

**Estrategia de cultivo semicontinuo y pretratamiento de
biomasa para la producción integrada de
lípidos y metano a partir de *Scenedesmus obtusiusculus*
AT-UAM**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Naturales e Ingeniería

P R E S E N T A

Mtro. Pierre-Louis Emile GORRY

Comité tutorial:

Directora: Dra. Marcia G. Morales Ibarría
Asesor: Dr. Sergio Revah Moiseev

Octubre 2025



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00034

Matrícula: 2161800873

Estrategia de cultivo semicontinuo y pretretamiento de biomasa para la producción integrada de lípidos y metano a partir de *Scenedesmus obtusiusculus*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:30 horas del día 30 del mes de octubre del año 2025 en la Unidad Cuajimalpa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS CARLOS FERNANDEZ LINARES
DRA. ADELA IRMENE ORTIZ LOPEZ
DR. ELIAS RAZO FLORES
DRA. MARIA LAURA GONZALEZ RESENDIZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

DE: PIERRE LOUIS EMILE GORRY

y de acuerdo con el artículo 100 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Gorry

PIERRE LOUIS EMILE GORRY
ALUMNO

REVISÓ

Rosalia Serrano
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CNI

Gerardo Perez Hernandez
DR. GERARDO PEREZ HERNANDEZ

PRESIDENTE

Luis Carlos Fernandez Linares
DR. LUIS CARLOS FERNANDEZ LINARES

VOCAL

Adela Irmene Ortiz Lopez
DRA. ADELA IRMENE ORTIZ LOPEZ

VOCAL

Elias Razo Flores
DR. ELIAS RAZO FLORES

SECRETARIA

Maria Laura Gonzalez Resendiz
DRA. MARIA LAURA GONZALEZ RESENDIZ

Esta tesis fue realizada en:

- El Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONAHCYT bajo el número de registro 001466.
- La Planta Piloto de Bioprocesos - Dr. Sergio Revah Moiseev y su invernadero del Departamento de Procesos y Tecnología de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa (UAM-C).
- El laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Procesos y Tecnología de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la UAM-C.
- En el laboratorio de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), A.C.

Agradecimientos a beca y proyectos:

Este trabajo fue financiado por el Fondo de Sustentabilidad Energética SENER-CONACYT, Clúster Biocombustibles Gaseosos, proyecto 247006. El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por la beca de doctorado de Pierre-Louis Émile Gorry (CVU 738823).



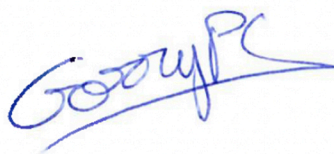
Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Doctorado del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental fue realizado de enero 2016 a octubre 2024 en laboratorios del Departamento de Procesos y Tecnologías Laboratorio Planta Piloto de Bioprocesos Dr. Sergio Revah Moiseev y su invernadero y en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 15 del mes de octubre del año 2025 el que suscribe Pierre-Louis Emile Gorry alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada; "Estrategia de cultivo semicontinuo y pretratamiento de biomasa para la producción integrada de lípidos y metano a partir de *Scenedesmus obtusiusculus*" realizada bajo la dirección de la Dra Marcia G. Morales Ibarría y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso de la directora del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: mmorales@cua.uam.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Pierre-Louis Emile Gorry

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

"El que suscribe, Pierre-Louis Emile Gorry, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otra(s) persona(s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita."



Pierre-Louis Emile Gorry

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Pierre-Louis Emile Gorry alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Pierre-Louis Emile Gorry.



Pierre-Louis Emile Gorry

Au moment du travail, quand peu à peu une compréhension s'amorce, prend forme, s'approfondit ; quand dans une confusion peu à peu on voit apparaître un ordre, ou quand ce qui semblait familier soudain prend des aspects insolites, puis troublants, jusqu'à ce qu'une contradiction enfin éclate et bouleverse une vision des choses qui paraissait immuable – dans un tel travail, il n'y a trace d'ambition, ou de vanité. Ce qui mène alors la danse est quelque chose qui vient de beaucoup plus loin que le « moi » et sa fringale de s'agrandir sans cesse (fut-ce de « savoir » et de « connaissances ») – de beaucoup plus loin sûrement que notre personne ou même notre espèce. (Grothendieck, 2021, p. 301-302).

La découverte de l'erreur est un des moments cruciaux, un moment créateur entre tous, dans tout travail de découverte, qu'il s'agisse d'un travail mathématique, ou d'un travail de découverte de soi. C'est un moment où notre connaissance de la chose sondée soudain se renouvelle. Craindre l'erreur et craindre la vérité est une seule et même chose. Celui qui craint de se tromper est impuissant à découvrir. C'est quand nous craignons de nous tromper que l'erreur qui est en nous se fait immuable comme un roc. (Grothendieck, 2021, p. 201).

Traducción:

En el momento del trabajo, cuando poco a poco comienza una comprensión, toma forma, se profundiza; cuando en una confusión poco a poco aparece un orden, o cuando lo que parecía familiar de repente adquiere aspectos inusuales, luego inquietantes, hasta que finalmente estalla una contradicción y derriba una visión de las cosas que parecía inmutable - en un trabajo así, no hay ni rastro de ambición, ni de vanidad. Lo que entonces dirige la danza es algo que viene de mucho más lejos que el «yo» y su hambre de expandirse constantemente (ya sea a través del «conocimiento») - de mucho más lejos que nuestra persona o incluso nuestra especie. (Grothendieck, 2021, p. 301-302).

El descubrimiento del error es uno de los momentos cruciales, un momento creativo de todos, en cualquier trabajo de descubrimiento, ya sea matemático o de autodescubrimiento. Es un momento en el que nuestro conocimiento de la cosa sondeada se renueva de repente. Temer el error y temer la verdad son una misma cosa. Quien teme el error es impotente para descubrir. Es cuando tememos equivocarnos cuando el error en nosotros se vuelve inamovible como una roca (Grothendieck, 2021, p. 201).

AGRADECIMIENTOS

En especial a mis Papas, Philippe y Marie-Anne Gorry por el amor, la confianza y el apoyo que siempre me han tenido, porque sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí; por sus consejos y recomendaciones que hayan hechos todo ese tiempo. En especial a mi padre por ser un mentor y una inspiración; a mi madre por ser el oído de la escucha y voz de la conciencia.

A Sara Gálvez Mancilla, mi compañera de vida, por su apoyo, cariño, paciencia y confianza que siempre me ha tenido y por acompañarme en esta aventura. Por los consejos y pláticas resolutivas, de todo tipo y para todo ámbito, que ha propiciado. Gracias a quien he descubierto una gran cultura y grandes pensamientos que me han enriquecido en múltiples aspectos.

A los padres de Sara, Miguel Gálvez y Mati Mancilla por su cálido recibimiento, apoyo y cariño constante.

A mis herman@s en Francia que aun a lo lejos tengo su cariño y cuento con ell@s siempre.

A la familia mexicana que ha adoptado como su hermano.

A la Dra. Marcia Morales por ser un mentor, enseñarme y guiarme en mi trabajo y sobre todo por el gran ejemplo de trabajo y fortaleza que es para mí.

Al Dr. Sergio Revah por la asesoría y apoyo brindados y compartir sus conocimientos.

Al Dr. Elías Razo por recibirme en el IPICYT, su apoyo y discusiones científicas y por hacerme conocer parte de San Luis Potosí.

A León Sánchez, Adriana Marín, Laura González, Ingrid Hernández, Ariel Mendoza, María Fernanda Soto, Rebeca Pérez, David Ramírez por todos estos años de trabajo,

amistad y diversión en torno a las microalgas. En especial a León por su asesoramiento, las prácticas científicas y propiciar mi integración en México.

A tod@s los amig@s de la planta piloto de Bioprocesos de la UAM-C, del laboratorio de Bioprocesos y del posgrado CNI, compañer@s de las UAM con quien hemos cruzado caminos.

RESUMEN

En este trabajo se estudian dos aspectos fundamentales en el desarrollo de un concepto de biorrefinería a partir de microalgas para la producción de lípidos y metano.

La limitación de nitrógeno (N) es la estrategia más común para acumular compuestos altamente energéticos en las microalgas, sin embargo, esta condición reduce la tasa de crecimiento de las microalgas y las productividades de biomasa, lípidos y carbohidratos. Adicionalmente, la biomasa de microalga es una materia prima de interés para producir CH₄ mediante digestión anaerobia (DA). Sin embargo, los retos más importantes para utilizar esta biomasa son la posible inhibición de la DA debido a la acumulación de ácidos grasos volátiles o amonio que pueden ser tóxicos para los microorganismos de la DA. Así mismo la presencia de una pared celular difícil de degradar limita la DA de la biomasa por lo que se requiere romperla e hidrolizarla previamente.

En este trabajo, se investigó la estrategia de operación semicontinua combinada con ciclos de alimentación-privación de nitrógeno del NaNO₃ (N-NaNO₃, abreviado a N) para aumentar la acumulación de lípidos y carbohidratos y la biomasa en la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. Por otro lado, se investigó el efecto de diferentes pretratamientos en la biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM para establecer el efecto sobre la producción de biogás.

Para el primer aspecto se evaluó el crecimiento y la productividad de lípidos en un fotobiorreactor de panel plano (FBR-P) de 1.8 L de volumen de operación bajo condiciones controladas, a través de ciclos de alimentación-privación de N de 72 y 24 horas a diferentes concentraciones de N de 6, 12 y 24 mg L⁻¹. Las mayores productividades de biomasa microalgal, lípidos y carbohidratos, 550 ± 28, 139 ± 4 y 198 ± 7 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, se obtuvieron para ciclos de 24 horas con una concentración de N de 12 mg L⁻¹ aumentando ~ 2.4 veces en comparación con los ciclos de privación de N de 72 horas. Esta estrategia también se aplicó en un fotobiorreactor de columna de burbujeo (FBR-CB) de 24 L de volumen de operación ubicado en un invernadero, donde se obtuvieron productividades de biomasa de 536 ± 27 y 667 ± 33 mg L⁻¹ d⁻¹ operado en semicontinuo con ciclos de alimentación-privación de 24 h de N con concentraciones de N de 6 y 12 mg_N L⁻¹, respectivamente.

Las máximas productividades de lípidos y carbohidratos alcanzadas fueron de 142 ± 10 y $169 \pm 14 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente con $12 \text{ mg}_N \text{ L}^{-1}$.

El segundo aspecto abordado fue el pretratamiento a biomasa microalgal completa y biomasa a la cual se le extrajeron los lípidos para establecer la producción de metano a partir de la DA. Los cuatro pretratamientos estudiados fueron: Enzimático (E), Termo mecánico (TM), Termo Químico (TQ) y Termo Mecánico Químico (TMQ). De los cuales, el TMQ obtuvo la mayor producción acumulada de metano, con $1323.9 \pm 38.8 \text{ mL L}^{-1}$ y $959.7 \pm 56.3 \text{ mL d}^{-1}$ para la biomasa completa y sin lípidos, respectivamente. El tratamiento E obtuvo la mayor $R_{\max}$ 118.2 mL d^{-1} con una producción acumulada de metano de $904.5 \pm 40.2 \text{ mL L}^{-1}$ en el caso de la biomasa completa. Desde el punto de vista de la productividad energética, es 2 a 6 veces más productivo extraer los lípidos y usar la biomasa residual como sustrato para la producción de metano que la biomasa completa.

Recapitulando, los resultados muestran que los ciclos de alimentación-privación de N y la operación en semicontinuo promovieron el aumento de la biomasa microalgal y la productividad de lípidos en *S. obtusiusculus* AT-UAM.

Por otro lado, los pretratamientos, en particular los que combinan temperatura y condiciones de hidrólisis ácida, demostraron ser claves para maximizar la producción de metano. Estos resultados ahondan en la importancia de la selección del pretratamiento adecuado de la biomasa microalgal para mejorar los rendimientos de metano y su integración en un esquema de biorrefinería.

ABSTRACT

This work studies two fundamental aspects in the development of a biorefinery concept from microalgae to produce lipids and methane.

Nitrogen (N) limitation is the most common strategy to accumulate high-energy compounds in microalgae; however, this condition reduces microalgae growth rate and biomass, lipid and carbohydrate productivities. Additionally, microalgae biomass is a feedstock of interest to produce CH₄ by anaerobic digestion (AD). However, the most important challenges for using this biomass are the possible inhibition of AD due to the accumulation of volatile fatty acids or ammonium that can be toxic to the AD microorganisms. Likewise, the presence of a cell wall that is difficult to degrade limits the DA of the biomass, so it is necessary to break it and hydrolyze it beforehand.

In this work, the strategy of semi-continuous operation combined with nitrogen from NaNO₃ (N-NaNO₃, abbreviated to N) feast-famine cycles was investigated to increase lipid and carbohydrate accumulation and biomass in the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. On the other hand, the effect of different pretreatments on the biomass of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM was investigated to establish the effect on biogas production.

For the first aspect, growth and lipid productivity were evaluated in a flat panel photobioreactor (FBR-P) of 1.8 L operating volume under controlled conditions, through 72 and 24 h N-feeding-deprivation cycles at different N concentrations of 6, 12 and 24 mg L⁻¹. The highest microalgal biomass, lipid and carbohydrate productivities, 550 ± 28, 139 ± 4 and 198 ± 7 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively, were obtained for 24-h cycles with an N concentration of 12 mg L⁻¹ increasing ~ 2.4-fold compared to 72-h N deprivation cycles. This strategy was also applied in a 24 L operating volume bubbling column photobioreactor (FBR-CB) located in a greenhouse, where biomass productivities of 536 ± 27 and 667 ± 33 mg L⁻¹ d⁻¹ operated in semi-continuous with 24 h N-feeding-deprivation cycles with N concentrations of 6 and 12 mg_N L⁻¹, respectively, were obtained. The maximum lipid and carbohydrate productivities achieved were 142 ± 10 and 169 ± 14 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively with 12 mg_N L⁻¹. The second aspect addressed was the pretreatment of wet microalgal biomass (complete) and biomass from which lipids were extracted to establish the methane production of biogas from AD. The four pretreatments studied were: Enzymatic (E),

Thermomechanical (TM), Thermochemical (TC) and Thermo-Mechanical-Chemical (TMC). Of which, TMC obtained the highest cumulative methane production, with $1323.9 \pm 38.8 \text{ mL L}^{-1}$ and $959.7 \pm 56.3 \text{ mL d}^{-1}$ for wet and lipid-free biomass, respectively. Treatment E obtained the highest $R_{\max}$ 118.2 mL d^{-1} with a cumulative methane production of $904.5 \pm 40.2 \text{ mL L}^{-1}$ for wet biomass. From the point of view of energy productivity, it is 2 to 6 times more productive to extract the lipids and use the residual biomass as a substrate for methane production than the whole biomass.

Recapitulating, the results show that N feast-famine cycles and semi-continuous operation promoted the increase of microalgal biomass and lipid productivity in *S. obtusiusculus* AT-UAM.

On the other hand, pretreatments, particularly those combining temperature and acid hydrolysis conditions, proved to be key to maximize methane production. These results further emphasize the importance of selecting the appropriate pretreatment of microalgal biomass to improve methane yields and its integration into a biorefinery scheme.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
GLOSARIO.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO.....	16
1.1 El cambio climático.....	16
1.1.1 Antropoceno: Los gases de efecto invernadero (GEI).....	16
1.1.2 Efecto invernadero.....	17
1.1.3 Tecnologías para la mitigación de CO ₂	18
1.2 Las microalgas.....	20
1.2.1 Características generales.....	21
1.2.2 Fotosíntesis en las microalgas.....	22
1.2.3 Composición bioquímica.....	24
1.2.4 Síntesis de moléculas energéticas.....	26
1.2.5 Portafolio de productos y aplicaciones.....	p.27
1.3 Cultivo y pretratamiento de microalgas.....	41
1.3.1 Sistemas de cultivo.....	41
1.3.2 Estrategias para incrementar la producción de moléculas energéticas.....	44
1.3.3 Recuperación de la biomasa microalgal.....	48
1.3.4 Pretratamientos de la biomasa.....	50
1.4 Digestión anaerobia.....	55
1.5 Biorrefinería.....	59
1.5.1 Estrategia I: Producción exclusiva de biocarburantes (compuesto de bajo valor agregado)	61
1.5.2 Estrategia II: Coproducción de productos de alto valor agregado y biocombustibles.....	63
1.5.3 Estrategia III: Coproducción de compuestos de valor agregado medio y biocombustibles.....	64
1.5.4 Estrategia IV: Integración de las microalgas en otros procesos y en la economía circular.....	65
1.5.5 Estrategia de diseño y estado actual.....	66
1.5.6 Aspectos de sostenibilidad.....	67
CAPITULO 2. ANTECEDENTES DIRECTOS, JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	70
2.1 Antecedentes directos y justificación.....	70

2.2 Pregunta de investigación e hipótesis.....	71
CAPITULO 3. OBJETIVOS.....	73
CAPITULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	74
4.1 Microalga e inóculo.....	74
4.2 Sistema experimental.....	75
4.2.1 Fotobiorreactor plano.....	75
4.2.2 Fotobiorreactores de columna de burbujas en invernadero.....	76
4.3 Operación.....	76
4.3.1 Operación del fotobiorreactor plano.....	76
4.3.2 Operación del fotobiorreactor de columna de burbujas en condiciones de invernadero.....	77
4.4 Métodos analíticos.....	77
4.5 Cálculos de cinética y productividad.....	78
4.6 Pretratamientos y digestión anaerobia.....	79
4.6.1 Digestión anaerobia de biomasa completa.....	79
4.6.2 Digestión anaerobia de biomasa sin lípidos.....	81
4.7 Análisis estadístico.....	83
CAPITULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	84
5.1 Influencia de la concentración de N y de los ciclos de alimentación-privación en el FBR-P.....	84
5.1.1 Ciclos de privación de N de 72 horas.....	85
5.1.2 Ciclos de alimentación-privación de N de 24 horas.....	86
5.2 Estrategia para la acumulación de lípidos y carbohidratos en condiciones de invernadero en FBR-CB.....	92
5.3 Efecto de los pretratamientos de biomasa de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM en la producción de biogás CH ₄ por digestión anaerobia.....	95
5.4 Biorrefinería.....	107
CAPITULO 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	114
REFERENCIAS.....	116
ANEXOS.....	140

Glosario

bc: Para referirse a la biomasa completa y fresca de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM

bd: Para referirse a la biomasa sin lípidos (biomasa deslipidizada) de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM

DA: Digestión anaerobia

DQO: Demanda química de oxígeno

E: Enzimático

FBR-CB: Fotobiorreactor columna de burbujeo

FBR-P: Fotobiorreactor plano

GEI: Gases de efecto invernadero

N: Nitrógeno

TM: Termo-mecánico

TQ: Termoquímico

TMQ: Termo-mecánico-químico

INTRODUCCIÓN

El aumento del consumo de combustibles fósiles incrementa las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), principalmente de dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera lo cual afecta el clima (Wilberforce et al., 2021). El cambio climático aumenta la posibilidad de que se produzcan situaciones no reversibles y eventos climáticos más intensos afecten el acceso a los alimentos, agua y energía, lo que puede llevar a la desestabilización social (Steffen et al., 2018). Por ello, las políticas internacionales desarrolladas recientemente se han centrado en la mitigación del cambio climático y en el fomento de la producción de energías renovables.

Las tecnologías fisicoquímicas, como la adsorción, la separación por membranas, la absorción química y la destilación criogénica, se han desarrollado y comercializado a escala industrial para capturar el CO₂. Sin embargo, las tecnologías fisicoquímicas disponibles actualmente consumen mucha energía, tienen costos elevados y su efectividad es limitada (Kamkeng et al., 2021), por lo que se están desarrollando biotecnologías, a base de microalgas, para fijar el CO₂ como biomasa a partir de la cual se pueden obtener productos de valor y generar energía. Las microalgas son una alternativa prometedora ya que pueden capturar hasta 1.83 toneladas de CO₂ por cada tonelada de biomasa seca de microalga mediante la fotosíntesis. Además, la biomasa de microalga, que contiene proteínas (30 - 50 %), carbohidratos (20 - 40 %) y lípidos (8 - 15 %) en condiciones de suficiencia de nutrientes, puede explotarse para obtener una amplia gama de productos (Huang et al., 2013).

Varios autores han reportado sobre la capacidad de diferentes géneros de microalgas como *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus*, *Monoraphidium*, entre otras, para acumular reservas intracelulares en forma de lípidos y carbohidratos bajo condiciones de estrés (Nayak et al., 2019; San Pedro et al., 2014; Sánchez-García et al., 2020; H. Yang et al., 2018). Por lo tanto, las microalgas podrían ser una fuente de componentes altamente energéticos para producir diferentes biocombustibles renovables como el biodiésel y el bioetanol debido al alto contenido de lípidos y carbohidratos, respectivamente (Bhatia et al., 2019). El rendimiento del bioetanol obtenido con biomasa de microalgas es entre 5 y 150 veces más alto que para el bioetanol de primera y segunda generación obtenido con maíz, colza o hierba suiza (Hossain et al., 2019; Xue et al., 2020). Así mismo el rendimiento de biodiesel con biomasa de

microalgas es de 10 a 300 veces mayor que con las materias primas de primera y segunda generación. A la fecha se han explorado diferentes estrategias para promover la acumulación de lípidos en las microalgas que implican condiciones de estrés como la limitación de nutrientes (privación de nitrógeno, N, o fosfato) (Toledo-Cervantes et al., 2013; Xue et al., 2020), cambios bruscos de pH de 7 a 5.5 por ejemplo, (Sánchez-García et al., 2020; Santos et al., 2014) o el aumento de la salinidad desde 40 hasta 320 mM de NaCl (Gour et al., 2020), entre otras. Por otro lado, se ha investigado la optimización de la producción de biogás con biomasa de microalgas mediante la aplicación de diferentes tipos de pretratamientos termoalcalinos, químicos, térmicos, mecánicos y biológicos (Vargas-Estrada et al., 2022).

Investigaciones anteriores realizadas con la microalga oleaginosa *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM demostraron su potencial biotecnológico para producir biomasa, capturar CO₂ y acumular lípidos. *S. obtusiusculus* AT-UAM acumuló lípidos hasta un ~56% de peso celular seco con una productividad de 85 mg L⁻¹ d⁻¹ en cultivo por lotes en condiciones de privación de N (Sánchez-García et al., 2020). También capturó CO₂ con una tasa de 950 mg L⁻¹ d⁻¹ en un medio con suficiente N (Cabello et al., 2015; Toledo-Cervantes et al., 2013).

A pesar de la elevada acumulación de lípidos obtenida, la viabilidad tecno-económica de los procesos con microalgas suele estar limitada por su bajo crecimiento de biomasa, que se ve afectado aún más por las condiciones de estrés requeridas para mejorar el contenido de lípidos en cultivo en lote. Una de las principales limitaciones para obtener una alta acumulación de lípidos es la necesidad de operar en 2 etapas, una de crecimiento y posteriormente una etapa de privación de nutrientes, lo cual aumenta los tiempos de producción y en consecuencia reduce la productividad de biomasa y por lo tanto de lípidos. El cultivo semicontinuo puede permitir superar parcialmente estas limitaciones en las microalgas (Aziz et al., 2020; Martínez-Macías et al., 2018; Mathimani et al., 2017).

Por otro lado, la biomasa de microalga es una materia prima de interés para producir CH₄ mediante digestión anaerobia (DA). La DA es una tecnología de bajo costo y bien conocida. Sin embargo, los retos más importantes para la producción de biogás son la posible inhibición debida al alto contenido en proteínas y a la pared celular que limita

la degradación de la biomasa. Los pretratamientos contribuyen a romper la pared celular y liberar el contenido intracelular. Los pretratamientos incluyen alternativas térmicas, químicas y biológicas. Cada uno tiene sus retos particulares y es específico de cada cepa. La investigación del aprovechamiento de la biomasa permite mejorar y optimizar su explotación en una biorrefinería. El concepto de biorrefinería se basa en el de la refinería petrolera, donde a partir de un solo recurso se obtienen múltiples productos. El desarrollo de biorrefinerías basadas en el uso de una o varias fuentes de biomasa ha sido complejo debido a la propia naturaleza de las biomásas. Por cada tipo de biomasa se debe de aplicar tratamientos y procesos específicos para obtener una amplia gama de productos incluyendo aquellos que se pueden destinar para biocombustibles (Gorry et al., 2018; Vargas-Estrada et al., 2022). Por otro lado, el desarrollo de biorrefinerías encaja en el concepto de economía circular ya que a partir de biomasa y de residuos orgánicos se puede producir diferentes productos y reducir la huella ambiental. En el caso de las microalgas, que fijan CO₂, pueden tratar aguas residuales y ser aprovechadas en un amplio rango de productos. Luego de haber obtenido el producto de interés de la biomasa microalgal es posible aprovechar la biomasa residual por ejemplo como sustrato de DA (Bastiaens et al., 2017).

El objetivo general de este estudio es analizar un esquema de biorrefinería a través de la integración de los procesos de generación biomasa-lípidos en semicontinuo y producción de biogás. Para lo cual, es importante evaluar estrategias de cultivo que permita mantener un estado en el que la productividad de lípidos y carbohidratos de *S. obtusiusculus* AT-UAM pueda mantenerse a niveles atractivos, de tal manera, que no se tenga que operar el sistema en dos etapas, crecimiento/cosecha y resuspender en medio sin nitrógeno. Para ello, se evaluaron los efectos de la operación semicontinua con ciclos de alimentación-privación de N sobre la acumulación de lípidos y carbohidratos con bajas concentraciones de N en fotobiorreactores planos bajo condiciones controladas (FBR-P). Además, la estrategia se aplicó en un fotobiorreactor de columna de burbujeo (FBR-CB) operado en un invernadero para evaluar el efecto de la variación climática y los ciclos naturales. Por otro lado, se evaluó el efecto de diferentes pretratamientos, térmico, químicos y enzimáticos sobre la biomasa completa y fresca y biomasa sin lípidos de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM sobre el rendimiento de metano (CH₄) en la digestión anaerobia.

CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO

En este capítulo se expone que es el cambio climático con un enfoque sobre el dióxido de carbono (CO₂) principal gas de efecto invernadero. Un método alternativo para aminorar la concentración del CO₂ en la atmosfera es el uso de biotecnologías a base de microalgas por lo que se presenta sus características principales y tecnologías asociadas.

1.1 El cambio climático

Como mencionado anteriormente, el cambio climático es una problemática a la cual la humanidad se enfrenta. Sus efectos ya son visibles y algunas consecuencias pueden empezar a hacerse palpable como sequias, inundaciones o el calentamiento global. Este último es provocado por la emisión de gases llamados gases de efecto invernadero (GEI).

1.1.1 Antropoceno: Los gases de efecto invernadero

Si bien la revolución industrial marca un giro importante para las sociedades humanas, también conlleva importantes consecuencias globales tanto para las sociedades humanas como para el ecosistema Tierra. En efecto, la transición de sociedades tradicionales a sociedades industriales y de consumo denota un cambio en las necesidades debido al desarrollo tecnológico y los requerimientos cada vez más grandes en energía de la humanidad tanto para su sistema productivo como a nivel individual. Esto ha hecho incrementar el uso de energía y la producción de GEI. Para subvenir a la necesidad energética de las sociedades modernas se ha hecho uso de los combustibles llamados fósiles tales como petróleo, gas y carbón. Las principales fuentes de GEI son la quema de estos combustibles tanto para producir energía como transportarse, la agricultura y el desarrollo de infraestructuras (NOAA, 2022; Ooi et al., 2020). El aprovechamiento de los combustibles fósiles, que sea para producir energía o en el transporte, es mediante su combustión cuya produce energía y CO₂ por lo que su uso masivo se traduce en un aumento de la concentración del mismo. Además, es producido en algunos procesos industriales como las fábricas de cemento y la producción de etanol para mencionar solo algunos. Adicionalmente, los depósitos naturales de estos combustibles se encuentran en cantidades limitadas, por lo que su consumo agotará estos depósitos.

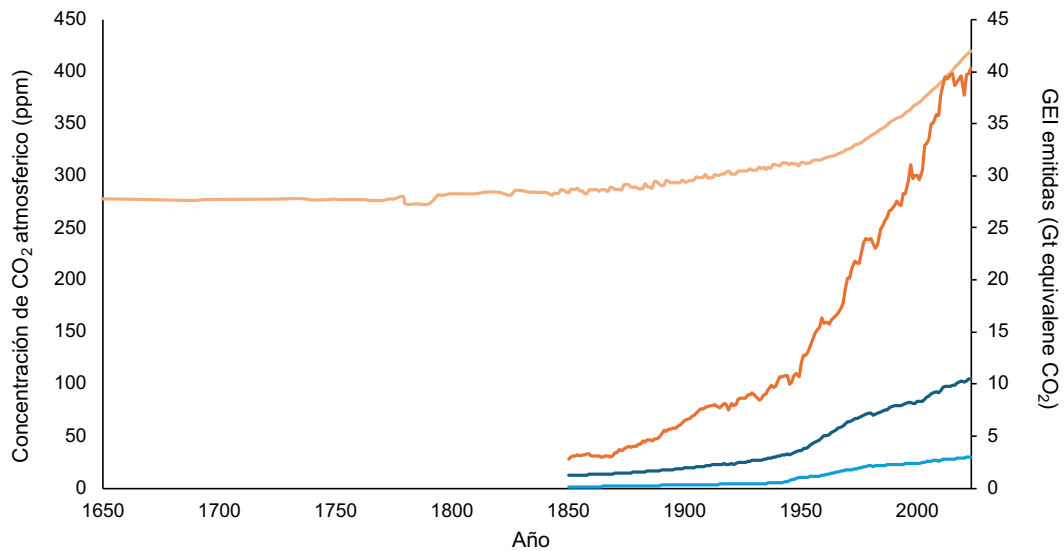


Figura 1 – Concentración de CO₂ atmosférico (curva naranja clara) en ppm (1650-2021), CO₂ (curva naranja), CH₄ (curva azul oscuro) y N₂O (curva azul claro) emitidos por año desde el inicio de la era industrial (1750-2021); datos extraídos de (*Data Page: Annual Greenhouse Gas Emissions Including Land Use*, 2023; Jones et al., 2023; Ritchie et al., 2020).

En consecuencia, la concentración de CO₂ aumenta de manera exponencial (**Figura 1**) desde el inicio de la revolución industrial hasta el día de hoy, a pesar de los tratados establecidos en el marco de la lucha contra el cambio climático a nivel mundial. Aunque hipotéticamente la humanidad dejaría de emitir CO₂ adicional, la resorción de este gas tardaría siglos en producirse y el cambio climático seguiría ocurriendo. La humanidad debe entonces no solamente reducir sus emisiones, sino que empezar a disminuir la presencia del CO₂ mediante su absorción.

1.1.2 Efecto invernadero

El sistema termodinámico Tierra recibe energía del sol en forma de energía electromagnética, la luz. La radiación solar es en parte bloqueada por la magnetosfera, un campo magnético alrededor de la tierra, en parte absorbida y finalmente otra parte es remitida al espacio en forma de radiación y de calor. A lo largo de ciclos astronómicos y geológicos de formación, la Tierra ha llegado a un equilibrio

termodinámico específico, entre otro caracterizado por una temperatura global promedio que se mantiene alrededor de 15°C. Para llegar y mantener a ese equilibrio termodinámico, la constitución y composición de la atmósfera han sido primordiales para generar el llamado efecto de invernadero. La constitución específica actual de la atmósfera es la que permite mantener esa temperatura promedio global gracias al equilibrio dinámico específico que genera la atmósfera. En particular la composición de la tropósfera, capa atmosférica más cercana a la superficie, es la siguiente: 78% nitrógeno (N₂), 1% oxígeno (O₂), 0.9% de argón y el 0.1% de otros gases entre ellos el dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), vapor de agua (H₂O) y neón. Entre ellos se definen los gases de efecto invernadero cuyos gases retienen la irradiación infrarroja y permite mantener la temperatura promedio de 15°C. Sin estos gases la temperatura promedio de la Tierra sería de alrededor de -18°C. Entre estos gases se encuentra el CO₂, el CH₄, el vapor de agua, el óxido de nitrógeno (N₂O) y el ozono (O₃). No obstante, a partir de la revolución industrial las concentraciones de los GEI presente en la atmósfera se incrementaron rápidamente (**Figura 1**) en un periodo geológicamente muy corto, de apenas 2 siglos, en particular el CO₂. Antes de la revolución industrial la concentración de CO₂ se encontraba debajo de los 280 ppm (NOAA, 2022). Hoy en día la concentración de CO₂ alcanza un valor de 414.72 ppm, es decir, prácticamente se duplicó desde la era pre-industrial y sigue aumentando de manera exponencial año tras año (NOAA, 2022). Sin embargo, un incremento en las concentraciones de gases de efecto invernadero, como el CO₂ o CH₄, tiene por consecuencia un aumento en el promedio global de la temperatura. Al aumentar la temperatura global, esto provoca el calentamiento global y genera cambios en la dinámica del clima y por lo tanto fragiliza los ecosistemas.

1.1.3 Tecnologías para la mitigación de CO₂

En la actualidad, para mitigar los efectos del cambio climático existen diversas tecnologías y estrategias. Se agrupan las tecnologías en 2 grupos principales: las fisicoquímicas y las biotecnológicas. Las primeras se pueden desglosar en adsorción, absorción, mitigación química, separación por membranas (**Tabla 1**). Por ejemplo, la adsorción consiste en explotar las propiedades físicas o químicas para interactuar con el CO₂ y fijarlo en un sólido usando un material poroso para separarlo de los demás

gases (Vaz et al., 2022; Wilberforce et al., 2021b). Su liberación se puede realizar gracias a un cambio de presión o temperatura dependiendo del material usado y del tipo de adsorción, física o química, lo que permite igualmente regenerar el adsorbente. La absorción física, se basa en el principio de Henry, interacciones de Van der Waals y electrostáticas (Wilberforce et al., 2021b). En el caso de la absorción se usa un solvente afín al CO₂ como una solución de aminas para la absorción física. La captura química consiste en fijar el CO₂ mediante su carbonatación y precipitación (Vaz et al., 2022). Entre otros absorbentes, se usa óxido de calcio para carbonatarlo, en un horno a altas temperaturas, 600-700°C (Hornberger et al., 2021), en carbonato de calcio (CaCO₃). Finalmente, el CaCO₃ es horneado a más de 900°C para regenerar el absorbente y liberar el CO₂ en un flujo de gas concentrado.

Tabla 1 - Principales ventajas e inconvenientes de los procesos fisicoquímicos de y captura del CO₂, tabla realizada a partir de Vaz et al. (2022).

Procesos fisicoquímicos	Ventajas	Desventajas
Adsorción	- Operación del proceso simple (diferentes temperaturas) - No produce desechos líquidos - Baja energía para regeneración del adsorbente - No corrosivo	- Alto costo - Consumo importante de energía - Disminución eficiencia de combustión en procesos de producción de energía - Complejos - Baja eficiencia de los procesos - No permite tratar altos flujos de gases - Baja selectividad de adsorbentes
Absorción	- Eficiente - Económicos - Nivel industrial - Capacidad de tratar grandes volúmenes - Mejor a largo plazo desde el punto de vista económico	- Alto consumo de solventes - Corrosivo - No amigable con el medio ambiente - Baja carga de CO₂ - Baja regeneración del solvente - Importante consumo de energía en el proceso
Mitigación química	- Productos con puntos de ebullición altos - Baja toxicidad - Biodegradables - Aplicación en agricultura, industria energética y de los polímeros	- Alto costo para regeneración del solvente - Oxidación de los productos genera sustancias corrosivas - Necesidad de aditivos
Separación por membranas	- Fácil de operar - Amigable con el medio ambiente - Bajo consumo de energía	- Baja estabilidad - Bajo flujo tratado - Selectividad y/o permeabilidad baja

Aunque muchas de esas tecnologías sean de las más estudiadas y desarrolladas, presentan diversas desventajas como baja eficiencia y tratamiento de flujos bajos en el caso de la adsorción, para la absorción, bajas cargas de CO₂ alimentadas y contaminación generada por los solventes (**Tabla 1**). De manera general, presentan altos consumos energéticos, costos de implementación elevados y límites operativos (Kamkeng et al., 2021). Así existe la alternativa de las biotecnologías actualmente en desarrollo entre otras la reforestación y el uso de una amplia variedad de microorganismos (Zahed et al., 2021). Si bien la reforestación contribuye en la mitigación y aporta varios servicios ecológicos a las sociedades humanas y al medioambiente, en sí sola no logrará la mitigación de las emisiones de origen antropogénicas. Por lo que se debe de investigar y desarrollar a las otras biotecnologías basadas en microorganismos cuyas presentan un alto potencial y múltiples ventajas. Por ejemplo, las microalgas por sus características se pueden explotar en un esquema de biorrefinería. Por ese motivo, a continuación, se presentan las microalgas y tecnologías afines que se utilizan para producir y explotar su biomasa para la mitigación del CO₂ en el marco de la lucha contra el cambio climático y la transición energética.

1.2 Las microalgas

Dentro de los microorganismos con aplicaciones biotecnológicas para la fijación del CO₂, se encuentra un grupo heterogéneo de organismos fotosintéticos que son las microalgas. Bajo ese término de microalgas se agrupan tanto procariotas como las Cianobacterias conocidas como “algas azules” o “algas verde-azuladas” y eucariotas tal como las clorófitas y diatomeas o los euglenófitos, que pueden ser tantos organismos unicelulares como multicelulares (Wang et al., 2008). Estos microorganismos pueden encontrarse en cualquier cuerpo de agua (dulce o marina) y casi en cualquier tipo de ecosistema (suelo, bosque, desierto) cuyos presentan diferentes condiciones de temperatura, pH, salinidad, irradiancia entre otras cosas. En la actualidad ya se han identificado y descrito más de 30 000 cepas (Sathasivam et al., 2019) y se estima que la biomasa microalgal presente en los cuerpos de agua, océanos y aguas dulces, captan alrededor del 50% del CO₂ y producen el 50% del O₂ a nivel mundial (Ianora et al., 2011; NOAA, 2024) .

1.2.1 Características generales

Su principal fuente de energía es la luz, captada durante el día y su conversión en ATP y NADHP mientras que durante el periodo de oscuridad del ciclo luz-oscuridad natural sintetizan moléculas esenciales para el crecimiento. Para poder realizar la captación y conversión de la luz en fuente de energía, las microalgas poseen un aparato fotosintético cuya estructura básica son los *cloroplastos*. Estos están conformados de *tilacoides* unas vesículas con membranas, en forma de disco aplastado y apilados. Los tilacoides se encuentran rodeados de un *estroma*, un tipo de matriz formado por un semilíquido. En el interior de los tilacoides se ubican las antenas que captan los fotones de luz, las clorofilas. La clorofila es uno de los 3 principales pigmentos que se encuentran en las microalgas junto a los carotenoides y las ficobilinas. La nutrición se hace por absorción iónica de C, H, O, N, P, S, K, Ca, Fe y Mg y de cantidades traza de Mn, B, Co, Cu, Zn y Mo. Algunas especies requieren además ciertas moléculas inorgánicas y orgánicas complejas como por ejemplo la vitamina B₁₂ o sílice (Lara Villa et al., 1996). El carbono lo pueden obtener del CO₂, o bicarbonato en forma soluble pero algunas microalgas pueden utilizar fuentes de carbono orgánicas. El conjunto de la fuente de energía, de carbono y los nutrientes necesarios para su crecimiento, permite a la microalga la producción de compuestos bioquímicos esenciales: proteínas, carbohidratos y lípidos. Se distinguen 3 grupos de reservas energéticas los cuales se clasifican de la siguiente manera, los compuestos de bajo peso molecular (azúcares, polioles y glucósidos), los compuestos de polímeros alfa y los compuestos de polímeros beta.

Algunas microalgas se reproducen de forma sexual y otras de manera asexual. En el caso de la reproducción sexual, emplean diversas estrategias: espórica, gamética (isogamia, anisógamia y oogamia) cigótica o somática. En cuanto a la reproducción asexual, estas emplean también diferentes estrategias como la formación de zoosporas, células reproductivas móviles gracias a la presencia de flagelos, de aplanasporas, células reproductivas no móviles, por bipartición, autosporas o monosporas y fragmentación entre otras (Graham & Wilcox, 2000).

Para el crecimiento de las microalgas intervienen factores como la luz, la temperatura, los nutrientes y el grado de mezclado (Pulz, 2001).

1.2.2 Fotosíntesis en las microalgas

El proceso bioquímico de la fotosíntesis oxigénica transforma la radiación solar en moléculas altamente energéticas que permiten el desempeño del metabolismo celular de la microalga. Es una reacción endergónica, es decir hay una ganancia neta de energía en la cual se crean enlaces químicos, característicos del metabolismo anabólico. Las reacciones fotosintéticas ocurren en los cloroplastos de la célula de la microalga. Se distinguen dos tipos de reacciones: luminosas y oscuras (Lakatos et al., 2019; Levasseur et al., 2020). La fotosíntesis inicia con la captación de la luz en la fase luminosa. Con sus antenas, la microalga captura fotones que van a energizar a dos electrones en el Fotosistema II (**Figura 2**). Esto desencadena una serie de reacciones en la que los fotones captados activan la fotólisis del agua. Este proceso genera protones para producir ATP, recuperar los 2 electrones y liberan como subproducto O₂. La acumulación de protones en el tilacoide provoca su transferencia hacia el estroma y se usan para convertir el ADP en ATP para el ciclo de Calvin. Mientras tanto, los dos electrones transferidos en la cadena de transporte estimulan el bombeo de más protones hacia el tilacoide. No obstante, van perdiendo energía a lo largo de la cadena por lo que al pasar por el Fotosistema I son nuevamente energizados para continuar su viaje en la siguiente cadena de transporte. En esta segunda ruta, los electrones sirven para producir NADPH, molécula esencial para la síntesis de azúcares. Se puede resumir la reacción global de la fase luminosa de esta manera:



La reacción de la fase luminosa es complementaria al ciclo de Calvin-Benson, ya que proporciona el ATP y NADPH necesarios para sintetizar gliceraldehído-3-fosfato (G3P). Posteriormente los carbohidratos necesarios para realizar las funciones básicas del metabolismo celular se sintetizan a partir del G3P obtenido del paso anterior. En el ciclo de Calvin-Benson, conocido como de “reacciones oscuras” o independientes de la luz, se fija el CO₂ y con H₂O se producen carbohidratos (Markou et al., 2012; Masojídek et al., 2013). El ciclo tiene lugar en el estroma de los cloroplastos y se puede resumir en 3 etapas: fijación, reducción y regeneración.

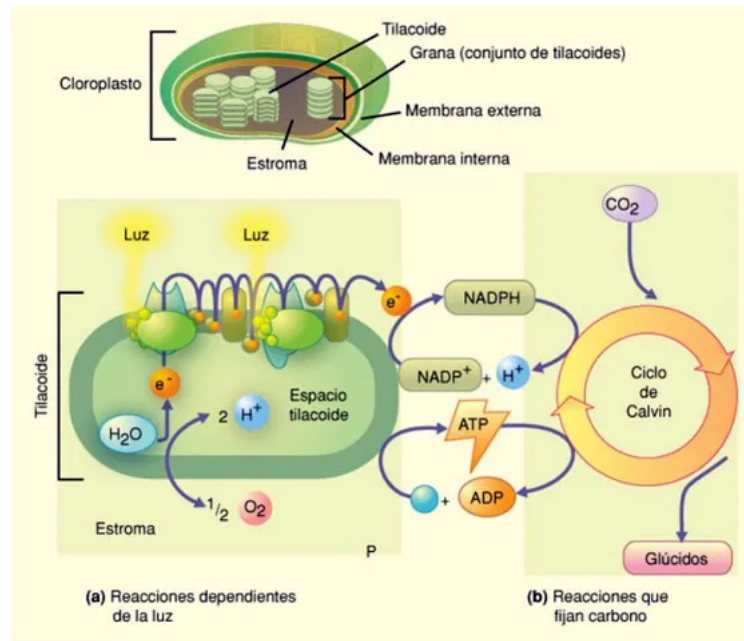


Figura 2. Fotosíntesis. Tomado de (Menéndez Valderrey, 2015).

