concentraciones (al menos 270 mg L⁻¹, NO₃⁻(t₀) de 547 mg L⁻¹). La relación Car/Chls se incrementa en forma considerable en verano, mientras que lo hace más lentamente en otoño e invierno. Las productividades de Car resultan en el siguiente orden: verano (0.86) < invierno (0.63) < otoño (0.49) [mg L⁻¹ día⁻¹]. Para medios completos y en condiciones de iluminación no inhibitorias las máximas productividades alcanzadas son de hasta aprox. 3 [mg L⁻¹ día⁻¹], con contenidos de Car de aprox. 0.6-1.2% [219]. Bajo condiciones de estrés más fuertes los aumentos en las productividades son

notables (ej. alta irradiancia [220], alta salinidad [221], ausencia de P o N [216], agregado de Fe^{2+} [215, 222], agregado de acetato [189, 223], incremento de temperatura [224] o combinaciones de ellas [225], con valores de entre 6-20 [$\text{mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$], y con contenidos porcentuales de 3-4.5 % [172].

Al día 20 de cultivo los contenidos máximos de Car son de 0.59% en verano (A), 1.12% en otoño (A) y 0.83% en invierno (NM). Los contenidos considerando los tiempos finales de cada condición ensayada son de 0.90% en verano (día 26, (A)), 1.12% en otoño (día 20, (A)) y 1.34% en invierno (día 36, (NM)). En días típicos de invierno la biomasa alcanzada es mayor, y finaliza en (NM), con un contenido de Car mayor a (A) de verano y otoño.

El bajo contenido de Car y las productividades alcanzadas podrían deberse a que los perfiles de radiación, y la evolución libre del medio de cultivo (composición, pH, NO_3^-), en parte producto de las condiciones de iluminación, no son inductores potentes de la carotenogénesis.

(5.2.3).- Nitrato (NO_3^-)

Si bien la preferencia en el uso de la fuente de nitrógeno varía de acuerdo a la cepa y los estadios celulares, en la mayoría de los casos el NO_3^- es la fuente inorgánica más adecuada para el crecimiento y la acumulación de astaxantina [205]. El valor de $\text{NO}_3^-(t_0)$ puede tener un efecto significativo sobre la cantidad final de biomasa producida y la velocidad de crecimiento r_x [182, 226], y sobre la biosíntesis y degradación de Chls y Car, etc.

En el presente trabajo se utilizó una $\text{NO}_3^-(t_0)$ dentro del rango recomendado por la literatura (8.82 mM). El NO_3^- decae linealmente durante el tiempo de cultivo, como se muestra en las Figs. ((3A), (3B) y (3C)). Las velocidades a la que el NO_3^- es removido, $r_{\text{NO}_3^-}$, resultan ser similares entre todas las condiciones ensayadas, pese a las diferencias en los perfiles de iluminación y a las composiciones de la biomasa observadas. Para verano $r_{\text{NO}_3^-}$ es de 15.87 [$\text{mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$] ($R^2=0.97$), para invierno de 15.38 [$\text{mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$] ($R^2=0.98$), y para otoño de 15.35 [$\text{mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$] ($R^2=0.99$).

(5.2.4).- Análisis del efecto del diámetro del FBR sobre los perfiles de Qv

H. pluvialis es una microalga de crecimiento lento, y en (M) tiene la particularidad de que su performance es mejor en condiciones de baja iluminación, ya sea fotoperiódica o continua. La mayoría de los procesos industriales de producción de biomasa en (M) se efectúan en condiciones *indoor*, con control de pH, agregado de vitaminas, sin cambios continuos en la iluminación, y en algunos casos con remoción y/o adición de medio de cultivo.

En nuestro trabajo hemos observado que en invierno no se alcanza (A), producto de una combinación de los Qv que componen el perfil y una menor cantidad de horas de iluminación. La razón más probable del corto tiempo de permanencia en (M) es la fluctuación del pH, en niveles muy alejados del óptimo para la síntesis de pigmentos y la división celular. Resulta sumamente necesario implementar un sistema de control de pH para un cultivo exitoso de *H. pluvialis*.

Continuando con la idea de aprovechar la luz solar, y ahora pensando en un proceso “two stage process”, el diámetro del FBR columna podría modificarse tal que el sistema colecte menos luz, lo que sería beneficioso para (M), o que colecte más luz, beneficioso para la inducción de la biosíntesis de Car secundarios y astaxantina en (NM) y (A). La Fig. (6) muestra los perfiles de Q_v que resultan con distintos diámetros de FBR, contenidos en el rango 0.08-0.36 [m].

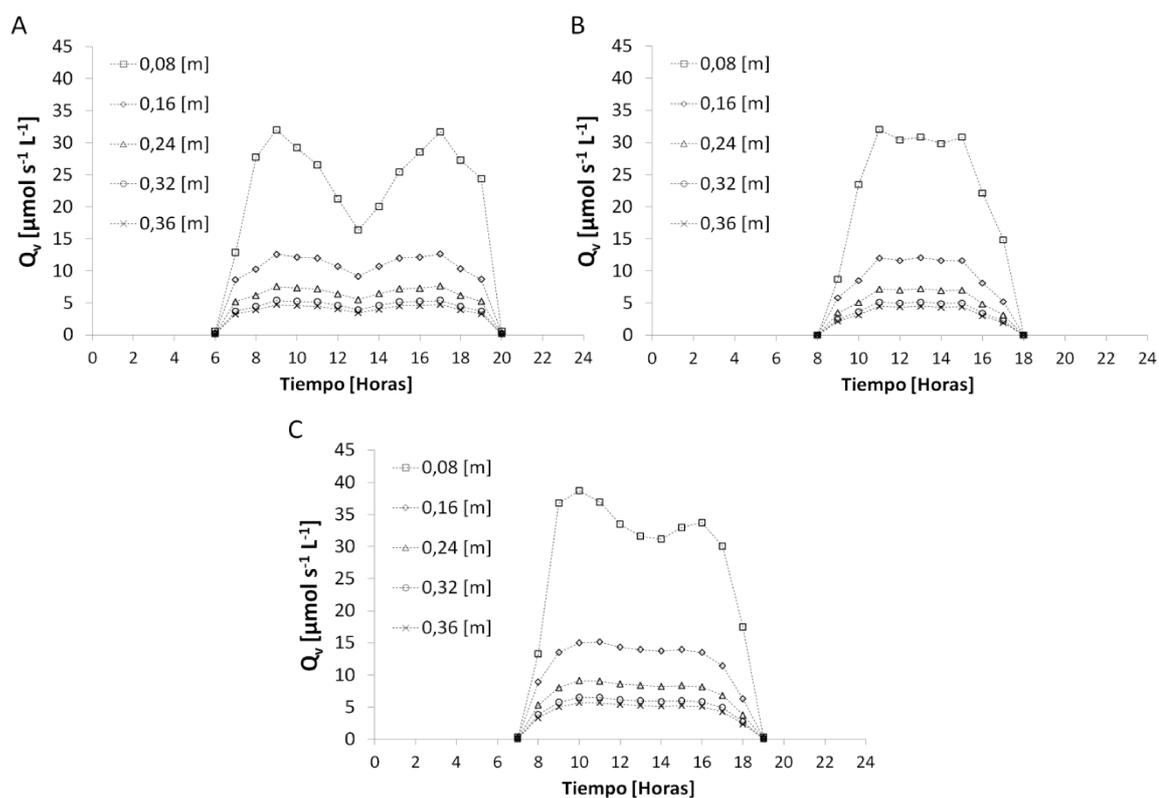


Figura (6). Efecto del diámetro del FBR sobre los perfiles de Q_v para días típicos de: A] Verano, B] Invierno, C] Otoño.