En primer lugar, al azúcar de 5 carbono (C), ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP), se le agrega el CO_2 catalizado por la enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCo). Esa reacción produce 6 moléculas de fosfoglicerato de 3C, cada una se convierte en gliceraldehído-3-fosfato (G3P) consumiendo ATP y NADPH. De las 6 moléculas de G3P, una tiene un destino diferente: una G3P sale del ciclo y sirve de base para la producción de hidratos de carbono mientras las otras reintegran el ciclo para regenerar la RuBP. Cabe mencionar que, en el caso de las cianófitas, que son procariotas, las reacciones de fotosíntesis ocurren en el citosol de la célula ya que carecen de cloroplastos (Markou et al., 2012).

Aunque todas las microalgas realizan la fotosíntesis, se pueden clasificar de acuerdo a la fuente de carbono y la de energía, que utilizan: a) fotoautotrófico (luz-energía y CO_2 -fuente de carbono); b) heterotrófico (moléculas orgánicas como fuente de carbono y energía); c) Mixotrófico (luz, carbono orgánico y CO_2); d) Fotoheterotrófico donde la luz es necesaria para usar los compuestos orgánicos como fuente de carbono; este sistema es parecido a la mixotrofia pero de hecho no está bien definido; e) los organismos auxótrofos, estos requieren de algún compuesto que no pueden sintetizar ellos mismos al carecer de la ruta metabólica correspondiente como por ejemplo la vitamina B12.

1.2.3 Composición bioquímica

Por lo general las células vivas suelen estar constituidas de 3 principales compuestos: *proteína*, *carbohidratos* y *lípidos*. Así, las microalgas se diferencian entre sí por su composición bioquímica y el tipo/perfil de proteínas, carbohidratos y lípidos que sintetizan. Adicional a estos 3 principales compuestos, como organismos fotosintéticos, las microalgas se diferencian también por el tipo de *pigmentos* que emplean para cosechar la energía lumínica.

Proteínas

Las proteínas son moléculas que por analogía pueden ser asimiladas a lo que es el motor en un coche, realizan funciones básicas y esenciales para el buen funcionamiento celular. Están involucradas en la estructura celular, en la transducción de señales, movimiento, catálisis de reacciones en forma de enzimas, transporte de compuestos y también como transportadoras de electrones (Cavonius et al., 2016). Ese compuesto tiene diferentes aplicaciones como biocomponentes (buscar ejemplos alternativos de uso de proteínas) o como fuente alimenticia tanto animal como del ser humano.

Carbohidratos

Los carbohidratos son el combustible principal de las células de microalga. Adicionalmente, llevan funciones estructurales, de protección y de almacenamiento de energía. Se pueden encontrar en forma de azúcares, celulosa, hemicelulosa, polisacáridos y almidón, entre otros. Su principal aplicación es la producción de biocombustibles como metano, hidrógeno y etanol entre otros. También tienen aplicaciones como biomateriales, bioquímicos y bionutrientes entre otros. Se usan para producir ácidos orgánicos tal como ácido láctico y succínico o polihidroxicanoatos para bioplásticos (Cesário et al., 2018). Estudios han mostrado propiedades antivirales, antimicrobianas y antioxidante así como bioestimulantes para plantas (Vieira Costa et al., 2021).

Lípidos

Existe una gran variedad de lípidos, los cuales han sido clasificados en diferentes nomenclaturas como glucolípidos o acilglicérido. No obstante, la mayoría de las microalgas suelen sintetizar ácidos grasos. Los lípidos juegan un papel en 3 principales funciones: estructural en la pared celular, sustancia de reserva para la síntesis de otros compuestos y fuente de energía. Los lípidos suelen servir de almacén de energía y la biomasa microalgal los produce y acumula cuando enfrenta condiciones no favorables de crecimiento. Debido a los diferentes roles que puedan tener en el metabolismo de la microalga, las microalgas sintetizan ácidos grasos los cuales son precursores de diferentes tipos de lípidos. Entre ellos se puede mencionar algunos como esteroides, ceras, glicolípidos, carotenoides, lípidos polares y no polares y fosfolípidos. La biomasa microalgal suele tener una línea basal de contenido lipídico de entre 1 y 30% de su peso. Como mencionado anteriormente en ciertas condiciones de crecimiento, algunas cepas pueden acumular entre 2-4 veces más lípidos, así se han reportado que algunas cepas pueden alcanzar hasta el 75% del peso seco (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016). La extracción de lípidos se hace generalmente mediante un solvente afín a estos por lo que se usa solventes orgánicos lipofílicos, por ejemplo, hexano o cloroformo, mezclas como cloroformo-metanol. También se pueden extraer mediante fluidos supercríticos.

Pigmentos

Los pigmentos son principalmente las antenas para captar los fotones de luz y usar su energía en su metabolismo. Algunos sirven para protegerse de la radiación solar. Por lo que existen diferentes clases de pigmentos: clorofila-a (verde intenso), clorofila-b (verde), carotenos (naranja), ficobiliproteínas (rojo y azul), xantofila (amarillo) y antocianinas (rojizo, purpurado y azulado). Varios pigmentos que no son clorofilas suelen tener un alto valor agregado ya que pueden tener aplicaciones en distintas industrias como alimenticia, cosmética y farmacéuticas, con diferentes propósitos. En efecto, varios pigmentos han presentado propiedades antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenas, beneficios en la salud como el estímulo del sistema inmunológico. En la biomasa microalgal, la clorofila llega a representar hasta 4% del peso seco, comparado a los 0.2-1.7% del peso seco que alcanza la luteína, un carotenoide (Iwamoto et al., 2024; Xie et al., 2021). La luteína se usa para prevenir la degeneración

macular (Iwamoto et al., 2024). Otros como las ficobiliproteínas o antocianinas también representan menos del 1-2% del peso de la biomasa. La astaxantina tiene se utiliza como parte de la alimentación de los salmones de acuicultura para darles su color, también en la cosmética como antioxidante en cremas para la piel (Su et al., 2023). En condiciones de estrés algunas cepas son capaces de superar estos valores y alcanzar hasta un 14% como es el caso de *Dunaliella* bajo estrés salino (Su et al., 2023).

1.2.4 Síntesis de moléculas energéticas

La fotosíntesis como se explicó en la sección correspondiente, es una reacción endergónica y se divide en 2 tipos de reacciones: luminosa y oscuras. Del ciclo de Calvin de la fase oscura se deriva/depende la síntesis de varias moléculas. La producción de los carbohidratos, $C_n(H_2O)_n$, depende del uso que tendrá en la célula de la microalga. Para la síntesis de almidón, primero el bicarbonato es transferido del citosol al estroma del cloroplasto y luego al tilacoide gracias a unos complejos proteicos. El bicarbonato es convertido en CO_2 mediante las enzimas anhidrasas carbónicas (AC). No obstante, la consecuencia de la acumulación interna de CO_2 resulta en la inhibición de la RuBisCO por lo que altera la eficiencia de la fotosíntesis. En efecto la inhibición de la RuBisCO tiene por consecuencia liberación de CO_2 durante la descarboxilación de la serina en la mitocondria afectando hasta un 25% la eficiencia de la carboxilación en el proceso de fotorrespiración.

Como se indicó anteriormente, una parte de los G3P se mantiene en el ciclo de Calvin-Benson y la otra parte se ocupa en la producción del almidón. Los G3P son convertidos en fructosa 1,6-bifosfato con el fosfato dihidroxiacetona, a su vez es transformado en glucosa-1-fosfato, el cual sirve de material de base para la síntesis de almidón.

Su síntesis consta de 3 etapas 1) activación de la glucosa, 2) elongación de cadena y 3) ramificación. La primera y más importante consiste en activar la glucosa como donador de glicósilo en la siguiente etapa. La glucosa se transmuta en ADP-glucosa, forma activada de la glucosa y permite la elongación de cadena para su posterior

ramificación. La enzima almidón sintasa va agregando los residuos de glucosa de la ADP-glucosa a moléculas de almidón.

Los ácidos grasos se caracterizan por una larga cadena lineal hidrocarbonada de 12 a 22 átomos de carbono, saturados e insaturados y presentando en su extremidad un grupo carboxilo. La posición y el número de enlaces dobles varían de 1 a 6. Algunos tipos de lípidos son más comunes, los ácidos grasos de 16C a 18C, pero eso depende de cada especie. En efecto, algunas cepas producen mayoritariamente moléculas de tamaño medio, 10C a 14C o larga, mayor a 20C. Cabe mencionar que la mayoría de las especies de aguas dulces acumulan en mayor proporción a ácidos grasos saturados y monoinsaturados, y producen ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, Polyunsaturated Fatty Acids) en menor cantidad. Para las especies marinas, los PUFAs llegan a ser la mayor fracción de los TAGs que produce la microalga.

La síntesis de los lípidos es producto del ciclo de Calvin-Benson en el cual el ATP y NADPH obtenido durante las reacciones de fase luminosa, los cuales sirven de sustrato. La biosíntesis de estos compuestos se puede resumir a 3 etapas. Antes el CO₂ se fija en moléculas de 3C y se convierte a piruvato mediante la glicolisis. Con el piruvato se produce el acetil-CoA, precursor de los ácidos grasos, dentro del cloroplasto. Luego, inicia la primera etapa, la cual es la carboxilación del acetil-CoA y precede la adición descarboxilativa y β -reducción. La adición o elongación de cadena corresponde a la segunda etapa, y se hace mediante profusos ciclos hasta la obtención de ácidos grasos, ACIL-ACP. Finalmente, tercer y última etapa, se obtienen triacilglicéridos con la adición de un tercer acetil-CoA al diacilglicerol catalizado por la aciltransferasa (Courchesne et al., 2009; C. Yang et al., 2000). La mayoría de estas reacciones se desarrollan en los cloroplastos,

1.2.5 Portafolio de productos y aplicaciones

Portafolio

Las microalgas pueden generar muchos productos de interés y tienen diferentes aplicaciones comerciales como: en la acuicultura, los cosméticos, la alimentación humana o las energías. Se cultivan a nivel industrial para obtener moléculas de alto

valor agregado tales como: fármacos, ácidos grasos polinsaturados para alimentos infantiles, complementos nutricionales, pigmentos en tintes naturales, bioestimulantes entre otros. También puede usarse como materia primaria para diferentes tipos de combustibles renovables (con huella de carbono neutro) como biodiesel, biometano, biohidrógeno, biopetróleo y bioetanol (Donohue & Cogdell, 2006; Meng et al., 2009; Rodolfi et al., 2009a; Schenk et al., 2008). Una posible clasificación es de un lado los biocombustibles y de otro lado los de bajo volumen de producción con alto valor agregado la cual se puede organizar en 8 macro categorías que son: bioquímicos, biocombustibles, biofarmacéuticos, biocosméticos, biomateriales, alimentación animal y humana y biofertilizantes representadas en la **Figura 3**.

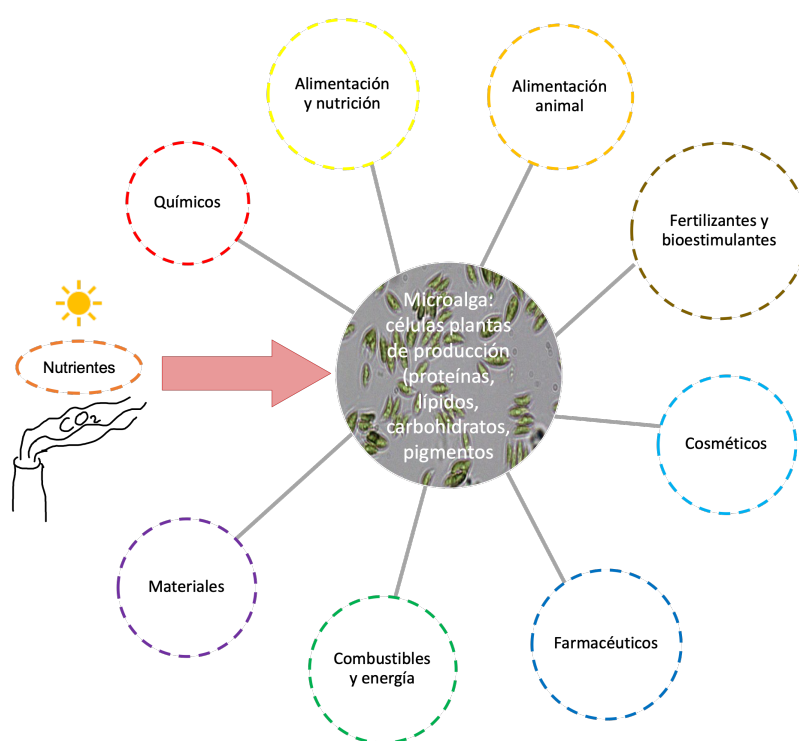


Figura 3. Aplicaciones de las microalgas. Adaptado de (Budzianowski, 2017; Gorrry et al., 2018).

La mayor aplicación, a nivel industrial es para la nutrición humana, animal y como materias primas para la industria farmacéutica. En efecto, varios estudios han reportado sobre el valor nutricional de diferentes cepas, así como beneficios sobre la salud. En el sector de la salud y nutrición, *Chlorella* es producida por más de 70 compañías para aplicaciones terapéuticas, en Japón algunos reportes la recomiendan

para el tratamiento en úlceras gástricas, heridas y estreñimiento o como medida preventiva para la arterioesclerosis, la hipertensión y el colesterol (**Tabla 2**). Espirulina es otra microalga utilizada en la alimentación con alto contenido proteico y excelente valor nutritivo como fuente de ácidos grasos que no pueden ser sintetizados por los seres humanos (Becker, 2007; Spolaore et al., 2006a). Además, aportan otros nutrientes como vitaminas, minerales. Estudios han reportado una reducción en los radicales libres y algunos pigmentos como la luteína son antioxidantes. Las principales aplicaciones de los pigmentos de microalgas son como colorantes para alimentos o también como suplementos alimenticios tanto humanos como animales, por ejemplo: el β -caroteno que es transformado en vitaminas o pigmentos formando compuestos proteicos como las ficobiliproteínas (de color rojo o azul) además pueden utilizarse en la industria de los cosméticos y los productos farmacéuticos.

La biomasa microalgal es una muy buena opción para alimentar animales ya que incide de manera favorable sobre su fisiología y por lo tanto su apariencia. Adicionalmente, algunas especies dependen de las microalgas para la coloración de su carne como los camarones. También se produce carotenoides como la astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Lorenz, R.T., Cysewski, 2000) o con la microalga *Dunaliella salina*. La astaxantina es un antioxidante muy potente que al contrario de muchos carotenoides no se convierte en vitamina A cuyo exceso es tóxico en el cuerpo humano. Su producción es principalmente para alimentos para peces y crustáceos. Además de eso, pueden producir los ácidos grasos tipo omega 3 y 6, que los seres humanos y los animales no pueden sintetizar. El único ácido graso omega 3 producido comercialmente mediante las microalgas como suplemento en la dieta diaria de los niños (O. P. Ward & Singh, 2005) se obtiene de la microalga *Cryptocodinium cohnii*. La **Tabla 2** resume las aplicaciones del portafolio de los bioproductos que se pueden obtener de las microalgas.

Tabla 2. Productos, usos y producción anual para diferentes especies de microalgas. Adaptada de Gorry et al. (2018).

Aplicación	Cepas	Ejemplos de funciones y/o moléculas	Volumen o precio de mercado
Alimentación y nutrición	<i>Arthrospira platensis</i> , <i>Arthrospira maxima</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Muriellopsis</i> sp., <i>Cryptocodinium</i> , <i>Schizochytrium</i> ,	- Complemento alimenticio. - Alto contenido en proteínas, hierro - principales ácidos grasos insaturados, - vitamina B12 - Protección contra la hipertensión y problemas renales, - inmunoestimulantes, - efecto sobre los niveles de lípidos en sangre. - Altos niveles de ciertos carotenoides antioxidantes	12-50 millones de dólares al año para las ficobiliproteínas
Alimentación animal	<i>Chlorella</i> , <i>Tetraselmis</i> , <i>Isochrysis</i> , <i>Pavlova</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Chaetoceros</i> , <i>Espirulina</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Skeletonema</i> , y <i>Thalassiosira</i>	- Alimento para zooplancton, piscicultura, cría de pollos. - Coloración de la carne del salmón o el exoesqueleto y la piel de los camarones y otras especies. - Mejora la fisiología de los animales de compañía y de granja	32.000 millones de dólares/año para <i>Chlorella</i> sp. (□-1,3-glucan, estimulante inmunitario en peces)
Fertilizantes y bioestimulantes	<i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Espirulina</i> , <i>Haematococcus</i> , <i>Chlorella</i> sp. y <i>Nannochloropsis</i> sp.	- Mejor calidad y fertilidad de suelos - Retención de agua - Liberación de nutrientes esenciales (fosfato, nitrógeno y oligoelementos) - Reducción del uso de fertilizantes químicos - Promotores del crecimiento de las plantas - Prevención de infecciones vegetales	Los bioestimulantes representan el 27% de los 3.400 millones de dólares, con precios de 1.300-1.500 euros/tonelada para los bioestimulantes de microalgas
Cosméticos	<i>Espirulina</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Haematococcus</i>	- Proteínas, - Vitaminas,	La astaxantina producida por <i>Haematococcus pluvialis</i> tiene precios

		- Minerales - Pigmentos - Ayudan a regenerar los tejidos - mejoran la síntesis de colágeno.	de mercado entre 1900-7000 USD/kg
Farmacéuticos	<i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Tolypothrix byssoidea</i> , <i>Chlamydomonas</i>	- Reducción de la actividad de la tirosinasa por inhibición - La tubercidina tiene actividad en la leucemia linfocítica. - El crecimiento del linfoma (células tumorales sanguíneas) en ratones ha sido detenido por la L-asparaginasa.	Hasta la fecha no se ha comercializado ningún producto farmacéutico derivado de microalgas. Sin embargo, el valor total de la industria farmacéutica mundial ascendió a 955 000 millones de dólares en 2011 (LEK, 2013) y el mercado de principios activos farmacéuticos a 101 000 millones de dólares.
Combustibles y energía	<i>Scenedesmus almeriensis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlamydomonas</i> , <i>Dunaliella</i>	- Ácidos grasos para biodiésel u otros combustibles de hidrocarburos - Biogás - Etanol	209 000 000 toneladas de ácidos grasos a 920 \$/tonelada
Materiales	<i>Chlorella infusionum</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Schizochytrium</i>	- Almidón (bioplásticos) - proteínas (bioplásticos). - Fitol para y esteroides para tensioactivos. - Aminoácidos o péptidos para poliuretanos y plastificantes.	1,5 millones de toneladas de termoplásticos a partir de proteínas a 1900 \$/tonelada
Químicos	<i>Dunaliella</i> , <i>Schizochytrium</i>	- Ácido láctico, - biometanol, - ácido glutámico - sorbitol - glicerol	36 000-2 300 000 toneladas de glicerol a 1550-3400 \$/tonelada

Algunas cepas como *Nostoc*, *Anabaena*, *Hamaetococcus* o *Chlorella* se usan de bioestimulantes y/o biofertilizantes en los cultivos. Su uso permite reducir la aplicación de fertilizante químicos cuyo uso intensivo y agresivo erosiona los suelos y a largo plazo reduce los rendimientos agrícolas y afecta los ecosistemas. El vertimiento del exceso de fertilizantes químicos en cuerpos de agua puede provocar eutrofización de

esos mismos. Cabe mencionar que, por ser producido por la industria petroquímica a partir de los combustibles fósiles, el uso de estos productos contribuye a la emisión de GEI. Existen diferentes tipos de biofertilizantes: microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfato y promotores del crecimiento de las plantas. De igual modo, las microalgas juegan un papel importante en los ecosistemas del suelo ya que contribuyen a la fertilización del suelo mediante la mejora de la porosidad por su estructura filamentos, la liberación de aminoácidos, hormonas y vitaminas que favorecen el crecimiento de las plantas (Chatterjee et al., 2017; Pulz & Gross, 2004; Singh et al., 2016). Por la estructura de las microalgas y la producción de sustancias adhesivas de ciertas cianobacterias, se incrementa la retención de agua en suelos. Finalmente, hasta en su muerte, contribuyen a mejores suelos aportando materia orgánica y minerales con su descomposición. Ciertas cepas tienen propiedades de prevención del crecimiento de malas hierbas, producen sustancias antivirales y antibacterianas que protegen las plantas.

Otras aplicaciones de las microalgas son los cosméticos y farmacéuticos. Algunos compuestos de estas son potenciales fuentes para nuevos fármacos. En efecto, varios trabajos agencian la posible fuente de moléculas bioactivas para la industria de la salud tales como agentes antioxidantes, antiinflamatorios, antitumorales, anticancerígenos, antimicrobianos, antivirales y antialérgicos, junto con otras propiedades farmacéuticas (Deniz et al., 2017). En particular, se ha identificado que algunos pigmentos como los carotenoides o las ficobiliproteínas y algunos polisacáridos mostraron actividades antioxidantes, antialérgicas, anticancerígenas y antiinflamatorias (D. Y. Kim et al., 2016). El mercado de la farmacéutica tiene un tamaño de cerca de 955 000 millones de dólares y solamente para las sustancias correspondiendo a las sustancias activas de fármacos ese mercado tiene un valor de cerca de 101 000 millones de dólares (van der Voort et al., 2015). Las siguientes sustancias ácidos grasos, pigmentos, péptidos y polifenoles se asocian a las actividades antimicrobianas y antivirales. Por otro lado, la industria cosmética ya cuenta con el uso de algunos pigmentos antioxidantes producidos con microalgas como es el caso de la astaxantina. Otras aplicaciones por la cual ya se utilizan en esta industria son agentes aglutinantes y texturizantes. El papel de los antioxidantes es proporcionar una protección dérmica (Jahan et al., 2017; Stolz & Obermayer, 2005; H.

M. D. Wang et al., 2015). Algunos compuestos son capaces de proteger contra las radiaciones UVA y/o UVB, otros como los carotenoides sirven de estabilizadores y en productos de protección solar. Los cosméticos azules como lápices de ojos, esmaltes para uñas o labiales contienen ficocianina un pigmento natural de color azul. Las proteínas de las microalgas parecidas al colágeno tienen aplicaciones en cremas o geles hidratantes, antienvjecimiento y antiarrugas. El fucoidan, un polisacárido se utiliza por sus propiedades protectoras e hidratantes. Para ciertos productos cosméticos que requieren estabilizantes, espesantes o emulsionantes se obtienen agar, carragenina o alginatos de las microalgas. Basado en el paisaje de los patentes, es un sector dominado por países europeo y en particular por Francia (Chilton et al., 2016).

Otro sector en desarrollo es la industria a base de compuestos bioquímicos. En efecto, para sustituir a los derivados del petróleo los cuales en un futuro cercano se harán escasos, la investigación y las industrias químicas buscan fuentes alternativas de compuestos químicos de origen biológicas. Las microalgas son una excelente alternativa ya que producen una amplia variedad de moléculas básicas para productos bioquímicos además de ser la clase de bioproductos más amplia de alto valor agregado (Bozell & Petersen, 2010; Budzianowski, 2017).

Unas de las primeras aplicaciones investigadas y con las cuales se inició su industrialización es la producción de bioenergías. Todos los combustibles derivados del petróleo, hidrocarburos, combustibles líquidos y gaseosos, pueden ser obtenidos a partir de biomasa microalgal hasta asfaltos (Bahadar & Bilal Khan, 2013; Budzianowski, 2017; Chew et al., 2017). Por ser unos de los primeros sectores en ser investigado, ha habido una gran producción de patentes. No obstante, la rentabilidad económica no se ha logrado debido a varios retos que aun enfrenta los procesos de producción de biocombustibles de microalga y los bajos costos de los combustibles fósiles. A partir de los lípidos de las microalgas se puede producir queroseno, gasolina o diésel. La fermentación de los carbohidratos produce bioetanol y la digestión anaeróbica permite producir biogás. Algunas cepas de microalgas son capaces de producir de forma directa hidrogeno mediante fotólisis. En el campo de las pilas de combustible, se ocuparon microalgas en un compartimento catódico y bacterias en el ánodo para la producción de electricidad (Gouveia et al., 2014; D. J. Lee et al., 2015).

Las microalgas producen oxígeno y las bacterias oxidan materia orgánica y producen electrones, los cuales se circulan en un circuito externo mediante el electrodo catódico. Se conjunta la producción de electricidad al tratamiento de aguas residuales con carga orgánica y ambos tipos microorganismos ayudan a reducir la carga orgánica y inorgánica del agua.

Además del portafolio de productos que se puede obtener de las microalgas, existen varias aplicaciones en procesos que se conjuntan a la producción de biomasa como la captura de CO₂, y el tratamiento de aguas residuales. En efecto, las microalgas pueden complementar o ser usada para la biorremediación de las aguas residuales antes de ser vertidas o usadas por las sociedades humanas. Las microalgas consumen materia orgánica e inorgánica lo cual reduce la carga orgánica presente en el agua (Debnath et al., 2021). El uso de la microalga se hace en complemento a otros procesos de tratamientos de aguas. Adicionalmente, dentro de los beneficios ambientales se encuentra igualmente la eliminación de metales pesados y la producción de oxígeno. Por ejemplo, las cepas *Galdieria sulphuraria*, *Chlorella vulgaris*, y *Aphanocapsa zanardinii* han sido reportadas por fijar metales pesados de aguas residuales (Dzizi et al., 2022; Kharel et al., 2023; Kwarciak-Kozłowska & Sławik-Dembiczak, 2021). En su estudio Kharel et al. (2023), *Galdieria sulphuraria* logró una remoción cerca del 50% del cadmio presente en el medio de cultivo.

Actualmente la más desarrollada a nivel industrial y una de las más investigadas es la producción de biomasa para la nutrición humana y ganadería (Ummalyma et al., 2023). A pesar del gran potencial de las microalgas, aún falta más investigación, inversión y políticas gubernamentales para propulsar las microalgas a un mayor nivel de industrialización (Gorry et al., 2017).

Biocombustibles

La mayoría de las naciones han firmados los diferentes tratados sobre el cambio climático y objetivos de desarrollo sostenible. Entre ellos está el objetivo de realizar de transitar a un “mix” energético con combustibles alternativos de huella de carbono neutra y de fuente renovable. Existen diferentes categorías de energía alternativa y renovable. Unos de ellos son los bioenergéticos producidos a partir de biomasa.

Los biocombustibles se pueden clasificar en 3 generaciones. La primera generación consiste en usar cultivos de hortaliza como fuente de energía mediante procesos de transformación para obtención de dichos biocombustibles. Para ser una fuente renovable deben ser cultivado de manera sostenible, tener una alta eficiencia energética y alto rendimiento de producción para compensar las emisiones de GEI a la hora de quemar el biocombustible. Sin embargo, presenten varias desventajas por lo que su uso no se ha extendido a nivel global. Por ejemplo, lograr una huella de carbono neutra es difícil debido a rendimientos no lo suficientemente altos, además de entrar en competencia directa con la agricultura para alimentación humana y animal, por el uso de suelo fértiles (Chisti 2007; Mata et al., 2010).

La segunda generación de biocombustible consiste en el uso de plantas no comestibles con costos de producción menores y con mayor rendimiento por superficie ocupada. Aunque no requerían de suelos fértiles, para mejorar sus rendimientos se ocuparon suelos dedicados a la producción de alimentos y entró en competencia con la agricultura (Sharma et al., 2020; Moncada et al., 2014; Hossain et al., 2019).

De ahí el interés para los biocombustibles de tercera generación, estos se basan en biomasa de microalga que puede ser cultivada en superficie no cultivables y evitar la competencia con la agricultura. Además, presentan varias ventajas que las hacen tener un alto potencial biotecnológico como productividades por área mayor a cultivos tradicionales, se pueden extraer una multitud de bioproductos con una amplia gama de aplicaciones (Gorry et al., 2018; Hossain et al., 2019; Xue et al., 2020).

A partir de la biomasa microalgal se puede producir una gran variedad de biocombustibles, a continuación, la lista de los combustibles que se pueden obtener a partir de la transformación de la biomasa: Biodiesel, hidrocarburos, biometano, hidrogeno, alcohol (etanol), combustibles líquidos, biosyngas (Bahadar et al., 2013; Boukhetaia & Blanquet, 2011).

La **Tabla 3** recapitula los combustibles que se pueden generar y de manera breve los pasos para transformar la biomasa y obtener dichos biocombustibles. Por ejemplo, la producción de etanol se hace mediante la hidrólisis de la biomasa y su fermentación

o bien se puede realizar por vías termoquímicas mediante un proceso de gasificación el cual genera syngas y luego mediante fermentación ese syngas se puede generar etanol (**Tabla 3**). En el caso del biometano y biohidrógeno ambos se pueden producir a partir de la digestión anaeróbica de la biomasa microalgal (**Tabla 3**).

Tabla 3. Obtención de los diferentes combustibles, tabla de adaptada de (Bahadar & Bilal Khan, 2013; Boukhetaia & Blanquet, 2011).

Proceso de transformación	Transformación 1	Molécula plataforma	Transformación 2	Producto final
Vías bioquímicas	Hidrólisis microbianas	Azúcares	Fermentación	Alcoholes Isoprenoides Hidrógeno
	Cosecha, extracción	Lípidos	Transesterificación	Biodiesel
			Descarboxilación	Hidrocarburos
	Metanización	Biogás	Metanización	Biometano
	Fotólisis (indirecta)	agua (nitrógeno o hidrógeno)	(nitrogenase o hidrogenase)	Hidrógeno
Vías termoquímicas	Gasificación	Syngas	Fermentación	Alcohol (etanol)
			Fisher-Tropsch	Combustibles líquidos
			Metanización	Alcoholes BioSNG
	Pirolisis/Torrefacción	Biobrutos/ bioaceites	Refinería	Hidrocarburos

Los combustibles pueden producirse por gasificación de la biomasa microalga (generación de biometanol), por fermentación (bioetanol), transesterificación de los lípidos (biodiesel), conversión hidrotermal, pirólisis (biometano, biolípidos), licuefacción hidrotermal (Bahadar & Bilal Khan, 2013).

Hidrógeno

El biohidrógeno se obtiene mediante 2 vías: termoquímica (**Tabla 3**) o biológica. En la vía termoquímica se procesa la biomasa mediante gasificación, pirolisis o hidrólisis. A la par de los procesos termoquímicos, es posible explotar la capacidad metabólica de ciertos organismos para producir de forma directa o indirecta hidrógeno. La producción biológica de hidrógeno se clasifica en 2 categorías: procesos metabólicos dependientes e independientes de la luz (Bahadar & Bilal Khan, 2013; Venkata Mohan & Pandey, 2019). En los procesos que dependen de la luz, encontramos la biofotólisis y la fotofermentación. La fermentación oscura, proceso independiente de la luz, produce biohidrógeno y también es conocido como proceso de acidogénesis. El hidrógeno es un subproducto de ciertas reacciones metabólicas o un compuesto intermedio de estas. Lo puede producir tanto eucariotas como procariotas: algas verdes, cianobacterias y bacterias fotosintéticas. Las microalgas son capaces de producir hidrogeno mediante biofotólisis directa o indirecta usando CO₂, luz y agua. Por ejemplo, en ciertas condiciones de cultivo, como la ausencia de sulfuro en el medio de cultivo, *C. reinhardtii* (Chisti, 2007; Mussgnug et al., 2010a) produce hidrógeno. En la fotólisis directa, la lisis del agua produce protones los cuales serán reducidos para formar H₂ mediante la oxidación de la ferredoxina reducida (Fd). La Fd cede su electrón a la hidrogenasa para finalmente poder reducir los protones en exceso producido por la hidrólisis (Venkata Mohan & Pandey, 2019). En el caso de la fotólisis indirecta, el microorganismo usa almidón en lugar de agua, como fuente de protones para la producción de H₂. Mientras las bacterias fotosintéticas lo generan por medio de la fotosíntesis anoxigénica o fotofermentación degradando moléculas orgánicas en condiciones anaeróbicas. Estos microorganismos producen H₂ y CO₂ con una mayor eficiencia que las microalgas ya que en estas la producción de O₂ termina inhibiendo la enzima hidrogenasa. Adicional a esto, se puede obtener hidrógeno por la fermentación oscura de los carbohidratos o de otras moléculas orgánicas de la biomasa o acidogénesis (Kapdan & Kargi, 2006; Venkata Mohan & Pandey, 2019). Es importante mencionar que se requiere inhibir parcialmente los microorganismos susceptibles de consumir el H₂ como las bacterias metanogénicas y con el fin de maximizar su producción. En efecto, la inhibición total de estos

microorganismos genera condiciones tóxicas para los microorganismos productores de H_2 . La producción de H_2 aún requiere de investigación ya que los rendimientos son bajos y tienen varios retos por resolver para su escalabilidad.

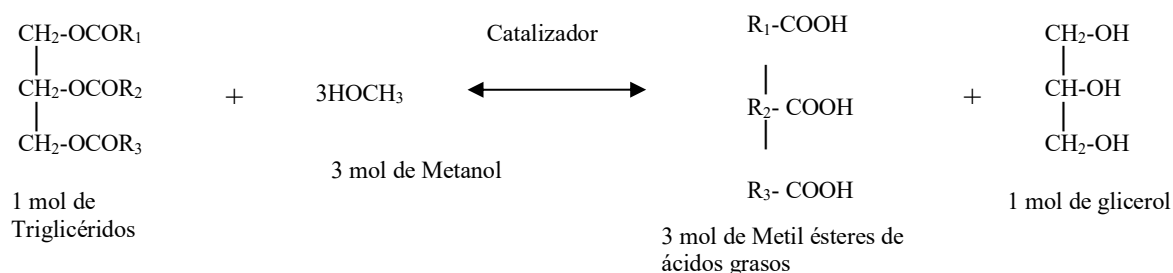
Etanol

Se produce a partir de la fermentación alcohólica de los carbohidratos contenidos en la microalga. La producción de bioetanol consta de varias etapas: pretratamiento, etapa de hidrólisis, fermentación y destilación. Los pretratamientos son necesarios para liberar los carbohidratos contenidos en las células de las microalgas. Después, debido a que los microorganismos que producen alcohol solo pueden consumir azúcares simples, el objetivo de la hidrólisis es producir monómeros de azúcares a partir de los polímeros de carbohidratos (Choi et al., 2010). La fermentación alcohólica inicia con la glucólisis de los monómeros de azúcares, luego el piruvato obtenido se descarboxila y finalmente el acetaldehído es convertido en alcohol. Al cabo de la fermentación, falta concentrar el bioetanol, ya que los microorganismos generalmente no toleran más de 12-15% de concentración en alcohol. Para eso, se destila el caldo de fermentación. Existen 3 técnicas convencionales, que son la destilación azeotrópica, la extracción líquido-líquido y la destilación extractiva (Sharma et al., 2020). No obstante, la producción de bioetanol enfrenta varios retos como la presencia de pentosa y hexosa los cuales se requieren reducir a monómeros para ser digestible por los microorganismos, la aparición de inhibidores durante el proceso de hidrólisis y el tratamiento de los residuos resultados de estos procesos. Además, se debe de encontrar un uso o reciclar los productos secundarios. La producción de bioetanol depende mucho de la disponibilidad de recursos como los lignocelulósicos. Finalmente, el impacto ambiental de la producción como lo menciona (Sharma et al., 2020) sigue siendo negativo, debido entre otro, a que un exceso de uso de los residuos lignocelulósico provoca mayores erosiones del suelo.

Biodiesel

El biodiesel se compone de monoalquilésteres obtenidos mediante reacciones de alcoholes de cadena corta (metanol o etanol en general) con ácidos grasos de cadena

larga obtenidos de biomasa renovable. Una vez que la biomasa ha sido recuperada del cultivo, hay que someterla a un proceso de transesterificación (o alcoholólisis) de los lípidos, donde una molécula de triglicéridos (ácidos grasos) se esterifica y se generan tres moléculas de metil-éster y una de glicerol según la reacción de transesterificación o alcoholólisis.



La reacción es catalizada mediante ácidos, álcalis (NaOH, KOH) o la enzima lipasa. Los álcalis funcionan 4000 veces más rápidos que los ácidos. La reacción se lleva a cabo a 60°C (el metanol hierve a 65°C), con una presión de 1 atm y con 1% en concentración por peso de aceite de catalizador (Ma & Hanna, 1999).

La producción de biodiesel puede hacerse partir de: aceites que provienen de cultivos alimentarios (primera generación), cultivos de plantas no destinadas para alimentos (segunda generación) o aceites quemados de restaurantes o grasas animales. Sin embargo, los aceites provenientes de cultivos destinados para alimento generan conflictos debido a la competencia que se genera con los productos alimentarios y además su rendimiento es bajo. Entonces las microalgas son una alternativa que elimina ese conflicto relacionado con la utilización de superficies agrícolas puesto que se pueden cultivar en superficies no fértiles y presentan un rendimiento mayor por unidad de superficie utilizada.

Para obtener una alta producción de biodiesel y que sea viable a nivel industrial es necesario seleccionar a la microalga adecuada que acumule alto contenido en lípidos, resistente a las condiciones ambiente, con una productividad de lípidos alta y el perfil idóneo (Chen et al., 2011).

Se han estudiado diversas estrategias de cultivo y operación de los fotobiorreactores para incrementar el contenido y la productividad de los lípidos con el fin de identificar las mejores especies (Chen et al., 2011). Algunas de ellas son la aplicación de

diferentes niveles de salinidad, limitación de nitrógeno durante el crecimiento (Breuer et al., 2012). Sin embargo, esa estrategia tiene la desventaja de que el aumento en los lípidos limita el aumento de la biomasa, la limitación de fósforo causa cambios en el perfil de ácidos grasos y contenido total de lípidos (Khozin-Goldberg & Cohen, 2006), la aplicación de ciclos de luz/oscuridad también favorece el metabolismo heterotrófico de ciertas microalgas y un cambio de pH favorece la acumulación de lípidos (Cabello et al., 2015; Gorry, 2015).

Biogás

El biogás está constituido principalmente de CH₄ (50-75%) y CO₂ que se produce a partir de la digestión anaerobia de materia orgánica donde las principales etapas son la hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (ver apartado **1.4 Digestión anaerobia**, p. 59).

La producción de biogás tiene por fin de sustituir al gas natural, un combustible fósil principalmente constituido de metano (CH₄>90%) y con un uso importante para generación eléctrica, calefacción, cocina y transporte (IEA, 2023). Sin embargo, su uso es sumamente contaminante y contribuye al calentamiento global. Su sustitución por biogás permitiría reducir las emisiones netas de carbono en un 70% al aprovechar los residuos orgánicos y aguas residuales (Weiland, 2010).

Con el fin de mitigar las emisiones de GEI, se ha propuesto generar biogás a partir de biomasa microalgal (Angelidaki & Sanders, 2004; Chisti, 2007; Mussnug et al., 2010a; Sialve, Bernet, Bernard, et al., 2009) pero se requiere caracterizar la composición de la microalga y de la pared celular, que puede influir en la tasa de producción de metano, ya que ésta reduce la disponibilidad de los nutrientes. En consecuencia, sin tratamiento, la producción de metano se limita 200-450 mL CH₄/g VS (volátiles sólidos) en el mejor de los casos, inferior a los 600 mL CH₄/g VS de residuos agrícolas (Mussnug et al., 2010b). Por lo mismo se han sugerido pretratamientos para acelerar el proceso y aumentar la producción de metano a partir de esta biomasa (Mussnug et al., 2010a; Sialve, Bernet, Bernard, et al., 2009). En la sección *1.3.4 Pretratamientos de la biomasa* (p. 51) más adelante, se detallan estos

pretratamientos. Una vez se haya producido el biogás, este se debe de purificar para poder usarse como combustible.

En 2022, la producción de biogás a nivel mundial alcanzó los 72.8 Mtoe (millones de toneladas equivalentes de petróleo), repartidos principalmente entre la Unión Europea (UE) con 21.5 Mtoe, China con 15 Mtoe y EE.UU con 7.5 (IEA, 2020, 2023). En la UE, la producción esta liderada por Alemania y Francia principalmente con digestores en zonas rurales para tratar residuos agrícolas igual que en China. En EE.UU, se han enfocado a aprovechar estiércoles. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura estima que los residuos agrícolas y biomasa de microalga podrían cubrir un 20% de la demanda global de gas para el 2040 (IEA, 2020; U.S. Department of Energy, 2024). Algunos países como la India proyectan tratar aguas residuales urbanas con microalgas y producir biogás en un esquema de economía circular, a través de programas nacionales como el *National Biogas Programme* con *Chlorella* spp. (Government of India, 2022; A. Kumar & Singh, 2021; Prandini et al., 2016; Ramos-Ibarra et al., 2019).

1.3 Cultivo y pretratamiento de microalgas

1.3.1 Sistemas de cultivo

Los sistemas de cultivo pertenecen a dos categorías: los sistemas abiertos y los sistemas cerrados. Los sistemas cerrados se les conoce como fotobiorreactores (FBR) (Chaumont, 1993; Chisti, 2006). Actualmente, la mayoría de la industria ocupa sistemas abiertos, estos incluyen estanques poco profundos, estanques circulares, canales, estanques circulares, *raceway ponds* y de tipo carrusel entre otros. En cuanto a los fotobiorreactores se incluyen las columnas de burbujeo, airlift, de lazo extendido tipo airlift, de placas y otros; donde el mezclado se realiza por suministro del gas (aire, aire + CO₂ puro). Existe una amplia variedad de diseños de sistemas, dependiendo del tipo de agitador, mezclado y disposición entre otro, además que hay sistemas híbridos. Por ejemplo, en los sistemas híbridos se asocian un sistema cerrado a un estanque (Estrada-Graf et al., 2020). Cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas que se presentan en la **Tabla 4**.

Aunque los sistemas abiertos son más baratos, las productividades de biomasa son menores y el riesgo de contaminación es alto debido al bajo control que se puede tener sobre algunas variables. Por otro lado, los fotobiorreactores tienen costos altos y las productividades son más altas, así Pechsiri et al., (2023), reportan productividades de $1.3 \text{ kg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ para fotobiorreactores cerrados contra $0.02 \text{ kg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en estanques abiertos. En cuanto al costo económico y energético varía considerablemente entre sistemas abiertos y cerrados: Por ejemplo, el capital a invertir para sistema tipo *raceway ponds* es relativamente económico con un costo de $2.47 \text{ \$USD m}^{-2}$ contra alrededor de $50 \text{ \$USD m}^{-2}$ para fotobiorreactores planos; el costo energético es también considerablemente mayor para los sistemas cerrados con $1.5 \text{ kWh m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ contra $0.37 \text{ kWh m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Acién et al., 2014; Banerjee & Ramaswamy, 2019; Clippinger & Davis, 2019; Valdovinos-García et al., 2021). Esto se traduce en un costo de la biomasa microalga que puede variar de $3 \text{ \$USD kg}^{-1}$ hasta un $12 \text{ \$USD kg}^{-1}$ dependiendo de si la biomasa es producida en sistemas abiertos o cerrados (Acién et al., 2014; Vieira Costa et al., 2019). Sin embargo, los fotobiorreactores cerrados presentan un riesgo de contaminación menor y se pueden controlar varios parámetros como: irradiancia, temperatura, mezclado y pH. Esto los hace ideal para producir bioproductos de alto valor agregado con requerimientos de pureza estrictos.

Tabla 4. Comparación entre los sistemas abiertos y cerrados de cultivo de microalgas adaptado de (Mata et al., 2010).

Tipo de sistema	Sistema cerrado	Sistema abierto
Riesgo/control de contaminación	Débil/Fácil	Alto/difícil
Control del proceso	Fácil	Difícil
Mezclado	Uniforme	Muy bajo
Régimen de operación	Lote o semicontinuo	Lote o semicontinuo
Espacio necesario	Depende del objetivo de la productividad	FBR < Estanques

Área/volumen	Alta (20–200 m ⁻¹)	Bajo (5–10 m ⁻¹)
Densidad población (células)	Alta	Baja
Inversión	Alta	Baja
Costos de operación	Alto	Bajo
Capital/costos operación estanques	Estanque 3–10 veces menos	FBR > Estanque
Eficiencia fotosintética	Alta	Baja
Control de la temperatura	Más uniforme	Difícil
Productividad	3–5 veces más productivo	Bajo
Pérdidas de agua	Depende del sistema de enfriamiento	FBR ~ Estanque
Estrés hidrodinámico sobre la microalga	Bajo-alto	Muy Bajo
Evaporación del medio de cultivo	Bajo	Alto
Control sobre la transferencia de la fase gas	Alto	Bajo
Pérdidas del CO₂	Depende del pH, alcalinidad, etc.	FBR ~ Estanque
Inhibición por O₂	Problema más grande en los FBR	FBR > Estanque
Concentración de la biomasa	3–5 veces más en los FBR	FBR > Estanque
Escalable	Difícil	Difícil

El diseño de fotobiorreactores cerrados se puede categorizar de la siguiente forma: columna, tubular, de placa, tanques. Dentro de estas principales categorías existen también subcategorías dependiendo de la disposición (vertical o horizontal), del tipo de mezcla (burbujeo, paleta). Los fotobiorreactores de columna tienen una mayor productividad con respecto a la superficie ocupada por el sistema, un menor riesgo de contaminación y de depósito de biomasa debido a su mayor grado de mezclado. Sin

embargo, por su diseño, los requerimientos energéticos para el funcionamiento de estos fotobiorreactores suelen ser mayor debido a que la presión a vencer es alta para el mezclado. Los fotobiorreactores de lazo o de placa maximizan la superficie de irradiancia con la biomasa, aunque por su diseño se generan mayores zonas hidrodinámicamente muertas. En estas zonas, se asienta la biomasa en consecuencia el riesgo de contaminación aumenta, se genera pérdidas de biomasa y disminuye la eficiencia de penetración de la luz en algunas partes del fotobioreactor.

1.3.2 Estrategias para incrementar la producción de moléculas energéticas

Las microalgas son organismos capaces de sobrevivir y adaptarse a diferentes condiciones ambientales, lo cual se ve reflejado en su perfil bioquímico y también en el perfil de los diferentes compuestos que constituyen las diferentes especies. En general, la acumulación de compuestos de interés, en particular carbohidratos y lípidos en microalgas ocurre bajo condiciones de estrés, principalmente con deficiencia de algún nutriente. En efecto varios estudios han mostrado que lípidos, carbohidratos y los metabolitos secundarios se acumulan bajo condiciones específicas de crecimiento: principalmente con un cambio en la concentración de ciertos macro- y/o micronutrientes (Solovchenko et al., 2008; Takagi et al., 2006). En particular, en ausencia de nitrógeno se acumulan carbohidratos y lípidos hasta en un 60% y 80% respectivamente (Solovchenko et al., 2008; Y. Wang et al., 2016). En esta condición, la microalga ya no sintetiza proteínas y el microorganismo modifica su ruta metabólica para producir aceite usando una parte del carbono destinado a producir carbohidratos durante la fotosíntesis. Otro efecto sobre la microalga es la disminución del grosor de las paredes de los tilacoides, la cual está compuesta en 50% por proteínas y en un 50% por lípidos resultando en una disminución de la eficiencia del PSII (Guschina & Harwood, 2006). Adicional a esto, la cantidad de PSII también disminuye. Sin embargo, la consecuencia es una disminución importante en la productividad de biomasa y por lo tanto de las productividades lipídicas y de carbohidratos (Solovchenko et al., 2008). En general, ambos mecanismos de acumulación de ambos compuestos siguen sin ser clara. Otros factores como la intensidad de luz (Solovchenko et al., 2008), aplicación de ciclos de luz, temperatura, pH o salinidad (Takagi et al., 2006) operan cambios en el metabolismo de la microalga.

También, aplicando la misma estrategia a diferentes cepas puede resultar en una acumulación de un compuesto diferente debido a la existencia de diferentes tipos de metabolismos en el grupo de las microalgas (Spolaore et al., 2006b). Cabe mencionar que la composición bioquímica y el perfil de los metabolitos es específico no solamente a la especie sino también a la edad del cultivo y la etapa de crecimiento en la cual se encuentra. Por ejemplo, en la fase estacionaria, las microalgas oleaginosas acumulan un mayor contenido de lípidos con respecto a la fase exponencial de crecimiento

Limitación de nitrógeno

La estrategia con mayor eficiencia de acumulación de lípidos o carbohidratos documentada son los cultivos de microalgas en ausencia de nitrógeno como en el caso de *Chlorella Vulgaris* FSP-E que acumula hasta 4 veces más carbohidratos en estas condiciones de limitación (Ho et al., 2013b). La repercusión de no usar nitrógeno sobre el metabolismo de las microalgas es la supresión de la síntesis de proteínas por lo que, dependiendo de la cepa, una parte del carbono usado en la fotosíntesis es para producir carbohidratos en forma de almidón o polisacáridos, y se redirigen hacia la producción de lípidos (Guschina & Harwood, 2006; Khozin-Goldberg & Cohen, 2006, 2011). En el caso de las cepas que acumulan almidón, en presencia de nitrógeno, la absorción de nitratos requiere de una gran cantidad de energía y en consecuencia no acumulan carbohidratos (Guschina & Harwood, 2006; Spolaore et al., 2006b). La ausencia de nitrógeno favorece la acumulación de almidón. La acumulación de G3P producido con el ciclo de Calvin-Benson se cambia a gluconeogénesis y síntesis de almidón, evitando entrar al ciclo de Krebs para la generación de energía directa en forma de ATP. Este cambio en la ruta metabólica conlleva un aumento en la actividad de enzimas como la fosfoglucomutasa y la ADP-glucosa pirofosforilasa, las cuales catalizan la transformación de G3P en AD-glucosa, precursor del almidón (Debnath et al., 2021; Khozin-Goldberg & Cohen, 2011). De manera paralela, se inhibe parcialmente el piruvato deshidrogenasa y en consecuencia se reduce la cantidad de carbono que se dirige al ciclo de ácido cítrico favoreciendo la producción de polisacáridos (Solovchenko et al., 2008). La redistribución del carbono en rutas metabólicas alternativas hace que algunas cepas

como *Chlorella* puedan alcanzar contenidos del 60% de su peso en carbohidratos (Debnath et al., 2021; Guschina & Harwood, 2006).

Las consecuencias observadas en cultivos con limitación de nitrógeno son la activación de la acil hidrolasa, adelgazamiento de la pared de los tilacoides, la activación de la enzima diacilglicerol aciltransferasa y la hidrólisis de los fosfolípidos. La activación de la enzima diacilglicerol aciltransferasa cataliza la reacción de transformación del acil-CoA en triacilglicéridos (Xin et al., 2010). Debido a la disminución de clorofila y un aumento en carotenoides, visualmente las células se ven despigmentadas (Debnath et al., 2021).

Varias cepas como *Chlorella minutissima*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Tretraselmis suecica* han sido estudiadas bajo condiciones de limitación de nitrógeno y se han observado aumentos en el contenido lipídico y/o de carbohidratos por encima del 40% (Debnath et al., 2021; Freitas Margarites & Vieira Costa, 2014). *Nannochloropsis* sp. ha sido reportada acumulando hasta 68% de lípidos con respecto a su peso seco en condiciones de ausencia de nitrógeno (Palanisamy et al., 2023), y de manera similar *Chlorella minutissima* acumuló hasta un 61% de su peso seco en carbohidratos en condiciones de limitación (Freitas Margarites & Vieira Costa, 2014). Así, estas cepas tienen un gran potencial biotecnológico para la producción de bioetanol, biogás y biodiesel entre otros.

Intensidad luminosa

Las microalgas por ser organismos fotosintéticos dependen principalmente de la disponibilidad, del tipo e intensidad de la luz. En ausencia de esta, las microalgas son incapaces de sobrevivir (Spolaore et al., 2006b). La intensidad de luz que requiere las microalgas es especie-dependiente. Sin embargo, todas requieren de una cantidad mínima hasta un máximo en el cual la actividad fotosintética alcanza su máximo y corresponde a la máxima tasa de crecimiento de la cepa. Ese punto es conocido como punto de saturación, arriba de ese punto ocurre la fotooxidación: la intensidad se vuelve dañinos para el microorganismo, se dañan sus receptores de luz lo que provoca una fotoinhibición que se traduce en una disminución de la tasa de

crecimiento debido a una reducción en la tasa de fotosíntesis y visualmente debido a la despigmentación la biomasa se vuelva blanca (Solovchenko et al., 2008).

El proceso conocido como fotoaclimatación controla la composición bioquímica de las microalgas en función de la cantidad y espectro de luz recibido. En general, en presencia de una alta irradiancia, las microalgas reducen la cantidad de clorofila a y pigmentos relacionados directamente con la fotosíntesis para evitar la fotooxidación. En el caso inverso de una reducción en la intensidad de luz, ocurre lo contrario: los organismos tienden a producir una mayor cantidad de clorofilas y pigmentos (clorofila b y c, carotenoides, ficobiliproteínas) con el fin de cosechar una mayor cantidad de luz. Ciertos estudios apuntan a que la cantidad de lípidos se relaciona con la cantidad de luz que recibe la microalga de la siguiente manera: es inversa proporcional. Xu et al., (2004) mostraron en su estudio esa relación para la cepa *Nannochloropsis sp.*

Varios estudios han mostrado que la elevación de la intensidad de luz provoca un cambio en el perfil lipídico de polares y PUFA hacia lípidos de reserva y saturados o MUFA. En su estudio (Nzayisenga et al., 2020) las microalgas *Desmodesmus sp.* y *Scenedesmus obliquus* fueron cultivadas con intensidades bajas, medias y altas de 50 a 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$. En dichas condiciones, las microalgas aumentaron su contenido total de lípidos, además se incrementó la proporción de ácido oleico (18:1, monoinsaturado) producido y disminuyó el ácido linolénico (18:3, poliinsaturado). De la misma manera, en *Chlorella vulgaris* y *Tetrademsus obliquus* el incrementar la irradiancia provoca un efecto similar con una disminución de la proporción de ácido linolénico y un incremento en la proporción de ácido oleico (Maltsev et al., 2021). Sin embargo, este cambio de perfil puede ocurrir hacia lo contrario, es decir se ha reportado para *Phaeodactylum tricornutum* que una irradiancia moderada favorece los PUFA y que la irradiancia alta produce ácidos grasos saturados y una disminución en los PUFA en su perfil lipídico. En condiciones de alta irradiancia, muchas cepas de microalgas producen perfiles de lípidos neutros y usan lípidos polares de membrana para producir TAG de almacenamiento (Sharma et al., 2012).

Habitualmente, el contenido total de lípidos y la promoción de ácidos grasos se logra para mayores intensidades de luz en conjunto a la ausencia de nitrógeno (Guschina & Harwood, 2006). Al contrario, a intensidades menores, se promueven los lípidos polares, fosfolípidos y glucolípidos, asociados a un papel estructural y funcional en las

células de microalgas. Como indicado anteriormente, los lípidos polares se asocian a la estructura de la membrana.

Salinidad

Otro factor que puede alterar el perfil bioquímico de las células de microalga es la salinidad del medio en el que están creciendo. El rango de salinidad es propio a cada especie. Sin embargo, las condiciones de cultivo pueden resultar en cambios de salinidad. Por ejemplo, la evaporación debido a mayores temperaturas aumenta la concentración de sal en el medio de cultivo. En consecuencia, las microalgas pueden sufrir de estrés osmótico, iónico e iónico intracelular. El estrés osmótico puede provocar una acumulación excesiva de agua dentro de la célula o al contrario un vaciado del agua hacia el medio. El estrés iónico, provocado por la acumulación de iones de sodio y potasio entre otros, El estrés iónico intracelular refiere a un cambio en las proporciones de los iones celulares lo cual puede provocar la muerte celular por el cambio de pH interno y la desregulación del metabolismo celular. A pesar de estos efectos por los cambios de salinidad, en especial un aumento, varios estudios han mostrado que se puede usar como estrategia para la acumulación de moléculas energéticas y un cambio en el perfil de los metabolitos (Guschina & Harwood, 2006; Takagi et al., 2006). *Dunaliella* mostró un aumento en ácidos grasos saturados y monoinsaturados relacionado con un aumento en la salinidad. En opuesto, los ácidos grasos insaturados disminuyen. En otra cepa, *Dunaliella salina* ocurre el efecto contrario: se incrementan los ácidos grasos insaturados y reduce los ácidos grasos saturados (Takagi et al., 2006).

1.3.3 Recuperación de la biomasa microalgal

Una vez que se ha realizado el cultivo de las microalgas se debe recuperar la biomasa generada. Existen varios métodos para recuperar la biomasa: sedimentación, centrifugación, secado, filtración, etc. La etapa de recuperación de biomasa tiene un costo importante entre un 20-30% del costo total de producción (Molina Grima et al., 2003) ya que la biomasa corresponde sólo entre 2-7% de los sólidos suspendidos totales (SST).

La recuperación de la biomasa involucra una o varias etapas de separación sólido-líquido y debido al tamaño de las microalgas (Brennan & Owende, 2010) se pueden usar flocculantes para formar partículas más grandes, cambiar el pH, usar electrocoagulación-floculación (ECF) (Uduman et al., 2011) o ultrasonido (Brennan & Owende, 2010; Zhang et al., 2009), para facilitar su recuperación por cualquiera de los métodos anteriores. y nuevos métodos como la introducción de nanopartículas magnéticas para favorecer la sedimentación (Nurra et al., 2014).

Actualmente, el proceso más usado para la recuperación es la centrifugación ya que permite concentrar la biomasa 150 veces más. Sin embargo, la centrifugación es un proceso con alto consumo de energía, así con una eficiencia de 95% se consume 20 kWh m⁻³ para un flujo 2 L min⁻¹ lo que repercute en un costo de casi 60 \$ L⁻¹ para los lípidos (Dassey & Theegala, 2013). Pero considerando que los volúmenes de cultivos son grandes, una opción consistiría en aumentar el flujo de procesamiento; lo que disminuirá la eficiencia, la energía consumida y hasta cierto punto el costo de producción de lípidos; para un flujo de 18 L/min, la centrífuga tiene una eficiencia de 28.5% y disminuye el precio de los lípidos a 0.864 \$ L⁻¹ lípidos (Dassey & Theegala, 2013).

Sin embargo, se sabe que no existe un método universal de recuperación ya que depende de la cepa, del sistema de cultivo usado y otros factores (Mata et al., 2010). El desarrollar un proceso de recuperación eficiente y económico que permita la minimización del costo para cualquier especie de microalga, es un área de la investigación muy activa.

Si la biomasa no se va a ocupar de manera inmediata, a lo mucho 24h posterior a su cosecha, es necesario almacenarla sin que se degrade. Para eso existen dos opciones: congelar la biomasa o secarla. El secado puede hacerse de 2 formas: el secado natural con el sol y el secado forzado. El secado solar requiere grandes superficies y es un proceso largo pero barato. El secado forzado es más rápido, pero conlleva un costo importante por la cantidad de energía requerida, además de que puede dañar la biomasa y desnaturalizarla. La opción de congelar la biomasa tiene la ventaja de no deteriorar los pigmentos y otros compuestos orgánicos de valor agregado, además de facilitar la extracción de ciertos compuestos como los lípidos. El costo de la congelación de la biomasa es equivalente al secado, sin embargo, cabe

mencionar que en operaciones a gran escala resulta más caro (Brennan & Owende, 2010).

1.3.4 Pretratamientos de la biomasa

Las microalgas de tipo eucariotas suelen tener paredes complejas, difíciles de romper y poca comprendidas. Así mismo, por su tamaño y morfología diferente de las plantas, los métodos tradicionales de extrusión de la biomasa de las primeras generaciones de biocombustibles no son aptas para la biomasa microalgal por su baja eficiencia con esta. Los combustibles a partir de microalgas todavía enfrentan algunos retos para su producción a gran escala. Para mejorar sus rendimientos es necesario mejorar la disponibilidad de los compuestos intracelulares para la extracción y producción de los diferentes biocombustibles. Por lo que como paso previo a la extracción y transformación de la biomasa se requiere pretratarla con el método adecuado que mejora la productividad y disminuye costos de producción. En efecto, Los pretratamientos mejoran la accesibilidad de los compuestos intracelulares de interés, lo cual incrementa los rendimientos de producción. Sin embargo, el tratamiento debe ser elegido de manera cuidadosa ya que depende de cada especie de microalga y de las especificidades en la estructura de su pared celular además que aumenta el consumo de energía en el proceso. En razón de que se requiere estudiar caso por caso el par pretratamiento-cepa en conjunto al producto que se desea obtener para maximizar el rendimiento y minimizar el requerimiento energético del proceso.

Los pretratamientos se clasifican generalmente en 2 categorías: los mecánicos y los no mecánicos (Günerken et al., 2015). La **Figura 4** muestra los principales pretratamientos que se pueden realizar a las microalgas para mejorar la disponibilidad de los compuestos de interés, clasificadas en función de las 2 categorías mencionadas.

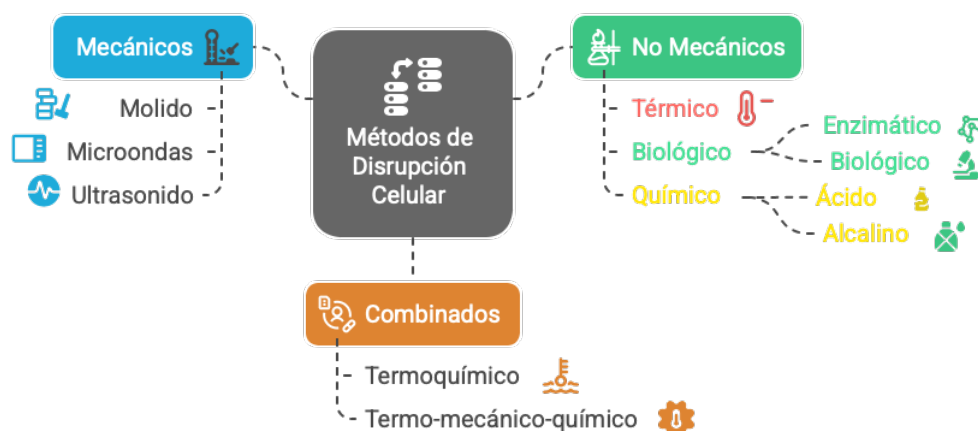


Figura 4. Principales pretratamientos de biomasa. Basado en (de Oliveira et al., 2022; Günerken et al., 2015).

Pared celular

Como se menciona al inicio de este capítulo, la pared celular de las microalgas es particular a cada especie. Hay que recordar que las microalgas no son un grupo taxonómico ya que agrupan tanto a microorganismos eucariontes como procariontes.

En primer lugar, las microalgas del dominio de los eucariontes poseen una pared celular que varía considerablemente entre especies. En el caso de las microalgas conocidas como microalgas verdes se pueden agrupar en 3 principales conjuntos (Synytsya et al., 2023): un grupo son las paredes constituidas por polisacáridos esencialmente de xilanos, mananos, glucanos y polisacáridos sulfatados; otro grupo es una pared compuesta por ácidos 2-cetoazúcares; finalmente el tercer grupo son capas a base de biopolímeros de manano de algas y polisacáridos principalmente de mananos, glucanos y quitina. La presencia de polímeros parientes de la quitina se liga a la simbiosis temprana con hongos y la transfección por medio de clorovirus de los genes responsable de la producción de quitina o análogos (Van Etten & Dunigan, 2012).

En el caso del género *Chlorella* su matriz está compuesta por carbohidratos, principalmente se han reportado ramnosa, galactosa y fucosa (Takeda, 1995). En su estudio Takeda (1995) reporta que la pared rígida del género *Chlorella* es compuesta

por glucosamina. Sin embargo, como lo menciona (de Oliveira et al., 2022), la estructura cambia considerablemente para especies diferentes a pesar de pertenecer al mismo género taxonómico. En *Chlorella* se han identificado 3 tipos de estructura: dos capas, una capa interna microfibrillar y una externa trilaminar; dos capas principales pero la capa externa no es trilaminar; finalmente la tercera categoría es de una capa microfibrillar (Yamada & Sakaguchi, 1982). Se ha detectado composición de celulosa y pectina (Yamada & Sakaguchi, 1982). De manera general, la pared de las microalgas está formada por polisacáridos estructurales, como β -glucanos, β -mánanos, α -ramanos y β -galactofuranos (Synytsya et al., 2023). El entramado de la celulosa actúa como el esqueleto de la pared celular proporcionándole soporte, rigidez y cohesión estructural. Estudios han reportado la presencia de quitina en la estructura de la pared celular de algunas cepas (Domozych, 2019; Synytsya et al., 2023). Otros estudios han identificado la presencia de heteropolisacáridos, polisacáridos con al menos cinco monosacáridos, en varias microalgas (Bernaerts et al., 2018). Proteínas y lípidos son también presentes en la composición de la pared celular. Las proteínas se encuentran en forma glicosilada e hidroxiprolina, para mencionar algunas, similar a las extensinas y las proteínas arabinogalactanas de las plantas terrestres (Domozych, 2019). En cuanto a los lípidos, desempeñan un papel importante en especial en superficie externa de la célula, ya que juega un papel en la permeabilidad e interacción con el medio ambiente (Spain et al., 2021).

La pared celular de las cianobacterias es notablemente diferente de las microalgas debido a su naturaleza bacteriana y pertenecer al dominio de los procariontes. En efecto, esta presenta características similares a bacteria gramnegativa y está compuesta por una capa de peptidoglicano. Sin embargo, presenta algunas especificidades a comparación de las bacterias gramnegativas como una capa más gruesa y la ausencia de ácidos teicoicos entre otras cosas. Además, sus paredes están constituidas por heteropolisacáridos ramificados. Por lo que su pared no presenta mayor dificultad en su ruptura para la liberación de los compuestos intracelulares. En el caso de las *Rhodophyta* o microalgas rojas, su particularidad radica en que carecen de una pared celular rígida. En sustitución, su estructura semejante a la pared es un gel polisacárido o capa de mucilago el cual tiene capacidad de parcialmente disolverse y cambiar la viscosidad de su medio (Synytsya et al.,

2023). Esta estructura ayuda en las funciones fisiológicas y su interacción con el medio ambiente de la microalga. Su composición es principalmente glucurónica, a menudo con grupos sulfato y/o metoxilo.

Mecánicos

Dentro de los pretratamientos mecánicos, se distinguen los mecánicos sólidos, líquidos y de otro tipo. Son tratamientos no específicos, es decir la ruptura se produce de la misma forma en cualquier especie, aunque dependiendo de la microalga y del tipo de pared celular puede variar la eficiencia del tratamiento. Se puede aplicar los siguientes tratamientos mecánicos: trituración con perlas, trituración con cuchillas, homogeneización a alta presión, ultrasonicación, microondas y campo eléctrico pulsado. La descripción resumida de cada uno de los tratamientos se encuentra en la **Tabla A1** en anexos.

Mecánico - Trituración con perlas

Dentro de los no mecánicos uno de los tratamientos más comunes es la homogeneización con perlas. El principio de este tratamiento consiste en aplicar fuerzas mecánicas de compactación y de cizallas a la biomasa para provocar su ruptura. Se usan perlas de diferentes diámetros y diferentes materiales, vidrio, acero o de cerámica. Las perlas son puestos en agitación mediante discos o anillos concéntricos o excéntricos. La biomasa es impactada durante las colisiones entre sí de las perlas lo cual ejerce una fuerza de compactación y/o de cizalla que provoca la ruptura celular. Diferentes parámetros influyen en la eficiencia del proceso tanto para el consumo de energía como la eficiencia de ruptura tal como el diámetro de las perlas, la cantidad de perlas, la cantidad de biomasa, el tiempo de retención, la viscosidad del fluido y ciclos entre otros. En efecto, por encima de 0.5 mm de diámetro se observó una disminución en la eficiencia de la ruptura celular (Doucha & Lívanský, 2008; Günerken et al., 2015). La combinación de algunos parámetros influye también en la eficiencia del proceso. Por ejemplo, a mayor viscosidad se requiere mayor carga de perlas, al contrario, a viscosidad menor se debe bajar la carga (Doucha & Lívanský, 2008; Günerken et al., 2015). De manera general, este proceso tiene varias ventajas

tales como la existencia de equipos industriales en el mercado, una buena eficiencia para otros tipos de biomasa y que cuenta de un solo paso, por lo que su escalabilidad es factible y lo hace un buen candidato. A pesar de que presente estas ventajas, en el caso de la biomasa microalgal en un esquema de biorrefinería su alto consumo de energía, la poca eficiencia de transferencia de la energía cinética a las células reduce su eficiencia. Algunos compuestos intracelulares de interés son altamente sensibles a las temperaturas lo cual incrementa el consumo energético para enfriar el homogeneizador. Adicionalmente, los costos en procesos posteriores se ven aún más aumentado por la formación de finos residuos tanto en la fase soluble como sólida debido a la baja selectividad en la distribución de las sustancias (Günerken et al., 2015).

No mecánicos

Los métodos no mecánicos usan las propiedades selectivas de agentes químicos, biológicos como enzimas o microorganismos o del fenómeno de difusión, la osmosis. Estos se basan en perforar o permeabilizar la membrana mediante la modificación de ciertos enlaces presente en las diferentes capas de la membrana celular lo que provoca la lixiviación de los compuestos celulares internos (Passos et al., 2014; Günerken et al., 2015).

No mecánico - Térmico

Los tratamientos térmicos son aquellos que usan el calor para provocar la ruptura celular. El calor genera una presión interna en las células lo cual puede llegar a romper la pared celular. También el calor aumenta la permeabilidad de la pared, así como desnaturaliza las proteínas y polisacáridos de la pared trae como consecuencias su ruptura (Günerken et al., 2015). No obstante, el pretratamiento térmico puede consumir importantes cantidades de energía además de desnaturalizar los metabolitos de interés e incluso producir compuestos recalcitrantes, es decir compuestos difíciles de explotar en etapas posteriores del procesamiento de la biomasa.

No mecánico - Químico

Los tratamientos mediante sustancias químicas explotan diferentes propiedades químicas: inhibición de la producción de compuestos necesarios para la membrana celular, reducción de la hidrofilia de medios, perforación de la membrana, saponificación o generación de poros entre otras cosas. Se pueden usar un amplio rango de sustancias: antibióticos, agentes quelantes, ácidos, bases, detergentes, solventes, surfactantes, agentes oxidantes (Günerken et al., 2015). La elección de uno u otro depende de diferentes factores, principalmente del compuesto objetivo de interés, de la selectividad y de la composición de la pared celular. Algunas desventajas del tratamiento químico es la presencia de sustancias no deseables tóxicas, desnaturalización y contaminación del medio ambiente.

No mecánico - Enzimático

El tratamiento enzimático para la lisis celular es específico ya que las enzimas se enlazan a moléculas específicas para provocar su ruptura. Es un tratamiento que requiere poca inversión además de tener requerimientos energéticos relativamente bajos (Günerken et al., 2015). También por las condiciones en el cual se desarrolla el proceso enzimático evita la desnaturalización de compuestos intracelulares de interés. Pero, la eficiencia del tratamiento enzimático depende mucho de la enzima o coctel de enzimas utilizados. El costo varía mucho dependiendo de la enzima, la lisis enzimática puede provocar la pérdida de otros compuestos de alto valor agregado debido a la oxidación (Günerken et al., 2015).

1.4 Digestión anaerobia

La DA es un proceso que ocurre de forma natural en lugares donde se acumula materia orgánica y se presentan condiciones anaeróbicas como por ejemplo en un lago o en el compostaje de residuos orgánicos. Se trata de un tipo de fermentación microbiana, realizado por una comunidad de diferentes microorganismos, bacterias y archaea las cuales trabajan en serie o simultáneamente. Esta comunidad microbiana produce entonces una mezcla de CH_4 y CO_2 conocido como biogás. El término biogás

a veces incluye el hidrógeno el cual también se puede producir en la digestión anaeróbica.

La digestión anaeróbica es un proceso bien establecido y conocido con diferentes aplicaciones. Su principal objetivo es la degradación de la materia orgánica residual y obtención del biogás. Este proceso permite tratar aguas residuales urbanas, estiércoles y demás residuos orgánicos de otras industrias. Adicional a la producción de biogás, se obtiene un agua parcialmente tratada y un lodo el cual sirve de abono para la agricultura y de alimento en ganadería, aunque esta última aplicación se sigue investigando (Yaniris et al., 2005).

A continuación, la **Figura 5** presenta un esquema basado en el modelo de digestión anaerobia 1 establecido por la Asociación Internacional del Agua, IWA por sus siglas en inglés (Batstone et al., 2002).

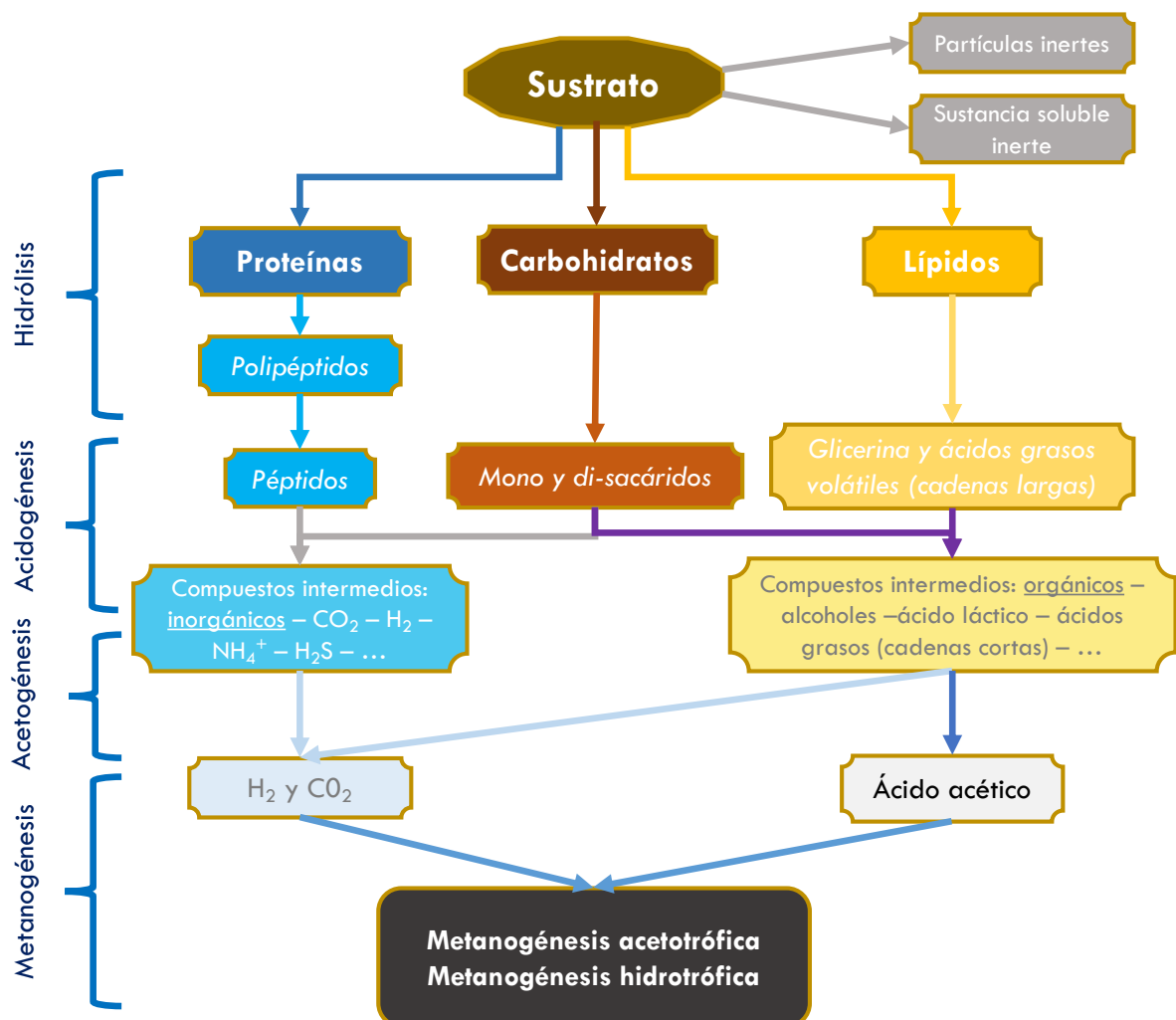


Figura 5. Metanogénesis. Adaptado de (Batstone et al., 2002).

La digestión anaerobia consta de 4 etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Algunas reacciones ocurren de manera simultánea o en paralelo.

La hidrólisis consiste en la reducción de moléculas orgánicas complejas en moléculas más simples y digestible por los microorganismos. Esta etapa la realiza tanto la comunidad microbiana como procesos fisicoquímicos previo a la digestión anaeróbica. Las proteínas producen aminoácidos, los carbohidratos son transformados en monosacáridos y los lípidos en ácidos grasos de cadena larga, catalizados por enzimas producidas por la misma comunidad microbiana.

En la etapa de acidogénesis, el principal sustrato de los microorganismos son los aminoácidos y monosacáridos. El sustrato de esta etapa es convertido en sustancias aún más simples: ácidos grasos volátiles. Entonces, se obtiene ácido acético, propiónico, butírico o valérico. En este momento del proceso, no se requiere de aceptores de electrones adicional y puede desarrollarse con altas concentraciones de hidrógeno y formato.

La siguiente etapa es la acetogénesis que convierte el ácido propiónico y butírico en acetato. Los organismos acetógenos responsable de esta transformación también producen CO_2 y H_2 . Al no tener aceptador de e^- interno, la oxidación de los ácidos grasos se hace utilizando a un aceptador de e^- externo que puede ser con un protón o bien CO_2 . El resultado de esta oxidación es la producción de H_2 o HCOO^- respectivamente al aceptador externo de e^- . Sin embargo, para que sea posible la reacción termodinámicamente, los niveles de H_2 y HCOO^- deben mantenerse en bajas concentraciones.

Finalmente, ocurre la última etapa de la digestión anaeróbica en la cual las archaea consumen el hidrógeno y el acetato. Se trata de un proceso metabólico anaeróbico de respiración. Los microorganismos al consumir el acetato realizan una dismutación de este en 2 productos: CO_2 y CH_4 . La presencia de diferentes ordenes en los lodos permite la realización de la metanogénesis mediante varias vías metabólicas, la principal siendo la acetoclástica, luego la hidrogenotrófica y en mucho menor medida la metilotrófica (Fenchel et al., 2012).

Esta última, usa el H₂ como sustrato para reducir el CO₂ o CO o HCOO⁻. Desde el punto de vista termodinámico ese proceso es altamente favorable, sin embargo, es un proceso H₂ dependiente.

La DA se suele modelar con el modelo de Gompertz. Este modelo fue en un principio desarrollado por Benjamin Gompertz en 1825 para modelizar la mortalidad humana. En la DA permite describir y representar la cinética de producción de metano gracias a un modelado adaptado. A través de este, se puede determinar parámetros claves como el potencial máximo de producción de metano, la fase de latencia y la velocidad de producción. La ventaja de este modelo radica en que permite optimizar la producción usando los parámetros claves mencionados anteriormente para la producción a escala industrial.

Este modelo se basa en un modelo matemático de tipo sigmoideo. Como se mencionó, se utilizaba para describir o modelar la mortalidad humana, con el simple supuesto que la tasa de mortalidad aumenta cuando envejecen los individuos y esta descrita por la ecuación:

$$N(t) = ae^{(-be^{(-ct)})}$$

donde N(t) es la población en el tiempo *t*, *a* es la población máxima o capacidad de carga, y *b*, *c* son parámetros que describen la forma y tasa de crecimiento de la curva.

Posteriormente, Zwietering et al. (1990) fueron pioneros en su uso con una versión modificada para modelar cinéticas microbianas. Después en diferentes trabajos se ha reportado un modelo modificado adaptado a la DA (Lay & Noike, 1997).

En la DA se ha usado un modelo modificado para mejor representarla:

$$H(t) = H_{max} * e^{\left(-\frac{R_{max}}{H_{max}} * (\lambda - t) + 1\right)}$$

Donde *H(t)* es la producción acumulada de CH₄ expresada en función del tiempo *t* (mL), *H_{max}* la producción máxima acumulada de CH₄ (mL), *R_{max}* la velocidad máxima de producción de CH₄ (mL d⁻¹) y *λ* el tiempo de retardo o latencia (d).

Si bien se utiliza ampliamente este modelo para la producción de metano, existen otros modelados como el modelo logístico y el de primer orden. Sin embargo, estos otros modelados matemáticos presentan inconvenientes: el logístico asume una

simetría perfecta en la fase de crecimiento y por lo tanto que a la mitad del tiempo de producción se haya producido la mitad del volumen total de metano; el de primer orden considera que la tasa de degradación es constante lo cual es en gran parte incorrecto ya que no toma en cuenta fases de adaptación y no hay diferenciación de crecimiento lento, acelerado y meseta (Zwietering et al., 1990). Al contrario de estos modelos, el de Gompertz toma en cuenta las diferentes etapas de producción del metano. Para validar el modelo empleado se usan indicadores como el coeficiente de determinación (R^2), el error cuadrático medio (RMSE) y el criterio de información de Akaike (AIC), entre otros. En términos prácticos del modelo Gompertz, los diferentes parámetros de este — $H_{\max}$ (volumen máximo de CH_4), $R_{\max}$ (tasa máxima de producción) y λ (tiempo de latencia)— sirven para optimizar los diferentes parámetros de producción como la carga de sustrato, pretratamientos, tiempo de retención y otras condiciones de operación (Lay & Noike, 1997).

1.5 Biorrefinería

Las fluctuaciones de los precios de los combustibles fósiles, la disminución de las reservas de petróleo y los acuerdos de la COP21 para reducir las emisiones de GEI fomentan la industria de los biocombustibles de biomasa y potencian la investigación en biocombustibles de microalgas (Pires, 2017). Las microalgas pueden desempeñar una doble función: Capturan CO_2 y la biomasa resultante puede utilizarse para producir una amplia gama de materiales. Es importante mencionar que algunos productos químicos derivados de la biomasa de microalgas no pueden sintetizarse a partir de combustibles fósiles.

A partir los años 90 se ha introducido el concepto de biorrefinerías como una forma de hacer los procesos sostenibles tanto económica como ambientalmente (Jong et al., 2011). La biorrefinería consiste en aprovechar la biomasa en su totalidad y obtener diversos productos para reducir el costo de producción de los biocombustibles, entre otros. Para eso, se necesitan realizar procesos de transformación y fraccionamiento de la biomasa (Cherubini, 2010), de manera similar a las refinerías de la industria petroquímica que producen a partir del petróleo energía, combustibles y productos

químicos. Por otro lado, para reducir los costos se ha propuesto usar aguas residuales como fuente de nutrientes (Pittman et al., 2011).

Algunos de ellos como biopolímeros o pigmentos como la ficocianina son productos de alto valor y pueden utilizarse directamente tras su separación o con ligeros ajustes estructurales. Por estas razones, las microalgas son de gran interés para la investigación y el desarrollo de procesos industriales que hagan viable su uso en un concepto de biorrefinería. Como se ha mencionado anteriormente, en el concepto de biorrefinería es necesario valorizar la mayor parte de los constituyentes de la biomasa microalgal. Algunas opciones para la valorización de la biomasa de algas que incluyen su uso como son: (1) células de algas intactas, (2) el contenido celular completo desorganizado, o (3) el fraccionamiento de la biomasa en diferentes grupos bioquímicos o compuestos específicos (Bastiaens et al., 2017). En la primera alternativa, la biomasa de microalgas se comercializa principalmente como polvo seco para piensos, alimentos o acuicultura, y el volumen de mercado aumenta constantemente (Laurens & Mcmillan, n.d.; Vigani et al., 2015). La fabricación de productos comerciales derivados de células enteras no genera biomasa residual, y la extracción o fraccionamiento de la biomasa no es necesaria. Por el contrario, las otras dos opciones permiten aplicar el concepto de biorrefinería. En las siguientes secciones se presentan las principales estrategias para cultivar/procesar/valorizar la biomasa de microalgas, y se clasifican globalmente en cuatro categorías y se presentan de manera esquemática en el diagrama **Figura 6**: (i) solo producción de biocombustibles (compuestos de bajo valor), (ii) productos de alto valor añadido y biocombustibles, (iii) productos de valor añadido medio (compuesto a granel) más biocombustibles y, por último, (iv) acoplado a otros procesos en el contexto de la economía circular .

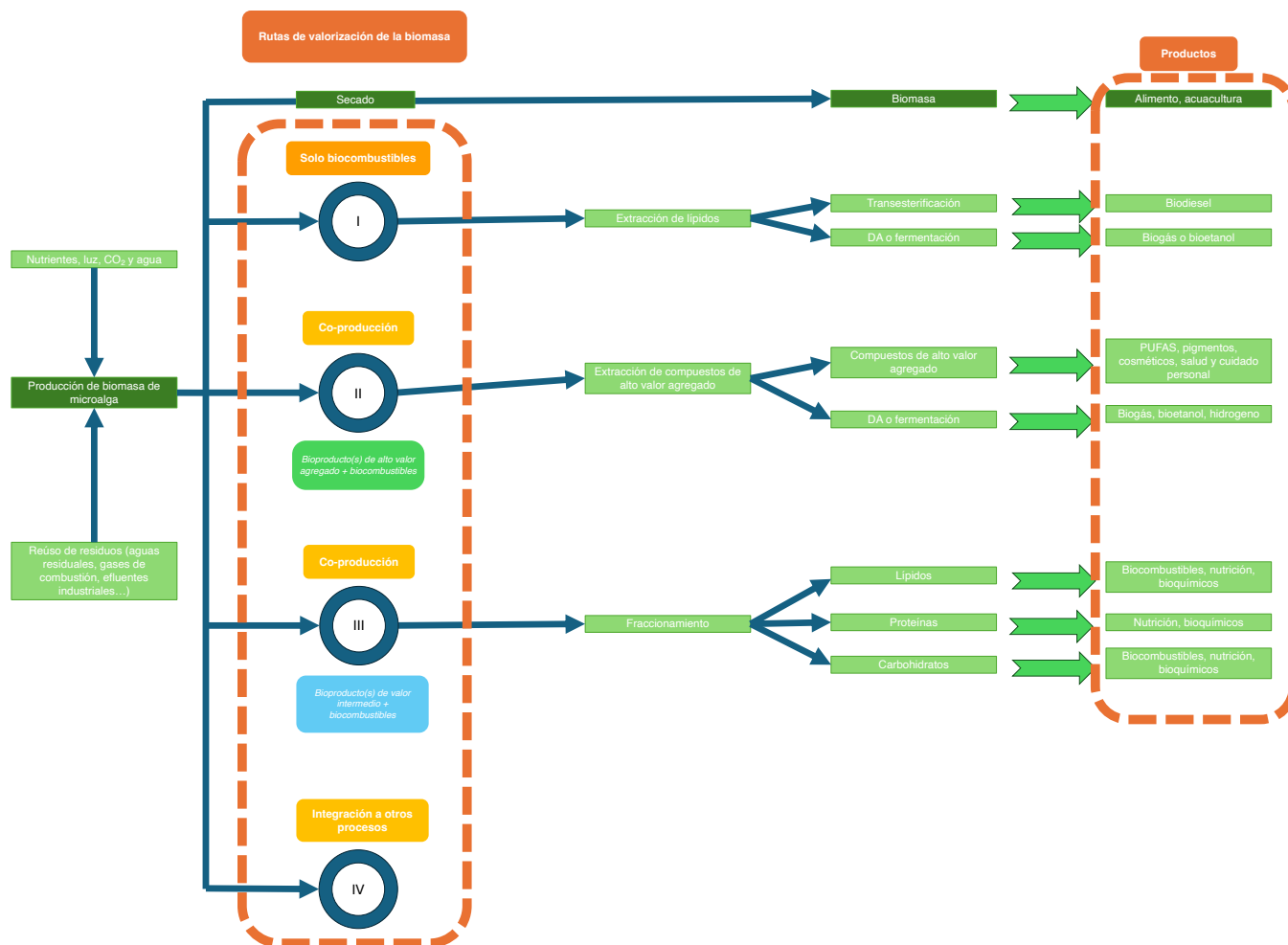


Figura 6. Diagrama de flujo de procesamiento de la biomasa microalgal en diferentes conceptos de biorrefinería. Adaptado de (Gorry et al., 2018).