Como se puede observar de la Fig. (6), los perfiles muestran Q_v mayores a medida que el diámetro es reducido. Diámetros pequeños de tubo se asocian a reactores tubulares verticales, una configuración que podría resultar útil para la etapa de estrés. Un aumento en el diámetro del tubo conduce a una reducción en la relación área-volumen, y en los valores de Q_v . Una duplicación en el diámetro testado (0.18 [m]) produce una reducción de un 30% en la cantidad de radiación diaria recibida. Una reducción en los valores de Q_v y en la cantidad de luz diaria recibida por el cultivo, producto del aumento del diámetro del vaso del reactor, podrían ser una alternativa potencial para el crecimiento de (M).

Para efectivamente evaluar el efecto del diámetro sobre el crecimiento de *H. pluvialis*, es necesario efectuar experiencias de cultivo a escala laboratorio, reproduciendo las nuevas condiciones de iluminación *outdoor*.

(6).- CONCLUSIONES

Con fines de producción de biomasa y astaxantina de *H. pluvialis* en condiciones *outdoor* de Santa Fe (Argentina), a escala planta piloto o industrial, es necesario la elección de un FBR, las condiciones de cultivo y las de operación. Para testear estos aspectos, en forma rápida, puede recurrirse a metodologías que persiguen reproducir las condiciones *outdoor* en el laboratorio, como la descrita en el Capítulo (5).

En el presente Capítulo se evaluó el comportamiento de la microalga *H. pluvialis* FAUBA 57 en un reactor columna de burbujeo de 30 L (0.18 [m] de diámetro) en condiciones de iluminación natural de días típicos de verano, otoño e invierno. El crecimiento se efectuó en un medio basal, sin el control de pH, y partiendo de (A). Se analizó la evolución en el tiempo de la biomasa, el contenido de Chls y Car, la productividad de la biomasa y los Car, y la composición de la población de células.

De los resultados experimentales se observa que el perfil de iluminación no tuvo un gran impacto sobre la germinación de (A), pero sí sobre la productividad de la biomasa y de los Car totales, la duración del ciclo de vida, la cantidad de biomasa producida y el contenido de pigmentos. Cuanto más grande es la radiación PAR diaria que recibe el FBR menor es la cantidad de biomasa producida. Por otro lado, a mayor cantidad de luz recibida y mayores valores de flujo radiante, más rápidamente se alcanza el estadio de (A) y el contenido de pigmentos es mayor.

Las productividades de la biomasa son bajas comparadas a otros reportes, pudiéndose deber a la evolución libre del medio de cultivo, especialmente al pH. Resulta indispensable considerar el control del pH en valores cercanos a la neutralidad para futuras experiencias. Las productividades de Car se encuentran dentro de los valores citados en la literatura, correspondientes a condiciones de cultivo donde no se aplican estrategias de estrés fuertes.

Un resultado importante para la geometría de columna vertical, es que permite considerar el escalamiento de la producción de biomasa y pigmentos, a través de un incremento en la longitud de los reactores. Esto sería posible debido a que dos reactores con igual diámetro y diferentes volúmenes presentan el mismo Q_v .

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO

Se caracterizó la emisión de diferentes tipos de LEDs mediante la definición y cuantificación de tres propiedades, la intensidad (relacionada al flujo radiante), la función de distribución direccional, y la espectral. Para ello se adoptó un modelo para el intercambio de energía radiante entre superficies, se efectuaron experiencias con un radiómetro, y se construyeron algoritmos de cálculo en Fortran 90. Con el conocimiento de las propiedades de la fuente artificial de energía radiante fue posible diseñar experiencias (políticas de alimentación de luz de interés) en fotobiorreactores (FBRs), tal de evidenciar y estudiar diferentes fenómenos relacionados a la cantidad, calidad y distribución de luz.

Se efectuaron modificaciones a una metodología basada en el método de Monte Carlo (MC) para la simulación del campo de energía radiante (CER) en suspensiones de microalgas, que permiten reducir significativamente el tiempo computacional y la complejidad (menos propensos a cierres inesperados por exceso de restricciones) de los algoritmos de cálculo de las propiedades del CER. Con el nuevo método propuesto se generaron algoritmos *ad hoc* en Fortran 90 para todos los reactores y fuentes de luz utilizados en la presente Tesis.

Se analizó el efecto de diferentes composiciones de la luz que alimenta a una suspensión de *Scenedesmus quadricauda*. Se utilizaron arreglos de LEDs que emiten las longitudes de onda λ más absorbibles en la fotosíntesis, aquellas contenidas en las regiones azul y roja del espectro visible. Todas las experiencias se efectuaron con igual cantidad total de fotones suministrados por unidad de volumen, siendo esta además constante en el tiempo. La velocidad de crecimiento de la biomasa y el contenido de Chls en las células fueron mayores a medida que se incrementaba la fracción de luz azul. La alteración en la cantidad de pigmentos es producto de que la luz azul estimula la síntesis de Chls, resultando en complejos de pigmentos de captación de luz / antenas más grandes, lo que conlleva a una menor eficiencia en el uso de la luz.

Considerando un modelo de absorción de luz sin interacción, concluimos que la eficiencia en el uso de la luz no es el resultado de la contribución independiente de cada fracción de fotones de diferentes longitudes de onda λ que llegan al reactor, sino que estas fracciones interfieren entre sí en el proceso de absorción. En otras palabras, el rendimiento de fotones para cada longitud de onda λ individual es función de la concentración de biomasa y de la luz que ilumina el cultivo. En todos los casos, independientemente de la composición espectral de la luz suministrada, el rendimiento de los fotones disminuye a medida que la concentración de biomasa aumenta, debido a la estratificación de luz.

Existen antecedentes de que la luz azul y la roja no sólo modifican los aspectos relacionados a la absorción de luz, sino que también la composición de las macromoléculas en la biomasa, como lípidos, carbohidratos y proteínas. Para metabolitos de alto valor, a partir de la biomasa de microalgas propagadas *indoor*, las herramientas de simulación y de diseño de fuentes de luz generadas pueden ser de mucha utilidad. Resulta de interés efectuar cultivos bajo una política de suministro de luz dinámica, es decir, oscilar entre iluminación roja y azul, dado que se ha observado que la aclimatación de los pigmentos ocurre en una escala de tiempo de horas. Esto podría conducir a un uso más eficiente de la luz suministrada y a mayores productividades.

La estratificación de la luz en el medio de cultivo comúnmente conduce a bajas eficiencias fotosintéticas y a bajas productividades. Se analizó el efecto de diferentes grados de estratificación sobre la productividad de una suspensión de *S. quadricauda* en un FBR escala laboratorio, y se cuantificó el grado de estratificación con una expresión analítica para la función de distribución de velocidades volumétricas de absorción de fotones. Los niveles de estratificación se generaron a partir de diferentes concentraciones de biomasa y disposiciones de la fuente de luz LED en la pared del reactor. Todas las experiencias se efectuaron con igual cantidad total de fotones suministrados por unidad de volumen, constante en el tiempo. Se observó que un aumento de la concentración de biomasa se acompañó de una reducción en la energía absorbida por unidad de biomasa, lo que provocó una reducción de la velocidad de crecimiento específica, un aumento en la síntesis de clorofilas (aclimatación) y una disminución de la eficiencia fotosintética. Bajo nuestras condiciones de trabajo, podemos afirmar que la distribución de energía radiante en el cultivo es determinante en la productividad del FBR. Sin embargo, si el efecto sobre la productividad va a ser favorable o desfavorable dependerá de si el impacto positivo de un aumento en la velocidad volumétrica promedio de absorción de fotones es superado por el efecto negativo de una disminución en la eficiencia en el uso de la radiación absorbida. Las herramientas generadas permiten comparar FBRs en términos de la absorción de fotones, y así elegir los mejores diseños para una cepa de microalga considerada. Es de interés evidenciar los efectos de niveles de estratificación mayores a los evaluados en el presente estudio (condiciones de iluminación y concentraciones de biomasa de sistemas *outdoor*).