1.5.1 Estrategia I: Producción exclusiva de biocombustibles (compuesto de bajo valor agregado)

Los biocombustibles se requieren a bajo precio y en gran volumen; sin embargo, entre todos los productos obtenidos a partir de microalgas, los biocombustibles tienen el coste más bajo y su precio siempre se compara con las alternativas fósiles; además, el balance energético del proceso de producción debe ser positivo. La mayoría de los biocombustibles pueden obtenerse conceptualmente a partir de microalgas, pero el biodiésel es una de las alternativas más interesantes como combustible líquido para el transporte (Amaro et al., 2011; Mallick et al., 2016; Mondal et al., 2017). No obstante, se ha demostrado que actualmente el biodiésel de microalgas no es competitivo en costes en comparación con el diésel fósil (Chisti, 2007). Por lo tanto, se introdujo la

idea de utilizar la biomasa residual para obtener más energía en busca de mejores ingresos, minimizando los residuos para completar el uso de la biomasa en el concepto de biorrefinería (Collet et al., 2011; Maurya et al., 2016). En la estrategia de solo biocombustible, hay tres escenarios para obtener más energía: (i) los residuos se pueden quemar para generar calor y electricidad, (ii) se pueden convertir en biogás mediante digestión anaerobia o en etanol mediante fermentación a partir de carbohidratos, y (iii) se pueden procesar termoquímicamente para obtener otros biocombustibles (Brownbridge et al., 2014). Pero en la estructura de la biorrefinería sólo con bioprocesamiento, la selección dependerá de la composición estequiométrica de la célula; el contenido de lípidos en la célula puede variar del 15 al 80% según la cepa, lo que deja una enorme cantidad de residuos. La composición de la biomasa residual desaceitada es rica en carbohidratos o proteínas, y su composición define la aplicación potencial. La biomasa residual con una alta relación C/N es beneficiosa para la producción de biometano, bioetanol y biohidrógeno, mientras que una baja relación C/N significa un alto contenido de proteínas, lo que puede ser beneficioso para su uso como fertilizante, medio de fermentación para microorganismos o suplemento alimenticio para animales y peces (Maurya et al., 2016). Se ha sugerido la producción de biogás a partir de biomasa residual desaceitada para producir calor o electricidad y contribuir al balance energético (Collet et al., 2011; Ward et al., 2014). Laurens et al. (2017) establecieron que el enfoque de fraccionamiento de la biomasa microalgal puede crear tres flujos potenciales de combustible diferentes, que permiten una reducción del 35 % en el precio mínimo global de venta del combustible en comparación con la estrategia de solo biodiésel. La estrategia general se centra en la explotación de lípidos para la producción de biodiésel y existe una preferencia por la producción de biogás primero a partir de biomasa residual y después a partir de bioetanol. Una estrategia intenta diversificar su producción de biocombustibles con hidrógeno. En este enfoque, el etanol se obtiene a partir de la fermentación de los carbohidratos liberados, el biodiésel o el combustible de aviación a partir de la fracción lipídica mediante hidrotratamiento e isomerización y, por último, los alcoholes mixtos (isobutanol, isopentanol y otros) a partir de la fracción proteica. Sin embargo, queda claro que el uso de biomasa residual por sí sola para producir energía no es tan favorable como parece a primera vista.

1.5.2 Estrategia II: Coproducción de productos de alto valor agregado y biocombustibles

Las microalgas son importantes productoras de muchos compuestos nutraceuticos de alto valor, como los ácidos grasos poliinsaturados o la astaxantina, que pueden justificar el elevado coste de las tecnologías de cultivo y procesamiento de microalgas (Liang et al., 2015; Shah et al., 2016a). En este escenario, el CO₂ fijado se valoriza y se producen biocombustibles tras la extracción de productos de alto valor. Algunos ejemplos incluyen la astaxantina producida por *Haematococcus pluvialis*, esta molécula de alto valor añadido ya se comercializa (Lorenz & Cysewski, 2000), y su precio de mercado es de 7000 USD/kg (Hariskos & Posten, 2014; Shah et al., 2016a). Esta microalga es una excelente candidata para esta estrategia porque la astaxantina supone aproximadamente el 5% del peso seco total de la célula, representando solo una pequeña fracción de esta. La astaxantina se produce bajo limitación de nitrógeno y simultáneamente con triglicéridos que constituyen hasta el 60% del peso seco (Solovchenko, 2015) y puede utilizarse para biodiésel. De este modo, tras la extracción de astaxantina, se puede producir biodiésel a partir de lípidos y biogás a partir de biomasa residual (Shah et al., 2016b). Otro organismo adecuado para la biorrefinería de compuesto de alto valor añadido es *Nannochloropsis* (Chua & Schenk, 2017) debido a su rápido crecimiento, altas productividades de aceite y contenido de ácidos grasos omega-3, específicamente el EPA cuyo precio de mercado es de hasta 100 USD por litro. Además, en la configuración de biorrefinería, el alto contenido de proteína comestible hace que esta alga sea viable para alimentos o piensos. Otras moléculas de alto valor en la biomasa de microalgas son: vitaminas, pigmentos, etc. Como puede observarse, el pigmento como compuesto de alto valor unido a la producción de biodiésel a partir de la fracción lipídica u otros biocombustibles a partir de la biomasa sobrante es el escenario más estudiado.

Uno de los principales retos de esta estrategia es que, a pesar de que la demanda prevista de productos de alto valor a partir de microalgas está aumentando, estos productos todavía se producen en cantidades relativamente pequeñas; por lo tanto, no se puede garantizar el suministro de biocombustible.

1.5.3 Estrategia III: Coproducción de compuestos de valor agregado medio y biocombustibles

El enfoque de la integración de productos de valor medio (carbohidratos, lípidos y proteínas) en la producción de biocombustibles fue propuesto por Wijffels et al. (2010). Hicieron hincapié en que es poco probable que un proceso para la producción de biodiésel a partir de lípidos de microalgas sea económicamente viable y que todos los componentes a granel de la biomasa deben valorizarse para desarrollar un proceso viable y sostenible. Esta idea promueve la diversificación de los sectores del mercado, introduciendo los productos de microalgas no sólo en el sector energético. Según Hariskos & Posten (2014), los productos químicos a granel constituyen un volumen de mercado de >10.000 toneladas/año con precios desde unos pocos USD/kg hasta 100 USD/kg y representan el 11% del crudo destinado a la síntesis petroquímica. Como se vio anteriormente, los principales componentes de la biomasa microalgal dependen de la cepa y los contenidos comunes son: lípidos (30-50%), proteínas (50-70%), carbohidratos (50%) y pigmentos (Chew et al., 2017). Estos bioquímicos implican el uso de proteínas para piensos o alimentos; carbohidratos para materiales bioactivos, cosméticos, aplicaciones nutricionales y farmacéuticas; y lípidos que, dependiendo de la longitud de la cadena, tienen aplicación como surfactantes, cosméticos, disolventes, lubricantes o biopolímeros (Hariskos & Posten, 2014; Jong et al., 2011). La mayoría de los estudios se centraron en los lípidos para biodiésel y las proteínas para alimentos o piensos. Pero otros incluyen la producción de bioetanol.

En las estrategias de coproducción (II y III), la selección de técnicas de separación suaves y selectivas es importante para mantener las propiedades de la mayoría de los componentes de la biomasa. Por lo tanto, se debe elegir una progresión adecuada de la cosecha seguida de la disrupción celular (Lee et al., 2012) y una secuencia de extracción y purificación suave y selectiva de los metabolitos de interés.

En cuanto a la definición del mejor orden de extracción de metabolitos, depende de la cepa y de las propiedades de los productos a recuperar. Ansari et al. (2017) demostraron para *Scenedesmus obliquus* que la secuencia de extracción: proteínas-lípidos-carbohidratos era la más conveniente. Sin embargo, una estrategia diferente fue propuesta por Dong et al. (2016), quienes sugirieron que un procesamiento combinado de algas (CAP, por sus siglas en inglés) es mucho mejor que el

procesamiento paralelo de algas (PAP, por sus siglas en inglés). En lugar de extraer los lípidos de la biomasa de algas antes de la fermentación alcohólica, como en el PAP, los lípidos se extraen de la torta de digestión anaeróbica. El CAP resulta ser muy eficaz para la obtención de azúcares, y la pérdida de lípidos es insignificante. La CAP reduce el coste del biocombustible de microalgas en un 9%. Sin embargo, es importante mencionar que este estudio no evaluó el coste de los bioproductos en un esquema de biorrefinería completa, utilizando toda la biomasa.

Bajo esta estrategia, la alta eficiencia del fraccionamiento en un proceso secuencial es uno de los principales cuellos de botella y representa un reto a superar. El objetivo principal de este enfoque es maximizar la producción y valorización de la biomasa con el fin de priorizar el uso de la biomasa para obtener productos de valor dando más importancia a la producción de materiales, que a su uso para energía (Keegan et al., 2013).

1.5.4 Estrategia IV: Integración de las microalgas en otros procesos y en la economía circular

En los últimos años, se ha destacado la importancia de los nuevos conceptos para las biorrefinerías y, en particular, para las microalgas. La biorrefinería obedece a los principios de la economía circular en el sentido de que todos los flujos de residuos son valorizados (Venkata Mohan, Modestra, et al., 2016) promoviendo el uso/transformación de flujos secundarios o residuales en productos de valor añadido (Yuan et al., 2015). Incluye el uso de: (i) aguas residuales como fuente de nutrientes (Barr & Landis, 2017; Delrue et al., 2016; Gouveia et al., 2016; Olguín, 2012; Queiroz et al., 2013; Zhu, 2015), (ii) digestato de un tratamiento de aguas residuales de la industria de la pulpa y el papel para reciclar internamente los nutrientes para el cultivo de microalgas; este es un ejemplo que conduce a un coste notablemente menor de la producción de biomasa de microalgas (Kouhia et al., 2015) o (iii) flujos de residuos gaseosos con alto contenido de CO₂ (Moncada et al., 2014; Wiesberg et al., 2017).

Por otra parte, en todos los estudios mencionados, el potencial de las microalgas para producir diferentes formas de bioenergía y productos químicos se ha presentado como conceptos separados que no se integran en la primera y segunda biorrefinerías en

carteras multiproducto. Recientemente, se ha reconocido que el concepto de biorrefinería desempeña un papel importante en el futuro desarrollo de una economía basada en la biotecnología y se ha propuesto recientemente la integración de las biorrefinerías de primera, segunda y tercera generación para desarrollar una bioindustria completa (Moncada et al., 2014). Ese trabajo analizó la integración de microalgas en una biorrefinería de caña de azúcar de segunda generación, incluyendo la producción conjunta de azúcar, etanol y electricidad, introduciendo el cultivo de *Chlorella* para utilizar corrientes ricas en CO₂ derivadas de sistemas de fermentación y cogeneración y producir posteriormente biodiésel, glicerol, azúcar, etanol combustible, calor y electricidad. Estos escenarios son tan diversos como los tipos de biomasa existentes; algunos trabajos incluyen las microalgas en la industria de la pulpa y el papel o en biorrefinerías de caña de azúcar para el tratamiento y valorización de efluentes, utilizando gases de combustión o aguas residuales.

Es importante señalar que, en este escenario, la posibilidad de esquemas de biorrefinería es infinita. A pesar de la complejidad que implica, la biorrefinería necesita promover una economía circular para alcanzar la viabilidad (Venkata Mohan, Modestra, et al., 2016; Venkata Mohan, Nikhil, et al., 2016). En las propuestas, se abandonó el concepto de biorrefinería para un solo producto.

1.5.5 Estrategia de diseño y estado actual

Para conceptualizar una biorrefinería, la secuencia de decisiones incluye (Toledo-Cervantes & Morales, 2014): (1) microalgas ricas en productos objetivo. (2) condiciones de cultivo y estrategias de operación, (3) procesos de conversión de microalgas enteras/biomasa microalgal deslipidizada a biocombustibles, (4) cosecha de biomasa, (5) métodos y secuencia de extracción de coproductos/transformación de toda la biomasa/el producto preextraído en productos finales, (6) integración de procesos de flujos y reciclaje de materiales, reducción de residuos y, por último, (7) un análisis del ciclo de vida. En el caso de los productos de alto valor, Eppink et al. (2017) sugirieron recomendaciones específicas sobre los métodos de recolección, disrupción celular y extracción. Indicaron la necesidad de conocer la composición y resistencia de la pared celular, y la localización del compuesto diana en el citoplasma, así como de seleccionar métodos de recolección moderados y disrupción celular

suave, eliminando primero la pared celular y después, la disrupción de orgánulos. El siguiente paso es la separación selectiva de las fracciones hidrófobas (lípidos, pigmentos) e hidrófilas (proteínas, carbohidratos) manteniendo la funcionalidad completa y, por último, el fraccionamiento de las mezclas de componentes hidrófilos e hidrófobos para recuperar los compuestos objetivo para diferentes aplicaciones comerciales. El paso final para la implementación de un proceso de biorrefinería es conectar las diferentes etapas en el proceso completo de la cadena. Todos los esfuerzos en el diseño de escenarios multiproducto buscan aumentar la viabilidad económica de la producción global de biocombustibles, pero, como puede verse, la configuración de una biorrefinería implica la toma de muchas decisiones, incluyendo alternativas para el cultivo, el consumo de agua y el suministro de nutrientes, las condiciones de cultivo para desencadenar la acumulación de los productos objetivo, y un complicado procesamiento posterior para maximizar la recuperación-explotación del producto. Por lo tanto, para definir la vía de procesamiento adecuada de la biomasa de microalgas, hay que analizar diferentes escenarios mediante técnicas de optimización, incluyendo aspectos tecnoeconómicos y cuestiones de sostenibilidad.

1.5.6 Aspectos de sostenibilidad

La mayor parte de la investigación actual sobre biocombustibles de microalgas se basa en el potencial del biodiésel a partir de lípidos de microalgas (Chisti, 2007); este estudio optimista se realizó en una situación extraordinaria con precios del petróleo extremadamente altos, lo que favoreció el desarrollo de los biocombustibles. En aquel momento, se estableció el reto inicial de disminuir su coste de producción a 0.48 USD/L. Posteriormente, (Wijffels et al., 2010) establecieron que este precio del biodiésel era alcanzable, al considerar una biorrefinería de microalgas, basada en la valorización de diferentes fracciones bioquímicas y productos de alto valor añadido. Hasta la fecha, se han publicado varios estudios sobre el análisis económico de procesos basados en microalgas (Ación et al., 2017; Davis et al., 2016; Douskova et al., 2009; Hoffman et al., 2017; Norsker et al., 2011; Slade & Bauern, 2013; Tredici et al., 2016). Recientemente, se han realizado revisiones sobre las evaluaciones tecnoeconómicas de los biocombustibles de microalgas, desde el punto de vista de la biorrefinería, analizando una gran variedad de escenarios (de Boer & Bahri, 2015;

Laurens et al., 2017). Dichos trabajos reportan precios que van desde 0.88 USD/L hasta 24.60 USD/L, concluyendo, sobre la base de los estudios tecnoeconómicos disponibles y las tecnologías actuales, que la producción de biocombustible microalgal es entre 4 y 5 veces más cara que los combustibles fósiles actuales; y las acciones para reducir ese coste pasan por: (1) productividades de al menos $30 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y un contenido mínimo de lípidos del 30%, (2) reducir el coste de capital, descartar el uso de fotobiorreactores y centrifugadoras, reducir los costes de deshidratación y, por último, identificar oportunidades de fuentes de carbono y nutrientes de menor coste.

Además de la evaluación económica, los biocombustibles de microalgas también deben cumplir objetivos favorables de ciclo de vida en cuanto a rendimiento energético y huella de carbono y agua para ofrecer mejoras cuantitativas respecto a los combustibles actuales.

Sin embargo, no existe una conclusión común sobre la sostenibilidad de los biocombustibles de microalgas (Gnansounou & Raman, 2017; Quinn & Davis, 2015). La importante variación en los estudios podría deberse a las diversas opciones técnicas (especies de microalgas, unidades de producción, procesamiento posterior y tecnología para la producción de energía, coproductos) y metodológicas (unidades funcionales, límites, métodos de asignación de coproductos) (Collet et al., 2015; Thomassen et al., 2017). Pero hay un acuerdo general en que producir solo biodiésel a partir de algas no es favorable y, para reducir el coste global, se ha sugerido lo siguiente: (i) integración de procesos (captura de CO_2 , tratamiento de aguas residuales y producción de biocombustible); (ii) optimización del diseño y las condiciones del fotobiorreactor para mejorar el rendimiento del biocombustible; y (iii) extracción de productos valiosos de la biomasa de algas (concepto de biorrefinería). Por lo tanto, una estrategia multiproducto en una biorrefinería se indica como la tendencia futura. Sin embargo, la ausencia de instalaciones para la producción de biocombustibles de microalgas a escala industrial con información precisa y fiable implica suposiciones teóricas o la extrapolación de información de laboratorio para hacer predicciones, mientras que el problema de diseño se formula matemáticamente para describir los sistemas de producción y su rendimiento. Recientemente se han publicado estudios teóricos sobre aspectos económicos o ACV en una estrategia de

multiprocesamiento-desarrollo-multiproducto (Gutiérrez-Arriaga et al., 2014; Martínez-Hernández et al., 2013; Menetrez, 2012; Posada et al., 2016). También se han llevado a cabo enfoques de optimización multiobjetivo para equilibrar diferentes criterios simultáneamente (Andiappan et al., 2015; Brunet et al., 2015; Rizwan et al., 2015; Santibañez-Aguilar et al., 2014) aplicando modelos de programación no lineal entera mixta (MINLP) o simulaciones de Monte Carlo para maximizar los ingresos o los rendimientos de producción, determinar la viabilidad económica y minimizar el impacto ambiental para encontrar la ruta de procesamiento óptima para la producción de biodiésel a partir de biomasa microalgal y el tratamiento de residuos. Aunque se han desarrollado herramientas computacionales, ningún escenario ha alcanzado los 0.48 USD/L necesarios para competir con la alternativa fósil.

En general, la mayoría de los estudios de ACV concluyen que la bioenergía a partir de algas tiene menores emisiones de GEI que los combustibles fósiles y que el proceso energéticamente viable debe utilizar estanques de canalización, procesar biomasa completa (evitar el secado), minimizar la energía necesaria para la disrupción celular y minimizar el uso de disolventes (de Boer & Bahri, 2015).

El sistema lineal de nuestra economía actual (extracción, fabricación, uso y eliminación) ha alcanzado sus límites, lo que conlleva el agotamiento de una serie de recursos naturales y combustibles fósiles (Venkata Mohan, Modestra, et al., 2016). En una bioeconomía, la estrategia de biorrefinería es un factor clave para cerrar el bucle en una economía circular con un modelo de producción restaurativo y regenerativo que valore los residuos y minimice los impactos medioambientales negativos mediante una transición a fuentes de energía renovables. La biomasa de microalgas es una de las mejores alternativas para una biorrefinería debido a los diversos productos que se pueden obtener. Sin embargo, las aplicaciones actuales de la biomasa de microalgas se destinan principalmente a la alimentación humana y animal, y los biocombustibles no se producen a escala industrial. En la actualidad, el elevado coste de producción de la biomasa y su posterior fraccionamiento la hacen ecológicamente inviable, sobre todo cuando la producción se centra en un único producto, como el combustible. Los avances en la modificación genética de las cepas, los sistemas de producción y el procesamiento posterior, además de la valorización y aceptación de una amplia gama de productos, podrían contribuir a evaluar la sostenibilidad y la rentabilidad.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES DIRECTOS, JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2.1 Antecedentes directos y justificación

La investigación sobre microalgas, que se hace en la UAM-C, incluye la obtención de una microalga oleaginosa que fue aislada de Cuatro Ciénegas Coahuila y que fue identificada como *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM (Toledo-Cervantes et al., 2013). Además, los trabajos anteriores demostraron su potencial biotecnológico para producir aceites y capturar CO₂ simultáneamente. Esta microalga es capaz de acumular hasta 56% de aceite cuando se encuentra bajo limitación de nitrógeno, con una productividad de 85 mg L⁻¹ d⁻¹. La máxima concentración de biomasa reportada para esta cepa es de 6 g L⁻¹ en condiciones de laboratorio y hasta 5.2 g L⁻¹ en un reactor airlift de lazo extendido operado en lote a la intemperie (Sánchez, 2013). La cepa tiene un gran potencial por su alta capacidad de acumulación de aceites y que además puede resistir altas concentraciones de CO₂ (15%), su óptimo de temperatura es 35°C y puede operar en condiciones a la intemperie. También capturó CO₂ con una tasa de 950 mg L⁻¹ d⁻¹ en medio con suficiente N (Toledo-Cervantes et al., 2013). Como ya se discutió, a pesar de la elevada acumulación de lípidos obtenida, la rentabilidad de los procesos microalgales para producción de aceites suele estar limitada por su bajo crecimiento de biomasa, las condiciones de estrés requeridas para mejorar la productividad de lípidos y su realización en 2 etapas. Estos requerimientos aumentan el costo de operación de los bioprocesos a base de microalga. Sin embargo, existen aún caminos por explorar para reducir estos costos. Entre ellos, el cultivo semicontinuo puede permitir superar parcialmente estas limitaciones (Meng et al., 2009; Rodolfi et al., 2009b; Wilkie et al., 2011). En efecto, la producción semi-continua es un paso más hacia altas productividades, reduciendo las etapas necesarias para que la biomasa produzca simultáneamente lípidos y biomasa. También permitiría evitar la necesidad de cosechar la biomasa y re-suspender en un medio sin nitrógeno.

Por otro lado, se han hecho pruebas preliminares para la producción de biogás con lodos metanogénicos de plantas de tratamientos de aguas, con la biomasa microalgal sin y con pretratamientos y en ambos casos es posible la producción de biogás. Rincón-Pérez et al. (2020) en su estudio de estudiaron pretratamientos termoquímicos sobre la biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM encontrando que el mejor

tratamiento para solubilizar los carbohidratos fue con 3% de HCl y 100°C y encontró que la mejor solubilización de DQO se obtuvo con la concentración de biomasa de 30 g L⁻¹ y un pretratamiento térmico de al menos 2h, alcanzando una solubilización de 60%. La producción de metano varió entre 109.3 a 192.7 mL CH₄ g⁻¹ SV agregado con concentraciones de biomasa de entre 1 a 10 g tCOD L⁻¹ y un pretratamiento térmico a 98°C durante 6h. En estos estudios se alcanzó un máximo de 296 mL CH₄ g⁻¹ SV y de 48 mL H₂ g⁻¹ SV (Rincón-Pérez et al., 2020). A pesar de los resultados prometedores algunas limitaciones surgieron como biomasa recalcitrante y los tiempos importantes de pretratamientos térmicos que incrementan los costos operativos y la huella ambiental. Debido a la variabilidad en la estructura de la pared celular de las microalgas, no existe tratamientos universales por lo que es necesario investigar más ampliamente las diferentes posibilidades de tratamiento. Finalmente, la presencia de microalga en co-digestión no mejora la producción de metano como menciona (Rincón-Pérez et al., 2021) en su estudio. Además, se ha estudiado la biomasa completa sin haber obtenido otros productos anteriores a la DA.

Aún existen algunos retos importantes como la posible inhibición debida al alto contenido en proteínas y la presencia de una pared celular que limita la degradación de la biomasa. Por eso es importante estudiar diferentes pretratamientos y su efecto en la producción de metano. Su estudio permite un mejor aprovechamiento de la biomasa. En perspectiva de la economía circular, el estudio de las biotecnologías de microalgas y específicamente la producción de biodiesel a partir del aceite obtenido y de biogás o metano con la biomasa residual puede contribuir a este esquema de economía y a reducir la huella ambiental. Es entonces necesario desarrollar un proceso integrado para reducir los costos aprovechando la biomasa residual resultante de la extracción de lípidos, es decir estudiar la producción de aceite y el uso de la biomasa residual como sustrato para la producción de metano.

2.2 Pregunta de investigación e hipótesis

Pregunta de investigación

La capacidad de acumular lípidos bajo condiciones de cultivo favorables se ha observado en pocas especies, por lo que ha surgido el interés en estudiar los principales factores que influyen en la acumulación de lípidos y determinar mejores

condiciones de operación para incrementar tanto el contenido como la productividad de biomasa y lípidos de manera simultánea en una cepa con alta tasa de crecimiento. Adicional a esto, la industrialización y comercialización de biocombustibles de tercera generación enfrenta retos de rentabilidad económica por lo que es necesario estudiar el reúso de la biomasa residual. Sin embargo, la biomasa residual presenta inconvenientes como la presencia de pared celular y/o compuestos que pueden afectar los procesos posteriores.

En este contexto se plantean las siguientes preguntas:

¿De qué manera la estrategia de cultivo semicontinuo con ciclos de alimentación-privación de nitrógeno, integrada con el pretratamiento y digestión anaerobia de la biomasa residual de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, permite avanzar en el desarrollo de un esquema de biorrefinería sostenible para la coproducción de lípidos y biogás?

Hipótesis

Si se identifican condiciones de operación y un estado fisiológico de la microalga que maximicen la productividad lipídica en un proceso semicontinuo, empleando corrientes residuales y acoplando un sistema de generación de biogás, será posible avanzar hacia el desarrollo de un proceso sostenible para la producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal.

CAPITULO 3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Analizar un esquema de biorrefinería a través de la integración de los procesos de generación biomasa-lípidos en semicontinuo y producción de biogás.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Definir y evaluar estrategias operacionales y nutricionales para incrementar la acumulación de lípidos en un sistema en semicontinuo.
- Evaluar diferentes pretratamientos y su efecto en la producción de metano en biomasa completa (y fresca) y en biomasa residual post-extracción de lípidos.
- Evaluar la producción energética teórica de las diferentes rutas de valorización de la biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM.

CAPITULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Microalga e inóculo

En este trabajo se utilizó la microalga *S. obtusiusculus* AT-UAM, la cual se aisló anteriormente por Toledo-Cervantes et al. (2013) de la poza Churince en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. El inóculo se cultivó en condiciones estériles en medio mineral BG-11 (pH 7) que contenía en g L⁻¹: NaNO₃, 1.5; K₂HPO₄, 0.04; MgSO₄·7H₂O, 0.075; EDTA disódico de magnesio, 0.001; CaCl₂·2H₂O, 0.036; ácido cítrico, 0.006; citrato de amonio férrico, 0.006; Na₂CO₃, 0.02, y 1 mL⁻¹ de solución mineral traza con la siguiente composición en mg L⁻¹: H₃BO₃, 2.86; MnCl₂·4H₂O, 1.81; ZnSO₄·7H₂O, 0.222; NaMoO₄·2H₂O, 0.39; CuSO₄·5H₂O, 0.079; Co(NO₃)₂·6H₂O, 0.494. Los productos químicos se adquirieron en J. T. Baker (Waltham, EE.UU.) y Tecsiqum SA de CV (Toluca, México) con una pureza de al menos el 99 %. Los ensayos experimentales se hicieron con el medio BG11 modificando las concentraciones de N de acuerdo con lo especificado en la sección 2.3.2.

La cepa se cultivó inicialmente en un fotobiorreactor de columna de burbujeo (FBR-CB) de 2.5 L para preparar el inóculo para los experimentos. El FBR-CB se alimentó continuamente con un flujo de 2 L min⁻¹ de aire con 5% v/v de CO₂ (Praxair, Ciudad de México, México) a través de un difusor de nylon conformado de 6 ramales en forma de asterisco localizado en el fondo del FBR-CB, cada uno de ellos con 5 perforaciones de 1 mm de diámetro interno. El FBR-CB se operó bajo condiciones controladas a 30 ± 1°C y 60 µmol m⁻² s⁻¹ de radiación fotosintética activa (PAR) continua provista por dos lámparas fluorescentes de 50W (Philipps, Ciudad de México, México). La biomasa se cosechó cuando el cultivo terminó la fase de crecimiento exponencial mediante centrifugación (a 4000 rpm durante 7 min) y se lavó con agua destilada antes de la inoculación de los sistemas experimentales.

4.2 Sistema experimental

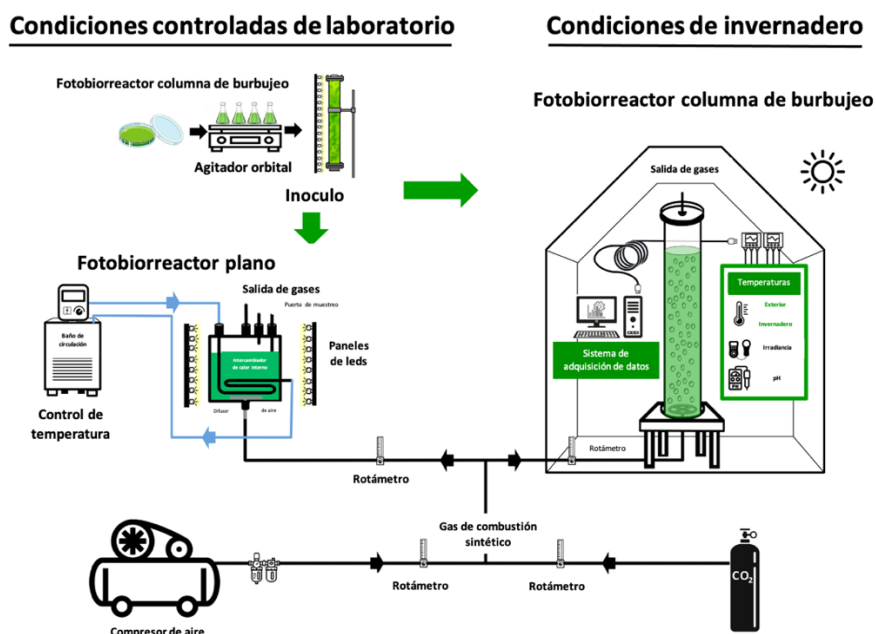


Figura 7. Representación esquemática de los sistemas experimentales para los ensayos de diferentes niveles de nitrógeno y en semicontinuo.

4.2.1 Fotobiorreactor plano

Los experimentos ensayados en el fotobiorreactor de panel plano (FBR-P) (**Figura 7**) se realizaron en condiciones controladas de laboratorio. El mismo está conformado de dos placas de acrílico transparente de 0.3 m de altura y 0.3 m de longitud colocadas verticalmente y a 0.025 m de distancia, con un volumen de trabajo de 1.8 L y un área iluminada de 0.09 m² a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por dos circuitos de LEDs impreso (Ilumileds, Ciudad de México, México) que se ajustaron para proporcionar iluminación continua. El FBR-P se alimentó continuamente con un flujo de 2.5 L min⁻¹ de aire con 1% v/v de CO₂ a través de un difusor de acero con dieciséis perforaciones de 1 mm de diámetro interno, el cual se ubicó en el fondo del FBR-P. La temperatura se controló con un intercambiador de calor tubular interno (9102A12E, PolyScience, Illinois, USA) a 35 °C en el FBR-P.

4.2.2 Fotobiorreactores de columna de burbujas en invernadero

Se instalaron dos FBR-CB (19°21'09.6 "N 99°16'57.6 "W) dentro de un invernadero (**Figura 6**). Los FBR-CBs consistieron en columnas de acrílico de 0.143 m de diámetro y 1.82 m de altura, con un volumen de trabajo de 24 L. El cultivo de los FBR-CB se alimentaron continuamente por un flujo de 4 L min⁻¹ de aire con 1% v/v de CO₂ a través de un difusor de nylon con seis puntas y cinco perforaciones de 1 mm de diámetro interno por cada punta, ubicado en el fondo del FBR-CB. Los FBR-CBs se operaron durante la temporada de otoño.

4.3 Operación

Se tomó como referencia una concentración de 12 mg_N L⁻¹ en el medio BG-11 suplementado, ya que informes anteriores para *S. obtusiusculus* AT-UAM mostraron que una tasa de consumo de ~12 mg_N L⁻¹ d⁻¹ aseguraba una productividad de biomasa de 500 mg L⁻¹ d⁻¹ y aumentaba el contenido de lípidos en modo de operación por lotes bajo condiciones controladas (Toledo-Cervantes et al., 2013). Además, en un ensayo previo se determinó que, para esta concentración de N, se consumía en 6 horas (**Figura A1** en anexo).

4.3.1 Operación del fotobiorreactor plano

El FBR-P se inoculó con la microalga *S. obtusiusculus* AT-UAM para tener una concentración inicial de biomasa de 893 ± 45 mg L⁻¹. Inicialmente se operó en modo lote utilizando un medio BG-11 modificado con 0.06 g de NaNO₃ L⁻¹ (12 mg de N L⁻¹) durante 7 días hasta alcanzar un contenido en lípidos de ~ 40%. Posteriormente a la cual se operaron los FBR-P en modo semicontinuo. Los ensayos se llevaron a cabo en el FBR-P bajo condiciones controladas en cultivo semicontinuo y diferentes concentraciones de 6, 12 y 24 mg_N L⁻¹ en el medio BG-11 suplementado al inicio de cada ciclo de alimentación-privación de N de 72 y 24 h, respectivamente. La duración de los ciclos garantiza un periodo en ausencia de N antes de la renovación del medio de cultivo con base al ensayo de consumo de N mencionado anteriormente. La cosecha de biomasa se realizó cada 72 o 24 horas para mantener una concentración inicial de biomasa de ~ 600 mg L⁻¹ en el medio de cultivo.

4.3.2 Operación del fotobiorreactor de columna de burbujas en condiciones de invernadero

De forma similar a los FBR-P se operaron los FBR-CB con una fase lote y posteriormente se cambió a la operación en semicontinuo. *S. obtusiusculus* AT-UAM se inoculó en el FBR-CB para alcanzar una concentración de biomasa de 890 ± 45 mg SST L⁻¹. El fotobiorreactor se operó inicialmente en modo lote durante 7 días utilizando el medio BG-11 con 0.31 g de NaNO₃ L⁻¹ (61 mg_N L⁻¹) en condiciones de invernadero. Luego, los ensayos se realizaron en el sistema en operación semicontinua bajo una baja concentración de 6 y 12 mg_N L⁻¹ en el medio BG11 a través de ciclos de alimentación de N de 24 horas. Los ciclos consistieron en el intercambio de medio BG-11 modificado y suplementado con la correspondiente concentración de N para alcanzar 6 o 12 mg_N L⁻¹, respectivamente, al inicio de cada ciclo, y la biomasa se cosechó diariamente con el fin de mantener una concentración de ~ 890 mg SST L⁻¹ en el medio de cultivo.

4.4 Métodos analíticos

Los parámetros ambientales, como la irradiación incidente en el FBR-P, se midieron periódicamente con un sensor cuántico de 2π, mientras que en el FBR-CB se midió continuamente con el sensor cuántico de 2π Sper Scientific 850008 (Cole Parmer, EE.UU.), respectivamente. El pH y la temperatura se monitorearon en línea en el medio de cultivo con un sensor electroquímico y un termopar (ALS-PHT1, AlgaeConnect, EE.UU.).

La concentración de biomasa en forma de SST se cuantificó según los métodos estándar (APHA, 2017). La concentración de N como nitrato (N-NO₃⁻) se midió por el método espectrofotométrico (Toledo-Cervantes et al., 2013) en muestras filtradas a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μm. Se añadió a la mezcla 1 mL de solución de HCl 1N para eliminar posibles interferencias con iones de hidróxido o carbonato. A continuación, se midió la absorbancia a 220 nm en un espectrofotómetro (HEB, UV-VIS modelo 752, Shaanxi, China). Se utilizó NaNO₃ como estándar. La concentración de SST y N-NO₃⁻ en el medio de cultivo se midió en el FBR-P y en el FBR-CB al principio y al final de cada condición probada.

La composición bioquímica de la biomasa (lípidos, carbohidratos totales y proteínas) se evaluó en el FBR-P y en el FBR-CB al final de cada ciclo de la condición probada. El contenido de lípidos se cuantificó por el método de la Sulfo-Fosfo-Vanillina (Mishra et al., 2014), se mezclaron alícuotas de 100 µL del medio de cultivo con 2 mL de H₂SO₄ (98 %) en un baño caliente a 100 °C durante 15 min. A continuación, se añadieron 5 mL de una solución de fosfato de vainillina (1.2 g L⁻¹ de vainillina al 68% de H₃PO₄) y se incubaron durante 20 min a 200 rpm en una incubadora oscura a 37°C. Por último, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (HEB, UV-VIS modelo 752, Shaanxi, China) a 530 nm. Se utilizó aceite de canola como estándar. La determinación cuantitativa de los carbohidratos totales se estimó mediante un método modificado de ácido fenol-sulfúrico a partir de una muestra de 0.5 mL de biomasa cosechada del medio de cultivo mediante centrifugación (4000 rpm, 5 min) (Dubois et al., 1956; Toledo-Cervantes et al., 2018). El contenido de proteínas se determinó con el método de Lowry modificado utilizando alícuotas de 1 mL de biomasa cosechada del medio de cultivo por centrifugación a 14 000 rpm durante 5 min (Lowry et al., 1951; Toledo-Cervantes et al., 2018). La composición bioquímica de la biomasa se expresó como porcentaje del peso seco. También se realizó la cuantificación de clorofilas mediante extracción con metanol (ver **Anexo 2**).

4.5 Cálculos de cinética y productividad

La productividad de la biomasa (P_b) (mg SST L⁻¹ d⁻¹) para el cultivo por lotes se calculó mediante la ecuación 1, donde C_0 es la concentración inicial de biomasa como SST (mg L⁻¹) en el cultivo en el tiempo t_0 (d); y C_f es la concentración final de biomasa (mg L⁻¹) del cultivo en el tiempo t_f (d) (Cabello et al., 2015).

$$P_b = \frac{(C_f - C_0)}{(t_f - t_0)} \quad \text{Ecuación 1}$$

La productividad media de la biomasa se calculó mediante la ecuación 2 para el cultivo semicontinuo, donde $C_{i,0}$ (mg SST L⁻¹) es la concentración inicial de biomasa después de la renovación i del medio mineral; en el tiempo $t_{i,0}$ (d) y $C_{i,f}$ (mg SST L⁻¹) es la concentración final de biomasa de la renovación i en el tiempo $t_{i,f}$ (d) bajo exposición a la luz. n es el número total de sustituciones parciales de líquido realizadas y sc para el funcionamiento semicontinuo (Han et al., 2013).

$$P_{b_sc} = \frac{\left[\sum_{i=0}^n \left(\frac{C_{i,f} - C_{i,0}}{t_{i,f} - t_{i,0}} \right) \right]}{n} \quad \text{Ecuación 2}$$

De forma similar, la productividad media de lípidos y carbohidratos P_{L_sc} y P_{CH_sc} , respectivamente ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), se determinó mediante las ecuaciones 3 y 4, donde P_b ($\text{mg SST L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) es la productividad de la biomasa, y X_l y X_{CH} (% del peso seco) es el contenido final de lípidos y carbohidratos por miligramo de biomasa, respectivamente.

$$P_l = P_b \times X_l P_{L_sc} = \frac{\left[\sum_{i=0}^n (P_{l,i} X_{l,i}) \right]}{n} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$P_{CH} = P_b \times X_{CH} P_{CH_sc} = \frac{\left[\sum_{i=0}^n (P_{CH,i} X_{CH,i}) \right]}{n} \quad \text{Ecuación 4}$$

La ecuación 5 calcula la productividad energética aproximada, E_T , expresada en $\text{cal L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. E_l (9.1 cal mg^{-1}) y E_{CH} (3.7 cal mg^{-1}) son el contenido energético de los lípidos y los carbohidratos, respectivamente (Subramanian et al., 2013):

$$E_T = (P_{L_sc} \times E_l) + (P_{CH_sc} \times E_{CH}) \quad \text{Ecuación 5}$$

4.6 Pretratamientos y digestión anaerobia

4.6.1 Digestión anaerobia de biomasa completa

Para los experimentos de DA, la biomasa cosechada se almacenó a 4°C hasta el pretratamiento. Para los ensayos de DA de biomasa sin lípidos, la cepa se volvió a inocular en condiciones de ausencia de nitrógeno con BG-11 2x para inducir la acumulación de lípidos. Posteriormente, se cosechó la biomasa con el mismo método y luego se secó en la estufa a 60°C durante al menos 48h. Se extrajeron los lípidos mediante la técnica de Soxhlet con hexano como solvente durante 18h. Luego se volvió a secar en la estufa durante 24h.

La biomasa de la microalga se sometió a cuatro tratamientos diferentes: enzimático (E), termo-mecánico (TM), termo-químico (TQ) y termo-mecánico-químico (TMQ). En estos ensayos la biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM que se utilizó era biomasa completa y fresca, refiriéndose a que la biomasa no pasó por ningún proceso de secado u otros tratamientos previos y se utilizó en estado concentrado y húmedo en los experimentos de digestión anaerobia. Para todos los pretratamientos se utilizó biomasa completa concentrada a una concentración de 10.95 g L^{-1} . Para el pretratamiento E, se añadieron 0.2 mL g^{-1} DWC de Viscozyme L (endo-beta-

glucanasa, xilanasa, celulasa, hemicelulosa) a la biomasa previamente concentrada y se incubaron en un agitador a 40°C, 250 rpm durante 24h y pH de 5. Para el tratamiento TM, la biomasa concentrada se homogeneizó primero con perlas de vidrio de 4 mm durante 10 minutos y, a continuación, se calentó en un baño de agua a 100°C durante 1 hora. Para el TQ, la biomasa concentrada se re-suspendió en una solución de ácido clorhídrico al 5% (1M), se remojó durante 15 minutos y se calentó durante 1 hora a 100°C en un baño de agua. Para el TMQ, la biomasa concentrada se re-suspendió en una solución de HCl al 5%, se molió con perlas y se calentó como se describe para el TM. Tras los pretratamientos, el pH se ajustó a 7.3 si era necesario, con una solución de hidróxido de sodio de 10M. Los experimentos por lotes para la digestión anaerobia se llevaron a cabo en un Sistema Automático de Prueba del Potencial de Metano (AMPTS-II) a 37°C y 150 rpm. Los reactores tenían un volumen líquido de 360 mL y un espacio de cabeza de 140 mL. Los frascos se inocularon con el medio mineral descrito por Cortés-Carmona et al. (2018). El inóculo consistió en 10 g SST L⁻¹ (7.6 g SV L⁻¹) de lodos anaerobios obtenidos de un digestor de vinazas de tequila (Casa Herradura, Jalisco, México) según lo descrito por Rincón-Pérez et al. (2021) y se añadió como sustrato el hidrolizado obtenido tras pretratamientos de tal manera de tener una Demanda Química de Oxígeno (DQO) total, DQO_t, inicial de 5 g L⁻¹. El equipo AMPTS-II monitoreó automáticamente la producción volumétrica de biogás. La composición del biogás se determinó mediante cromatografía de gases. Los ensayos control consistieron en sistemas sin sustrato con sólo inóculo para determinar la actividad endógena y el control positivo con glucosa como sustrato a 5 g L⁻¹ de DQO_t. Se define la relación inóculo/sustrato (I/S) como la proporción entre la cantidad de inóculo y de sustrato usado. En este estudio se empleó la mejor relación I/S=2 (g SV_{inoc} g SV_{sust}⁻¹) obtenido por Cortés-Carmona et al. (2018). En este estudio, la cantidad de sólidos volátiles aportado por la biomasa microalgal fue de 0.92 g SV g biomasa⁻¹. La biomasa completa tiene un DQO_t de 1.26 g DQO g biomasa⁻¹.