Se propuso y desarrolló un primer enfoque para estimar la productividad de FBRs *outdoor* iluminados con luz solar, de escala de planta piloto o producción, reales o hipotéticos, basado en el uso de un reactor comercial de laboratorio y un módulo LED programable. Las experiencias persiguen reproducir fielmente en laboratorio las condiciones de iluminación *outdoor*, en términos del número de fotones por unidad de tiempo y volumen (flujo volumétrico) que recibe externamente el cultivo. Se caracterizó la radiación de un módulo LED, y se calculó cuanta luz impacta en las paredes del reactor comercial, operando en una capacidad de emisión del 100%. Esto permitió conocer las condiciones de operación del sistema de iluminación, para posteriormente reproducir cualquier perfil de flujo

volumétrico de interés. Las herramientas se generaron abordando el caso de un reactor columna de burbujeo de 30 L localizado en Santa Fe, para el cual se obtuvieron, a partir de datos históricos de radiación solar local, los perfiles de luz horarios para días típicos del año. La potencialidad de simular reactores columna surgió de un análisis del CER en diferentes escenarios (biomasa, clorofilas, perfiles de iluminación). Se discutieron los aspectos que podrían conducir a que las productividades estimadas difieran de las reales, y se propusieron algunas formas operativas que potencialmente podrían ser útiles para salvar esto. Es necesario encontrar estrategias que permitan simular la conducta de reactores con geometrías muy alejadas a las del reactor comercial (ej. generar distribuciones particulares sobre la pared del reactor, agregar elementos externos que permitan generar ciclos de luz oscuridad, etc.), y contar con reactores de planta piloto para validar la propuesta efectuada. El potencial de la metodología no sólo radica en la estimación de productividades, sino que puede ser utilizada como un criterio para el escalamiento de cultivos de microalgas, en las etapas de síntesis de FBRs y fuentes de radiación.

Se analizó el crecimiento autotrófico de una cepa nativa de *Haematococcus pluvialis*, una microalga con actual interés biotecnológico, industrial y comercial (acumula astaxantina), bajo condiciones de iluminación *outdoor* correspondientes a un reactor columna de burbujeo de 30 L. Se eligieron días típicos de invierno, verano y otoño, debido a que difieren en fotoperíodo, en la cantidad de luz diaria que alcanza al reactor, y en los valores de flujo volumétrico. Los cultivos fueron efectuados en forma *batch*, con control de aireación, agitación y temperatura, pero dejando evolucionar libremente el pH. La suspensión inoculada consistió de aplanosporas, tal de analizar la posibilidad de comenzar un cultivo con el producto de una etapa de estrés (pensando en una estrategia de *two stage process*). El perfil de iluminación tuvo un gran impacto sobre la productividad de la biomasa y de los carotenoides totales, la duración del ciclo de vida, la cantidad de biomasa producida y el contenido de pigmentos. Las productividades fueron significativamente más bajas que los reportes bibliográficos. Se concluyó que es necesario incorporar un sistema de control de pH (pudiendo ser una corriente de CO₂), con el fin de aumentar el tiempo de permanencia de la microalga en el estadio de crecimiento vegetativo, y lograr mayores productividades. Por último, en base a los resultados experimentales obtenidos, se propusieron diseños de reactores columna y tubulares para un proceso de producción de astaxantina basado en la metodología *two stage process*.

Las herramientas generadas por el GiiB durante la formación doctoral están siendo utilizadas en instancias de formación académica y profesional de alumnos de grado de la carrera de Lic. en Biotecnología de la FBCB (pasantías extracurriculares en investigación y desarrollo, trabajos finales de Lic. en Biotecnología). También se han efectuado instancias de transferencia de conocimiento a grupos de investigación de biotecnología de algas, así como a empresas interesadas en incorporar microalgas a sus productos (diseño de FBRs, cultivo, cosecha de biomasa, etc.).

El trabajo forma parte de un proyecto de mayor envergadura del GiiB, en el cual se abordan diferentes aspectos del cultivo de microalgas, mediante la incorporación de conocimientos de biología, termodinámica, bioquímica, matemática y físico - química.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] P Falkowski, RT Barber, V Smetacek (1998) Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary productivity. *Science* 281: 200-206.
- [2] CB Field, MJ Behrenfeld, JT Randerson, P Falkowski (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281: 237-240.
- [3] SM Adl, AGB Simpson, CE Lane, J Lukeš, D Bass, SS Bowser, MW Brown, F Burki, M Dunthorn, V Hampl, A Heiss, M Hoppenrath, E Lara, L le Gall, DH Lynn, H McManus, EAD Mitchell, SE Mozley-Stanridge, LW Parfrey, J Pawlowski, S Rueckert, L Shadwick, CL Schoch, A Smirnov and FW Spiegel (2012) The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59: 429-514.
- [4] L Taiz, E Zeiger (2003), Chapter 7 -Photosynthesis: The Light Reactions- En: Plant physiology (3rd Edition), Sinauer Associates, USA, p. 111-143.
- [5] JA Raven, S Donnelly (2013) The potential for photosynthesis using the radiation from low-temperature black bodies. En: *Habitability of Other Planets and Satellites*, (Ed: JP Devera, J Seckbach), Springer, p. 269-284.
- [6] BW Holman, AE Malau-Aduli (2013) *Spirulina* as a livestock supplement and animal feed. *J. Anim. Physiol. Anim. Nut.*, 97(4): 615-23.
- [7] F Camacho, A Macedo, F Malcata (2019) Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review. *Mar Drugs*. 17(6): 312.
- [8] P Janczyk, B Halle, WB Souffrant (2009) Microbial community composition of the crop and ceca contents of laying hens fed diets supplemented with *Chlorella vulgaris*. *Poultry Science*, 88(11): 2324-2332.
- [9] YL Jiang, W Zhang, JF Wang, Y Chen, SH Shen, TZ Liu (2013) Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresour. Technol.* 128: 359-364.
- [10] Yamaha Motor. <https://global.yamaha-motor.com/news/2005/0706/bio.html>. Último acceso: 12/09/2019.
- [11] Metales pesados presentes en diferentes tipos de efluentes industriales. <https://www.mendoza.conicet.gov.ar/portal/enciclopedia/terminos/Efluentes.htm>. Último acceso: 12/09/2019.
- [12] V Matamoros, Y Rodríguez (2016) Batch vs continuous-feeding operational mode for the removal of pesticides from agricultural run-off by microalgae systems: a laboratory scale study. *J. Hazard Mater.* 309: 126-132.
- [13] B Petrie, R Barden, B Kasprzyk-Hordern (2015) A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72: 3-27.
- [14] J Stevenson, L Graham (2014) Ecological assessments with algae: a review and synthesis. *J Phycol* 50(3): 437-461.
- [15] X Tang, LY He, XQ Tao, Z Dang, CL Guo, GN Lu, XY Yi (2010) Construction of an artificial microalgal-bacterial consortium that efficiently degrades crude oil. *J. Hazard Mater.* 181(1): 1158-1162.
- [16] MA Borowitzka (2013) High-value products from microalgae-their development and commercialization. *J. Appl. Phycol.* 25: 743-756.

- [17] Fucoxantina. <https://www.algatech.com/algatech-product/fucovital/>. Último acceso: 12/09/2019.
- [18] Ficocianina. <http://neotalgae.es/es/tienda/alimentacion/ficocianina/>. Último acceso: 12/09/2019.
- [19] N Korbee, F López-Figueroa, J Aguilera (2006) Acumulación de aminoácidos tipo micosporina (MAAs): biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Revista chilena de historia natural* 79(1): 119-132.
- [20] J Liu, M Sommerfeld, Q hu (2013) Screening and characterization of *Isochrysis* strains and optimization of culture conditions for docosahexaenoic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(11): 4785-4798.
- [21] P Kiran Kumar, S Vijaya Krishna, K Verma, K Pooja, D Bhagawan, K Srilatha, V Himabindu (2018) Bio oil production from microalgae via hydrothermal liquefaction technology under subcritical water conditions. *J. Microbiol. Methods* 153: 108-117.
- [22] A Dubini, D González-Ballester (2016), Chapter 10 -Biohydrogen from Microalgae- En: *Algae Biotechnology: Products and Processes*, (Ed: F Bux, Y Chisti), Springer, p. 165-194.
- [23] R Ramaraj, N Dussadee (2015) Biological Purification Processes for Biogas Using Algae Cultures: A Review. *International Journal of Sustainable and Green Energy* 4: 20-32.
- [24] L Sanchez Rizza, ME Sanz Smachetti, M Do Nascimento, GL Salerno, L Curatti (2017) Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. *Algal Res.* 22: 140-147.
- [25] DS Domozych, M Ciancia, JU Fangel, MD Mikkelsen, P Ulvskov, WG Willats (2012) The cell walls of green algae: A journey through evolution and diversity. *Front. Plant Sci.* 3: 82.
- [26] MJ Scholz, TL Weiss, RE Jinkerson, J Jing, R Roth, U Goodenough, MC Posewitz, HG Gerken (2014) Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryot Cell* 13(11): 1450-1464.
- [27] JAV Costa, MG De Morais (2011) The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresour. Technol.* 102: 2-9.
- [28] M Mondal, S Goswami, A Ghosh (2017) Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. *3 Biotech* 7: 99.
- [29] B Singh, A Guldhe, P Singh, A Singh, I Rawat, F Bux (2015), -Sustainable production of biofuels from microalgae using a biorefinary approach-. En: *G. Applied environmental biotechnology: Present scenario and future trends*, Kaushik (Ed: G. Kaushik), Springer, p. 115-128.
- [30] KK Sharma, H Schuhmann, PM Schenk (2012) High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5(12): 1532-1553.
- [31] CV Zannol (2013) Factibilidad económica de producción de biodiesel a partir de microalgas en Argentina, Tesis en Gestión ambiental.
- [32] Y Chisti (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3) 294-306.
- [33] Y Collos, PJ Harrison (2014) Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Mar Pollut Bull.* 80(1-2): 8-23.
- [34] D Vandamme, I Foubert, I Fraeye, B Meesschaert, K Muylaert (2012) Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresour. Technol.* 105: 114-119.
- [35] FG Acien Fernández, JM Fernández Sevilla, JJ Magán, E Molina Grima (2012) Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol. Adv.* 30: 1344-1353.

- [36] WJ Oswald, CG Golueke (1968) -Large scale production of microalgae-. En: Single Cell Protein (Ed: RI Mateless, SR Tannenbaum), MIT Press, Cambridge, p. 271-305.
- [37] MA Borowitzka (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70(1-3): 313-321.
- [38] Y Chisti (2013) Raceways-based production of algal crude oil. *Green* 3: 195-216.
- [39] JBK Park, RJ Craggs, AN Shilton (2011) Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 102: 35-42.
- [40] JP Hoffmann (1998) Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology* 34: 757-763.
- [41] JC Weissman, RP Goebel (1987) Design and analysis of microalgal open pond systems for the purpose of producing fuels: a subcontract report. <https://www.nrel.gov/docs/legosti/old/2840.pdf>. Último acceso: 12/09/2019.
- [42] A Richmond, Z Cheng-Wu (2001) Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis sp.* outdoors. *J. Biotechnol.* 85: 259-269.
- [43] JU Grobbelaar, L Nedbal, L Tichy, I Setlik, L Setlik (1995) Variation in some photosynthetic characteristics of microalgae cultured in outdoor thin-layered sloping reactors. *J. Appl. Phycol.* 7: 175-184.
- [44] R Bosma, JH de Vree, PM Slegers, M Janssen, RH Wijffels, MJ Barbosa (2014) Design and construction of the microalgal pilot facility AlgaePARC. *Algal Res* 6: 160-169.
- [45] DB da Fonseca, LT Guerra, ET Santos, SH Mendonça, JG Silva, LA Costa, JC Navalho (2016), Chapter 13 -ALGAFARM: A Case Study of Industrial *Chlorella* Production-En: Microalgal Production for Biomass and High Value Products (Ed: SP Slocombe, JR Beneman), Taylor and Francis Group, New York, p. 295-309.
- [46] MH Huesemann, T Dale, A Chavis, B Crowe, S Twary, A Barry, D Valentine, R Yoshida, M Wigmosta, V Cullinan (2017) Simulation of outdoor pond cultures using indoor LED-lighted and temperature-controlled raceway ponds and Phenometrics photobioreactors. *Algal Res* 21, 178-190.
- [47] FG Acien Fernández, E Molina Grima, A Reis, G Torzillo, GC Zittelli, C Sepúlveda, J Masojídek (2017), Chapter 1 -Photobioreactors for the production of microalgae- En: Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts (Ed: CG Gonzalez-Fernandez, R Muñoz), Woodhead Publishing, p. 1-44.
- [48] MR Tredici (2004) Mass production of microalgae: photobioreactors. En: Handbook of Microalgal Cultures, Biotechnology and Applied Phycology (Ed: A Richmond), Blackwell, Oxford, p. 178-214.
- [49] G Torzillo, GC Zittelli (2015) -Products and Refinery Design- En: Algal Biorefineries (Ed: A Prokop, RK Bajpai, ME Zappi) Springer, p. 187-212.
- [50] NH Norsker, MJ Barbosa, MH Vermue, RH Wijffels (2011) Microalgal production-a close look at the economics. *Biotechnol. Adv.* 29: 24-27.
- [51] MR Tredici, GC Zittelli, L Rodolfi (2010) -Photobioreactors-. En: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (Ed: MC Flickinger), Wiley, Hoboken, NJ, p. 3821-3838.
- [52] AP Carvalho, LA Meireles, FX Malcata (2006) Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 22 (6): 1490-1506.