Se determinó la DQO de los pretratamientos y de los sistemas de DA mediante la técnica estándar (APHA, 2017), que consistió en añadir 1.2 mL de solución digestora a 2 mL de muestra y posteriormente se agregó 2.8 mL de solución catalizadora y se sometió a digestión durante 2 horas a 150°C. Finalmente se midió la absorbancia en el espectrómetro a 600 nm.

El rendimiento de CH₄ se calculó como el volumen máximo neto acumulado de CH₄ por DQO_t suministrado.

4.6.2 Digestión anaerobia de biomasa sin lípidos

Los ensayos de DA se realizaron con dos metodologías debido a limitaciones de cantidad de biomasa, técnicas, de recursos económicos y administrativas. El uso del sistema AMPTS-II requería de una cantidad mínima de sustrato para los experimentos con la que no se contaba para la biomasa sin lípidos. Cabe mencionar que el sistema AMPTS-II para su uso requería permisos institucionales. La biomasa sin lípidos resultante de la extracción fue insuficiente para alcanzar el volumen mínimo exigido por el AMPTS-II, por lo que se ensayó la Actividad Metanogénica Específica (AME) en botellas serológicas de 50 mL. Adicional a esto, el sistema Soxhlet también está limitado en la cantidad de biomasa que se puede extraer, cerca de 3 gramos de manera simultánea, el AMPTS requiriendo alrededor de 25 gramos de biomasa sin lípidos. En ambos casos se igualó la DQO inicial (5 g DQO L⁻¹) y se aplicaron los mismos pretratamientos (E, TM, TQ, TMQ), de modo que la única variable metodológica fue el volumen de operación y el tipo de equipo, para garantizar la comparabilidad de los resultados.

En estos ensayos, primero se extrajeron los lípidos de la biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM mediante el método de Soxhlet usando hexano como solvente. La biomasa se cultivó en condiciones de acumulación de lípidos y tenía un contenido de lípidos de 33% (**Tabla 7**). Se determinó la DQO_t de esa biomasa una vez los lípidos extraídos. Posteriormente se aplicaron los mismos pretratamientos E, TM, TQ y TMQ previamente descritos en la sección 2.6.1. Para eso se pesaron 0.29 g de biomasa seca sin lípidos para tener 5 g L⁻¹ DQO_t en los hidrolizados de biomasa en los diferentes pretratamientos. Se realizó un experimento Actividad Metanogénica Específica (AME), con la biomasa sin lípidos y pretratada. El ensayo se realizó en botellas serológicas de volumen total de 120 mL y un volumen de operación de 50 mL, a 37°C en un agitador orbital a 150 rpm. De igual forma, las botellas serológicas se inocularon con el medio mineral descrito por Cortés-Carmona et al. (2018). El inóculo consistió en 10 g SST L⁻¹ de lodos anaerobios obtenidos de un digestor de vinazas de tequila (Casa Herradura, Jalisco, México) según lo descrito por Rincón-Pérez et al. (2021) y se añadió como sustrato el hidrolizado obtenido tras pretratamientos de tal

manera de tener una DQO_t inicial de 5 g L^{-1} . El biogás se recolectó por desplazamiento de líquido en botellas serológicas rellenas con una solución de hidróxido de sodio (3M) para fijar el CO_2 . La solución se recolectaba en tubos falcón y de manera periódica se midió el volumen de líquido desplazado por la producción de biogás con probetas. La composición del biogás se determinó mediante cromatografía de gases. Los ensayos control consistieron en sistemas sin sustrato (Endógeno) con sólo inóculo para la actividad endógena y el control positivo consistió en un ensayo glucosa como sustrato a 5 g L^{-1} de DQO_t . En este estudio, la cantidad de sólidos volátiles aportado por la biomasa microalgal es de $0.63 \text{ g SV g biomasa}^{-1}$. La biomasa sin lípidos tiene un DQO_t de $0.87 \text{ g DQO g biomasa}^{-1}$.

Se determinó la DQO de los pretratamientos y de los sistemas de DA mediante la técnica estándar (APHA, 2017) de la misma manera que la previamente descrita en la sección anterior.

El rendimiento de CH_4 se calculó como el volumen máximo neto acumulado de CH_4 por DQO_t suministrado.

Los parámetros de producción teórica y la tasa de producción de metano máxima se determinaron con la ecuación 6, la cual usa un modelo modificado de Gompertz:

$$H(t) = H_{max} * e^{\left(-e^{\frac{R_{max}}{H_{max}}(\lambda - t) + 1}\right)} \quad \text{ecuación 6}$$

donde:

$H(t)$: la producción acumulada de CH_4 en el tiempo t (mL).

H_{max} : la producción máxima acumulada de CH_4 (mL).

R_{max} : la velocidad máxima de producción de CH_4 (mL d^{-1}).

λ : el tiempo de retardo o latencia (d).

La ecuación 7 calcula la productividad energética aproximada del metano por volumen de trabajo. $E_{\text{CH}_4_DA}$, expresada en cal L^{-1} , E_{CH_4} ($9.5 \text{ cal mL}^{-1} \text{ CH}_4$) es el contenido energético del metano y V_{max} es el volumen total de metano producido en la DA en $\text{mL CH}_4 \text{ L}^{-1}$:

$$E_{\text{CH}_4_DA} = (V_{max_CH_4} \times E_{\text{CH}_4}) \quad \text{Ecuación 7}$$

La ecuación 8 calcula la productividad energética aproximada del metano producido en la DA de la biomasa sin lípidos y obtenida de los lípidos extraídos de la biomasa de microalga.

E_{T_DA} , expresada en cal L^{-1} . E_l (9.1 cal mg^{-1}) es el contenido energético de los lípidos (Subramanian et al., 2013):

$$E_{T_DA} = (m_{l_extraidos} \times E_l) + E_{CH4_DA} \quad \text{Ecuación 8}$$

4.7 Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como valor promedio $\pm$ desviación estándar. Los datos de los ciclos de privación de N de 72 y 24 horas en el FBR-P se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) utilizando la prueba de diferencia significativa (o HSD) de Tukey. Posteriormente, los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías utilizando como factores de análisis la concentración de N (6, 12 y 24 mg L^{-1}) y la duración del ciclo (24- y 72- h). El ANOVA se realizó en el software Origin V9 considerando valores de probabilidad ($p \leq 0.05$) con un nivel de confianza del 95%.

CAPITULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Influencia de la concentración de N y de los ciclos de alimentación-privación en el FBR-P

El FBR-P fue operado en dos etapas para evaluar el efecto de la concentración de N en el medio suplementado sobre el crecimiento y la composición bioquímica de la biomasa de *S. obtusiusculus* AT-UAM. La primera etapa consistió en una operación por lote utilizando $12 \text{ mg}_\text{N} \text{ L}^{-1}$ en el medio para estimular el contenido de lípidos. Al termino de la etapa lote, se inició el régimen semicontinuo con ciclos periódicos de alimentación-privación de N de 24 o 72 horas, ensayando diferentes concentraciones iniciales de N (6, 12 y $24 \text{ mg}_\text{N} \text{ L}^{-1}$).

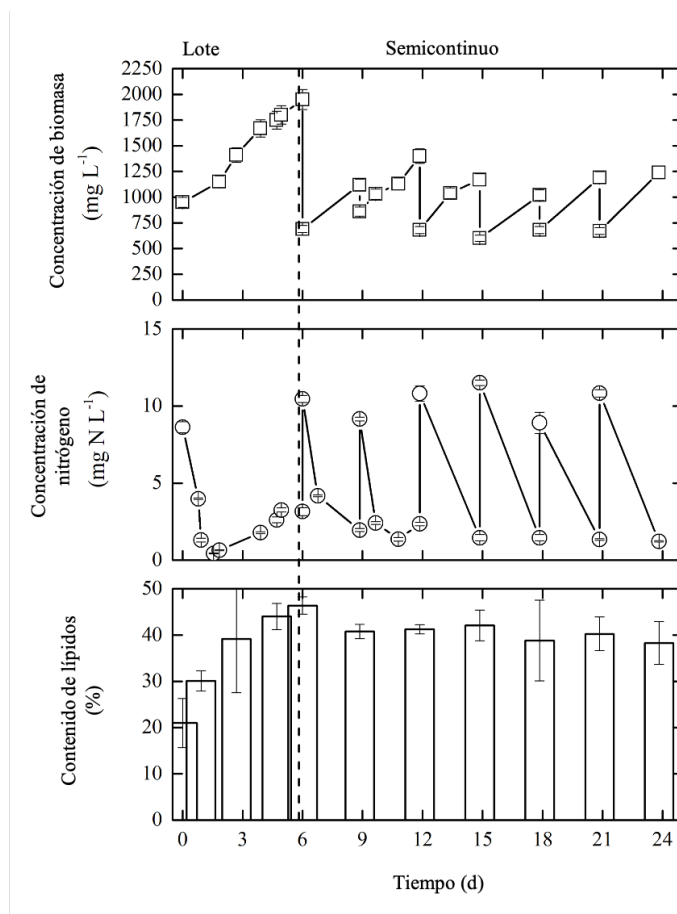


Figura 8. Evolución en el tiempo de la concentración de biomasa, la concentración de N y el contenido de lípidos, operando el FBR-P en lote y semicontinuo con ciclos de 72 h de privación de N con $12 \text{ mg}_\text{N} \text{ L}^{-1}$ en el medio de cultivo.

La **Figura 8** presenta el detalle del comportamiento en estas dos etapas para el FBR-P operado en condiciones controladas con ciclos de 72h y una concentración de N de

12 mg_N L⁻¹. La primera etapa consistió en un período inicial en lote de 7 días y luego seis ciclos de alimentación-privación de N. Como se puede observar durante la operación por lote, el contenido de biomasa aumentó hasta 1950 ± 98 mg L⁻¹ y el nitrógeno se consumió en seis horas. Al final de esta etapa, la composición bioquímica de la biomasa fue: lípidos 46 ± 3 %, carbohidratos 36 ± 7 %, y proteínas 15 ± 5 %. Posteriormente, se inició la operación en semicontinuo con ciclos de 72 h teniendo inicialmente 12 mg_N L⁻¹. Se observaron seis picos de concentración de biomasa asociados al crecimiento de las microalgas tras la extracción del cultivo y la reposición con solución mineral fresca que condujo a la concentración inicial de nitrógeno ensayada. El contenido de lípidos al final de cada ciclo se mantuvo alrededor de 40 ± 3%. Las curvas de cada ciclo se encuentran en la sección de anexos (**Figura A3 y A4**).

En general, el promedio de los contenidos durante la etapa de funcionamiento por lote para todas las condiciones de duración de ciclos y concentraciones de N fueron similares: lípidos 41 ± 3 %, carbohidratos 40 ± 7 % y proteínas 15 ± 5 %. La productividad de biomasa y lípidos fue de 301 ± 15 mg L⁻¹ d⁻¹ y 122 ± 8 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente.

En las siguientes secciones, se describe el desempeño del sistema operado en semicontinuo para cada condición.

5.1.1 Ciclos de privación de N de 72 horas

La **Tabla 5** resume la composición bioquímica promedio de la biomasa obtenida en los experimentos con 6, 12 y 24 mg_N L⁻¹ durante los ciclos de privación de N de 72 horas. Se obtuvo un alto contenido en lípidos, hasta un 40% del peso seco, con 6 y 12 mg_N L⁻¹. A pesar del alto contenido lipídico alcanzado, se registró un crecimiento limitado de *S. obtusiusculus* AT-UAM cuando el sistema fue alimentado con 6 mg_N L⁻¹, resultando en una baja productividad de biomasa y lípidos (144 ± 7 y 58 ± 1 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente) (**Figura 9a y b**). Las adiciones de medio con 12 y 24 mg_N L⁻¹ iniciales aumentaron la productividad de biomasa 1.14 y 2.72 veces, respectivamente (**Figura 9a**). Asimismo, las productividades de lípidos aumentaron en factores de 1.14 y 2.22, respectivamente.

Tabla 5. Composición bioquímica de *S. obtusiusculus* AT-UAM con funcionamiento semicontinuo en el FBR-P a diferentes concentraciones de nitrógeno (N) en el medio de cultivo y ciclos de 24- 72 h de alimentación-privación

Concentración de N (mg _N L ⁻¹)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)	Proteínas (%)
Ciclos de alimentación-privación de 72h			
6	40 ± 2	33 ± 5	19 ± 5
12	40 ± 3	40 ± 4	16 ± 5
24	34 ± 4	38 ± 4	20 ± 4
Ciclos de alimentación-privación de 24h			
6	32 ± 3	38 ± 9	22 ± 4
12	25 ± 4	36 ± 5	29 ± 3
24	20 ± 3	43 ± 3	31 ± 2

Los valores de productividad de los carbohidratos estuvieron en el mismo rango que los encontrados para los lípidos, como se muestra en la **Figura 9b**. Durante los ciclos de privación por N de 72 horas, la acumulación de energía, representada por la acumulación de moléculas de reserva de energía, pareció activarse más que el crecimiento, mientras que para 24 mg_N L⁻¹, las productividades fueron alrededor de 2 veces más que las de 6 y 12 mg_N L⁻¹ (**Figura A3**).

El contenido en proteínas se situó en torno al 18% del peso seco en los tres ensayos. En la microalga, las proteínas son imprescindibles ya que incluyen principalmente las enzimas metabólicas necesarias. El contenido de proteínas es proporcional al número de células y no a su masa, ya que las células rara vez acumulan proteínas como reserva de energía y, por tanto, su contenido de masa relativo está determinado por la abundancia de moléculas energéticas y estructurales. Esto puede confirmarse con la información de la **Tabla 5**, donde las condiciones, generalmente la inanición de N, promueven principalmente la acumulación de lípidos o carbohidratos, pero, por otro lado, limitan el crecimiento de la biomasa y la productividad.

5.1.2 Ciclos de alimentación-privación de N de 24 horas

El contenido lipídico en los ensayos de ciclos de 24 h de alimentación-privación por N fue inferior al obtenido para ciclos de 72 h (**Tabla 5** y **Figura A4**). Se observaron

disminuciones de alrededor del 8% para concentraciones iniciales de N de 6 mg_N L⁻¹ (9.3 mg_N g⁻¹) y del 14.5% para 12 y 24 mg_N L⁻¹ (18.6 y 40.3 mg_N g⁻¹). Por otro lado, con ciclos más cortos, las productividades de biomasa aumentaron 2.32, 3.35 y 1.65 veces para concentraciones iniciales de N de 6, 12 y 24 mg_N L⁻¹ (9.3, 18.6 y 40.3 mg_N g⁻¹), respectivamente (**Figura 9c**). En consecuencia, la productividad de lípidos alcanzó 139 ± 4 mg L⁻¹ d⁻¹, cuando el sistema se alimentó con 12 mg_N L⁻¹ (18.6 mg_N g⁻¹) suplementado en el medio, a pesar de la baja acumulación de lípidos alcanzada en la biomasa durante ciclos de 24 h de alimentación-privación por N (**Figura 9d**).

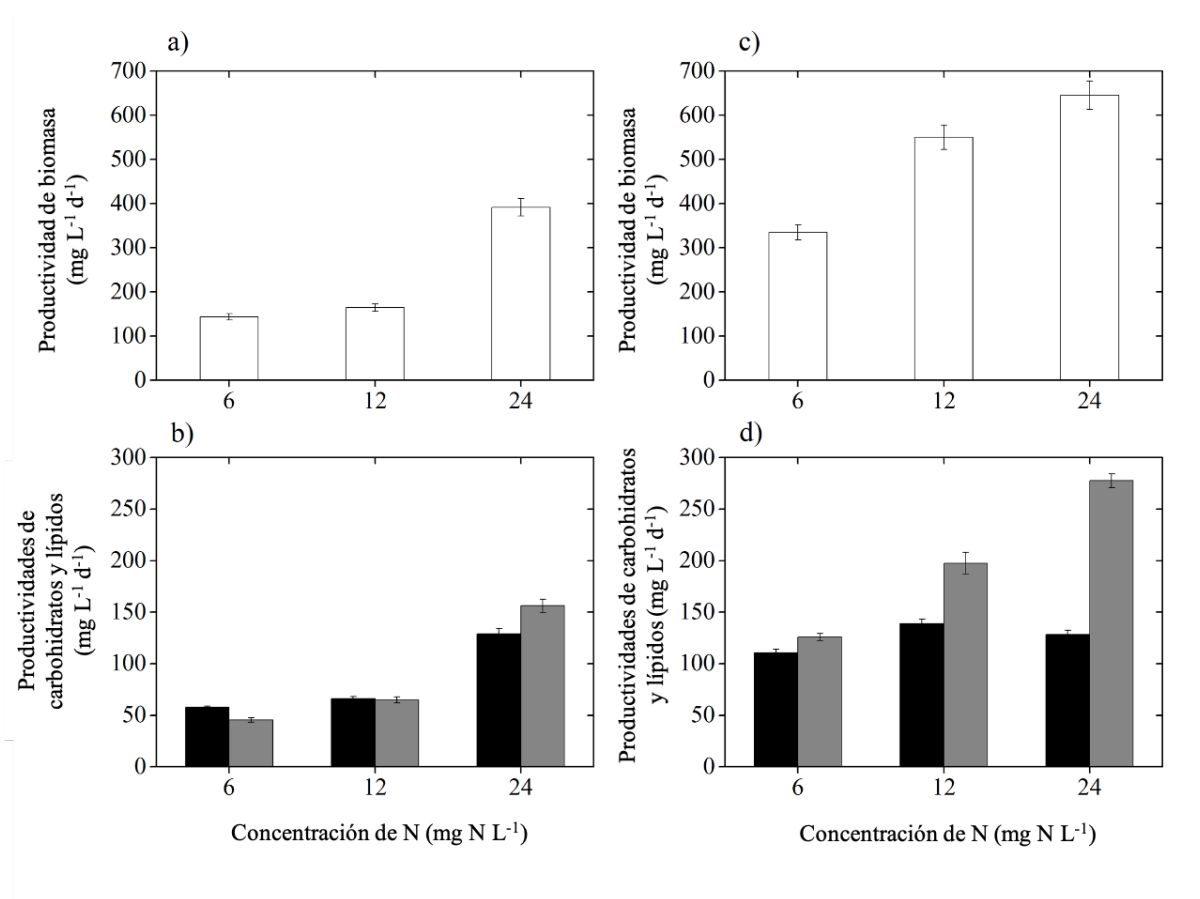


Figura 9. Productividades de biomasa, lípidos y carbohidratos para ciclos de 72 h de privación de N (a y b) y ciclos de 24 h de privación de N (c y d) a diferentes concentraciones de nitrógeno (N) en el medio de cultivo en el FBR-P. Las productividades de lípidos y carbohidratos se representan en barras negras y grises, respectivamente. Las barras verticales representan la desviación estándar ($\pm$ DE, n = 3).

De la misma manera, el aumento en la productividad de biomasa se tradujo en un incremento de 3.05, 3.04 y 1.77 veces en la productividad de los carbohidratos

respectivamente, para concentraciones iniciales de N de 6, 12 y 24 mg_N L⁻¹. A pesar de tener un contenido en carbohidratos parecidos entre ambos ciclos con promedios cerca de 37% y 39% respectivamente, en el ciclo de 72h y 24h. En particular, la mayor productividad de carbohidratos, con 278 ± 7 mg L⁻¹ d⁻¹, se obtuvo para el ciclo corto de 24h con una concentración de N de 24 mg_N L⁻¹, lo cual coincide con la mayor acumulación de carbohidratos de 43%.

En resumen, aunque un alto contenido de lípidos, hasta ~ 40 % obtenido durante los ciclos de alimentación-privación de N de 72 horas (**Tabla 5** y **Figura A3**), los valores de biomasa y productividad de lípidos fueron ~ 3.4 veces menores comparados con los ciclos de privación de N de 24 horas, donde se obtuvo un valor máximo de 32 ± 3 % (**Figura A4**). Por lo tanto, el rendimiento de los ciclos de 72 y 24 horas de alimentación-privación de N mostró diferencias estadísticamente significativas (prueba ANOVA, $p \leq 0.05$) en la biomasa y la productividad de lípidos. Además, la prueba ANOVA de dos vías indicó diferencias significativas en la composición bioquímica para las concentraciones de 24 mg_N L⁻¹ y 6 mg_N L⁻¹ suplementadas en el medio BG11 modificado y los ciclos de alimentación-privación de N de 72 y 24 h ($p \leq 0.05$). Así, la concentración de N y la duración del ciclo fueron factores clave en esos experimentos, y ambos tuvieron un impacto en el perfil bioquímico. En consecuencia, el funcionamiento del FBR-P en modo semicontinuo bajo condiciones controladas y la aplicación de ciclos de N de alimentación-privación de 24 horas demostraron la capacidad de *S. obtusiusculus* AT-UAM para crecer y acumular compuestos de reserva energética como lípidos o carbohidratos.

Estos resultados mostraron que las productividades de lípidos y carbohidratos dependen de varios factores como las concentraciones de N, la duración de los ciclos de privación y el modo de cultivo. En la **Tabla 6** se comparan diferentes estrategias para aumentar la productividad de lípidos y carbohidratos de diferentes microalgas. En este contexto, diferentes autores han implementado diferentes estrategias para aumentar la acumulación de lípidos en las microalgas utilizando privación de N, diferentes fuentes y concentraciones de N, la limitación de micronutrientes como Ca y Mg, la acidificación controlada, la temperatura, los fotoperíodos y la intensidad de la luz (Brindhadevi et al., 2021; Gour et al., 2020; Hanifzadeh et al., 2018; Ho et al., 2013b; Sánchez-García et al., 2020; Santos et al., 2014). Sin embargo, las

condiciones de estrés reducen las tasas de crecimiento de la biomasa afectando directamente a la productividad de lípidos. Por ejemplo, durante el cultivo por lotes de *S. obtusiusculus* AT-UAM en condiciones de privación de N y pulsos de ácido, se observó una baja productividad de lípidos de 85 mg L⁻¹ d⁻¹ a pesar de alcanzar un contenido máximo de lípidos del 60%. Tal y como informó Yuan et al. (2018), *Chlorella* sp. GN1 alcanzó un alto contenido en lípidos (54 %) pero una baja productividad de lípidos de 67 mg L⁻¹ d⁻¹. Sin embargo, la productividad y el contenido de lípidos se han optimizado en pocos estudios. Por ejemplo, *Chlorella* sp. HS2, cultivada utilizando una operación de dos etapas (cinco días de condiciones de suficiencia de N y luego se pasó a cuatro días en condiciones de ausencia de N), mostró un alto contenido de lípidos y productividad, de ~ 37 %, y 217 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente (Ho et al., 2013b). Con el fin de aumentar el crecimiento de la biomasa y el rendimiento de lípidos se han validado estrategias de cultivo en modo semicontinuo combinadas con la privación de N en el cultivo (Cabello et al., 2015). Por ejemplo, *Nannochloropsis oculata* cultivada en modo semicontinuo, alcanzó una productividad de lípidos de ~ 146 mg L⁻¹ d⁻¹, ligeramente superior a la de este trabajo mientras que la microalga fue cultivada en modo discontinuo la productividad de lípidos fue 2.2 veces menor (**Tabla 6**) (Aziz et al., 2020).

Tabla 6. Comparación de diferentes estrategias para mejorar la productividad de lípidos y carbohidratos por microalgas.

Especie de microalga	Sistema de cultivo	Volumen de trabajo (L)	Operación	Modo de operación	Productividad lipídica (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Productividad de carbohidratos (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Referencias
<i>C. sorokiniana</i> NIES-2168	FBR	-	Interior	Semicontinuo	-	695	Wang et al. (2016)
<i>Chlorella</i> sp. AE10	FBR-CB	0.35	Interior	Semicontinuo	-	673	Yuan et al. (2018)
<i>C. vulgaris</i> FSP-E	FBR	1	Interior	Lote	-	631	Ho et al. (2013b)
<i>Synechococcus</i>	Botella	0.8	Interior	Lote	-	535	Möllers et al. (2014)
<i>S. obliquus</i> CNW-N	FBR	1	Interior	Lote	-	468	Ho et al. (2013b)
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FBR-P	1.8	Interior	Semicontinuo	128	278	Este trabajo (a)

<i>Chlamydomonas</i> <i>sp. JSC4</i>	FBR-CB	1	Interior	Gradiente	223	-	Ho et al. (2014)
<i>Chlorella sp. HS2</i>	FBR-C	0.5	Interior	Dos-etapas	216.9	-	Nayak et al. (2019)
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FBR-P	1.8	Interior	Semiconti nuo	139	198	Este trabajo (b)
<i>Chlamydomonas</i> <i>sp. JSC4</i>	FBR-CB	1	Interior	Dos-etapas	184	-	Ho et al. (2014)
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FBR-CB	24	Exterior	Semiconti nuo	142	169	Este trabajo (c)
<i>C. salina</i>	Botella	0.4	Interior	Lote	-	170	Mayers et al. (2018)
<i>S. obliquus</i>	FBR-P	80	Exterior	Semicontin uo	170	-	Feng et al. (2014)
<i>A. obliquus</i> UTEX 393 mutante (Slm1)	FP airlift- lazo FBR	1.7	Interior	Continuo	157	-	Remmers et al. (2017)
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FBR-P	1.8	Interior	Semiconti nuo	129	156	Este trabajo (d)
<i>Nannochloropsis</i> <i>sp.</i>	Matraz	1	Interior	Fed-Lote	148	-	Cheirsilp & Torpee (2012)
<i>N. oculata</i>	Matraz Erlenme yer	0.08	Interior	Semicontin uo	146	-	Macías et al. (2018b)
<i>N. gaditana</i>	Tubular- FBR	310	Exterior	Continuo	110	-	San Pedro et al. (2014)
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FBR-CB	24	Exterior	Semiconti nuo	118	137	Este trabajo (e)
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FBR-P	1.8	Interior	Semiconti nuo	111	128	Este trabajo (f)
Consorcio (cepa principal: <i>Geitlerinema sp.</i>)	FBR-P	400	Exterior	Semicontin uo	93	-	Romero- Villegas et al. (2018)
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FBR-P	1.8	Interior	Lote	85	-	Sánchez- García et al. (2020)
<i>Spirulina sp.</i> LEB 18 and <i>Chlorella</i> <i>fusca</i> LEB 111	FBR-CB	1.5	Interior	Semicontin uo	-	79	(Moreira et al., 2016)
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FBR-P	1.8	Interior	Semiconti nuo	66	65	Este trabajo (g)

<i>Chlorella</i> sp. GN1	FBR-P	1	Exterior	Lote	67	-	(Feng et al., 2020)
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FBR-CB	24	Exterior	Lote	66	-	(Sánchez-García et al., 2020)
<i>N. oceanica</i> IMET1	FBR-CB	0.5	Interior	Lote	51	-	(Liu et al., 2018)
<i>Porphyridium purpureum</i>	FBR-lazo	600	Exterior (invernadero)	Semicontinuo	-	47	(Fuentes-Grünwald et al., 2015)
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FBR-P	1.8	Interior	Semicontinuo	58	46	Este trabajo (h)
<i>Monoraphidium dybowskii</i> LB50	Raceway	4000	Exterior	Semicontinuo	17	-	(H. Yang et al., 2018)
<i>Chlorella vulgaris</i> BDUG 91771	Raceway	5000	Exterior	Semicontinuo	12	-	(Mathimani et al., 2017)
<i>Chlorella sorokiniana</i> str. SLA-04	FBR-CB	0.5	Interior	Lote	17	12	(Hanifzadeh et al., 2018)

(a) 24h - 24 mg_N L⁻¹, (b) 24h - 12 mg_N L⁻¹, (c) 24h - 12 mg_N L⁻¹, (d) 72h - 6 mg_N L⁻¹, (e) 24h - 6 mg_N L⁻¹, (f) 24h - 6 mg_N L⁻¹, (g) 72h - 12 mg_N L⁻¹, (h) 72h - 6 mg_N L⁻¹.

Por el contrario, el contenido de carbohidratos se incrementó hasta el 43 ± 3 % (**Tabla 5**), lo que corresponde a una productividad de carbohidratos de 278 ± 7 mg L⁻¹ d⁻¹ (**Figura 9d**) cuando el FBR-P fue alimentado con 24 mg_N L⁻¹ durante ciclos de alimentación-privación de N de 24 horas. Las productividades de carbohidratos en esta investigación fueron inferiores a las obtenidas en cultivos de interior con especies de *Chlorella*, como *C. sorokiniana* NIES-2168, *Chlorella* sp. AE10 y *C. vulgaris* FSP-E; que habían alcanzado productividades de carbohidratos de 695, 673 y 631 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente (**Tabla 6**) (Ho et al., 2013a; Wang et al., 2016; Yuan et al., 2018). Sin embargo, es importante señalar que todas las cepas mencionadas no son microalgas oleaginosas y son el estándar de producción de carbohidratos. La mayoría de los trabajos de acumulación de lípidos no reportan las productividades de carbohidratos. Además, cabe resaltar que la vía biosintética de los carbohidratos compite con la vía de los lípidos, es decir, la biosíntesis de los lípidos y de los carbohidratos comparte el piruvato como precursor común del carbono (M.-H. Liang et al., 2019) durante el ciclo de Calvin-Bassham-Benson, por lo que los ciclos de N de

alimentación-privación podrían inducir la biosíntesis de carbohidratos previa a la de los lípidos. Pese a eso, el tener otro producto energético como lo son los lípidos representa una ventaja sobre las cepas no oleaginosas que producen principalmente carbohidratos.

Globalmente, los ciclos de N alimentación-privación dieron lugar a la acumulación de compuestos energéticos como lípidos y carbohidratos por parte de *S. obtusiusculus* AT-UAM cultivado en semicontinuo. Sin embargo, el contenido medio de proteínas en la biomasa obtenida con una mayor concentración de N en el medio BG11 modificado, durante los ciclos de alimentación y privación de N de 24 horas, reveló el predominio del crecimiento sobre la acumulación de reservas energéticas, que aumentó (**Tabla 5**).

5.2 Estrategia para la acumulación de lípidos y carbohidratos en condiciones de invernadero en FBR-CB

El funcionamiento de los FBR-CB en condiciones de invernadero experimentó amplias variaciones climáticas debido a la transición de la estación de otoño. Así, mientras que las temperaturas ambientales estaban en el rango de 3 a 25 °C con un promedio de 12.9°C, las condiciones del invernadero alcanzaron de 4 a 42 °C con un promedio de 19°C (**Figura A2** en anexo) debido a la radiación solar. A pesar de estas temperaturas extremas, el medio de cultivo sólo varió entre 7 y 35 °C (**Figura A2**), lo que fue inferior a los 40 °C reportados en condiciones exteriores durante las estaciones de otoño e invierno para el cultivo de *S. obtusiusculus* AT-UAM (Sánchez-García et al., 2020). El invernadero redujo considerablemente la irradiación incidente sobre el FBR-CB y alcanzó hasta 475 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un promedio de 309 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante el día (**Figura A2**), esta condición fue baja comparada con la reportada anteriormente (Sánchez-García et al., 2020) y de 2300 a 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en condiciones de exterior (Feng et al., 2020). Durante los ciclos de privación de N de 24 horas, el pH varió de 7 a 11 cuando el sistema fue operado en modo semicontinuo y con una concentración inicial de N de 6 $\text{mg}_\text{N} \text{L}^{-1}$ en el medio modificado BG-11 (**Figura A2**) comparado con el pH estable alrededor de 7 con 12 $\text{mg}_\text{N} \text{L}^{-1}$. La fluctuación temporal de pH en el sistema con 6 $\text{mg}_\text{N} \text{L}^{-1}$ puede ser explicada a que al consumir el CO_2 disuelto en forma de bicarbonato, se produzca una alcalinización del medio. Adicional a esto, la baja

concentración de N genera condiciones de limitación y por lo tanto de estrés para las microalgas las cuales compensan con un mayor consumo de bicarbonato como fuente de carbono inorgánico y alcalinizan aún más el medio. Con una mayor concentración de nitrógeno, el pH se mantiene mediante el suministro de CO₂ al medio de cultivo, para compensar la alcalinización inducida tanto por la captación de CO₂ como por el consumo de nitrato por parte de las microalgas (Chi et al., 2011; Scherholz & Curtis, 2013).

El FBR-CB fue operado en modo lote durante ~ 7 días antes de comenzar el ciclo de alimentación de N de 24 horas. A pesar de que la temperatura en el medio de cultivo estaba fuera del óptimo reportado para el crecimiento de las *Scenedesmus obtusiusculus* (35 °C) (Cabello et al., 2015) la productividad de la biomasa alcanzó un promedio de 536 ± 27 y 667 ± 33 mg L⁻¹ d⁻¹ cuando el sistema fue alimentado con una concentración de N de 6 y 12 mg_N L⁻¹ al inicio de cada ciclo bajo operación semi-continua, respectivamente. El aumento de la productividad de la biomasa estuvo en consonancia con el aumento de la carga de N al FBR-CB. En consecuencia, la productividad de lípidos alcanzó valores de 118 ± 7 y 142 ± 10 mg L⁻¹ d⁻¹ durante ciclos de alimentación de N de 24 horas con una concentración de N de 6 y 12 mg L⁻¹ en el medio fresco, respectivamente. De forma similar, *S. obliquus* en cultivo semicontinuo al aire libre alcanzó una productividad de lípidos de 183 mg L⁻¹ d⁻¹ bajo agotamiento de N (**Tabla 6**) (Feng et al., 2014); y se obtuvieron valores más bajos con *Chlorella* sp. GN1 en cultivo continuo obtuvo una acumulación de lípidos del 54% (Feng et al., 2020), y *S. obtusiusculus* AT-UAM alcanzó una acumulación de lípidos del 45% en funcionamiento discontinuo (Sánchez-García et al., 2020). Sin embargo, los estudios que reportan una baja productividad de lípidos oscilando entre 17–67 mg L⁻¹ d⁻¹ (**Tabla 6**), no se consideraron debido a que no es factible su valorización ya que la rentabilidad de la producción de biodiésel se centra en una alta productividad de lípidos, superior a 50 mg L⁻¹ d⁻¹ (Ananthi et al., 2021; Sibi et al., 2016).

En cuanto a la productividad de carbohidratos en *S. obtusiusculus* AT-UAM, se obtuvieron valores de 137 ± 18 y 169 ± 14 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, a través de ciclos de alimentación-privación de N de 24 horas con una concentración de N de 6 y 12 mg L⁻¹ al inicio de cada ciclo en operación semicontinua. En nuestro estudio, la productividad de carbohidratos fue superior a los 47 mg L⁻¹ d⁻¹ alcanzados por

Porphyridium purpureum cultivada en exterior (**Tabla 6**) (Fuentes-Grünwald et al., 2015).

La **Figura 10** muestra la producción total de energía teórica obtenida por cada compuesto energético, es decir carbohidratos y lípidos, la cual se calculó con los datos experimentales de este trabajo con la ecuación 5. Como puede observarse, la energía se acumuló principalmente en lípidos para el ciclo de alimentación-privación de N de 72 horas más que en carbohidratos. La contribución de los lípidos representó alrededor del 71% de la energía producida y los carbohidratos aportaron el 29%. Para el ciclo de alimentación-privación de N de 24 horas, el equilibrio cambió; la proporción de lípidos fue de alrededor del 62% y la de carbohidratos del 38%. Además, los ciclos de alimentación-privación de N de 24 horas obtuvieron un aumento de 2.2, 2.4 y 1.3 veces de la productividad energética para una concentración inicial de N de 6, 12 y 24 mg L⁻¹ con respecto a los ciclos de privación de N de 72 horas. La productividad energética total alcanzada en condiciones de invernadero fue similar a la encontrada en condiciones de interior (ciclos de alimentación-privación de N de 24 horas). Mientras que el contenido energético de los lípidos fue ligeramente mayor que en condiciones de interior (**Figura 10**). Globalmente, *S. obtusiusculus* AT-UAM almacenó preferentemente energía en forma de lípidos.

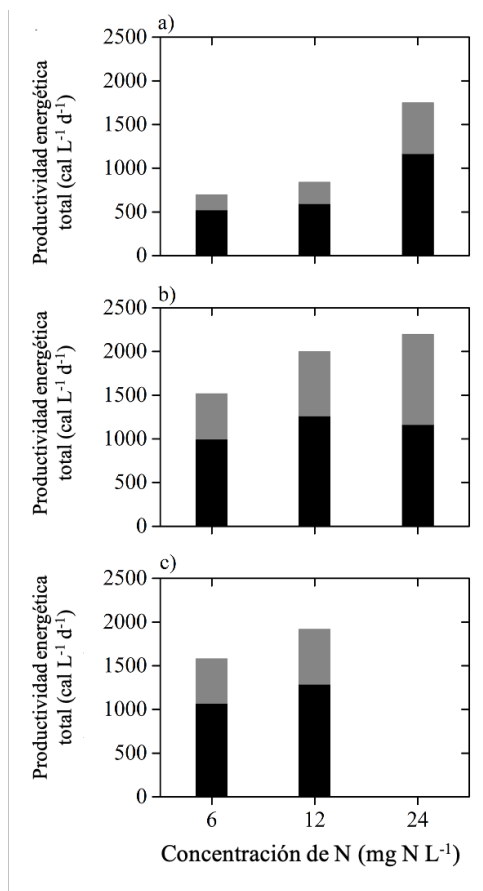


Figura 10. Productividad energética teórica obtenida en diferentes ciclos de alimentación de N con diferentes concentraciones de nitrógeno en el FBR-P para: a) ciclo de 72 h, b) para ciclo de 24 h y c) en el FBR-CB para ciclo de 24 h en condiciones de invernadero. Lípidos (barras negras) y carbohidratos (barras grises).

Por lo tanto, las condiciones del invernadero propiciaron un entorno favorable para el crecimiento y la mejora de la productividad de *S. obtusiusculus* AT-UAM en el FBR-CB en comparación con cuando se cultiva en condiciones controladas en el FBR-P durante los ciclos de alimentación-privación de N de 24 horas.

5.3 Efecto de los pretratamientos de biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en la producción de biogás CH_4 por digestión anaerobia

Para contextualizar los experimentos de DA con biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus*, a continuación, se presenta en la **Tabla 7** el perfil bioquímico de la biomasa usada. La biomasa completa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM tiene características típicas de la biomasa crecida en condiciones de suficiencia de

nutrientes, obteniendo 51.2% de proteínas, 28.7% de carbohidratos y 13.3% de contenido lipídico (Sánchez-García et al., 2020). A diferencia de la biomasa que se usó para extraer lípidos, esta tiene el perfil de un cultivo en ausencia de nitrógeno por lo que los metabolitos principales se reparten de la siguiente manera 24.3% de proteínas, 35.3% de carbohidratos y 33% de lípidos. Debido a la extracción de lípidos, la biomasa sin lípidos usada como sustrato para la DA tiene un perfil diferente con 39.7% de proteínas, 57% de carbohidratos y lípidos residuales en 0.9%. Ese porcentaje residual de lípidos puede deberse a la naturaleza compleja de la pared de la microalga la cual puede retener lípidos presentes en la estructura o a la interacción de los lípidos con proteínas y carbohidratos, lo que dificulta su extracción. Adicionalmente, los métodos de extracción son naturalmente limitados por factores físicos y químicos.

Tabla 7. Perfil bioquímico de la biomasa utilizada en los experimentos de DA.

	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
Biomasa completa y fresca	51.2%	28.7%	13.3%
Biomasa antes de extracción de lípidos	24.3%	35.3%	33%
Biomasa sin lípidos	39.7%	57%	0.9%

La **Figura 11a** presenta la producción neta acumulada de CH₄ a lo largo del tiempo a partir de la biomasa completa (bc) y la biomasa sin lípidos (bd), los cuales se extrajeron previamente por Soxhlet. Como puede observarse, el tratamiento TM obtuvo la menor producción de CH₄ con un volumen acumulado neto de 324.3 ± 25 mL y de 413.8 ± 33 mL para la bc y bd, respectivamente. A pesar de la baja solubilidad de la biomasa de microalgas, los pretratamientos E_{bc}, TQ_{bc} y TMQ_{bc} produjeron altos volúmenes de CH₄, alcanzando al menos 1 L de CH₄ neto acumulado por litro de reactor (**Figura 11a y b**). E, TQ y TMQ alcanzaron 904.5 ± 40.2, 1226.3 ± 11.6 y 1323.9 ± 38.8 mL de CH₄ acumulado neto, respectivamente. En cuanto a E_{bd}, TQ_{bd} y TMQ_{bd} obtuvieron 693.2 ± 29.8, 832.7 ± 38.2 y 959.7 ± 56.3 mL de CH₄ acumulado neto, respectivamente (**Figura 11b**). El máximo volumen producido fue obtenido por

el control positivo debido a la alta disponibilidad, solubilidad y degradabilidad de la glucosa.

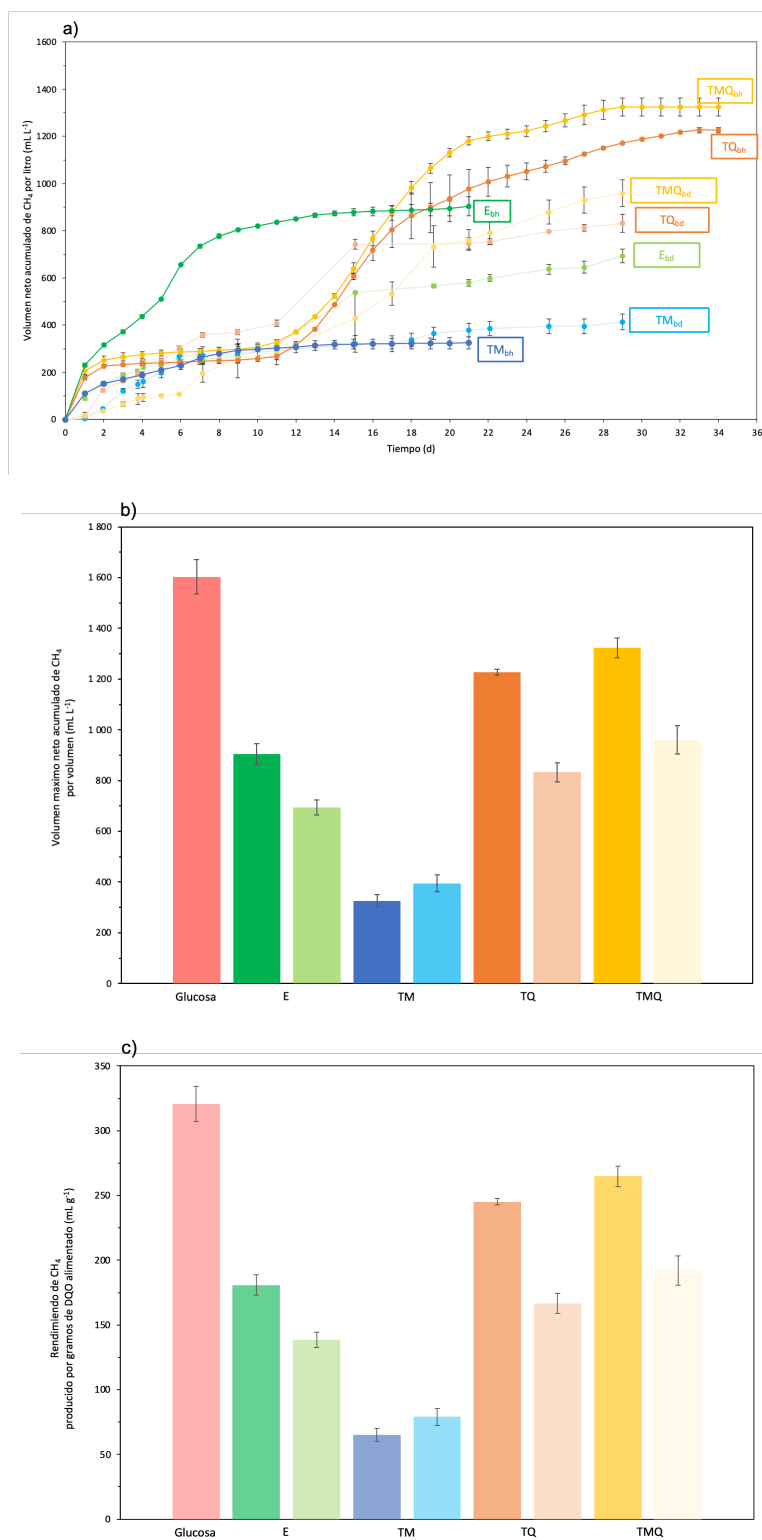


Figura 11. (a) Acumulación de CH_4 producido a lo largo del tiempo por volumen de trabajo de los experimentos. (b) Volumen máximo neto producido por volumen de trabajo y (c)

rendimiento de CH₄ por cantidad de DQO alimentada; por cada condición, control positivo y pretratamientos, las barras oscuras son de biomasa completa y las barras más claras son de biomasa sin lípidos.