- [53] M Olaizola, ME Huntley (2003), -Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae- En: *Recent Advances in Marine Biotechnology 9: Biomaterials and Bioprocessing* (Ed: M Fingerman, R Nagabhushaman), Science Publishers, New Hampshire, p. 143-164.
- [54] GC Zittelli, N Biondi, L Rodolfi, MR Tredici (2013), Chapter 13 -Photobioreactors for Microalgal Biofuel Production- En: *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (2nd Edition) (Ed: A Richmond, Q Hu), John Wiley and Sons, p. 225-266.
- [55] EG Nwoba, DA Parlevliet, DW Laird, K Alameh, NR Moheimani (2019) Light management technologies for increasing algal photobioreactor efficiency. *Algal Res.* 39.
- [56] J Masojídek, G Torzillo (2008) -Mass Cultivation of Freshwater Microalgae- En: *Encyclopedia of Ecology* (Ed: SE Jørgensen, BD Fath), Academic Press, Oxford, UK, p. 2226-2235.
- [57] Q Huang, F Jiang, L Wang, C Yang (2017) Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering* 3(3): 318-329.
- [58] N Yeh, JP Chung (2009) High-brightness LEDs-Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13(8): 2175-2180.
- [59] PS Schulze, LA Barreira, HG Pereira, JA Perales, JC Varela (2014) Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends Biotechnol.* 32(8): 422-30.
- [60] M Glemser, M Heining, J Schmidt, A Becker, D Garbe, R Buchholz, T Brück (2015) Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100(3): 1077-1088.
- [61] Seoul Semiconductor, SunLike LEDs. <http://www.seoulsemicon.com/en/product/SunLike/>. Último acceso: 08/08/2019.
- [62] Skye Instruments Limited: Instruments for monitoring our environment, PAR sensors. <https://www.skyeinstruments.com/applications/commercial-horticulture/light-sensors-systems-commercial-horticulture/par-quantum-sensors/>. Último acceso: 08/08/2019.
- [63] Ocean Optics, Inc. <https://oceanoptics.com/product-category/usb-series/>. Último acceso: 08/08/2019.
- [64] E Molina Grima, FG Acién Fernández, F García Camacho, Y Chisti (1999) Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J. Biotechnol.* 70: 231-247.
- [65] FC Rubio, F García Camacho, JM Sevilla, Y Chisti, E Molina Grima (2003) A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnol. Bioeng.* 81: 459-473.
- [66] I Niizawa, RJ Leonardi, HA Irazoqui, JM Heinrich (2016) Light wavelength distribution effects on the growth rate of *Scenedesmus quadricauda*, *Biochem. Eng. J.* 126: 126-134.
- [67] FG Acién Fernández, JM Fernández Sevilla, E Molina Grima (2013) Photobioreactors for the production of microalgae. *Environmental Science and Bio/Technology* 12(2).
- [68] MN Ozisik (1973), Chapter 8 -Basic Relations for Radiative Heat Transfer in Participating Media- En: *Radiative Transfer and Interactions with Conduction and Convection*, John Wiley and Sons New York, p. 249-253.
- [69] H Berberoglu, L Pilon (2007) Experimental measurement of the radiation characteristics of *Anabaena variabilis* ATCC 29413-U and *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 49419. *Int. J. Hydrogen Energy* 32(18): 4772-4785.
- [70] H Berberoglu, A Melis, L Pilon (2008) Radiation characteristics of *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 and its truncated chlorophyll antenna transformants tla1, and tla1-CW. *Int. J. Hydrogen Energy* 33(22): 6467-6483.

- [71] H Berberoglu, L Pilon (2009) Radiation characteristics of *Botryococcus braunii*, *Chlorococcum littorale*, and *Chlorella sp.* used for CO₂ fixation and biofuel production. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 110: 1879-1893.
- [72] L Pottier, J Pruvost, J Deremetz, JF Cornet, J Legrand, CG Dussap (2005) A fully predictive model for one-dimensional light attenuation by *Chlamydomonas reinhardtii* in a torous photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 91(56): 9-582.
- [73] J Pruvost, J Legrand, P Legentilhomme, A Muller-Feuga (2002) Simulation of microalgae growth in limiting light conditions: flow effect. *Am. Inst. Chem. Eng.* 48 (5): 1109-1120.
- [74] JF Cornet, CG Dussap, G Dubertret (1992) A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: I. Coupling between light transfer and growth kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 40 (7): 817-825.
- [75] JF Cornet, CG Dussap, P Cluzel, G Dubertret (1992) A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. *Biotechnol. Bioeng.* 40 (7): 826-834.
- [76] JF Cornet, CG Dussap, JB Gross, C Binois, C Lasseur (1995) A simplified monodimensional approach for modeling by coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. *Chem. Eng. Sci.* 50 (9): 1489-1500.
- [77] J Dauchet, S Blanco, JF Cornet, ME Hafi, V Eymet, R Fournier (2013) The practice of recent radiative transfer Monte Carlo advances and its contribution to the field of microorganisms cultivation in photobioreactors. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 128: 52-59.
- [78] JM Heinrich, I Niizawa, FA Botta, AR Trombert, HA Irazoqui (2012a) Analysis and design of photobioreactors for microalgae production I: Method and parameters for radiation field simulation. *J. Photochem. Photobiol.* 88: 938-951.
- [79] JM Heinrich, I Niizawa, FA Botta, AR Trombert, HA Irazoqui (2012b) Analysis and design of photobioreactors for microalgae production II: Experimental Validation of a radiation field simulator based on a Monte Carlo algorithm. *J. Photochem. Photobiol.* 88: 952-960.
- [80] JM Heinrich, I Niizawa, FA Botta, AR Trombert, HA Irazoqui (2013) Stratification of the radiation field inside a photobioreactor. *J. Photochem. Photobiol.* 89: 1127-1134.
- [81] I Niizawa, JM Heinrich, HA Irazoqui (2014) Modeling of the influence of light quality on the growth of microalgae in a laboratory scale photo-bio-reactor irradiated by arrangements of blue and red LEDs. *Biochem. Eng. J.* 90: 214-223.
- [82] JM Heinrich (2013), –Anexo 3 Capítulo 7- En: Tesis Doctoral: Construcción, diseño, análisis y puesta en funcionamiento de un foto-bio-reactor: modelado del campo radiante, de los fenómenos de transferencia de materia y de la cinética de crecimiento de algas microscópicas de interés tecnológico, p. 295.
- [83] C Yan, L Zhu, Y Wang (2016) Photosynthetic CO₂ uptake by microalgae for biogas upgrading and simultaneously biogas slurry decontamination by using of microalgae photobioreactor under various light wavelengths, light intensities, and photoperiods. *Appl. Energy* 178: 9-18.
- [84] P Falkowsky, J La Roche (1991) Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27: 8-14.
- [85] W Rudiger, F López-Figueroa (1992) Photoreceptors in algae. *Photochem. Photobiol.* 55(6): 949-954.
- [86] Z Dubinsky, N Stambler (2009) Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications. *Aquat. Microb. Ecol.* 56: 163-176.
- [87] F López-Figueroa, FX Niell (1990) Effects of light quality on chlorophyll and biliprotein accumulation in seaweeds. *Mar. Biol.* 104: 321-327.

- [88] S Baer, M Heining, P Schwerna, R Buchholz, H Hübner (2016) Optimization of spectral light quality for growth and product formation in different microalgae using a continuous photobioreactor. *Algal Res.* 14: 109-115.
- [89] M Kula, M Rys, K Mozdzeń, A Skoczowski (2013) Metabolic activity, the chemical composition of biomass and photosynthetic activity of *Chlorella vulgaris* under different light spectra in photobioreactors. *Eng. Life Sci.* 14(1): 57-67.
- [90] JM Mercado, MDP Sánchez-Saavedra, G Correa-Reyes, L Lubián (2004) Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquat. Bot.* 78: 265-277.
- [91] MT Gutierrez-Wing, A Silaban, J Barnett, K Rusch (2014) Light irradiance and spectral distribution effects on microalgal bioreactors. *Eng. Life Sci.* 14: 574-580.
- [92] PS Schulze (2013) -Introduction- En: Master Thesis: Effects of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on microalgal production, p. 12-16.
- [93] C Wilhelm, P Kramer, A Wild (1985) Effect of different light qualities on the ultrastructure, thylakoid membrane composition and assimilation metabolism of *Chlorella fusca*. *Physiologia Plantarum* 64(3): 359-364.
- [94] TH Kim, Y Lee, SH Han, SJ Hwang (2013) The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus sp.* for wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 130: 75-80.
- [95] F Abiusi, G Sampietro, G Marturano, N Biondi, L Rodolfi, M D'Ottavio, MR Tredici (2014) Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. *Biotechnology and bioengineering* 111(5): 956-964.
- [96] J Thielmann, P Galland, H Senger (1991) Action spectra for photosynthetic adaptation in *Scenedesmus obliquus* I: Chlorophyll biosynthesis under autotrophic growth. *Planta* 183: 334-339.
- [97] AN Ramya, PS Ambily, BS Sujitha, A Muthu, MK Kumar (2017) Single cell lipid profiling of CASA-CC202 under nitrogen starved condition by surface enhanced Raman scattering (SERS) fingerprinting. *Algal Res.* 25: 200-206.
- [98] J Anand, M Arumugam (2015) Enhanced lipid accumulation and biomass yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition. *Bioresour. Technol.* 188: 190-194.
- [99] RJ Ritchie (2008) Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol or ethanol solvents. *Photosynthetica* 46(1): 115-126.
- [100] E Goldman, R Jacobs (1991) Determination of nitrates by ultraviolet absorption. *J. Am. Water Works Assoc.* 53-187.
- [101] M Mitra, A Melis (2008) Optical properties of microalgae for enhanced biofuels production. *Opt. Express* 16(26): 21807-21820.
- [102] VH Smith (1983) Light and nutrient dependence of photosynthesis by algae. *J. Phycol.* 19: 306-313.
- [103] D Hermsmeier, E Mala, R Schulz, J Thielmann, P Galland, H. Senger (1991) Antagonistic blue- and red-light regulation of *cab*-gene expression during photosynthetic adaptation in *Scenedesmus obliquus*. *J. Photochem. Photobiol.* 11: 189-202.
- [104] K Humbeck, B Hoffmann, H Senger (1988) Influence of energy flux and quality of light on the molecular organization of the photosynthetic apparatus in *Scenedesmus*. *Planta* 73: 205-212.

- [105] J Masojídek, J Kopecký, M Koblížek, G Torzillo (2004) The xanthophyll cycle in green algae (Chlorophyta): its role in the photosynthetic apparatus. *Plant Biol.* 6: 342-349.
- [106] A Melis (2009) Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Sci.* 177: 272-280.
- [107] A Melis, J Neidhardt, JR Benemann (1999) *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *J. Appl. Phycol.* 10: 515-525.
- [108] JH Mussgnug, S Thomas-Hall, J Rupprecht, A Foo, V Klassen, A McDowall, PM Schenk, O Kruse, B Hankamer (2007) Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion. *Plant Biotechnol J.* 5(6): 802-814.
- [109] DR Ort, X Zhu, A Melis (2011) Optimizing antenna size to maximize photosynthetic efficiency. *Plant physiology* 155(1): 79-85.
- [110] C Formighieri, F Franck, R Bassi (2012) Regulation of the pigment optical density of an algal cell: filling the gap between photosynthetic productivity in the laboratory and in mass culture. *Journal of biotechnology* 162(1): 115-123.
- [111] Z Perrine, S Negi, RT Sayre (2012) Optimization of photosynthetic light energy utilization by microalgae. *Algal Res* 1: 134-142.
- [112] JH Kwon, G Bernat, H Wagner, M Rogner, S Rexroth (2013) Reduced light-harvesting antenna: Consequences on cyanobacterial metabolism and photosynthetic productivity. *Algal Res* 2(3): 188-195.
- [113] Y Nakajima, R Ueda (2000) The effect of reducing light-harvesting pigment on marine microalgal productivity. *J Appl Phycol* 12(3-5): 285-290.
- [114] A Melis, A Murakami, JA Nemson, K Aizawa, K Ohki, Y Fujita (1996) Chromatic regulation in *Chlamydomonas reinhardtii* alters photosystem stoichiometry and improves the quantum efficiency of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 47: 253-265.
- [115] L Pilon, H Berberoglu, R Kandilian (2011) Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 112 (17): 2639-2660.
- [116] JU Grobbelaar, L Nedbal, V Tichý (1996) Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photo-acclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. *J. Appl. Phycol.* 8(4-5): 335-343.
- [117] C Vejrazka, M Janssen, M Streefland, R Wijffels (2011) Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in flashing light. *Biotechnol. Bioeng.* 108: 2905-2913.
- [118] A Lunka, D Bayless (2013) Effects of flashing light-emitting diodes on algal biomass productivity. *J. Appl. Phycol.* 25(6): 1679-1685.
- [119] E Sforza, D Simionato, GG Giacometti, A Bertucco, T Morosinotto (2012) Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS One* 7(6): e38975.
- [120] B Gris, T Morosinotto, GM Giacometti, A Bertucco, E Sforza (2014) Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors: effects of light intensities and light-dark cycles on growth, productivity, and biochemical composition. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172(5): 2377-2389.
- [121] ME Martínez, S Sánchez, JM Jiménez, F El Yousfi, L Muñoz (2000) Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 73 (3): 263-272.
- [122] VS Ferreira, RF Pinto, C Sant'Anna (2016) Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. *J. Appl. Microbiol.* 3: 661-670.

- [123] VS Ferreira, C Sant'Anna (2017) Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33(1): 20.
- [124] EDG Danesi, CO Rangel-Yagui, JCM Carvalho, S Sato (2004) Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenergy* 26(4): 329-335.
- [125] H Senger, P Fleischhacker (1978) Adaptation of the photosynthetic apparatus of *Scenedesmus obliquus* to strong and weak light conditions. *Physiol. Plant.* 43: 35-42.
- [126] AP Carvalho, SO Silva, JM Baptista, FX Malcata (2011) Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1275-1288.
- [127] WM Darley (1982), Chapter 3- Phytoplankton: Environmental Factors Affecting Growth-. En: *Algal biology: a physiological approach*. Blackwell Scientific Publications, Belgium, p. 921-952.
- [128] B Demmig-Adams, WW Adams III (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual review of plant biology* 43(1): 599-626.
- [129] T de Mooij (2016). Chapter 4- Effect of photoacclimation on microalgae mass culture productivity- En: Tesis Doctoral "Antenna size reduction in microalgae mass culture", p. 83.
- [130] JU Grobbelaar, N Kurano (2003) Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation. *J. Appl. Phycol.* 15(2-3): 121-126.
- [131] T de Mooij (2016), Chapter 3-Impact of light color on photobioreactor productivity – En: Tesis Doctoral "Antenna size reduction in microalgae mass culture", p. 44.
- [132] W Blanken, PR Postma, L de Winter, RH Wijffels, M Janssen (2016) Predicting microalgae growth, *Algal Res* 14: 28-38.
- [133] K Zhang, N Kurano, S Miyachi (2002) Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25: 97-101.
- [134] H Qiang, A Richmond (1996) Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 8: 139.
- [135] JU Grobbealar (1989) Do light/dark cycles of medium frequency enhance phytoplankton productivity?. *J. Appl. Phycol.* 4(1): 333-340.
- [136] BF Lucker, CC Hall, R Zegarac, DM Kramer (2014) The environmental photobioreactor (ePBR): An algal culturing platform for simulating dynamic natural environments. *Algal Res* 6: 242-249.
- [137] SM Secker, PJ Littlefair (1987) Daylight availability and lighting use: Geographical variations. *Lighting Research and Technology* 19(2): 25-34.
- [138] V Khavrus, I Shelevytsky (2012) Geometry and the physics of seasons. *Physics Education* 47(6): 680-691.
- [139] JA Duffie, WA Beckman (2013) -Part 1: Fundamentals. En: *Solar Engineering of Thermal Processes*, John Wiley and Sons New Jersey, p. 10.
- [140] JM Heinrich (2016), Capítulo 3- Escalado en Reactores PP-PTLC - En: Tesis de Maestría "Producción de microalgas con fines alimenticios y energéticos", p. 85-112.
- [141] ED Albizzati, GH Rossetti, OM Alfano (1997) Measurements and predictions of solar radiation incident on horizontal surfaces at Santa Fe, Argentina (31° 39'S, 60° 43'W). *Renewable Energy* 11(4): 469-478.