La **Figura 11a** evidencia el comportamiento en el tiempo de la producción de CH₄. En el caso de los pretratamientos, TM_{bc} y E_{bc}, entraron en fase estacionaria los días 8 y 12, con una producción menor al 1% del volumen acumulado, respectivamente. Ambos pretratamientos alcanzaron su máximo alrededor del día 12. El pretratamiento E produjo 2.8 veces más CH₄ que el TM_{bc} por lo que esto sugiere que el cóctel enzimático mejora de manera efectiva la disponibilidad de los compuestos de la microalga. En el caso de TQ_{bc} y TMQ_{bc}, los pretratamientos mostraron un comportamiento diaúxico, que se caracteriza por dos fases distintas de producción en respuesta a la disponibilidad de diferentes fuentes de carbono. En su primera etapa, del día 0 al día 12, TQ_{bc} y TMQ_{bc} alcanzaron volúmenes similares a TM_{bc}, pero con una mayor velocidad alcanzando un primer máximo el día 4. Esto sugiere que la presencia de ácido favorece la solubilización de compuestos más simples y digeribles para los lodos. En el día 12, TQ y TMQ iniciaron una segunda etapa de producción de metano hasta alcanzar altos volúmenes, es decir al menos 1 L L⁻¹ de CH₄. La diferencia entre los pretratamientos TQ_{bc}, TMQ_{bc} y TM_{bc} es la presencia de ácido, ya que en los 3 se aplicó un tratamiento térmico. Los pretratamientos primero hacen mas accesible compuestos de fácil asimilación y la hidrólisis acida permite que compuestos más complejos o difíciles de digerir fueran digeribles por los lodos. En efecto, la hidrólisis ácida es un proceso químico en el cual los iones de hidrógeno rompen los enlaces glicosídicos y son catalizados por la presencia del ácido. Los pretratamientos buscan mejorar la solubilización de polisacáridos y proteínas presentes en la pared celular, los cuales suelen ser resistentes a la DA. Entre estos están la celulosa y hemicelulosa, que son compuestos difíciles de digerir y con los pretratamientos son hidrolizados en moléculas más simples y por lo tanto que los lodos pueden metabolizar con mayor facilidad (Bohutskyi & Bouwer, 2012).

De la misma manera, se observó que en el caso del pretratamiento TM_{bd} entró en fase estacionaria el día 21 con una producción menor al 1% del volumen acumulado para la biomasa sin lípidos y, alcanzó su máximo alrededor del día 27. El pretratamiento E_{bd} produjo 1.7 veces más que el TM_{bd} lo cual es consistente con los resultados

obtenidos previamente con la biomasa completa. Se observaron, de igual forma, comportamientos diaúxicos para E_{bd} , TQ_{bd} y TMQ_{bd} . A diferencia de la biomasa completa, el pretratamiento E_{bd} también mostró una etapa diaúxica. En su primera etapa, del día 0 al día 12, E_{bd} , TQ_{bd} y TMQ_{bd} lograron volúmenes similares a TM_{bd} , pero con una mayor velocidad. Esto sigue coincidiendo con los resultados obtenidos con la biomasa completa y refuerza la hipótesis de que tanto el ácido y, en su caso, el cóctel enzimático, favorecen la solubilización de compuestos más simples y digeribles por los lodos (de Oliveira et al., 2022; Córdova et al., 2019; Passos et al., 2014; Hernandez et al., 2015; Batstone et al., 2002). En el día 12, E_{bd} , TQ_{bd} y TMQ_{bd} arrancaron una segunda etapa de producción de metano hasta alcanzar sus volúmenes máximos cerca del día 22. Así mismo, como en el caso de la biomasa completa, la diferencia entre los pretratamientos TQ_{bd} , E_{bd} , TMQ_{bd} y TM_{bd} es la presencia de ácido en TMQ_{bd} y TQ_{bd} . En el tratamiento E_{bd} , el pH de 5 propicia una mejor solubilización de los carbohidratos liberados por las enzimas lo cual permite una mayor conversión a metano durante la DA (Brodeur et al., 2011; Kim et al., 2016; Kumar & Sharma, 2017). Aunque el pH ácido del tratamiento E_{bd} mejora la solubilización de carbohidratos y otros compuestos solubles, no es tan eficiente como los tratamientos TQ_{bd} y TMQ_{bd} , los cuales al hidrolizar mejoran la solubilización de compuestos insolubles (Opurum et al., 2021).

Estos resultados demostraron la importancia de un pretratamiento adecuado de la biomasa de microalgas para la DA. Los pretratamientos adecuados producen un mayor CH_4 debido a la liberación del contenido intracelular. En la **Figura 11b**, se observa el volumen acumulado máximo producido durante los experimentos de DA de los sustratos de diferentes biomazas de microalga, húmeda y sin lípidos, con diferentes pretratamientos. Los valores de los rendimientos de la biomasa completa de CH_4 fueron de 264.8 ± 7.8 , 245.3 ± 2.3 y 180.9 ± 8 mL g DQO⁻¹ los cuales se obtuvieron con TMQ_{bc} , TQ_{bc} y E_{bc} , respectivamente (**Figura 11c**). Estos rendimientos fueron 4.1, 3.8 y 2.8 veces superiores a los del pretratamiento TM_{bc} , que fue el más bajo, 64.9 ± 5 mL g DQO⁻¹. Por otro lado, la biomasa sin lípidos obtuvo como rendimientos de CH_4 de 191.9 ± 11.3 , 166.5 ± 7.6 y 138.6 ± 6 mL g DQO⁻¹, para TMQ_{bd} , TQ_{bd} y E_{bd} (**Figura 11c**), respectivamente. También para el pretratamiento, TM_{bd} , se obtuvo el menor valor de rendimiento, 78.9 ± 1.3 mL g DQO⁻¹. TMQ_{bd} , TQ_{bd} y E_{bd}

tuvieron valores de rendimientos 2.3, 2 y 1.7 veces superiores a los del pretratamiento TM_{bd} . De todo lo anterior, se observa que la biomasa sin lípidos tuvo menores producción y rendimientos de metano. Posiblemente esto pudo deberse a que la biomasa, después de la extracción de los lípidos, se encontraba seca y por lo tanto la efectividad de los pretratamientos fueron menor, haciendo que la porción digerible y disponible de la DQO de la biomasa fuera menor comparado a la biomasa completa. En su trabajo Yang et al. (2023) compararon la extracción de azúcares de biomasa fresca, congelada y seca. Reportaron mayores solubilizaciones de carbohidratos con biomasa fresca, y mencionan que al secar la biomasa se puede formar estructuras reticuladas y se endurece la biomasa. La formación de estructuras reticuladas reduce la permeabilidad de la pared celular lo cual dificulta la extracción y solubilización de compuestos intracelulares. Esto podría explicar las diferencias entre este estudio y los resultados obtenidas por Cortes-Carmona et al. (2018) en el cual usaron biomasa seca y así mismo la diferencia con la biomasa sin lípidos que se encontraba en estado seco debido a la previa extracción por Soxhlet. También como sustrato, los lípidos tienen una densidad energética mayor, es decir su proporción de carbono es mayor que en los carbohidratos o proteínas, lo cual significa que, a cantidades iguales, se produciría más metano con los lípidos.

Globalmente, el mayor rendimiento con *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM fue obtenido por TMQ_{bc} . Los valores de TMQ_{bc} , TQ_{bc} son mayores al rendimiento de 199.6 mL g DQO⁻¹ reportado por Cortés-Carmona et al. (2018) en experimentos en lote para una relación I/S similar de 2 (**Tabla 8**). En cuanto a la biomasa sin lípidos, TMQ_{bd} obtuvo rendimientos similares a los reportados por Cortés-Carmona et al. (2018) mientras que TQ_{bd} fue inferior. En el caso del tratamiento E_{bc} , el valor obtenido es similar al de Cortés-Carmona et al. (2018). La diferencia podría deberse al uso de ácido en los pretratamientos y al estado de la biomasa, fresca, utilizada en este trabajo y de biomasa seca por Cortés-Carmona et al. (2018) (**Tabla 8**). Por lo tanto, el volumen de CH₄ producido y los rendimientos con biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM son comparables al valor obtenido en la bibliografía. Los valores de rendimiento de sustrato obtenidos en este estudio fueron superiores a los 220 mL y 250 mL g DQO⁻¹ para el pretratamiento enzimático reportado para *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris*, respectivamente (Mahdy et al., 2016). En cuanto a los rendimientos de CH₄

obtenidos para los pretratamientos TMQ_{bc} y TQ_{bc} aplicados a *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, estos fueron mayores a los reportados para *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus* sp. (Córdova et al., 2018) y similares a *Chlorella vulgaris* (Mahdy et al., 2016).

Tabla 8. Comparación de rendimientos de producción de metano en diferentes cepas.

Cepa	Pretratamientos y condiciones de DA	Rendimiento (mL CH ₄ g _{COD} ⁻¹)	Rendimiento (mL CH ₄ g _{sv} ⁻¹)	Referencias
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM	Biomasa seca, térmico con I/S de 2	199.6	307	Cortés-Carmona et al. (2018)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Fresca, mejor pretratamiento con ultrasonidos con IS de 2	216	459	Córdova et al. (2018)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Fresca, enzimático con I/S de 2	220	345	Mahdy et al. (2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Fresca, enzimático con I/S de 2	250	401	Mahdy et al. (2016)
Consorcio (<i>Scenedesmus</i> 80%, <i>Keratococcus</i> 19%, <i>Oscillatoria</i> 2%)	Fresca/seca, ozonización con I/S de 2	-	309	Cardeña et al. (2017)
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM	Biomasa seca, térmico con I/S de 0.5	-	296.4	Rincón-Pérez et al. (2020)
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM	Biomasa completa, TMQ con I/S de 2	264.8	357.8	Este trabajo
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i> AT-UAM	Biomasa completa, TQ con I/S de 2	245.3	331.4	Este trabajo

A continuación, la **Tabla 9** muestra los valores de R_{max} calculados a partir del modelo de Gompertz. Como puede observarse, la tasa de producción mayor de CH₄ se alcanzó con el pretratamiento E_{bc} , y con el pretratamiento TMQ_{bc} fue 8.4 veces menor de la biomasa completa. Adicional a esto, para TQ_{bc} y TMQ_{bc} existe una fase de latencia importante (λ), siendo de 2.9 y 3.2 d, respectivamente; que se observa entre las 2 etapas de producción (**Figura 11a**) de la diauxia, del día 4-5 al día 12. Esto podría

explicarse por la permeabilización más específica de la pared celular por el tratamiento enzimático y mayor solubilización de compuestos insolubles, así como una mayor cantidad de sustancias complejas reducidas a formas más fácilmente digerible. Sin embargo, TMQ_{bc} produjo más CH_4 debido a una mayor conversión de la biomasa total.

Tabla 9. Volumen acumulado neto experimental de CH_4 y parámetros de Gompertz obtenidos para cada pretratamiento con biomasa completa y biomasa sin lípidos.

Experimental		Parámetros de Gompertz			
	V_{max} (mL L ⁻¹)	H_{max} (mL L ⁻¹)	R_{max} (mL d ⁻¹)	λ (d)	R^2
Biomasa completa					
Endógeno	227.5 ± 19.3	213.2	26.8	0	0.93
Glucosa	1488.5 ± 50.1	1515.7	504.1	0	0.98
E_{bc}	904.5 ± 40.2	891.8	118.2	0	0.98
TM_{bc}	324.7 ± 25.0	320.4	48.6	0	0.94
TQ_{bc}	1226.3 ± 11.6	1334.6	52.2	2.9	0.96
TMQ_{bc}	1323.9 ± 38.8	1616.7	59.9	3.2	0.95
Biomasa sin lípidos					
Endógeno	330 ± 16.5	390.5	23.0	0.0	0.98
Glucosa	1718 ± 85.6	1073.0	85.9	0.2	0.96
E_{bd}	693.2 ± 29.8	694.1	38.2	0.0	0.92
TM_{bd}	394.7 ± 33.0	334.2	52.3	1.0	0.98
TQ_{bd}	832.7 ± 38.2	786.0	48.2	3.0	0.97
TMQ_{bd}	959.7 ± 56.3	918.1	41.3	4.4	0.97

En el caso de la biomasa sin lípidos, el $R_{\max}$ obtenido es parecido o inferior a los de la biomasa completa para TM, TQ y TMQ. En el caso del pretratamiento E, el $R_{\max}$ de la biomasa sin lípidos es notablemente inferior. En efecto, las diferencias que se observan pueden ser explicadas por los tipos de pretratamientos: en el pretratamiento E, las enzimas atacan específicamente los enlaces glucosídicos presentes entre la celulosa y hemicelulosa lo cual facilita la ruptura de la pared celular y por ende su digestión; en cuanto a los tratamientos termoquímicos, el calor y la acidez rompen enlaces de proteínas y polisacáridos, resultando en una mayor solubilización de compuestos insolubles (Bohutskyi & Bouwer, 2012).

Esto sugiere que la extracción de lípidos podría haber inducido transformaciones y cambios en los compuestos de la biomasa. Es posible que se hayan producido compuestos recalcitrantes y no digeribles para los lodos. También esto parece indicar que los lípidos son una fuente relativamente importante para la nutrición de los lodos anaerobios.

Estos resultados con *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM fueron consistentes con los obtenidos por Cortés-Carmona et al. (2018), Rincón-Pérez et al. (2020), Rincón-Pérez et al. (2021) con la misma cepa, y otros estudios con otras cepas (Cardeña et al., 2017; Mahdy et al., 2016; Vargas-Estrada et al., 2022). Adicionalmente, con la relación I/S usada en estos ensayos se obtuvieron resultados que coinciden con lo obtenido por Cortés-Carmona et al. (2018), agregando a lo anterior que en su estudio se concluye que a menor I/S, menor producción de metano.

Del mismo modo, la **Tabla 10** recapitula el rendimiento en volumen de metano producido por gramos de SV agregados con el sustrato. Se observó una disminución del rendimiento entre las biomásas de alrededor de 20% para el pretratamiento E y de un 30% en el caso de TM y TMQ con respecto a la biomasa completa. Para TM se observa un ligero aumento del 20%. En el caso de TM_{bd} , el haber extraído los lípidos previamente podría haber mejorado la disponibilidad de sustrato para los lodos. De manera general, los rendimientos de 331.4 y 357.8 mL CH_4 g SV^{-1} obtenidos para TQ_{bc} y TMQ_{bc} , respectivamente, fueron mayores al valor obtenido por Cortés-Carmona et al. (2018) de 307 mL CH_4 g SV^{-1} y los 296.4 mL CH_4 g SV^{-1} de Rincón-Pérez et al. (2020). En comparación con otras cepas como *Chlorella* existe una gran

variabilidad en los rendimientos dependiendo del pretratamiento y posiblemente de los lodos usados. Así diferentes estudios reportan desempeño de 142 mL CH₄ g SV⁻¹ con pretratamientos termo químicos (Passos et al., 2016), de 297 mL CH₄ g SV⁻¹ con solo tratamiento térmico (Scarcelli et al., 2020) y hasta 415 mL CH₄ g SV⁻¹ con pretratamiento biológico usando *B. licheniformis* (He et al., 2016). Por lo que los rendimientos obtenidos en estos se parecen con (Moreira et al., 2016) y las diferencias posiblemente podrían ser por la cepa empleada. En cuanto al género *Scenedesmus* este estudio obtuvo valores más altos que Cardeña et al. (2017) con 309 mL CH₄ g SV⁻¹ con respecto al tratamiento TMQ_{bc} el cual alcanzó 357.8 mL CH₄ g SV⁻¹. El mejor rendimiento obtenido en este estudio es similar al de Mahdy et al. (2016) de 345 mL CH₄ g SV⁻¹ con *Scenedesmus* sp. Esa diferencia entre las cepas puede deberse entre otras cosas a su pared celular y la composición de esta ya que por un lado Hernández et al. (2015) en su estudio mencionan que las cepas que utilizaron tuvieron rendimientos diferentes en el pretratamiento enzimático usando el mismo coctel de enzimas. Por otro lado, Hernández et al. (2015) mencionan que la *Scenedesmus almeriensis* fue la microalga más resistente a los pretratamientos y sugieren que además del grosor de su pared, su composición con altos contenidos en hemicelulosa y celulosa en conjunto con bajos contenidos de carbohidratos induce una baja solubilización de estos. Adicionalmente, en su trabajo Sánchez-García et al. (2020) reportan que la estructura de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM está compuesta por: una capa de pectina, una capa basada en algaenano (biopolímero de tricapa) y una capa fibrilar. En su estudio observaron modificaciones estructurales en la pared celular en función de las condiciones de cultivo, en ausencia de N y ausencia de N con pulsos ácidos, con respecto a condiciones de crecimiento. Así, en ausencia de N se engrosan las capas de pectina y fibrilar mientras la de algaenano disminuye; adicionando los pulsos ácidos, la capa de algaenano termina desapareciendo. Globalmente en condiciones de crecimiento, el grosor de la pared es de 125 nm, en ausencia de N de 140 nm y en ausencia de N combinado a pulsos ácidos de 330 nm. Lo anterior podría explicar los diferentes rendimientos entre pretratamientos (**Tabla 10**). Esto también permite entender que si el tratamiento E fue eficaz, es por la composición del coctel Viscozyme L entre otras cosas tiene: la pectinasa, cuya única función es romper los enlaces de la pectina, degrada la primera barrera protectora, la celulasa rompe las resistentes microfibrillas de celulosa, la hemicelulasa y xilanasas

degradan la hemicelulosa y el xilano, que son los polímeros que actúan como "cemento", uniendo las fibras de celulosa entre sí, y la β -glucanasa degrada los β -glucanos, otro polisacárido estructural común en esta capa. Al final queda la membrana celular la cual siendo principalmente compuesta por lípidos estructurales se lisa con facilidad.

Tabla 10. Rendimientos de producción de CH_4 por cantidad de SV suministrado para cada pretratamiento de ambas biomásas húmeda y sin lípidos.

Rendimiento de CH_4 (mL g SV^{-1})		
	Húmeda	Sin lípidos
Glucosa	320.7 ± 13.6	
E	244.5 ± 10.9	187.4 ± 8.1
TM	87.8 ± 6.8	106.7 ± 8.9
TQ	331.4 ± 3.1	225.1 ± 10.3
TMQ	357.8 ± 10.5	259.4 ± 15.2

En su estudio, Rincón-Pérez et al. (2020) reportan que la temperatura y la acidez son los parámetros de mayor influencia en la solubilización de los carbohidratos y en el caso del DQO solubilizado todos los parámetros (temperatura, acidez, tiempo y concentración de biomasa) así como algunas interacciones de estos favorecen la solubilización del DQO de la biomasa microalgal. Lo anterior explica los resultados obtenidos con la biomasa hidrolizada con HCl en este trabajo. Ciertamente, el efecto de temperatura y ácido sobre la biomasa reportado por Rincón-Pérez et al. (2020) con una temperatura cerca de 100°C y HCl al 3%, son parámetros parecidos a los usados en estos experimentos. Por lo que, en estas condiciones la liberación de DQO y solubilización de los carbohidratos es mayor e induce un mayor volumen de metano producido como se puede observar la diferencia de volumen producido entre los hidrolizados ácidos TQ y TMQ, con 1226.3 ± 11.6 y $1323.9 \pm 11.6 \text{ mL L}^{-1}$, respectivamente; y la biomasa hidrolizada solamente con agua en TM alcanzando

324.7 ± 25.0 mL L⁻¹. Esto se confirma con la diferencia observada en la biomasa sin lípidos obteniendo con 832.7 ± 38. y 959.7 ± 56.3 mL L⁻¹ versus 394.7 ± 33.0, respectivamente TQ, TMQ y TM. También Rincón-Pérez et al. (2020) menciona que los carbohidratos alcanzan solamente una solubilización del 50% cuando se usa agua como solvente para hidrolizar la biomasa. De la misma manera, probablemente la combinación de la temperatura y del ácido haya permitido una mayor ruptura de la pared celular liberando tanto los biocompuestos intracelulares, así como los polisacáridos estructurales como celulosa, hemicelulosa, pectina y glucanos. Como lo señala Deng et al. (2019) en su estudio, el efecto del ácido es romper moléculas grandes y recalcitrantes como las mencionadas anteriormente. Aunque los carbohidratos se fueran convirtiendo en otros compuestos, por ejemplo, furfurales, ácido acético o propiónico, estos siguen contribuyendo al DQO global y pueden ser usados como sustrato por los lodos en etapas intermedias (Boopathy, 2002; Deng et al., 2019; Hernández et al., 2015; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000). La menor producción de metano con TM se debe probablemente a una menor solubilización de carbohidratos y DQO, como lo menciona Rincón-Pérez et al. (2020).

Por otra parte, el comportamiento diaúxico es un fenómeno que ocurre debido a la composición molecular del sustrato alimentado e indica la presencia de 2 fuentes de carbono: una fácilmente digerible como azúcares simples, aminoácidos y ácidos grasos; y otra más compleja como polisacáridos o proteínas estructurales. En efecto, la primera etapa de producción corresponde al consumo de compuestos directamente digeribles por parte de los microorganismos del lodo anaerobio, lo cual se debe a la represión catabólica. Una vez se hayan agotado esa primera fuente de carbono, es cuando los microorganismos hidrolíticos empiezan a hidrolizar las moléculas más complejas aun presente en el sustrato. La segunda fase de latencia traduce entonces que ciertos compuestos tienen tasas de degradación distintas y sobre todo una reorganización metabólica de la comunidad de microorganismos. En la segunda etapa de producción de metano, los microorganismos cambian sus enzimas para poder consumir las moléculas aún presentes, pero no consumible de forma directa (Campuzano & González-Martínez, 2017; Cohen, 2011). Ese cambio de enzimas permite hidrolizar moléculas más complejas en sus formas de monómeros. Sin embargo, ese comportamiento se observa únicamente en TQ y TMQ. Esto sugiere

que el uso de ácido combinado a un tratamiento térmico hace disponibles compuestos difíciles de digerir y con las enzimas adecuadas a estas sustancias, los microorganismos pueden consumirlos. A pesar de los pretratamientos que solamente deshacen las estructuras celulares, pero quedan moléculas complejas como polisacáridos y proteínas las cuales requieren de una hidrólisis adicional por parte de los microorganismos en compuestos más sencillos como azúcares y aminoácidos. Eventualmente y adicional a lo anterior, la presencia de algunos compuestos inhibitorios, como las sales que se forman al neutralizar la biomasa pretratada con HCl y la formación de amoníaco durante la degradación de las proteínas, podría ser una posible explicación en la prolongación de la fase de latencia de la segunda etapa de producción de metano (Ganesh Saratale et al., 2018).

5.4 Biorrefinería

Los resultados obtenidos confirman la idea de que el uso de la biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en un esquema de biorrefinería es posible. Los datos obtenidos muestran que la biomasa residual pretratada permite producir un volumen de biogás cerca de 0.9 L por volumen de trabajo de DA. Sin embargo, la DA no convierte toda la biomasa en energía en forma de metano, sino que conforme el bioproceso ocurre una parte de la energía contenida en la biomasa es convertida en otros compuestos como CO₂, usada en el metabolismo celular y el crecimiento de la biomasa de los lodos. En efecto, como lo presenta la **Figura 12**, el extraer los lípidos y producir metano con la biomasa residual permite aumentar desde 2 hasta 6 veces la productividad energética global con respecto a la biomasa completa. Las productividades energéticas fueron calculadas con las ecuaciones 7 y 8, son las productividades teóricas totales, es decir sin considerar el gasto energético de los diferentes procesos. Esta diferencia se debe a que en la digestión anaerobia no toda la biomasa es convertida a CH₄, sino que, dependiendo del sustrato alimentado, de su composición y de los pretratamientos, entre el 50 y 80% se convierte en CH₄ (Ganesh Saratale et al., 2018). En comparación, el 90% de los lípidos son convertidos a biodiesel mediante transesterificación. Cabe mencionar que en condiciones de temperatura y presión estándares (25°C y 1 atm), el diésel tiene mayor densidad energética que el CH₄ (Fanchi & Fanchi, 2016). En el caso de TM, el aprovechar los lípidos como fuente de energía y utilizar la biomasa residual como sustrato implica el

mayor incremento de 4.6 veces con respecto a la biomasa completa. Con el pretratamiento E, la productividad energética se duplica en comparación con la biomasa completa. Finalmente, para TQ y TMQ, el incremento es 1.6 y 1.5 respectivamente.

En ese mismo sentido, Sills et al. (2013) han estimado las necesidades energéticas para producir biodiesel y biogás con varias cepas de microalgas como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis* y *Phaeodactylum*. Para eso compararon tres escenarios de productividades de biomasa de microalga siendo bajo, base y alto respectivamente $12.5 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, $25 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y $50 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Estimaron que potencialmente se podría ahorrar alrededor de 0.3-1 MJ/MJ de biocombustible producido en la coproducción de biodiesel y biometano con los escenarios base y alto (Sills et al., 2013). Aunque, en el caso desfavorable de bajas productividades de biomasa y que el proceso consume más energía, varios estudios han mostrado los beneficios de la DA de la biomasa residual en el balance energético, en el impacto de los combustibles sobre sus emisiones de GEI y en los costos de producción (González-González et al., 2018; Harun et al., 2011; Hasan et al., 2024; Laubscher & Cowan, 2020; Posada Duque et al., 2016). Cabe mencionar que, aunque el balance energético no varía mucho con el contenido de lípidos, los combustibles líquidos tienen mayor valor en el mercado lo que mejora la viabilidad económica de la biomasa microalgal (Sills et al., 2013). Además, Sills et al. (2013) encontraron que el fertilizante obtenido de la DA y su reúso como fuente de nutrientes para los cultivos de microalgas reduce de 0.03 MJ/MJ de biocombustible producido. También el uso de la biomasa residual como sustrato presenta mejor impacto energético que usarla como alimento animal (Sialve, Bernet, & Bernard, 2009; Vargas-Estrada et al., 2022).

Sin embargo, mediante balances de materia y energía, el análisis del ciclo de vida permite conocer los impactos ambientales propio a cada escenario. Además, procesos de extracción de biocompuestos a partir de biomasa completa permite reducir de manera importante el costo inducido por la necesidad de secar la biomasa para extraer los lípidos para el biodiesel (Figuerola-Torres & Theodoropoulos, 2023; Wiley et al., 2011). También otros estudios sugieren que en ciertos casos y usando co-cultivos de microalgas o cultivos con otros microorganismos se podría omitir ciertos pasos como

el pretratamiento o reducir la necesidad de separar la biomasa del agua (Gonzalez-Fernandez et al., 2018; Laubscher & Cowan, 2020; Leong et al., 2023).

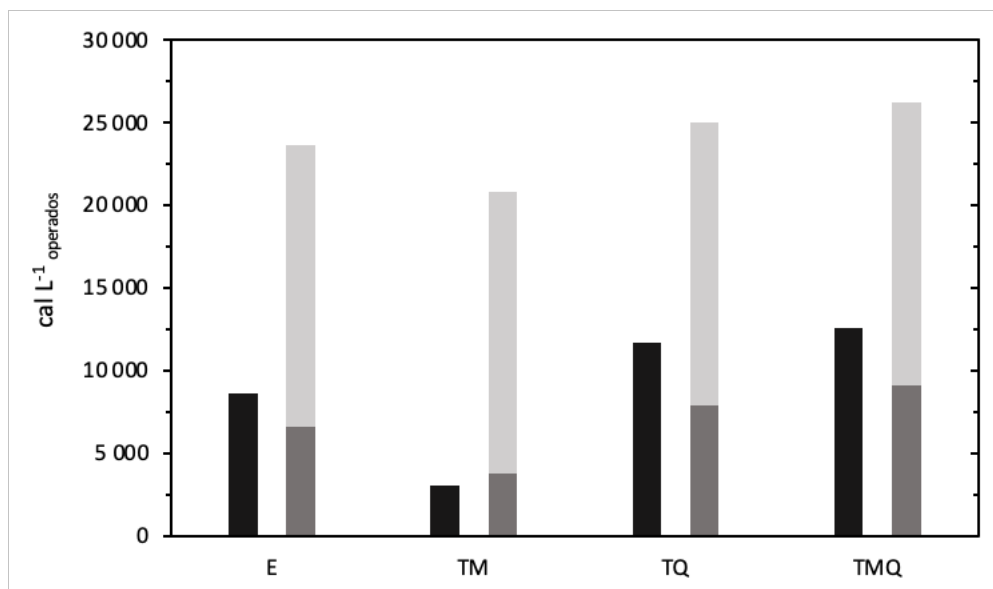


Figura 12. Productividad energética teórica obtenida con biomasa completa, biomasa sin lípidos y de los lípidos extraídos. Las barras negras representan la biomasa completa, las barras grises oscuras la energía obtenida del biogás con la biomasa sin lípidos y las barras grises claras la energía obtenida de los lípidos extraídos.

El aprovechamiento de la biomasa residual permitiría compensar costos de producción del biodiesel a partir de los lípidos extraídos de la biomasa además de evitar su desperdicio y así cumplir con los objetivos de desarrollo sostenible como el minimizar la producción de residuos en un esquema de economía circular (Vargas-Estrada et al., 2022). Estudios comparativos de costos de producción de lote versus semicontinuo han mostrado una reducción significativa en los costos de producción para la operación semicontinua (Quiroz et al., 2025). Esto coincide con los resultados de este trabajo de mayores productividades y recuperación de energía (**Figura 12**). Así una biomasa producida en lote tiene un costo de alrededor de US\$1200-US\$1800 comparado con una producción en semicontinuo esta tiene un valor de US\$1000-\$1100 (Quiroz et al., 2025). A lo cual se agrega que la producción en semicontinuo es más resiliente y menos afectado en su costo frente a las variaciones de productividades de biomasa. En efecto, el valor inferior del rango es el costo de producción usando fotobiorreactores abiertos de menor costo y el límite superior del rango es usando fotobiorreactores cerrados de mayor costo destacando una gran

diferencia en la operación en lote, con un costo alrededor de US\$600 más, mientras que en la operación semicontinuo la diferencia de costo es solamente de US\$100 por el tipo de fotobiorreactores.

Adicional a los productos energéticos obtenidos, CH₄ y biodiesel, el digestato es un sustrato muy nutritivo y puede ser utilizado como biofertilizante. Muchos estudios han trabajado sobre este co-producto que es el digestato desde hace varias décadas iniciando desde al menos los años 90 y sigue siendo un tema de interés a la fecha. Se ha encontrado que el tipo de biomasa que se digiere influye en la composición y características del digestato como una reducción en la relación de carbono-nitrógeno y mayor contenido de nitrógeno en forma de iones amoníaco NH₄⁺. Unos de los principales resultados que destaca la utilidad del digestato es la presencia de nitrógeno principalmente en forma de NH₄⁺, con contenidos desde un 44% hasta un 81% en el lodo aumentando la disponibilidad del nitrógeno, en comparación a biomasa no digerida (Logan & Visvanathan, 2019; Sills et al., 2013). Mas recientemente se ha planteado y estudiado su uso como fuente alternativa de nutrientes para el cultivo de microalgas (Bauer et al., 2021). Como se mencionó anteriormente, el reúso del digestato como parte del medio de cultivo reduce en un 0.2 MJ/MJ de biocombustible producido y así mismo el costo de producción de los biocombustibles de microalgas. También se ha encontrado un incremento en la disponibilidad de varios nutrientes y mejoran las propiedades del suelo como fósforo, estructura del suelo, retención de agua y contenido de materia orgánica (European Biogas Association, 2024; Levin et al., 2021). Aunque requieren de un tratamiento previo a su uso como fertilizante, su uso permite reducir la dependencia a fertilizantes sintéticos.

Recientemente se ha investigado la producción de otros productos con la DA como hidrógeno y ácidos grasos volátiles que son productos de alto valor agregado. En particular se han propuesto realizar una DA de 2 etapas para aprovechar y mejorar los rendimientos de los diferentes productos (Mussnug et al., 2010c; Vargas-Estrada et al., 2022; Xia et al., 2014). En su estudio Xia et al. (2014) produjo primero hidrógeno mediante fermentación oscura con una mezcla de biomásas de *Chlorella pyrenoidosa*, hongos y almidón de yuca. Posteriormente, utilizaron los sobrenadantes remanentes de la fermentación oscura para producir H₂ mediante fotofermentación y, finalmente

los residuos tanto de la fotofermentación como los residuos sólidos de la fermentación oscura se usaron como sustrato para la producción de CH₄ mediante DA.

A todo esto, se suman los beneficios de la producción de la microalga como la mitigación del CO₂, tratamientos de aguas residuales y producción de una amplia gama de bioproductos de alto valor agregado. La combinación de corrientes residuales, la recirculación y el aprovechamiento de las diferentes corrientes con el uso de microalgas como materia prima en una biorrefinería permitirá reducir costos y hacer posible económicamente el uso de microalgas en un esquema de biorrefinería. La mejora de la productividad de lípidos obtenidos en el apartado 3.1 y 3.2 en conjunto con los resultados de los experimentos de DA refuerzan el potencial de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM como candidata para la producción de bioenergéticos. Así mismo, como se observa en la **Figura 12**, se muestra el potencial de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en una biorrefinería. En efecto, este estudio mostró que se obtiene más energía en producir ambos productos, lípidos y metano, que solamente el CH₄ producido con la biomasa completa (**Figura 12**). De manera complementaria, el uso de biomasa fresca permite reducir costos al omitir la etapa de secado de la biomasa. Estudios han también mostrado que además se puede recircular el biogás producido en cultivos de microalgas para la purificación del biogás y alcanzar las metas de cero emisiones (Meier et al., 2015; Salafudin et al., 2015). Aunque la presencia del O₂ producido por las microalgas requiere instaurar un proceso de 2 etapas y recircular al menos 2 veces el biogás para reducir el contenido de CO₂ (Meier et al., 2015; Vargas-Estrada et al., 2022). En complemento, una propuesta de biorrefinería que ha sido estudiada es el modelo de cascada el cual consiste en la explotación secuencial de la biomasa de microalga para maximizar su uso evitando de descartar residuos de biomasa y por lo tanto mejorando su valor económico (Francavilla et al., 2015; Keegan et al., 2013). Generalmente, la secuencia es la ya sugerida en este trabajo de primero extraer lípidos, separar la luteína, usar la biomasa residual como sustrato para DA y finalmente obtener biometano por un lado y biofertilizante por otro lado (Sánchez-García, 2024). Como se ha mencionado anteriormente, se podría usar este biofertilizante para la agricultura o bien para cultivos de otros microorganismos. Ese modelo de biorrefinería permite explotar el

95% de la biomasa contra un 7-28% en un uso singular (Monlau et al., 2021; Slegers et al., 2020).

El diagrama de biorrefinería presentado en la **Figura 13**, basado en este trabajo, es una de las posibles opciones de configuración para la valorización de la biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. El siguiente sintetiza la importancia de abordar la explotación de la biomasa de microalga bajo un esquema de biorrefinería para lograr viabilidad económica, reduciendo costo y dándole mayor uso a la biomasa como lo menciona Slegers et al. (2020). En efecto, la energía bruta obtenida es mayor en cuanto más uso se le da a la biomasa lo cual coincide con trabajos previamente reportados (Monlau et al., 2021; Slegers et al., 2020). Por lo tanto, esto tendrá implicaciones en cuanto a la reducción de costos y/o energía necesaria ya que el biogás obtenido podría ser usado como fuente de energía de la misma biorrefinería. La recirculación de agua o bien su comercialización reducirá costos o incrementará los ingresos y lo mismo con el digestato.

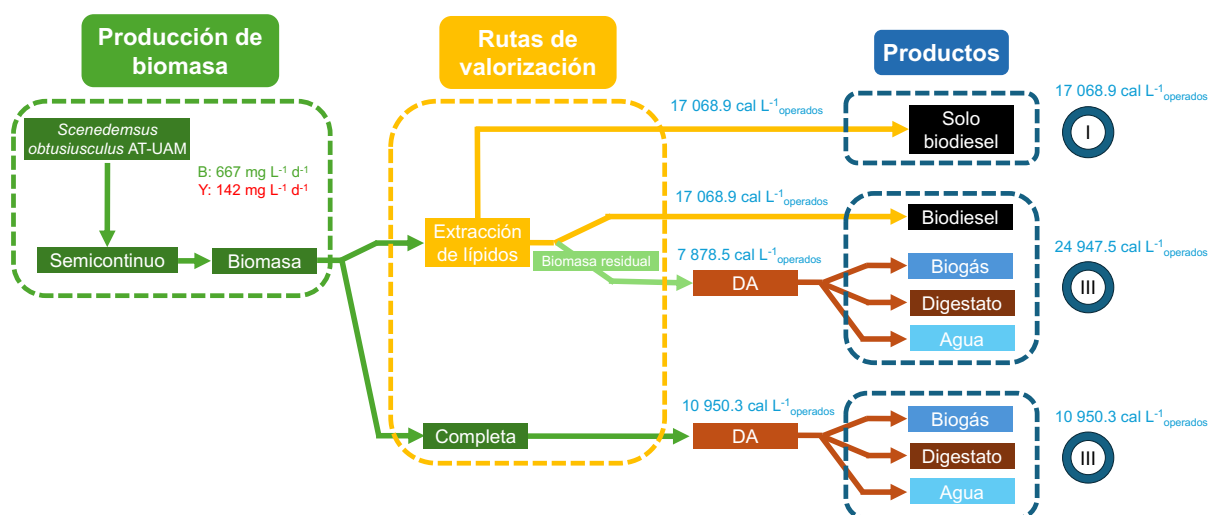


Figura 13. Esquema de biorrefinería de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM basado en los resultados de esta investigación. B es la productividad de biomasa, Y la productividad de lípidos, y los valores en azul son la energía obtenida. (I) y (III) son las rutas de valorización de la **Figura 6**.

A pesar de que el género *Scenedesmus* sea de los más costosos en producir y valorizar su biomasa debido a su pared difícil de romper, la producción de aceite es de las más interesante desde una perspectiva económica de costos contra ingresos,

mientras los pigmentos y las proteínas por sus procesos de separación y purificación tienen costos mayores a los ingresos que se pueden generar de forma individual (Slegers et al., 2020). Por lo que esta investigación coincide con el trabajo de Slegers et al. (2020) el cual muestra la importancia de valorizar la biomasa en múltiples productos en conjunto a la producción de aceite. Esto se debe al volumen de aceite que se puede obtener frente al de los pigmentos. Además, el aceite obtenido genera cerca del 60% del ingreso mientras las proteínas en forma de péptidos aportan el 35% del ingreso y los 5% los complementa los pigmentos (Slegers et al., 2020). También mencionan que el pretratamiento enzimático incrementa poco el costo de producción frente al de alta presión o la extracción mediante solvente (Slegers et al., 2020).

Este trabajo mostró una mejora en la productividad lipídica tanto en condiciones controladas como de invernadero. También se evidenció la importancia de elegir el pretratamiento adecuado para la producción de CH₄ y el beneficio de recircular la biomasa residual después de extraer los lípidos, en una perspectiva de biorrefinería de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. Futuros estudios deberán investigar la escalabilidad y operación en condiciones reales mediante estrategias de dosificación de N de bajo costo o usando corrientes residuales junto con el aprovechamiento del CO₂ producido durante la metanogénesis. Así mismo, se tendrá que estudiar la estabilidad de los procesos a largo plazo, el desplazamiento de la cepa de microalga y los riesgos de inhibición de los lodos anaerobios.

CAPITULO 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

Se evaluaron nuevas estrategias de funcionamiento (cultivo semicontinuo y ciclos de alimentación-privación de N) en *S. obtusiusculus* AT-UAM. La microalga fue capaz de acumular compuestos energéticos como lípidos y carbohidratos durante los ciclos de alimentación-privación de N. A través de los ciclos de alimentación de N de 24 horas, se alcanzó la máxima productividad de biomasa en condiciones de interior y de invernadero, que fueron de 536 y 667 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Además, la productividad de lípidos se incrementó con valores de 139 ± 4 y 142 ± 10 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Mientras que la productividad máxima de carbohidratos alcanzó una media de 198 ± 7 mg L⁻¹ d⁻¹ en condiciones de interior. Por lo tanto, este estudio reafirma el potencial de *S. obtusiusculus* AT-UAM para producir energía renovable y capturar CO₂ simultáneamente en diversas condiciones.

En cuanto a la producción de biogás, los experimentos demostraron la importancia del tipo de pretratamiento y la efectividad de ciertos tratamientos en comparación con otros. El mayor volumen de biogás con biomasa completa se produjo con el pretratamiento TMQ, alcanzando un máximo de 1323.9 ± 38.8 mL L⁻¹ con un R_{max} de 59.9 mL d⁻¹. El tratamiento E obtuvo el mayor R_{max}, con 118.2 mL d⁻¹.

En cuanto a la utilización de la biomasa residual después de la extracción de lípidos el mayor volumen de biogás fue alcanzado con TMQ, alcanzando un máximo de 959.7 ± 56.3 mL L⁻¹ con un R_{max} de 41.3 mL d⁻¹. El tratamiento TM obtuvo el mayor R_{max}, con 52.3 mL d⁻¹.

A manera de conclusión, este trabajo logró mostrar la importancia de implementar el uso de biomasa de microalga en un esquema de biorrefinería, mejorando la recuperación y la obtención de energía mediante la recirculación de la biomasa residual.

Perspectivas

Como apertura al futuro este trabajo perfila varias posibilidades de temas de estudios. En efecto las altas productividades de lípidos y carbohidratos obtenidos en los cultivos

semicontinuos abren perspectivas de rendimientos altos en cultivos continuos por lo que se debería de investigar procesos continuos y/o en cascada de esta cepa usando aguas residuales.

Los resultados de pretratamientos TMQ y E muestran la importancia de los pretratamientos, sin embargo, en una perspectiva de sostenibilidad se podría investigar otros métodos menos contaminantes que consumen menos energía y que puedan aplicarse a biomasa completa para así disminuir la necesidad energética de la separación con el agua. Se podría investigar cultivos en consorcio para generación de floculantes y de microorganismos capaces de romper las células de microalgas o cocteles enzimáticos especializados para esta cepa.

Asimismo, es necesario explorar otras rutas de biorrefinería integrando y comparando con otros bioproductos de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM como la luteína, biofertilizante para cultivos de hortalizas o incluso como medio de cultivo para otros microorganismos.

También falta por explorar la producción de otros combustibles como el bioetanol y otras opciones de hidrocarburos u otros derivados de estos.

Entre las otras posibilidades de la DA, se suma la vía de producción de ácidos carboxílicos mediante fermentación oscura, los cuales tienen aplicaciones en biocombustibles, industria química y de materiales y en la industria agroalimentaria.

Finalmente sería importante estudiar el digestato de la DA como fertilizante para hortalizas y como sustrato de otros microorganismos de interés biotecnológicos ya que el digestato tiene un perfil específico al sustrato que se le alimenta.

REFERENCIAS

- Acién, F. G., Fernández, J. M., & Molina-Grima, E. (2014). Economics of Microalgae Biomass Production. *Biofuels from Algae*, 313–325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00014-0>
- Acién, F. G., Molina, E., Fernández-Sevilla, J. M., Barbosa, M., Gouveia, L., Sepúlveda, C., Bazaes, J., & Arbib, Z. (2017). Economics of microalgae production. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts* (pp. 485–503). Elsevier.
- Amaro, H. M., Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88(10), 3402–3410. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014>
- Ananthi, V., Raja, R., Carvalho, I. S., Brindhadevi, K., Pugazhendhi, A., & Arun, A. (2021). A realistic scenario on microalgae based biodiesel production: Third generation biofuel. *Fuel*, 284(March 2020), 118965. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118965>
- Andiappan, V., Ko, A. S. Y., Lau, V. W. S., Ng, L. Y., Ng, R. T. L., Chemmangattuvalappil, N. G., & Ng, D. K. S. (2015). Synthesis of sustainable integrated biorefinery via reaction pathway synthesis: Economic, incremental environmental burden and energy assessment with multiobjective optimization. *AIChE Journal*, 61(1), 132–146. <https://doi.org/10.1002/aic.14616>
- Angelidaki, I., & Sanders, W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3(2), 117–129. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3>
- Ansari, F. A., Shriwastav, A., Gupta, S. K., Rawat, I., & Bux, F. (2017). Exploration of Microalgae Biorefinery by Optimizing Sequential Extraction of Major Metabolites from *Scenedesmus obliquus*. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 56(12), 3407–3412. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b04814>
- APHA. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 23rd. American Public Health Association.
- Aziz, M. M. A., Kassim, K. A., Shokravi, Z., Jakarni, F. M., Lieu, H. Y., Zaini, N., Tan, L. S., Islam, S., & Shokravi, H. (2020). Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119(April 2019), 109621. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109621>
- Bahadar, A., & Bilal Khan, M. (2013). Progress in energy from microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 128–148. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.029>
- Banerjee, S., & Ramaswamy, S. (2019). Comparison of productivity and economic analysis of microalgae cultivation in open raceways and flat panel photobioreactor. *Bioresource Technology Reports*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100328>
- Barr, W. J., & Landis, A. E. (2017). Comparative life cycle assessment of a commercial algal multiproduct biorefinery and wild caught fishery for small pelagic fish. *The*

International Journal of Life Cycle Assessment. <https://doi.org/10.1007/s11367-017-1395-7>

- Bastiaens, L., Van Roy, S., Thomassen, G., & Elst, K. (2017). Biorefinery of algae: Technical and economic considerations. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts* (pp. 327–345). Elsevier.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V, Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Sanders, W. T. M., Siegrist, H., & Vavilin, V. A. (2002). *The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1)*. <http://iwaponline.com/wst/article-pdf/45/10/65/425002/65.pdf>
- Bauer, L., Ranglová, K., Masojídek, J., Drosig, B., & Meixner, K. (2021). Digestate as sustainable nutrient source for microalgae—challenges and prospects. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 11, Issue 3, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app11031056>
- Becker, E. W. (2007). Micro algae as a source of protein. *Biotechnol Adv*, 25, 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Bernaerts, T. M. M., Kyomugasho, C., Van Looveren, N., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2018). Molecular and rheological characterization of different cell wall fractions of *Porphyridium cruentum*. *Carbohydrate Polymers*, 195, 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.001>
- Bhatia, S. K., Bhatia, R. K., Jeon, J. M., Kumar, G., & Yang, Y. H. (2019). Carbon dioxide capture and bioenergy production using biological system – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 110(September 2018), 143–158. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.070>
- Bohutskyi, P., & Bouwer, E. (2012). Biogas production from algae and cyanobacteria through anaerobic digestion: A review, analysis, and research needs. In *Advanced Biofuels and Bioproducts* (Vol. 9781461433). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4_36
- Boopathy, R. (2002). Methanogenesis from furfural by defined mixed cultures. *Current Microbiology*, 44(6), 406–410. <https://doi.org/10.1007/s00284-001-0010-z>
- Boukhetaia, N., & Blanquet, P. (2011). *Rapport sur l'industrie des énergies décarbonnées en 2010*.
- Bozell, J. J., & Petersen, G. R. (2010). Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy's "Top 10" revisited. *Green Chemistry*, 12(4), 539. <https://doi.org/10.1039/b922014c>
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., & Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.003>
- Brindhadevi, K., Mathimani, T., Rene, E. R., Shanmugam, S., Chi, N. T. L., & Pugazhendhi, A. (2021). Impact of cultivation conditions on the biomass and lipid in microalgae with

- an emphasis on biodiesel. *Fuel*, 284(April 2020), 119058. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119058>
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Enzyme Research*, 2011(1). <https://doi.org/10.4061/2011/787532>
- Brownbridge, G., Azadi, P., Smallbone, A., Bhave, A., Taylor, B., & Kraft, M. (2014). The future viability of algae-derived biodiesel under economic and technical uncertainties. *Bioresource Technology*, 151, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.062>
- Brunet, R., Boer, D., Guillén-Gosálbez, G., & Jiménez, L. (2015). Reducing the cost, environmental impact and energy consumption of biofuel processes through heat integration. *Chemical Engineering Research and Design*, 93, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.06.018>
- Budzianowski, W. M. (2017). High-value low-volume bioproducts coupled to bioenergies with potential to enhance business development of sustainable biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 70 (December 2015), 793–804. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.260>
- Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., & Morales, M. (2015). Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresource Technology*, 181, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.034>
- Campuzano, R., & González-Martínez, S. (2017). Influence of process parameters on the extraction of soluble substances from OFMSW and methane production. *Waste Management*, 62, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.015>
- Cardeña, R., Moreno, G., Bakonyi, P., & Buitrón, G. (2017). Enhancement of methane production from various microalgae cultures via novel ozonation pretreatment. *Chemical Engineering Journal*, 307, 948–954. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.09.016>
- Cavonius, L. R., Albers, E., & Undeland, I. (2016). In vitro bioaccessibility of proteins and lipids of pH-shift processed *Nannochloropsis oculata* microalga. *Food and Function*, 7(4), 2016–2024. <https://doi.org/10.1039/c5fo01144b>
- Cesário, M. T., da Fonseca, M. M. R., Marques, M. M., & de Almeida, M. C. M. D. (2018). Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. In *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Issue 3, pp. 798–817). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.006>
- Chatterjee, A., Singh, S., Agrawal, C., Yadav, S., Rai, R., & Rai, L. C. (2017). Role of Algae as a Biofertilizer. *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*, 189–200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00010-2>
- Chaumont, D. (1993). Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5, 593–604. <https://doi.org/10.1007/BF02184638>
- Cheirsilp, B., & Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and

- fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125>
- Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>
- Chi, Z., O'Fallon, J. V., & Chen, S. (2011). Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends in Biotechnology*, 29(11), 537–541. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.006>
- Chilton, V., Mantrand, N., & Morel, B. (2016). Patent Landscape Report: Microalgae-Related Technologies. *Patent Landscape Report*. http://www.wipo.int/edocs/pubdocs/en/wipo_pub_947_5.pdf
- Chisti, Y. (2006). Microalgae as sustainable cell factories. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)*, 5(3), 261–274. <https://doi.org/10.30638/eemj.2006.018>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Choi, S. P., Nguyen, M. T., & Sim, S. J. (2010). Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresource Technology*, 101(14), 5330–5336. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.026>
- Chua, E. T., & Schenk, P. M. (2017). A biorefinery for *Nannochloropsis*: Induction, harvesting, and extraction of EPA-rich oil and high-value protein. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.124>
- Clippinger, J., & Davis, R. (2019). *Techno-Economic Analysis for the Production of Algal Biomass via Closed Photobioreactors: Future Cost Potential Evaluated Across a Range of Cultivation System Designs*. www.nrel.gov/publications.
- Cohen, G. N. (2011). Microbial biochemistry. In *Nature* (Vol. 500, Issue 3847). Springer. <https://doi.org/10.1201/9781003191674-13>
- Collet, P., Hélias, A., Lardon, L., Steyer, J. P., & Bernard, O. (2015). Recommendations for Life Cycle Assessment of algal fuels. *Applied Energy*, 154, 1089–1102. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.03.056>
- Collet, P., Hélias Arnaud, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R. A., & Steyer, J. P. (2011). Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology*, 102(1), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.154>
- Córdova, O., Passos, F., & Chamy, R. (2018). Physical Pretreatment Methods for Improving Microalgae Anaerobic Biodegradability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185(1), 114–126. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2646-6>

- Córdova, O., Passos, F., & Chamy, R. (2019). Enzymatic Pretreatment of Microalgae: Cell Wall Disruption, Biomass Solubilisation and Methane Yield Increase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 189(3), 787–797. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03044-8>
- Cortés-Carmona, M., Tapia-Rodríguez, A., Morales, M., Celis, L. B., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2018). Methane production from thermally pretreated *Scenedesmus obtusiusculus* biomass in semi-batch reactors at low reaction times. *Biochemical Engineering Journal*, 136, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.05.006>
- Courchesne, N. M. D., Parisien, A., Wang, B., & Lan, C. Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*, 141(1–2), 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.02.018>
- D'Alessandro, E. B., & Antoniosi Filho, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 832–841. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>
- Dassey, A. J., & Theegala, C. S. (2013). Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. *Bioresource Technology*, 128, 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.061>
- Data Page: Annual greenhouse gas emissions including land use.* (2023). Part of the Following Publication: Hannah Ritchie, Pablo Rosado, and Max Roser (2023) - “CO₂ and Greenhouse Gas Emissions”. Data Adapted from Jones et al.. Retrieved from <https://Ourworldindata.Org/Grapher/Total-Ghg-Emissions> [Online Resource].
- Davis, R., Markham, J., Kinchin, C., Grundl, N., Tan, E. C. D., & Humbird, D. (2016). *Process Design and Economics for the Production of Algal Biomass: Algal Biomass Production in Open Pond Systems and Processing Through Dewatering for Downstream Conversion*. www.nrel.gov/publications.
- de Boer, K., & Bahri, P. A. (2015). *Economic and Energy Analysis of Large-Scale Microalgae Production for Biofuels BT - Biomass and Biofuels from Microalgae: Advances in Engineering and Biology* (N. R. Moheimani, M. P. McHenry, K. de Boer, & P. A. Bahri, Eds.; pp. 347–365). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16640-7_17
- de Oliveira, M. C., Bassin, I. D., & Cammarota, M. C. (2022). Microalgae and Cyanobacteria Biomass Pretreatment Methods: A Comparative Analysis of Chemical and Thermochemical Pretreatment Methods Aimed at Methane Production. In *Fermentation* (Vol. 8, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100497>
- Debnath, C., Bandyopadhyay, T. K., Bhunia, B., Mishra, U., Narayanasamy, S., & Muthuraj, M. (2021). Microalgae: Sustainable resource of carbohydrates in third-generation biofuel production. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 150). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111464>

- Delrue, F., Álvarez-Díaz, P. D., Fon-Sing, S., Fleury, G., & Sassi, J. F. (2016). The environmental biorefinery: Using microalgae to remediate wastewater, a win-win paradigm. *Energies*, 9(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/en9030132>
- Deng, C., Lin, R., Cheng, J., & Murphy, J. D. (2019). Can acid pre-treatment enhance biohydrogen and biomethane production from grass silage in single-stage and two-stage fermentation processes? *Energy Conversion and Management*, 195(May), 738–747. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.05.044>
- Deniz, I., García-Vaquero, M., & Imamoglu, E. (2017). Trends in red biotechnology: Microalgae for pharmaceutical applications. In *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00018-2>
- Domozych, D. (2019). Algal Cell Walls. In eLS (pp. 1–11). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000315.pub4>
- Dong, T., Knoshaug, E. P., Davis, R., Laurens, L. M. L., Van Wycken, S., Pienkos, P. T., & Nagle, N. (2016). Combined algal processing: A novel integrated biorefinery process to produce algal biofuels and bioproducts. *Algal Research*, 19, 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.021>
- Donohue, T. J., & Cogdell, R. J. (2006). Microorganisms and clean energy. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(11), 800. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1534>
- Doucha, J., & Lívanský, K. (2008). Influence of processing parameters on disintegration of Chlorella cells in various types of homogenizers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(3), 431–440. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1660-6>
- Douskova, I., Doucha, J., Livansky, K., MacHat, J., Novak, P., Umysova, D., Zachleder, V., & Vitova, M. (2009). Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 179–185. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1811-9>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dzizi, S., Chaib, N., Noune, F., Kaddeche, H., & Charchar, N. (2022). Removal of cadmium from industrial wastewater using blue-green and green microalgae (*Aphanocapsa zantedinii* and *Chlorella vulgaris*). *Desalination and Water Treatment*, 273, 139–148. <https://doi.org/10.5004/dwt.2022.28858>
- Eppink, M. H. M., Olivieri, G., Reith, H., Berg, C. van den, Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2017). From Current Algae Products to Future Biorefinery Practices: A Review. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 123, 127–141. <https://doi.org/10.1007/10>
- Estrada-Graf, A., Hernández, S., & Morales, M. (2020). Biomitigation of CO₂ from flue gas by *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM using a hybrid photobioreactor coupled to a biomass recovery stage by electro-coagulation-flotation. *Advances in environmental biotechnology and engineering*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08240-2>/Published

- European Biogas Association. (2024). *Exploring digestate's contribution to healthy soils*. www.europeanbiogas.eu
- Fanchi, J. R., & Fanchi, C. J. (2016). *Energy In The 21st Century*. World Scientific Publishing Company.
- Fenchel, T., King, G. M., & Blackburn, T. H. (2012). Bacterial Metabolism. In *Bacterial Biogeochemistry*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415836-8.00001-3>
- Feng, P., Xu, Z., Qin, L., Asraful Alam, M., Wang, Z., & Zhu, S. (2020). Effects of different nitrogen sources and light paths of flat plate photobioreactors on the growth and lipid accumulation of *Chlorella* sp. GN1 outdoors. *Bioresource Technology*, 301(January), 122762. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122762>
- Feng, P., Yang, K., Xu, Z., Wang, Z., Fan, L., Qin, L., Zhu, S., Shang, C., Chai, P., Yuan, Z., & Hu, L. (2014). Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. *Bioresource Technology*, 173, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.123>
- Figuerola-Torres, G. M., & Theodoropoulos, C. (2023). Techno-economic analysis of a microalgae-based biorefinery network for biofuels and value-added products. *Bioresource Technology Reports*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101524>
- Francavilla, M., Kamaterou, P., Intini, S., Monteleone, M., & Zabaniotou, A. (2015). Cascading microalgae biorefinery: Fast pyrolysis of *Dunaliella tertiolecta* lipid extracted-residue. *Algal Research*, 11, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.017>
- Freitas Margarites, A. C., & Vieira Costa, J. A. (2014). Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. In *Journal of Engineering Research and Applications* www.ijera.com (Vol. 4, Issue 11). www.ijera.com
- Fuentes-Grünwald, C., Bayliss, C., Zanain, M., Pooley, C., Scolamacchia, M., & Silkina, A. (2015). Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier Transform Infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production. *Bioresource Technology*, 189, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.042>
- Ganesh Saratale, R., Kumar, G., Banu, R., Xia, A., Periyasamy, S., & Dattatraya Saratale, G. (2018). A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. *Bioresource Technology*, 262(March), 319–332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.030>
- Gnansounou, E., & Raman, J. K. (2017). Life Cycle Assessment of Algal Biorefinery. In *Life-Cycle Assessment of Biorefineries*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63585-3.00007-3>
- Grothendieck, A. (2021). Récoltes et semilles. TEL: Gallimard.
- Gonzalez-Fernandez, C., Barreiro-Vescovo, S., De Godos, I., Fernandez, M., Zouhayr, A., & Ballesteros, M. (2018). Biochemical methane potential of microalgae biomass using

- different microbial inocula. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1188-7>
- González-González, L. M., Correa, D. F., Ryan, S., Jensen, P. D., Pratt, S., & Schenk, P. M. (2018). Integrated biodiesel and biogas production from microalgae: Towards a sustainable closed loop through nutrient recycling. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 82, pp. 1137–1148). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.09.091>
- Gorry, P.-L. (2015). *Caracterización del cultivo en semicontinuo de la microalga oleaginosa Scenedesmus obtusiusculus*. Université Technologique de Compiègne, Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Universidad de Zaragoza.
- Gorry, P.-L., Ibarria, M. M., & Gorry, P. (2017). *Science and technology indicators of microalgae-based biofuel research*.
- Gorry, P.-L., Sánchez, L., & Morales, M. (2018). Microalgae Biorefineries for Energy and Coproduct Production. In *Green Energy and Technology* (Vol. 0, Issue 9783319690926). https://doi.org/10.1007/978-3-319-69093-3_5
- Gour, R. S., Garlapati, V. K., & Kant, A. (2020). Effect of Salinity Stress on Lipid Accumulation in *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp.: Feasibility of Stepwise Culturing. *Current Microbiology*, 77(5), 779–785. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01860-z>
- Gouveia, L., Graça, S., Sousa, C., Ambrosano, L., Ribeiro, B., Botrel, E. P., Neto, P. C., Ferreira, A. F., & Silva, C. M. (2016). Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs. Scale-up considerations. *Algal Research*, 16, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.010>
- Gouveia, L., Neves, C., Sebastião, D., Nobre, B. P., & Matos, C. T. (2014). Effect of light on the production of bioelectricity and added-value microalgae biomass in a Photosynthetic Alga Microbial Fuel Cell. *Bioresource Technology*, 154, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.049>
- Government of India. (2022). *Biogas Programme*.
- Graham, L. E., & Wilcox, L. W. (2000). *Algae*. Prentice-Hall, Inc.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 2, pp. 243–260). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45(2), 160–186. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>
- Gutiérrez-Arriaga, C. G., Serna-González, M., Ponce-Ortega, J. M., & El-Halwagi, M. M. (2014). Sustainable Integration of Algal Biodiesel Production with Steam Electric Power Plants for Greenhouse Gas Mitigation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(6), 1388–1403. <https://doi.org/10.1021/sc400436a>
- Han, F., Huang, J., Li, Y., Wang, W., Wan, M., Shen, G., & Wang, J. (2013). Enhanced lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* through the culture strategy of semi-continuous cultivation with nitrogen limitation and pH control by CO₂. *Bioresource Technology*, 136, 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.017>

- Hanifzadeh, M. M., Garcia, E. C., & Viamajala, S. (2018). Production of lipid and carbohydrate from microalgae without compromising biomass productivities: Role of Ca and Mg. *Renewable Energy*, 127, 989–997. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.05.012>
- Hariskos, I., & Posten, C. (2014). Biorefinery of microalgae - opportunities and constraints for different production scenarios. *Biotechnology Journal*, 9(6), 739–752. <https://doi.org/10.1002/biot.201300142>
- Harun, R., Davidson, M., Doyle, M., Gopiraj, R., Danquah, M., & Forde, G. (2011). Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass and Bioenergy*, 35(1), 741–747. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.10.007>
- Hasan, M. M., Mofijur, M., Uddin, M. N., Kabir, Z., Badruddin, I. A., & Khan, T. M. Y. (2024). Insights into anaerobic digestion of microalgal biomass for enhanced energy recovery. In *Frontiers in Energy Research* (Vol. 12). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2024.1355686>
- He, S., Fan, X., Katukuri, N. R., Yuan, X., Wang, F., & Guo, R. B. (2016). Enhanced methane production from microalgal biomass by anaerobic bio-pretreatment. *Bioresource Technology*, 204, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.073>
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., & García-González, M. C. (2015). Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, 262, 939–945. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.049>
- Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013a). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresource Technology*, 135, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100>
- Ho, S. H., Li, P. J., Liu, C. C., & Chang, J. S. (2013b). Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 145, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.119>
- Ho, S. H., Nakanishi, A., Ye, X., Chang, J. S., Hara, K., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2014). Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-97>
- Hoffman, J., Pate, R. C., Drennen, T., & Quinn, J. C. (2017). Techno-economic assessment of open microalgae production systems. *Algal Research*, 23, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.005>
- Hornberger, M., Moreno, J., Schmid, M., & Scheffknecht, G. (2021). Experimental investigation of the calcination reactor in a tail-end calcium looping configuration for CO₂ capture from cement plants. *Fuel*, 284(March 2020), 118927. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118927>

- Hossain, N., Mahlia, T. M. I., Zaini, J., & Saidur, R. (2019). Techno-economics and Sensitivity Analysis of Microalgae as Commercial Feedstock for Bioethanol Production. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 38(5), 1–14. <https://doi.org/10.1002/ep.13157>
- Ianora, A., Bentley, M. G., Caldwell, G. S., Casotti, R., Cembella, A. D., Engström-Öst, J., Halsband, C., Sonnenschein, E., Legrand, C., Llewellyn, C. A., Paldavičienė, A., Pilkaityte, R., Pohnert, G., Razinkovas, A., Romano, G., Tillmann, U., & Vaiciute, D. (2011). The relevance of marine chemical ecology to plankton and ecosystem function: An emerging field. In *Marine Drugs* (Vol. 9, Issue 9, pp. 1625–1648). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md9091625>
- IEA. (2020). *Outlook for biogas and Prospects for organic growth World Energy Outlook Special Report biomethane*.
- IEA. (2023). *Renewables 2023*. www.iea.org
- Iwamoto, H., Soccol, C. R., Molina-Aulestia, D. T., Cardoso, J., de Melo Pereira, G. V., de Souza Vandenberghe, L. P., Manzoki, M. C., Ambati, R. R., Ravishankar, G. A., & de Carvalho, J. C. (2024). Lutein from Microalgae: An Industrial Perspective of Its Production, Downstream Processing, and Market. In *Fermentation* (Vol. 10, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/fermentation10020106>
- Jahan, A., Ahmad, I. Z., Fatima, N., Ansari, V. A., & Akhtar, J. (2017). Algal bioactive compounds in the cosmeceutical industry: A review. *Phycologia*, 56(4), 410–422. <https://doi.org/10.2216/15.58.1>
- Jones, M. W., Peters, G. P., Gasser, T., Andrew, R. M., Schwingshackl, C., Gütschow, J., Houghton, R. A., Friedlingstein, P., Pongratz, J., & Le Quéré, C. (2023). National contributions to climate change due to historical emissions of carbon dioxide, methane, and nitrous oxide since 1850. *Scientific Data*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-023-02041-1>
- Jong, E. de, Higson, A., Walsh, P., & Wellisch, M. (2011). Biobased Chemicals - Value Added Products from Biorefineries. *A Report Prepared for IEA Bioenergy-Task*, 36.
- Kamkeng, A. D. N., Wang, M., Hu, J., Du, W., & Qian, F. (2021). Transformation technologies for CO₂ utilisation: Current status, challenges and future prospects. *Chemical Engineering Journal*, 409(September 2020), 128138. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128138>
- Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(5), 569–582. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015>
- Keegan, D., Kretschmer, B., Elbersen, B., & Panoutsou, C. (2013). Cascading use: A systematic approach to biomass beyond the energy sector. In *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* (Vol. 7, Issue 2, pp. 193–206). <https://doi.org/10.1002/bbb.1351>
- Kharel, H. L., Shrestha, I., Tan, M., & Selvaratnam, T. (2023). Removal of Cadmium and Lead from Synthetic Wastewater Using *Galdieria sulphuraria*. *Environments - MDPI*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/environments10100174>

- Khozin-Goldberg, I., & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67(7), 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>
- Khozin-Goldberg, I., & Cohen, Z. (2011). Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. In *Biochimie* (Vol. 93, Issue 1, pp. 91–100). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.07.020>
- Kim, D. Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J. I., Lee, K., Park, J. Y., Chang, W. S., Lee, J. S., & Oh, Y. K. (2016). Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresource Technology*, 199, 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107>
- Kim, J. S., Lee, Y. Y., & Kim, T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- Kouhia, M., Holmberg, H., & Ahtila, P. (2015). Microalgae-utilizing biorefinery concept for pulp and paper industry: Converting secondary streams into value-added products. *Algal Research*, 10, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.001>
- Kumar, A. K., & Sharma, S. (2017). Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>
- Kumar, A., & Singh, J. S. (2021). *Microalgae in Waste Water Remediation* (First edition). CRC Press. <https://researchs.uam.elogim.com/linkprocessor/plink?id=a4c7262e-e30d-35c0-98ca-c7dc6a7bb12b>
- Kwarciak-Kozłowska, A., & Sławik-Dembiczak, L. (2021). Biosorption of lead from municipal wastewater by alginate beads, free and alginate-immobilized *Chlorella vulgaris*. *Desalination and Water Treatment*, 218, 303–308. <https://doi.org/10.5004/dwt.2021.26969>
- Lakatos, G. E., Ranglová, K., Manoel, J. C., Grivalský, T., Kopecký, J., & Masojídek, J. (2019). Bioethanol production from microalgae polysaccharides. *Folia Microbiologica*, 64(5), 627–644. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00732-0>
- Lara Villa, M. A., Moreno Ruiz, J. L., Mauricio, A., & Jesús, E. (1996). *Fitoplancton: conceptos básicos y técnicas de laboratorio* (Issue Sirsi) i9789706209009).
- Laubscher, R. K., & Cowan, A. K. (2020). Elaboration of an algae-to-energy system and recovery of water and nutrients from municipal sewage. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 20, Issue 7, pp. 305–315). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000007>
- Laurens, L. M. L., Markham, J., Templeton, D. W., Christensen, E. D., Van Wycken, S., Vadelius, E. W., Chen-Glasser, M., Dong, T., Davis, R., & Pienkos, P. T. (2017). Development of algae biorefinery concepts for biofuels and bioproducts; a perspective on process-compatible products and their impact on cost-reduction. *Energy Environ. Sci.*, 10(8), 1716–1738. <https://doi.org/10.1039/C7EE01306J>
- Laurens, L. M., & Mcmillan, J. D. (n.d.). *State of Technology Review on Algae Bioenergy* (Task 39). www.Task39.org

- Lay, J., & Noike, T. (1997). Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. In *Wat. Res* (Vol. 31, Issue 6).
- Lee, A. K., Lewis, D. M., & Ashman, P. J. (2012). Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 46, pp. 89–101). <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.034>
- Lee, A. K., Lewis, D. M., & Ashman, P. J. (2013). Force and energy requirement for microalgal cell disruption: An atomic force microscope evaluation. *Bioresource Technology*, 128, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.032>
- Lee, D. J., Chang, J. S., & Lai, J. Y. (2015). Microalgae-microbial fuel cell: A mini review. *Bioresource Technology*, 198, 891–895. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.061>
- Leong, W. H., Lim, J. W., Rawindran, H., Liew, C. S., Lam, M. K., Ho, Y. C., Khoo, K. S., Kusakabe, K., Abdelghani, H. T. M., Ho, C. D., Ng, H. S., Usman, A., & Kang, H. S. (2023). Energy balance and life cycle assessments in producing microalgae biodiesel via a continuous microalgal-bacterial photobioreactor loaded with wastewater. *Chemosphere*, 341. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139953>
- Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 41(March), 107545. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>
- Levin, K. S., Auerswald, K., Reents, H. J., & Hülsbergen, K. J. (2021). Effects of organic energy crop rotations and fertilisation with the liquid digestate phase on organic carbon in the topsoil. *Agronomy*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/agronomy11071393>
- Liang, M.-H., Wang, L., Wang, Q., Zhu, J., & Jiang, J.-G. (2019). High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15), 2423–2441. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1455030>
- Liang, Y., Kashdan, T., Sterner, C., Dombrowski, L., Petrick, I., Kröger, M., & Höfer, R. (2015). Algal biorefineries. In *Industrial biorefineries & white biotechnology* (pp. 35–90). Elsevier.
- Liu, J., Yao, C., Meng, Y., Cao, X., Wu, P., & Xue, S. (2018). The $\Delta f/Fm'$ -guided supply of nitrogen in culture medium facilitates sustainable production of TAG in *Nannochloropsis oceanica* IMET1. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1168-y>
- Logan, M., & Visvanathan, C. (2019). Management strategies for anaerobic digestate of organic fraction of municipal solid waste: Current status and future prospects. *Waste Management and Research*, 37(1_suppl), 27–39. <https://doi.org/10.1177/0734242X18816793>
- Lorenz, R.T., Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.*, 18(4), 160–167.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Ma, F., & Hanna, M. A. (1999). Biodiesel production: A review. *Bioresource Technology*, 70(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00025-5)

- Mahdy, A., Mendez, L., Tomás-Pejó, E., del Mar Morales, M., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2016). Influence of enzymatic hydrolysis on the biochemical methane potential of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(5), 1299–1305. <https://doi.org/10.1002/jctb.4722>
- Mallick, N., Bagchi, S. K., Koley, S., & Singh, A. K. (2016). Progress and challenges in microalgal biodiesel production. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01019>
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition. In *Biology* (Vol. 10, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biology10101060>
- Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 96, Issue 3, pp. 631–645). <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>
- Martinez-Hernandez, E., Campbell, G., & Sadhukhan, J. (2013). Economic value and environmental impact (EVEI) analysis of biorefinery systems. *Chemical Engineering Research and Design*, 91(8), 1418–1426. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.02.025>
- Martínez-Macías, R., Meza-Escalante, E., Serrano-Palacios, D., Gortáres-Moroyoqui, P., Ruíz-Ruíz, P. E., & Ulloa-Mercado, G. (2018). Effect of fed-batch and semicontinuous regimen on *Nannochloropsis oculata* grown in different culture media to high-value products. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(2), 585–590. <https://doi.org/10.1002/jctb.5405>
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (Second Edition).
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Mathimani, T., Bhumathi, D., Shan Ahamed, T., Dineshbabu, G., Deviram, G., Uma, L., & Prabakaran, D. (2017). Semicontinuous outdoor cultivation and efficient harvesting of marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 with minimum solid co-precipitation and high floc recovery for biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 149, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.06.077>
- Maurya, R., Paliwal, C., Ghosh, T., Pancha, I., Chokshi, K., Mitra, M., Ghosh, A., & Mishra, S. (2016). Applications of de-oiled microalgal biomass towards development of sustainable biorefinery. *Bioresource Technology*, 214, 787–796. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.115>
- Mayers, J. J., Vaiciulyte, S., Malmhäll-Bah, E., Alcaide-Sancho, J., Ewald, S., Godhe, A., Ekendahl, S., & Albers, E. (2018). Identifying a marine microalgae with high carbohydrate productivities under stress and potential for efficient flocculation. *Algal Research*, 31(March), 430–442. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.034>

- Meier, L., Pérez, R., Azócar, L., Rivas, M., & Jeison, D. (2015). Photosynthetic CO₂ uptake by microalgae: An attractive tool for biogas upgrading. *Biomass and Bioenergy*, 73, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.10.032>
- Menéndez Valderrey, J. L. (2015). *Cloroplastos. Funciones*. Asturnatura.Com (En Línea) Num. 510. <https://www.asturnatura.com/temarios/biologia/organulos-energeticos/cloroplasto-funciones>
- Menetrez, M. Y. (2012). An Overview of Algae Biofuel Production and Potential Environmental Impact. *Environmental Science & Technology*, 46(13), 7073–7085. <https://doi.org/10.1021/es300917r>
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.04.014>
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 155, 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>
- Molina Grima, E., Belarbi, E. H., Ación Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20(7–8), 491–515. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)
- Möllers, K. B., Cannella, D., Jørgensen, H., & Frigaard, N.-U. (2014). Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 64. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-64>
- Moncada, J., Tamayo, J. A., & Cardona, C. A. (2014). Integrating first, second, and third generation biorefineries: Incorporating microalgae into the sugarcane biorefinery. *Chemical Engineering Science*, 118, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.07.035>
- Mondal, M., Goswami, S., Ghosh, A., Oinam, G., Tiwari, O. N., Das, P., Gayen, K., Mandal, M. K., & Halder, G. N. (2017). Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. *3 Biotech*, 7(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0727-4>
- Monlau, F., Suarez-Alvarez, S., Lallement, A., Vaca-Medina, G., Giacinti, G., Munarriz, M., Urreta, I., Raynaud, C., Ferrer, C., & Castañón, S. (2021). A cascade biorefinery for the valorization of microalgal biomass: biodiesel, biogas, fertilizers and high valuable compounds. *Algal Research*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102433>
- Moreira, J. B., Terra, A. L. M., Costa, J. A. V., & Morais, M. G. (2016). Utilization of CO₂ in semi-continuous cultivation of *Spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(3), 691–698. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160333s20150135>
- Mussgnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A., & Kruse, O. (2010a). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, 150(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030>

- Mussgnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A., & Kruse, O. (2010b). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, 150(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030>
- Mussgnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A., & Kruse, O. (2010c). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, 150(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030>
- Nayak, M., Suh, W. I., Chang, Y. K., & Lee, B. (2019). Exploration of two-stage cultivation strategies using nitrogen starvation to maximize the lipid productivity in *Chlorella* sp. HS2. *Bioresource Technology*, 276(October 2018), 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.111>
- NOAA. (2024, June 16). *How much oxygen comes from the ocean?* National Ocean Service Website. <https://oceanservice.noaa.gov/facts/ocean-oxygen.html>
- NOAA, U. S. N. O. and A. A. (2022). *Climate Change: Atmospheric Carbon Dioxide*. 1–6.
- Norsker, N. H., Barbosa, M. J., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2011). Microalgal production - A close look at the economics. In *Biotechnology Advances* (Vol. 29, Issue 1, pp. 24–27). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>
- Nurra, C., Torras, C., Clavero, E., Ros, S., Rey, M., Lorente, E., Farriol, X., & Salvadó, J. (2014). Biorefinery concept in a microalgae pilot plant. Culturing, dynamic filtration and steam explosion fractionation. *Bioresource Technology*, 163, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.009>
- Nzayisenga, J. C., Farge, X., Groll, S. L., & Sellstedt, A. (2020). Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1646-x>
- Olguín, E. J. (2012). Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1031–1046. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.001>
- Ooi, Z. L., Tan, P. Y., Tan, L. S., & Yeap, S. P. (2020). Amine-based solvent for CO₂ absorption and its impact on carbon steel corrosion: A perspective review. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 28(5), 1357–1367. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.02.029>
- Opurum, C. C., Nweke, C. O., Nwanyanwu, C. E., & Nwogu, N. A. (2021). Kinetics of Diauxic Biogas Production from Energy Crops: Sunflower (*Helianthus annuus*) and Napier Grass (*Pennisetum purpureum*) with Animal Manure. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 48–58. <https://doi.org/10.9734/cjast/2021/v40i631316>
- Palanisamy, K. M., Bhuyar, P., Rahim, M. A., Vadiveloo, A., Al-Dhabi, N. A., Govindan, N., & Maniam, G. (2023). Lipid Enhancement in Oleaginous *Nannochloropsis* sp. under Nitrate Limitation for Future Bioenergy Production. *International Journal of Energy Research*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/5412660>
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1)

- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., & Ferrer, I. (2014). Pretreatment of microalgae to improve biogas production: a review. *Bioresource technology*, 172, 403–412.
- Passos, F., Felix, L., Rocha, H., Pereira, J. de O., & de Aquino, S. (2016). Reuse of microalgae grown in full-scale wastewater treatment ponds: Thermochemical pretreatment and biogas production. *Bioresource Technology*, 209, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.006>
- Pechsiri, J. S., Thomas, J. B. E., Bahraoui, N. El, Fernandez, F. G. A., Chaouki, J., Chidami, S., Tinoco, R. R., Martin, J. P., Gomez, C., Combe, M., & Gröndahl, F. (2023). Comparative life cycle assessment of conventional and novel microalgae production systems and environmental impact mitigation in urban-industrial symbiosis. *Science of the Total Environment*, 854(July 2022). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158445>
- Pires, J. C. M. (2017). COP21: The algae opportunity? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(February), 867–877. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.197>
- Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>
- Posada Duque, J. A., Brentner, L. B., Ramirez, A., & Patel, M. K. (2016). Conceptual design of sustainable integrated microalgae biorefineries: Parametric analysis of energy use, greenhouse gas emissions and techno-economics. *Algal Research*, 17, 113–131. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.022>
- Posada, J. A., Brentner, L. B., Ramirez, A., & Patel, M. K. (2016). Conceptual design of sustainable integrated microalgae biorefineries: Parametric analysis of energy use, greenhouse gas emissions and techno-economics. *Algal Research*, 17, 113–131. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.022>
- Prandini, J. M., da Silva, M. L. B., Mezzari, M. P., Pirolli, M., Michelon, W., & Soares, H. M. (2016). Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus* spp. *Bioresource Technology*, 202, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.082>
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3), 287–293. <https://doi.org/10.1007/s002530100702>
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635–648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Queiroz, M. I., Hornes, M. O., Gonçalves da Silva Manetti, A., Zepka, L. Q., & Jacob-Lopes, E. (2013). Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. *Biosystems Engineering*, 115(2), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.12.013>
- Quinn, J. C., & Davis, R. (2015). The potentials and challenges of algae based biofuels: A review of the techno-economic, life cycle, and resource assessment modeling. *Bioresource Technology*, 184, 444–452. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.075>

- Quiroz, D., McGowen, J. A., & Quinn, J. C. (2025). Techno-economic analysis of microalgae cultivation strategies: batch and semi-continuous approaches. *Algal Research*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2025.104109>
- Ramos-Ibarra, J. R., Snell-Castro, R., Neria-Casillas, J. A., & Choix, F. J. (2019). Biotechnological potential of *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. microalgae to endure high CO₂ and methane concentrations from biogas. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(10), 1603–1610. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02157-y>
- Remmers, I. M., Hidalgo-Ulloa, A., Brandt, B. P., Evers, W. A. C., Wijffels, R. H., & Lamers, P. P. (2017). Continuous versus batch production of lipids in the microalgae *Acutodesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 244, 1384–1392. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.093>
- Rincón-Pérez, J., Celis, L. B., Morales, M., Alatraste-Mondragón, F., Tapia-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2021). Improvement of methane production at alkaline and neutral pH from anaerobic co-digestion of microalgal biomass and cheese whey. *Biochemical Engineering Journal*, 169(February). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107972>
- Rincón-Pérez, J., Razo-Flores, E., Morales, M., Alatraste-Mondragón, F., & Celis, L. B. (2020). Improving the Biodegradability of *Scenedesmus obtusiusculus* by Thermochemical Pretreatment to Produce Hydrogen and Methane. *Bioenergy Research*, 13(2), 477–486. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10067-w>
- Ritchie, H., Roser, M., & Rosado, P. (2020). CO₂ and Greenhouse Gas Emissions. Published Online at OurWorldInData.Org.
- Rizwan, M., Lee, J. H., & Gani, R. (2015). Optimal design of microalgae-based biorefinery: Economics, opportunities and challenges. *Applied Energy*, 150, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.04.018>
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009a). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100–112. <https://doi.org/10.1002/bit.22033>
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009b). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100–112. <https://doi.org/10.1002/bit.22033>
- Romero-Villegas, G. I., Fiamengo, M., Ación-Fernández, F. G., & Molina-Grima, E. (2018). Utilization of centrate for the outdoor production of marine microalgae at the pilot-scale in raceway photobioreactors. *Journal of Environmental Management*, 228(February), 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.020>
- Salafudin, Setyobudi, R. H., Wahono, S. K., Nindita, A., Adinurani, P. G., Nugroho, Y. A., Sasmito, A., & Liwang, T. (2015). Biological Purification System: Integrated Biogas from Small Anaerobic Digestion and Natural Microalgae. *Procedia Chemistry*, 14, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.069>
- San Pedro, A., González-López, C. V., Ación, F. G., & Molina-Grima, E. (2014). Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters

- and lipid production rates in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology*, 169, 667–676. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.052>
- Sanchez, L. (2013). *Cultivo a la intemperie de Scenedesmus obtusiusculus en un fotobiorreactor solar “ air-lift .”* UAM.
- Sánchez-García, L., Cabello, J., Jiménez-García, L. F., Revah, S., & Morales-Ibarría, M. (2020). Enhancing the lipid content of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM by controlled acidification under indoor and outdoor conditions. *Algal Research*, 51(July), 102024. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102024>
- Sánchez-García, L. (2024) Biorrefinería a partir de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. Producción de lípidos y pigmentos [Tesis doctoral no publicada]. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Santibañez-Aguilar, J. E., González-Campos, J. B., Ponce-Ortega, J. M., Serna-González, M., & El-Halwagi, M. M. (2014). Optimal planning and site selection for distributed multiproduct biorefineries involving economic, environmental and social objectives. *Journal of Cleaner Production*, 65, 270–294. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.08.004>
- Santos, A. M., Wijffels, R. H., & Lamers, P. P. (2014). pH-upshock yields more lipids in nitrogen-starved *Neochloris oleoabundans*. *Bioresource technology*, 152, 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.079>
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 26, Issue 4, pp. 709–722). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>
- Scarcelli, P. G., Serejo, M. L., Paulo, P. L., & Boncz, M. Á. (2020). Evaluation of biomethanization during co-digestion of thermally pretreated microalgae and waste activated sludge, and estimation of its kinetic parameters. *Science of the Total Environment*, 706, 135745. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135745>
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., & Hankamer, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, 1(1), 20–43. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>
- Scherholz, M. L., & Curtis, W. R. (2013). Achieving pH control in microalgal cultures through fed-batch addition of stoichiometrically-balanced growth media. *BMC Biotechnology*, 13. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-39>
- Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016a). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 7(APR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016b). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue APR2016). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>

- Sharma, B., Larroche, C., & Dussap, C. G. (2020). Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource Technology*, 313(January), 123630. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123630>
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., & Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532–1553. <https://doi.org/10.3390/en5051532>
- Sialve, B., Bernet, N., & Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. In *Biotechnology Advances* (Vol. 27, Issue 4, pp. 409–416). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.03.001>
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., Sialve, B., Bernet, N., & Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable . To cite this version : HAL Id : hal-00854465. *Biotechnology Advances*, 27(4), 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.03.001>
- Sibi, G., Shetty, V., & Mokashi, K. (2016). Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels – A review. In *Journal of the Energy Institute* (Vol. 89, Issue 3, pp. 330–334). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.joei.2015.03.008>
- Sills, D. L., Paramita, V., Franke, M. J., Johnson, M. C., Akabas, T. M., Greene, C. H., & Tester, J. W. (2013). Quantitative uncertainty analysis of life cycle assessment for algal biofuel production. *Environmental Science and Technology*, 47(2), 687–694. <https://doi.org/10.1021/es3029236>
- Singh, P., Kumari, S., Guldhe, A., Misra, R., Rawat, I., & Bux, F. (2016). Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.001>
- Slade, R., & Bauen, A. (2013). Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy*, 53, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.019>
- Slegers, P. M., Olivieri, G., Breitmayer, E., Sijtsma, L., Eppink, M. H. M., Wijffels, R. H., & Reith, J. H. (2020). Design of Value Chains for Microalgal Biorefinery at Industrial Scale: Process Integration and Techno-Economic Analysis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.550758>
- Solovchenko, A. E. (2015). Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell. *Photosynthesis Research*, 125(3), 437–449. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0156-3>
- Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., & Merzlyak, M. N. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 20(3), 245–251. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9233-0>
- Spain, O., Plöhn, M., & Funk, C. (2021). The cell wall of green microalgae and its role in heavy metal removal. *Physiologia Plantarum*, 173(2), 526–535. <https://doi.org/10.1111/ppl.13405>