- [142] SMARTS v. 2.9.2. <https://www.nrel.gov/grid/solar-resource/smarts.html>. Último acceso: 15/08/2019.
- [143] AC Apel, D Weuster-Botz (2015) Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments. *Bioprocess Biosyst Eng.* 38(6): 995-1008.
- [144] CA Gueymard, D Myers, K Emery (2002) Proposed reference irradiance spectra for solar energy system testing. *Solar Energy* 73(6): 443-467.
- [145] SW Hogewoning, P Douwstra, G Trouwborst, W van Ieperen, J Harbinson (2010) An artificial solar spectrum substantially alters plant development compared with usual climate room irradiance spectra. *J Exp Bot* 61: 1267-1276.
- [146] D Parlevliet, NR Moheimani (2014) Efficient conversion of solar energy to biomass and electricity. *Aquat Biosyst.* 10: 4.
- [147] J Ross, M Sulev (2000) Sources of errors in measurements of PAR. *Agric. For. Meteorol.* 100: 103-125.
- [148] M Chen, RE Blankenship (2011) Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 16(8): 427-31.
- [149] KM Weyer, DR Bush, A Darzins, BD Willson (2010) Theoretical maximum algal oil production. *Bioenerg Res* 3: 204-213.
- [150] JF Escobedo, EN Gomes, AP Oliveira, J Soares (2011) Ratios of UV, PAR and NIR components to global solar radiation measured at Botucatu site in Brazil. *Renew. Energy* 36: 169-178.
- [151] T Bat-Oyun, M Shinoda, M Tsubo (2012) Effects of cloud, atmospheric water vapor, and dust on photosynthetically active radiation and total solar radiation in a Mongolian grassland. *J. Arid Land* 4: 349-356.
- [152] NOAA (2014) SURFRAD network: desert rock, NV. <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/grad/surfrad/desrock.html>. Último acceso: 15/08/2019.
- [153] M Dyble, N Narendran, A Bierman, T Klein (2005) Impact of dimming white LEDs: chromaticity shifts due to different dimming methods. https://www.lightingassociates.org/i/u/2127806/f/tech_sheets/Impact_of_Dimming_white_LEDs.pdf. Último acceso: 15/08/2019.
- [154] https://www1.eere.energy.gov/buildings/publications/pdfs/ssl/poplawski_dimming_lightfair2012.pdf. Último acceso: 15/08/2019.
- [155] MH Huesemann, B Crowe, P Waller, A Chavis, S Hobbs, S Edmundson, M Wigmosta (2016) A validated model to predict microalgae growth in outdoor pond cultures subjected to fluctuating light intensities and water temperatures. *Algal Res.* 13: 195-206.
- [156] V Khavrus, I Shelevytsky (2010) Introduction to solar motion geometry on the basis of a simple model. *Physics Education* 45(6): 641-653.
- [157] V Khavrus, I Shelevytsky (2012) Geometry and the physics of seasons. *Physics Education* 47(6): 680-691.
- [158] PI Cooper (1969) The absorption of radiation in solar stills. *Solar Energy* 12(3): 333-346.
- [159] BYH Liu, RC Jordan (1960) The interrelationship and characteristic distribution of direct, diffuse and total solar radiation. *Solar Energy* 7: 53-65.
- [160] FG Ación Fernández, F Garcia Camacho, JA Pérez, JM Fernández Sevilla, E Molina Grima (1997) A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnol Bioeng.* 55(5): 701-714.

- [161] RT Lorenz, GR Cysewski (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18: 160-167.
- [162] M Olaizola (2000) Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 12: 499-506.
- [163] M Olaizola (2003) Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.* 20: 459-466.
- [164] A Ranga Rao, P Siew Moi, S Ravi, RG Aswathanarayana (2014) Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review. *Mar. Drugs* 12: 128-152.
- [165] MMR Shah, Y Liang, JJ Cheng, M Daroch (2016) Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Front. Plant Sci.* 7:531.
- [166] EA Johnson, GH An (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.* 11: 297-326.
- [167] KD Nguyen (2013) Astaxanthin: A Comparative Case of Synthetic VS Natural Production. *Chemical and Biomolecular Engineering Publications and Other Works.*
- [168] P Tocquin, A Fratamico, F Franck (2011) Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *J. Appl. Phycol.* 24: 365-373.
- [169] JA Del Campo, H Rodríguez, J Moreno, MA Vargas, J Rivas, MG Guerrero (2004) Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(6): 848-54.
- [170] S Qin, GX Liu, ZY Hu (2008) The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Process Biochemistry* 43(8): 795-802.
- [171] RYN Ma, F Chen (2001) Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum* sp. *Process Biochemistry* 36(12): 1175-1179.
- [172] C Aflalo, Y Meshulam, A Zarka, S Boussiba (2007) On the relative efficiency of two vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Bioeng.* 98: 300-305.
- [173] E Del Río, FG Acién Fernández, MC García Malea, J Rivas, E Molina Grima, MG Guerrero (2005) Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 91(7): 808-815.
- [174] YK Lee, CW Soh (1991) Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 27: 575-577.
- [175] J Li, Y Liu, JJ Cheng, M Mos, M Daroch (2015) Biological potential of microalgae in China for biorefinery-based production of biofuels and high value compounds. *N. Biotechnol.* 32: 588-596.
- [176] PG Scodelaro Bilbao, MC Damiani, GA Salvador, PI Leonardi (2016) *Haematococcus pluvialis* as a source of fatty acids and phytosterols: potential nutritional and biological implications. *J. Appl. Phycol.* 28(6): 3283-3294
- [177] AE Solovchenko (2015) Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell. *Photosynth. Res.* 125: 437-449.
- [178] S Santoyo, I Rodríguez Meizoso, A Cifuentes, L Jaime, G García Blairsy Reina, FJ Señorans, E Ibáñez (2009) Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT-Food Sci. Technol.* 42: 1213-1218.

- [179] G Torzillo, T Goksan, C Faraloni, J Kopecký, JR Masojídek (2003) Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage. *J. Appl. Phycol.* 15: 127-136.
- [180] MC López, R Sánchez Edel, JL López, FG Fernández, JM Sevilla, J Rivas, MG Guerrero, E Molina Grima (2006) Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *J. Biotechnol.* 123(3): 329-42.
- [181] M Harker, AJ Tsavalos, AJ Young (1996b) Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* 82: 113-118.
- [182] BY Zhang, YH Geng, ZK Li, HJ Hu, YG Li (2009) Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. *Aquaculture* 295: 275-281.
- [183] CD Kang, SJ Han, SP Choi, SJ Sim (2010) Fed-batch culture of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* by exponential nutrient feeding and stepwise light supplementation. *Bioproc. Biosys. Eng.* 33: 133-139.
- [184] G Panis, J Rosales Carreón (2016) Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Res.* 18: 175-190.
- [185] I Niizawa, BY Espinaco, RJ Leonardi, JM Heinrich, GA Sihufe (2018) Enhancement of astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under autotrophic growth conditions by a sequential stress strategy. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 48(6): 528-534.
- [186] RC Starr, JA Zeikus (1993) UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology* 29:1-106.
- [187] N Wang, B Guan, Q Kong, N Wang, B Guan, Q Kong (2018) A semi-continuous cultivation method for *Haematococcus pluvialis* from non-motile cells to motile cells. *J. Appl. Phycol.* 30: 773-781.
- [188] A Cifuentes, M González, S Vargas, M Hoeneisen, N González (2003) Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol. Res.* 36: 343-357.
- [189] R Sarada, U Tripathi, GA Ravishankar (2002b) Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochem.* 37: 623-627.
- [190] C Zhang, J Liu, I Zhang (2017) Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *J. Ocean. Limnol.* 35: 1205-1211.
- [191] HK Lichtenthaler (1987), Chapter 34 -Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes-, En: *Methods in Enzymology* (Ed: L Packer, R Douce), Academic Press 148, p. 350-382.
- [192] A Kobayashi, T Kakizono, N Nishio, S Nagai (1992) Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 74(1): 61-63.
- [193] J Liu, JP van der Meer, L Zhang, Y Zhang, Chapter 12 -Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for Astaxanthin Production. En: *Microalgal Production for Biomass and High-Value Products* (Ed: SP Slocombe, JR Benemann), CRC Press Taylor & Francis Group, p. 274.
- [194] F Mascia, L Girolomoni, MJP Alcocer, I Bargigia, F Perozeni, S Cazzaniga, G Cerullo, C D'Andrea, M Ballottari (2017) Functional analysis of photosynthetic pigment binding complexes in the green alga *Haematococcus pluvialis* reveals distribution of astaxanthin in Photosystems. *Sci Rep.* 7(1): 16319.

- [195] MC Damiani, PI Leonardi, OI Pieroni, EJ Cáceres (2006) Ultrastructure of the cyst wall of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): wall development and behaviour during cyst germination. *Phycologia* 45(6): 616-623.
- [196] B Wang, Z Zhang, Q Hu, M Sommerfeld, Y Lu, D Han (2014) Cellular Capacities for High-Light Acclimation and Changing Lipid Profiles across Life Cycle Stages of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE* 9(9): e106679.
- [197] R Ma, SR Thomas-Hall, ET Chua, F Alsenani, E Eltanahy, ME Netzel, G Netzel, Y Lu, PM Schenk (2018) Gene expression profiling of astaxanthin and fatty acid pathways in *Haematococcus pluvialis* in response to different LED lighting conditions. *Bioresour Technol.* 250: 591-602.
- [198] C Hagen, K Grünewald, M Xyländer (2001) Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.* 13: 79-87.
- [199] R Praveenkumar, K Lee, J Lee, YK Oh (2015) Breaking dormancy: an energy-efficient means of recovering astaxanthin from microalgae. *Green Chem.* 17: 1226-1234.
- [200] YY Choi, ME Hong, SJ Sim (2015) Enhanced astaxanthin extraction efficiency from *Haematococcus pluvialis* via the cyst germination in outdoor culture systems. *Process Biochemistry* 50(12): 2275-2280.
- [201] T Kakizono, M Kobayashi, S Nagai (1992) Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 403-405.
- [202] K Mengel, P Robin, L Salsac (1983) Nitrate reductase activity in shoots and roots of maize seedlings as affected by the form of nitrogen nutrition and the pH of the nutrient solution. *Plant Physiol.* 71: 618-622.
- [203] N Hata, JC Ogbonna, Y Hasegawa, H Taroda, H Tanaka (2001) Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *J. Appl. Phycol.* 13: 395-402.
- [204] M Harker, AJ Tsavalos, JJ Yong (1996) Autotrophic growth and carotenoid production of in a 30 liter air-lift photobioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* 82: 113-118.
- [206] R Sarada, S Bhattacharya, GA Ravishankar (2002a) Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 517-521.
- [206] BY Zhang, YG Li, ZK Li, HJ Hu (2003) Effects of temperature, light intensity and pH on photosynthesis and growth rate of *Haematococcus pluvialis*. *Oceanol. Limnol. Sin.* 34: 558-565.
- [207] K Kaewpintong, A Shotipruk, S Powtongsook, P Pavasant (2007) Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresour. Technol.* 98: 288-295.
- [208] T Göksan, I Ak, C Kılıç (2011) Growth Characteristics of the Alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as Affected by Nitrogen Source, Vitamin, Light and Aeration. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 11: 377-383
- [209] J Fábregas, A Domínguez, M Regueiro, A Maseda, A Otero (2000) Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 530-535.
- [210] Y Hoffman, C Aflalo, A Zarka, J Gutman, TY James, S Boussiba (2008) Isolation and characterization of a novel chytrid species (phylum Blastocladiomycota), parasitic on the green alga *Haematococcus*. *Mycol. Res.* 112: 70-81.
- [211] J Gutman, A Zarka, S Boussiba (2009) The host range of *Paraphysoderma sedebokerensis*, a chytrid that infects *Haematococcus pluvialis*. *Eur. J. Phycol.* 44: 509-514.

- [212] JJ Yoo, SP Choi, BW Kim, SJ Sim (2012) Optimal design of scalable photobioreactor for phototropic culturing of *Haematococcus pluvialis*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35: 309-315.
- [213] D Chaumont, CJ Thépenier (1995) Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle. *J. Appl. Phycol.* 7: 529-537.
- [214] G Torzillo, T Göksan, O Isik, Ş Gökpinar (2005) Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *European Journal of Phycology* 40(2): 233-240.
- [215] M Kobayashi, Y Kurimura, T Kakizono, N Nishio, Y Tsuji (1997) Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 84(1): 94-97.
- [216] S Boussiba, W Bing, PJ Yuan, A Zarka, F Chen (1999) Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol. Lett.* 21: 601-604.
- [217] M Orosa, D Franqueira, A Cid, J Abalde (2005) Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* 96: 373-378.
- [218] A Solovchenko (2011) Pigment composition, optical properties, and resistance to photodamage of the microalga *Haematococcus pluvialis* cultivated under high light. *Russ. J. Plant. Physiol.* 58: 9-17.
- [219] M Grung, FML D'Souza, M Borowitzka (1992) Algal Carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)- astaxanthin esters. *J. Appl. Phycol.* 4: 165-171.
- [220] AC Kiperstok, P Sebestyén, B Podola, M Melkonian (2017) Biofilm cultivation of *Haematococcus pluvialis* enables a highly productive one-phase process for astaxanthin production using high light intensities. *Algal Res.* 21: 213-222.
- [221] LT Tam, DD Hoang, DTN Mai, NTH Thu, HTL Anh, DD Hong (2012) Study on the effect of salt concentration on growth and Astaxanthin accumulation of microalgae *Haematococcus pluvialis* as the initial basis for two phase culture of astaxanthin production. *J. of Biology (AJOB) of the Vietnam Academy of Science and Technology* 34(2).
- [222] ME Hong, YY Choi, SJ Sim (2016) Effect of red cyst cell inoculation and iron (II) supplementation on autotrophic astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under outdoor summer conditions. *J. Biotechnol.* 218: 25-33.
- [223] M Kobayashi, T Kakizono, S Nagai (1993) Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 867-873.
- [224] AE Tjahjono, Y Hayama, T Kakizono, Y Terada, N Nishio, S Nagai (1994b) Hyper accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol. Lett.* 16: 133-138.
- [225] Y Lemoine, B Schoefs (2010) Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynth. Res.* 106: 155-177.
- [226] J Wang, MR Sommerfeld, C Lu, Q Hu (2013) Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae* 28(2): 193-202.