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006a). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006b). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Steffen, W., Rockström, J., Richardson, K., Lenton, T. M., Folke, C., Liverman, D., Summerhayes, C. P., Barnosky, A. D., Cornell, S. E., Crucifix, M., Donges, J. F., Fetzer, I., Lade, S. J., Scheffer, M., Winkelmann, R., & Schellnhuber, H. J. (2018). Trajectories of the Earth System in the Anthropocene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(33), 8252–8259. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810141115>
- Stolz, P., & Obermayer, B. (2005). Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics and Toiletries*, 120(3), 99–106. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=16605264>
- Su, M., Bastiaens, L., Verspreet, J., & Hayes, M. (2023). Applications of Microalgae in Foods, Pharma and Feeds and Their Use as Fertilizers and Biostimulants: Legislation and Regulatory Aspects for Consideration. In *Foods* (Vol. 12, Issue 20). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/foods12203878>
- Subramanian, S., Barry, A. N., Pieris, S., & Sayre, R. T. (2013). Comparative energetics and kinetics of autotrophic lipid and starch metabolism in chlorophytic microalgae: Implications for biomass and biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-150>
- Synytsya, A., Sushytskyi, L., Saloň, I., Babayeva, T., & Čopíková, J. (2023). Intracellular and extracellular carbohydrates in microalgae. In *Handbook of Food and Feed from Microalgae: Production, Application, Regulation, and Sustainability* (pp. 87–102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99196-4.00017-6>
- Takagi, M., Karseno, & Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(3), 223–226. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.223>
- Takeda, H. (1995). Cell wall composition and taxonomy of symbiotic *Chlorella* from *Paramecium* and *Acanthocystis*. *Phytochemistry*, 40(2), 457–459. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00279-G](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00279-G)
- Thomassen, G., Van Dael, M., Lemmens, B., & Van Passel, S. (2017). A review of the sustainability of algal-based biorefineries: Towards an integrated assessment framework. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 68, 876–887. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.02.015>
- Toledo-Cervantes, A., Garduño Solórzano, G., Campos, J. E., Martínez-García, M., & Morales, M. (2018). Characterization of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for high-energy molecules accumulation: deeper insight into biotechnological potential of strains of the same species. *Biotechnology Reports*, 17(October 2017), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.11.009>

- Toledo-Cervantes, A., & Morales, M. (2014). Biorefinery: using microalgal biomass for producing lipids, biofuels. *ENERGY SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGY*, 17.
- Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E., & Revah, S. (2013). Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresource Technology*, 130, 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.081>
- Tredici, M. R., Rodolfi, L., Biondi, N., Bassi, N., & Sampietro, G. (2016). Techno-economic analysis of microalgal biomass production in a 1-ha Green Wall Panel (GWP®) plant. *Algal Research*, 19, 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.005>
- Uduman, N., Bourniquel, V., Danquah, M. K., & Hoadley, A. F. A. (2011). A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, 174(1), 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.012>
- Ummalyma, S. B., Sirohi, R., Udayan, A., Yadav, P., Raj, A., Sim, S. J., & Pandey, A. (2023). Sustainable microalgal biomass production in food industry wastewater for low-cost biorefinery products: a review. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 22, Issue 4, pp. 969–991). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09814-3>
- U.S. Department of Energy. (2024). *2023 Billion-Ton Report: An Assessment of U.S. Renewable Carbon Resources*. <https://doi.org/10.23720/BT2023/2316165>
- Valdovinos-García, E. M., Petriz-Prieto, M. A., de los Ángeles Olán-Acosta, M., Barajas-Fernández, J., Guzmán-López, A., & Bravo-Sánchez, M. G. (2021). Production of microalgal biomass in photobioreactors as feedstock for bioenergy and other uses: A techno-economic study of harvesting stage. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/app11104386>
- van der Voort, M., Vulsteke, E., Vulsteke, E., & Visser, C. L. M. de. (2015). Report WP2A7.02: Macro-economics of algae products. *Public Output Report of the EnAlgae Project*, 47. https://www.researchgate.net/publication/282333133_Macro-economics_of_algae_products
- Van Etten, J. L., & Dunigan, D. D. (2012). Chloroviruses: Not your everyday plant virus. In *Trends in Plant Science* (Vol. 17, Issue 1, pp. 1–8). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.10.005>
- Vargas-Estrada, L., Longoria, A., Arenas, E., Moreira, J., Okoye, P. U., Bustos-Terrones, Y., & Sebastian, P. J. (2022). A Review on Current Trends in Biogas Production from Microalgae Biomass and Microalgae Waste by Anaerobic Digestion and Co-digestion. *Bioenergy Research*, 15 (1), 77–92. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10276-2>
- Vaz, S., Rodrigues de Souza, A. P., & Lobo Baeta, B. E. (2022). Technologies for carbon dioxide capture: A review applied to energy sectors. *Cleaner Engineering and Technology*, 8 (May 2021), 100456. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2022.100456>
- Venkata Mohan, S., Modestra, J. A., Amulya, K., Butti, S. K., & Velvizhi, G. (2016). A Circular Bioeconomy with Biobased Products from CO₂ Sequestration. *Trends in Biotechnology*, 34(6), 506–519. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.012>

- Venkata Mohan, S., Nikhil, G. N., Chiranjeevi, P., Nagendranatha Reddy, C., Rohit, M. V., Kumar, A. N., & Sarkar, O. (2016). Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. In *Bioresource Technology* (Vol. 215, pp. 2–12). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.130>
- Venkata Mohan, S., & Pandey, A. (2019). Sustainable Hydrogen Production. *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biohydrogen, Second Edition*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64203-5.00001-0>
- Vieira Costa, J. A., Bastos Freitas, B. C., Martins Rosa, G., Moraes, L., Greque Morais, M., & Mitchell, B. G. (2019). Operational and economic aspects of Spirulina-based biorefinery. In *Bioresource Technology* (Vol. 292). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121946>
- Vieira Costa, J. A., Lucas, B. F., Pires Alvarenga, A. G., Botelho Moreira, J., & Greque de Morais, M. (2021). Microalgae Polysaccharides: An Overview of Production, Characterization, and Potential Applications. In *Polysaccharides* (Vol. 2, Issue 4, pp. 759–772). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2040046>
- Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M. J., Sijtsma, L., Ploeg, M., & Enzing, C. (2015). Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science and Technology*, 42(1), 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.004>
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>
- Wang, H. M. D., Chen, C. C., Huynh, P., & Chang, J. S. (2015). Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology*, 184, 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.001>
- Wang, Y., Chiu, S. Y., Ho, S. H., Liu, Z., Hasunuma, T., Chang, T. T., Chang, K. F., Chang, J. S., Ren, N. Q., & Kondo, A. (2016). Improving carbohydrate production of *Chlorella sorokiniana* NIES-2168 through semi-continuous process coupled with mixotrophic cultivation. *Biotechnology Journal*, 11(8), 1072–1081. <https://doi.org/10.1002/biot.201500270>
- Ward, A. J., Lewis, D. M., & Green, F. B. (2014). Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*, 5(1), 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.02.001>
- Ward, O. P., & Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627–3652. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.02.020>
- Weiland, P. (2010). Biogas production: Current state and perspectives. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 85, Issue 4, pp. 849–860). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>
- Wiesberg, I. L., Brigagão, G. V., de Medeiros, J. L., & Araújo, O. D. Q. F. (2017). Carbon dioxide utilization in a microalga-based biorefinery: Efficiency of carbon removal and

- economic performance under carbon taxation. *Journal of Environmental Management*, 203, 988–998. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.03.005>
- Wijffels, R. H. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5993), 796–799. <https://doi.org/10.1126/science.1189003>
- Wilberforce, T., Olabi, A. G., Sayed, E. T., Elsaid, K., & Abdelkareem, M. A. (2021). Progress in carbon capture technologies. *Science of The Total Environment*, 761, 143203.
- Wiley, P. E., Campbell, J. E., & McKuin, B. (2011). Production of Biodiesel and Biogas from Algae: A Review of Process Train Options. *Water Environment Research*, 83(4), 326–338. <https://doi.org/10.2175/106143010x12780288628615>
- Wilkie, A. C., Edmundson, S. J., & Duncan, J. G. (2011). Indigenous algae for local bioresource production: Phycoprospecting. *Energy for Sustainable Development*, 15(4), 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2011.07.010>
- Xia, A., Cheng, J., Ding, L., Lin, R., Song, W., Zhou, J., & Cen, K. (2014). Enhancement of energy production efficiency from mixed biomass of *Chlorella pyrenoidosa* and cassava starch through combined hydrogen fermentation and methanogenesis. *Applied Energy*, 120, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.01.045>
- Xie, Y., Xiong, X., & Chen, S. (2021). Challenges and potential in increasing lutein content in microalgae. In *Microorganisms* (Vol. 9, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051068>
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101(14), 5494–5500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>
- Xu, F., Hu, H.-H., Cong, W., Cai, Z.-L., & Ouyang, F. (2004). Growth characteristics and eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. in mixotrophic conditions. In *Biotechnology Letters* (Vol. 26).
- Xue, Z., Yu, Y., Yu, W., Gao, X., Zhang, Y., & Kou, X. (2020). Development Prospect and Preparation Technology of Edible Oil From Microalgae. *Frontiers in Marine Science*, 7(June). <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00402>
- Yamada, T., & Sakaguchi, K. (1982). Comparative studies on *Chlorella* cell walls: Induction of protoplast formation. *Archives of Microbiology*, 132(1), 10–13. <https://doi.org/10.1007/BF00690809>
- Yang, C., Hua, Q., & Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 6(2), 87–102. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00080-2)
- Yang, H., He, Q., & Hu, C. (2018). Feasibility of biodiesel production and CO₂ emission reduction by *Monoraphidium dybowskii* LB50 under semi-continuous culture with open raceway ponds in the desert area. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1068-1>
- Yang, J., Cai, D., Liu, X., Zhu, L., Zhang, C., Peng, Q., Han, Y., Liu, G., & Yang, M. (2023). Glucose Conversion for Biobutanol Production from Fresh *Chlorella sorokiniana* via

Direct Enzymatic Hydrolysis. *Fermentation*, 9(3), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/fermentation9030284>

- Yaniris, L. A., Abreu, O., & Ma, C. (2005). La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. *Icidca*, XXXIX, 35–48. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120659006>
- Yuan, J., Kendall, A., & Zhang, Y. (2015). Mass balance and life cycle assessment of biodiesel from microalgae incorporated with nutrient recycling options and technology uncertainties. *GCB Bioenergy*, 7(6), 1245–1259. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12229>
- Yuan, Y., Liu, H., Li, X., Qi, W., Cheng, D., Tang, T., Zhao, Q., Wei, W., & Sun, Y. (2018). Enhancing Carbohydrate Productivity of *Chlorella* sp. AE10 in Semi-continuous Cultivation and Unraveling the Mechanism by Flow Cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185(2), 419–433. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2667-1>
- Zahed, M. A., Movahed, E., Khodayari, A., Zanganeh, S., & Badamaki, M. (2021). Biotechnology for carbon capture and fixation: Critical review and future directions. *Journal of Environmental Management*, 293(May), 112830. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112830>
- Zhang, G., Zhang, P., & Fan, M. (2009). Ultrasound-enhanced coagulation for *Microcystis aeruginosa* removal. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(3), 334–338. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.10.014>
- Zhu, L. (2015). Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1376–1384. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.040>
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van ' K., & Riet, T. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. In *Applied and Environmental Microbiology*.

ANEXOS

ANEXO 1 – Figuras y tablas complementarias

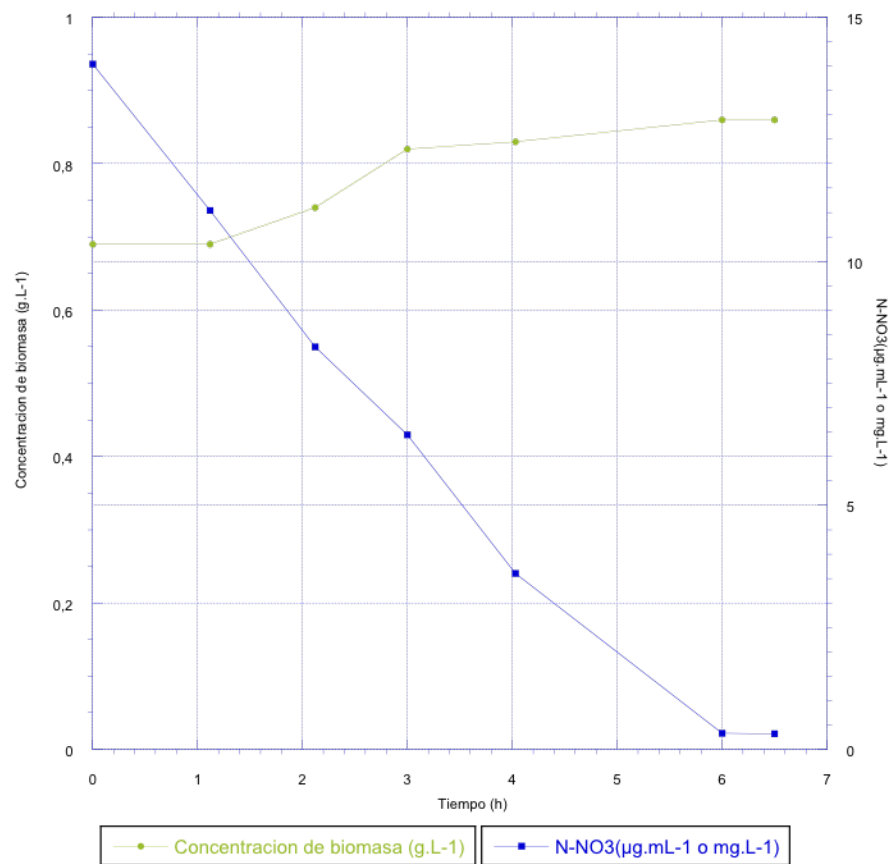


Figura A1. Consumo de N-NO3 y evolución de la concentración de biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM en el tiempo (Ensayo preliminar).

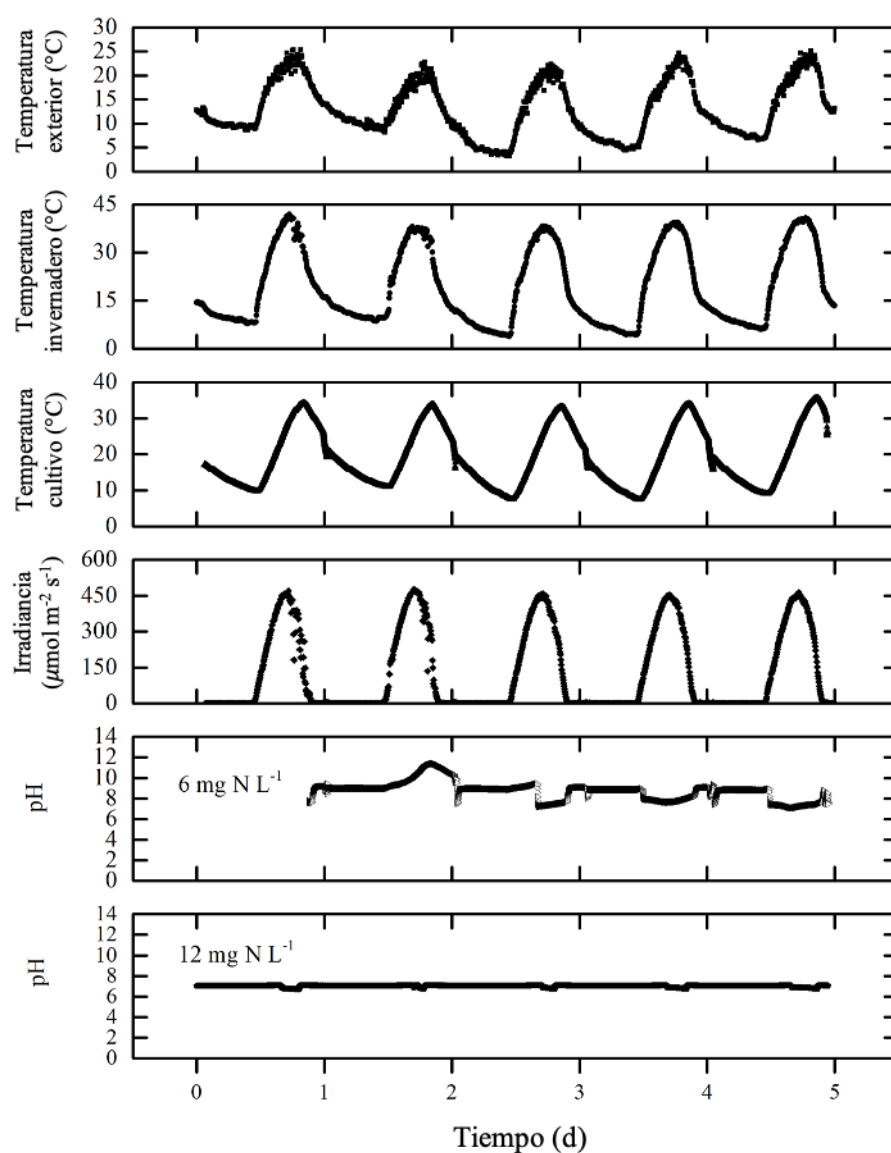


Figura A2. Evolución temporal de los parámetros ambientales durante el funcionamiento del FBR-CB en condiciones de invernadero.

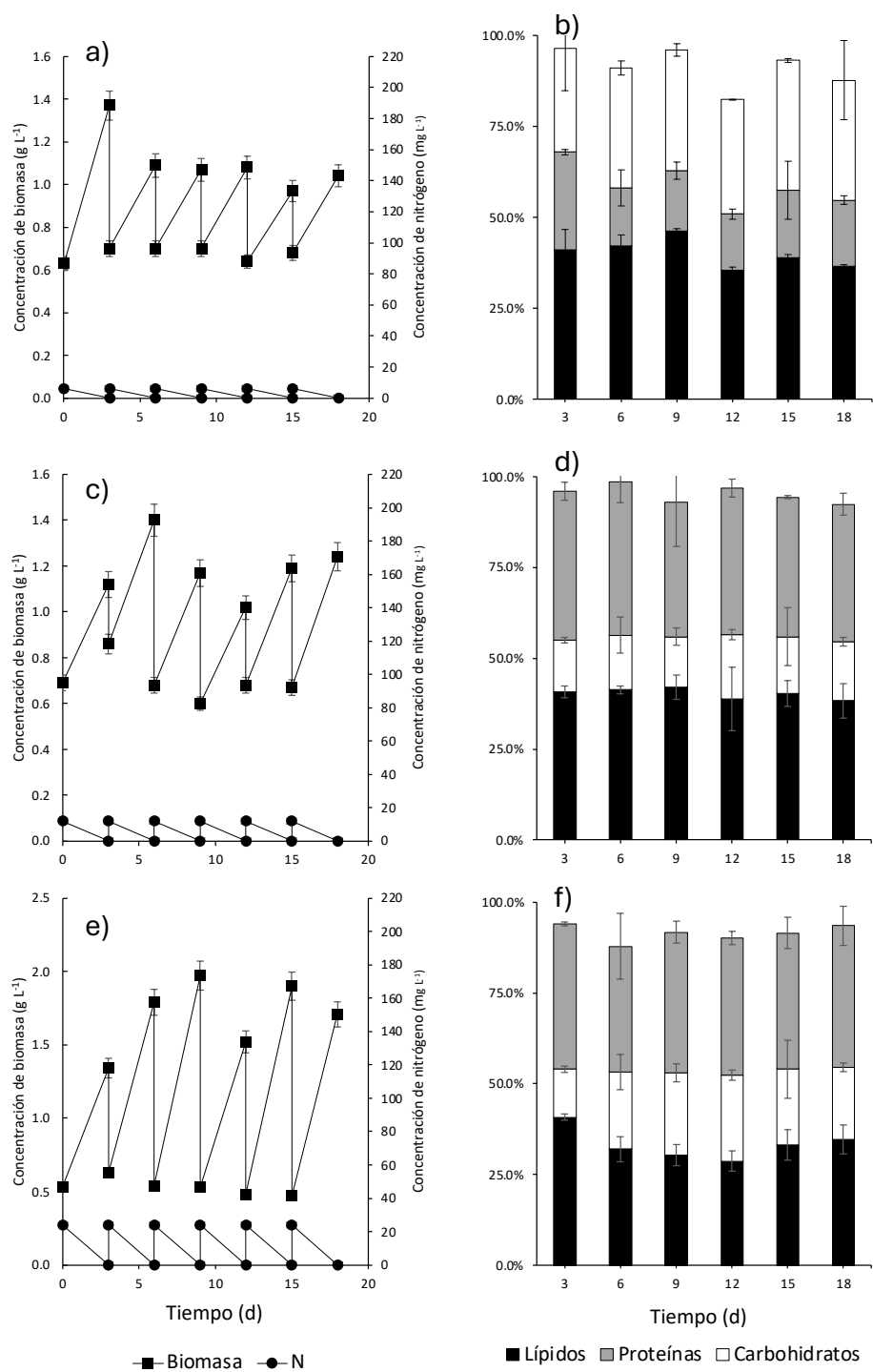


Figura A3. Evolución en el tiempo de la concentración de biomasa y la concentración de N (a, c y e) y del perfil bioquímico (b, d y f), operando el FBR-P en semicontinuo con ciclos de 72 h de N a) y b) con 6 $\text{mg}_\text{N L}^{-1}$, c) y d) con 12 $\text{mg}_\text{N L}^{-1}$ y e) y f) con 24 $\text{mg}_\text{N L}^{-1}$.

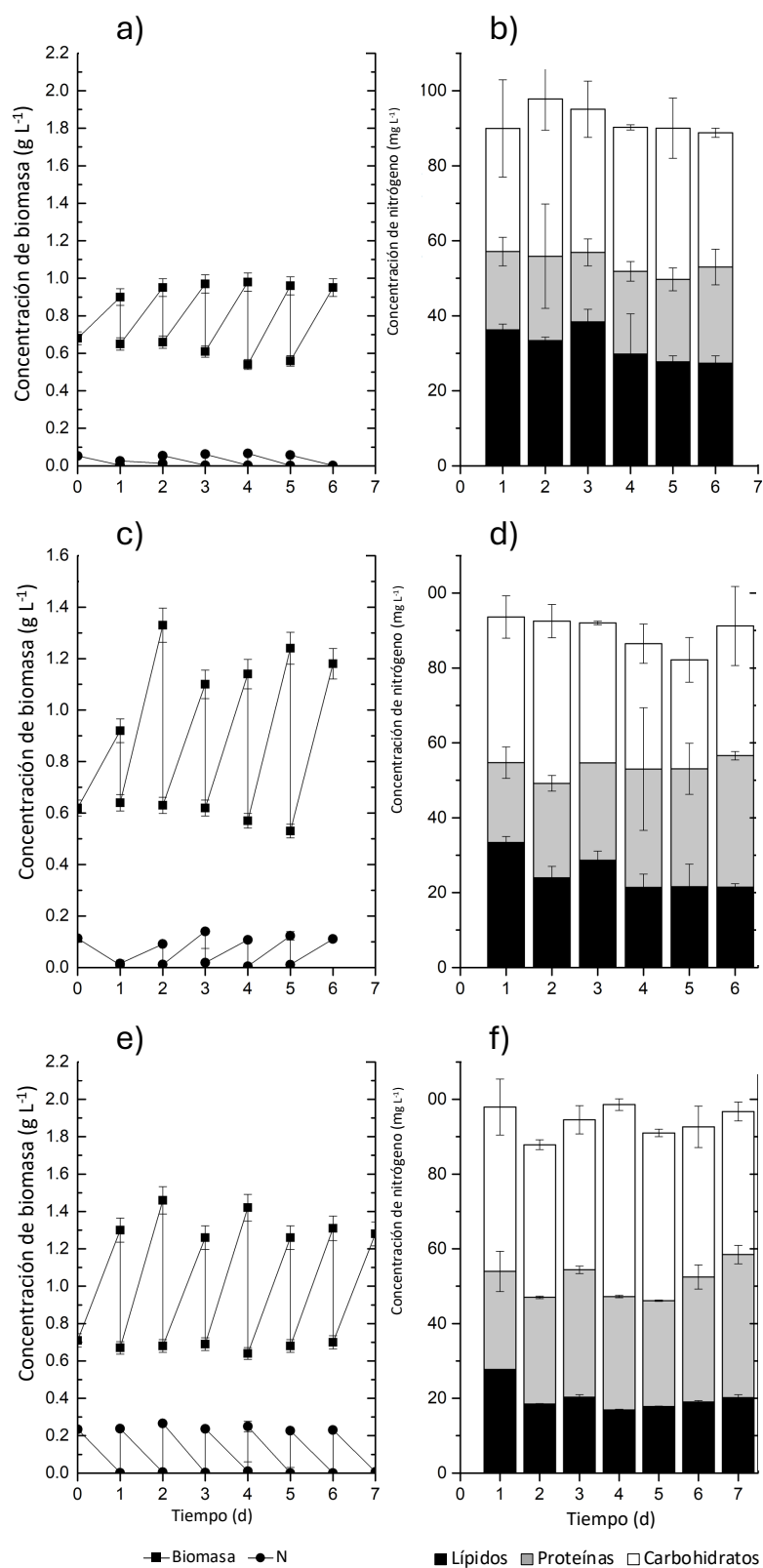


Figura A4. Evolución en el tiempo de la concentración de biomasa y la concentración de N (a, c y e) y del perfil bioquímico (b, d y f), operando el FBR-P en semicontinuo con ciclos de 24 h de N a) y b) con 6 mg_N L⁻¹, c) y d) con 12 mg_N L⁻¹ y e) y f) con 24 mg_N L⁻¹.

Tabla A1. Los diferentes pretratamientos aplicables a la biomasa y sus ventajas e inconvenientes.

Tipo de pretratamiento	Tratamiento	Principio físico-químico-biológico	Ventajas	Desventajas	Referencia(s)
Mecánicos	Trituración con perlas	Aplicación de fuerzas mecánicas de compactación y cizalla mediante la colisión de perlas agitadas, provocando la ruptura celular.	Existencia de equipos industriales, buena eficiencia para otros tipos de biomasa, un solo paso, escalabilidad factible.	Alto consumo de energía, poca eficiencia en transferencia de energía cinética, sensibilidad de compuestos a la temperatura (aumenta costo de enfriamiento), formación de finos residuos, baja selectividad.	(Doucha & Livanský, 2008; Günerken et al., 2015)
	Trituración con cuchillas	Aplicación de fuerzas de cizalla mediante cuchillas a alta velocidad y explotación del efecto de cavitación para romper la membrana celular.	Fácil de poner en marcha, alta eficiencia de ruptura celular, puede tratar mayores concentraciones de biomasa, tiempo de contacto corto.	Consumo energético no favorable (rebasa 150% del contenido calórico de la biomasa), agresivo con sustancias celulares (desnaturaliza proteínas por calor).	(Günerken et al., 2015; A. K. Lee et al., 2013)
	Homogeneización a alta presión	El fluido de biomasa impacta a alta presión sobre un anillo, generando fuerzas de cizallamiento y cavitación que rompen la célula.	Genera una emulsión (adaptado para esos procesos), preferido para escala industrial, fácil de implementar, existen equipos industriales.	Rendimiento energético varía con la concentración, proceso no selectivo, disminuye digestibilidad de proteínas (no es suave), genera micropartículas y sustancias diluidas (aumenta costos de separación).	(Günerken et al., 2015)
	Ultrasonificación	La cavitación y la propagación de una onda de choque en el líquido forman corrientes que ejercen fuerzas de cizallamiento sobre la biomasa.	Eficaz a escala de laboratorio, aplicable a un amplio rango de biomasa.	Consume mucha energía, desnaturaliza las sustancias (por temperatura, vibraciones y formación de radicales libres).	(Günerken et al., 2015)
	Microondas	Interacción selectiva con moléculas polares (agua), aumentando la temperatura por fricción intermolecular hasta la ebullición, provocando ruptura celular por presión interna.	Calentamiento muy rápido y selectivo de moléculas polares (agua).	Mayoría de energía perdida por difusión, desnaturaliza proteínas (forma aglomerados), produce radicales libres, no adecuado para compuestos volátiles.	(Günerken et al., 2015)
	Campo eléctrico pulsado	Aplicación de un campo eléctrico que induce tensión y compresión electromecánica, generando poros en la membrana celular.	Fácil de escalar.	Requiere bastante energía, se limita a solventes libres de iones, eficiencia variable, desnaturaliza proteínas.	(Günerken et al., 2015)
No Mecánicos	Térmico	El calor genera presión interna en la célula hasta romper la pared; aumenta la permeabilidad y desnaturaliza proteínas y polisacáridos de la pared.	Simple de implementar, efectivo para aumentar la permeabilidad y solubilizar materia orgánica.	Puede consumir importantes cantidades de energía, desnaturaliza metabolitos de interés, puede producir compuestos recalcitrantes.	(No se citan referencias en el párrafo)
	Químico	Explotación de propiedades químicas (saponificación, generación de poros, inhibición, etc.) usando ácidos, bases, solventes, oxidantes, etc.	Alta efectividad y potencial de selectividad (dependiendo del agente: ácido, base, solvente).	Presencia de sustancias tóxicas, desnaturalización de compuestos, contaminación del medio ambiente.	(Günerken et al., 2015)
	Enzimático	Tratamiento específico donde las enzimas se enlazan a moléculas concretas de la pared celular para provocar su ruptura.	Requiere poca inversión, requerimientos energéticos relativamente bajos, evita la desnaturalización de compuestos de interés.	Eficiencia depende del coctel de enzimas, costo variable, puede provocar pérdida de otros compuestos de alto valor por oxidación.	(Günerken et al., 2015)

ANEXO 2 – Metodologías

CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA MEDIANTE EXTRACCIÓN CON METANOL

Método para clorofila

1. Centrifugar 1 mL de la muestra a 4000 rpm durante 5 min.
2. Resuspender la pastilla celular adicionando 5 mL de metanol al 90% (v/v) y tapar con aluminio para mantener la muestra en oscuridad.
3. Sonicar la muestra a 60°C durante 60 min. Se debe tener cuidado de que el tubo utilizado este bien cerrado para evitar evaporación del solvente.
4. Medir la cantidad de extracto (V2).
5. Centrifugar la muestra a 4 000 rpm durante 20 min y recuperar el sobrenadante.
6. Utilizando metanol 90% (v/v) como blanco, medir la absorbancia del sobrenadante a las longitudes de onda siguientes: 650, 665 y 750 nm.

Cálculos

Cuantificar el contenido de clorofilas en las células se usando la siguiente ecuación:

Clorofila ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = $(16.5 \cdot (A_{665} - A_{750})) - (8.3 \cdot (A_{650} - A_{750}))$ (Becker, 1994).

Nota: Cuando la lectura de absorbancia a 750 nm es mayor a 0.01 se recomienda volver a centrifugar la muestra y volver a leer a todas las longitudes de onda.

PUBLICACIONES Y TRABAJOS PRESENTADOS

2024 - Conferencia en el Laboratorio Ecosistemas Biologicos con la ponencia **Biotecnología con microalgas: Cultivo casero y bioestimulante.**

2024 - Conferencia **Eficiencia Energética** en el Tecnológico Nacional de México a través del instituto tecnológico de Tlalpan (TECNM-Tlalpan).

2024 - Microalgas: El futuro verde para un planeta sostenible en el evento del Día y Noche Iberoamericana de I@s Investigadores, UAM-Cuajimalpa.

2024 - Taller en el Laboratorio Ecosistemas Biologicos con la ponencia **Taller de cultivo y bioestimulante de microalgas**, en línea, organizado por LABtinoamerica y consulado de España de Mexico, Costa Rica y Chile.

2023 – Cartel. **Effect of pretreatments of fresh *Scenedesmus obtusiusculus* biomass on CH₄ production by anaerobic digestion** en el congreso XIV Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion organizado por la International Water Association (IWA), Querétaro, 2023.

2023 – Cartel. **Microalgas para la eliminación de contaminantes en agua residual y el aprovechamiento de su biomasa** en el 5o Simposio de las Licenciaturas de la DCNI, UAM-Cuajimalpa.

2022 – Gorry, P.-L., Ángeles, R., Revah, S. and Morales-Ibarría, M. (2022), **Effect of nitrogen feast–famine cycles and semi-continuous cultivation on the productivity of energy-rich compounds by *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM.** J Chem Technol Biotechnol, 97: 1506-1516. <https://doi.org/10.1002/jctb.6987>

2022 - Ponencia y taller. **Aplicaciones y cultivo de las microalgas** en el ALGAE BLOOM: *Laboratorio de pensamiento sobre bioarte y medio ambiente* con la plataforma LABtinoamerica (Chile), virtual, 2022.

2022 - Microalgas para la captura de CO₂, y obtención de diferentes productos, en el marco de las actividades realizadas en el evento: "UAM Cuajimalpa es tu casa", UAM-Cuajimalpa.

2019 – Cartel. Cultivo semicontinuo de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* con bajos niveles de nitrógeno para la acumulación de lípidos en el V simposio del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la UAM Cuajimalpa, CDMX, 2019

2018 – Gorry, P. L., Sánchez, L., & Morales, M. (2018). Microalgae biorefineries for energy and coproduct production. In Energy from microalgae (pp. 89-140). Cham: Springer International Publishing.

2017 – Cartel. Cultivo semicontinuo de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* bajo limitación en nitrógeno para producción de lípidos en el IV simposio del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la UAM Cuajimalpa, CDMX, 2017

2017 – Cartel, Science and Technology Indicators of Microalgae-Based Biofuel Research; 16o Congreso de International Conference on Scientometrics & Informetrics (ISSI), Wuhan, China, 2017.

2017 – Cartel. Cultivo semicontinuo de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* bajo limitación en nitrógeno para la producción de lípidos; 17o Congreso de Biotecnología y Bioingeniería de la Sociedad Mexicana Biotecnología y Bioingeniería (SMBB), Puerto Vallarta, México, 2017.

2016 – Cartel. Influence of acid pH on *Scenedesmus obtusiusculus* outdoor culture under nitrogen deplete conditions; 10o Congreso de International Society for Environmental Biotechnology (ISEB), Barcelona, España, 2016.

Effect of nitrogen feast–famine cycles and semi-continuous cultivation on the productivity of energy-rich compounds by *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM

Pierre-Louis Gorry,^a Roxana Ángeles,^{b,c} Sergio Revah^d and Marcia Morales-Ibarria^{d*}

Abstract

BACKGROUND: Nitrogen (N) limitation is the most common strategy used to accumulate energy-rich compounds in microalgae. However, this condition reduces the microalga growth rate and biomass, lipid and carbohydrate productivities. In this work, a semi-continuous operation strategy combined with N feast–famine cycles were investigated in order to increase the lipid, carbohydrate and biomass contents in the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM.

RESULTS: Growth and lipid productivity were evaluated in a flat-panel photobioreactor (FP-PBR) under controlled conditions, through 72 and 24 h N feast–famine cycles at different N concentrations (6, 12 and 24 mg N L⁻¹). The highest accumulation of microalgal biomass, lipid and carbohydrate (550 ± 28, 139 ± 4 and 198 ± 7 mg L⁻¹ d⁻¹) was obtained for 24 h cycles at 12 mg N L⁻¹ and were up to ~2.4 times compared to that of 72 h N feast–famine cycles. This strategy was also applied in a bubble column photobioreactor (BC-PBR) located in a greenhouse. Here, biomass productivities obtained under a semi-continuous operation for 24 h N feast–famine cycles with 6 and 12 mg N L⁻¹ were 536 ± 27 and 667 ± 33 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively. The maximum productivity of lipid and carbohydrate reached 142 ± 10 and 169 ± 14 mg L⁻¹ d⁻¹ with 12 mg N L⁻¹, respectively.

CONCLUSION: The studied N feast–famine cycles and semi-continuous operations increased the productivity of biomass and lipids in *S. obtusiusculus* AT-UAM.

© 2021 Society of Chemical Industry (SCI).

Keywords: biomass production; greenhouse conditions; lipid productivity; nitrogen limitation; *Scenedesmus obtusiusculus*; semi-continuous cultivation

INTRODUCTION

The rise in the consumption of fossil fuels has been increasing the emissions of greenhouse gases (GHG), mainly carbon dioxide (CO₂), into the atmosphere.¹ The concentration of CO₂ in the atmosphere has been risen rapidly in the last decades, affecting the climate and contributing to non-reversible climate events that impact the access to food, water and energy. Moreover, all these issues may lead to social destabilization.² Thus, international policies have been focused on mitigating climate change and promoting renewable energy production.

Physical/chemical technologies, such as adsorption, membrane separation, chemical absorption and cryogenic distillation, have been developed and commercialized on an industrial scale to capture CO₂. These technologies are energy intensive, costly and limited in their operation.³ Nevertheless, biological technologies to transform CO₂ into energy, such as the use of microalgae, are under development. Microalgae are a promising alternative for CO₂ as they can capture up to 1.83 tons per ton of dry microalgal biomass through photosynthesis.⁴ Besides, microalgal biomass contains proteins (30–50%), carbohydrates (20–40%) and

lipids (8–15%) under nutrient sufficiency. This can be further exploited through a wide range of products.⁵

Several authors have reported the ability of different microalgal genera such as *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus* and *Monoraphidium* to accumulate intracellular reserves as lipids and carbohydrates under stress conditions.^{6–9} Therefore, microalgae

* Correspondence to: M Morales-Ibarria, Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Av. Vasco de Quiroga 4871, Santa Fe Cuajimalpa, CP 05348, Cd. de México, Mexico. E-mail: mmorales@cua.uam.mx

^a Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Cd. de México, Mexico

^b Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain

^c Instituto de Procesos Sostenibles, Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain

^d Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Cd. de México, Mexico

could be a high-yielding source of energy-rich components to produce different renewable biofuels such as biodiesel and bioethanol, due to the high content of lipids and carbohydrates, respectively.¹⁰ Bioethanol yield from microalgae is between 5 and 150 times higher than that of common first- or second-generation feedstocks such as Swiss grass, corn or sugar beet.¹¹ Biodiesel can be produced by transesterification of microalgal lipids, since the oil production from microalgae is approximately 10–300 times higher than that in plants.¹² Different stress conditions have been explored to trigger lipid accumulation in microalgae, such as nutrient limitation (nitrogen (N) or phosphate starvation),^{12,13} pH shock^{8,14} or increased salinity.¹⁵

Previous research performed with the oleaginous microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM demonstrated its biotechnological potential to produce oils and capture CO₂ simultaneously. *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM accumulated lipids up to about 56% dry cell weight (DCW), with a productivity of 85 mg L⁻¹ d⁻¹ under N starvation in batch cultivation.⁸ It also captured CO₂ at a rate of 950 mg L⁻¹ d⁻¹ in N-sufficient medium.^{13,16} Despite the high lipid accumulation obtained, the economic feasibility of the microalgal processes is often limited by its low biomass growth, which is intensified by the stress conditions required to improve lipid productivity in a batch culture. Semi-continuous cultivation may allow us to partially overcome these limitations.^{17–19}

This study aimed to enhance the growth and increase lipid and carbohydrate productivities of *S. obtusiusculus* AT-UAM. The effects on lipid and carbohydrate accumulation with low N concentrations were evaluated in flat-panel controlled photobioreactors (FP-PBR) operated semi-continuously with N feast–famine cycles. This strategy was also applied to a bubble column–PBR (BC-PBR) operated in a greenhouse, to establish the effects of climate variation and changing incident irradiance.

MATERIALS AND METHODS

Microalga and inoculum

The microalga *S. obtusiusculus* AT-UAM isolated from springs in Cuatro Ciénegas (Coahuila, Mexico)¹³ was used in this work. The inoculum was grown under sterile conditions in mineral medium BG-11, pH 7 (in g L⁻¹): NaNO₃, 1.5; K₂HPO₄, 0.04; MgSO₄·7H₂O, 0.075; magnesium disodium EDTA, 0.001; CaCl₂·2H₂O, 0.036; citric acid, 0.006; ferric ammonium citrate, 0.006; Na₂CO₃, 0.02; and 1 mL⁻¹ of trace mineral solution. The latter had the following composition (in mg L⁻¹): H₃BO₃, 2.86; MnCl₂·4H₂O, 1.81; ZnSO₄·7H₂O, 0.222; NaMoO₄·2H₂O, 0.39; CuSO₄·5H₂O, 0.079; Co(NO₃)₂·6H₂O, 0.494. Chemicals were purchased from JT Baker (Waltham, MA, USA) and Tecsiquim SA de CV (Toluca, Mexico) with a purity of at least 99%. Modified BG-11 with different N concentrations were supplemented according to section below on 'Operation of the bubble column photobioreactor under greenhouse conditions'.

Prior to the experiments, the strain was grown in a 2.5 L BC-PBR. The culture medium in the BC-PBR was mixed continuously by a 2 L min⁻¹ flow of air with 5% v/v CO₂ (Praxair, Mexico City, Mexico) through a sparger with six nylon tips, each with five perforations of 1 mm internal diameter at the bottom of the PBR. The PBR was operated under controlled conditions at 30 ± 1 °C and 60 μmol m⁻² s⁻¹ continuous photosynthetic active radiation (PAR) by two 50 W fluorescent lamps (Philips, Mexico City, Mexico). The biomass was harvested when the culture reached the exponential growth phase by centrifugation (at 4000 rpm

for 7 min) and washed with distilled water before inoculation of the experimental systems.

Experimental system

Flat-panel photobioreactor

The FP-PBR (Fig. 1), located indoors, consisted of two transparent acrylic plates of 0.3 m height and 0.3 m length placed vertically and 0.025 m apart, with a working volume of 1.8 L and an area of 0.09 m² at 200 μmol m⁻² s⁻¹, illuminated by two LED printed circuit boards (Ilumileds, Mexico City, Mexico), set to provide continuous illumination. The culture medium in the FP-PBR was mixed continuously by a 2.5 L min⁻¹ flow of filtered air with 1% v/v CO₂ through a sparger with 16 perforations of 1 mm internal diameter, at the bottom of the FP-PBR. The temperature was controlled by an internal tubular heat exchanger (9102A12E, Poly-Science, Niles, IL, USA) at 35 °C in the FP-PBR.

Bubble column photobioreactors

Two BC-PBRs were installed (19° 21' 09.6" N, 99° 16' 57.6" W) inside a greenhouse (Fig. 1). They consisted of acrylic bubble columns of 0.143 m diameter and 1.82 m height, with a working volume of 24 L. The culture medium in the BC-PBRs was mixed continuously by a 4 L min⁻¹ flow of filtered air with 1% v/v CO₂, through six tips of a nylon gas diffuser with five perforations of 1 mm of internal diameter at the bottom of the BC-PBR. The BC-PBRs were operated during the fall season.

Operational procedure

A concentration of 12 mg N L⁻¹ was taken as reference in the supplemented BG-11 medium, at the onset the N feast–famine cycles during semi-continuous cultivation, as previous reports for *S. obtusiusculus* AT-UAM showed that a consumption rate of ~12 mg N L⁻¹ d⁻¹ ensured a biomass productivity of 500 mg L⁻¹ d⁻¹ and increased the lipid content in batch operation mode under controlled conditions.¹³

Flat-panel photobioreactor operation

The FP-PBR was inoculated with the microalga *S. obtusiusculus* AT-UAM to reach an initial biomass concentration of 893 ± 45 mg total suspended solids (TSS) L⁻¹. The FP-PBR was initially operated in batch mode using distilled water and a modified BG-11 medium with 0.06 g NaNO₃ L⁻¹ (12 mg N L⁻¹) for 7 days until reaching a lipid content of ~40% DCW. Then, assays were carried out in the FP-PBR, under controlled conditions and semi-continuous cultivation, and using different N concentrations (6, 12 and 24 mg N L⁻¹) in the supplemented BG-11 medium at the onset of each N feast–famine cycle of 72 and 24 h. Each volumetric N concentration was equivalent to 9.3, 18.6 and 40.3 mg N g⁻¹ DCW specific concentrations, respectively, with reference to the initial biomass concentration. Biomass harvesting was performed every 72 or 24 h to maintain an initial biomass concentration of approximately 600 mg TSS L⁻¹ in the cultivation broth.

Operation of the bubble column photobioreactor under greenhouse conditions

The microalga *S. obtusiusculus* AT-UAM was inoculated in BC-PBR to achieve a biomass concentration of 890 ± 45 mg TSS L⁻¹. The photobioreactor was initially operated in a 7-day batch mode under greenhouse conditions using BG-11 medium with 0.31 g NaNO₃ L⁻¹ (61 mg N L⁻¹) and filtered tap water. The assays were then carried out in the system at a semi-continuous operation under low N concentration (6 and 12 mg N L⁻¹, equivalent to

Laboratory controlled conditions

Greenhouse conditions

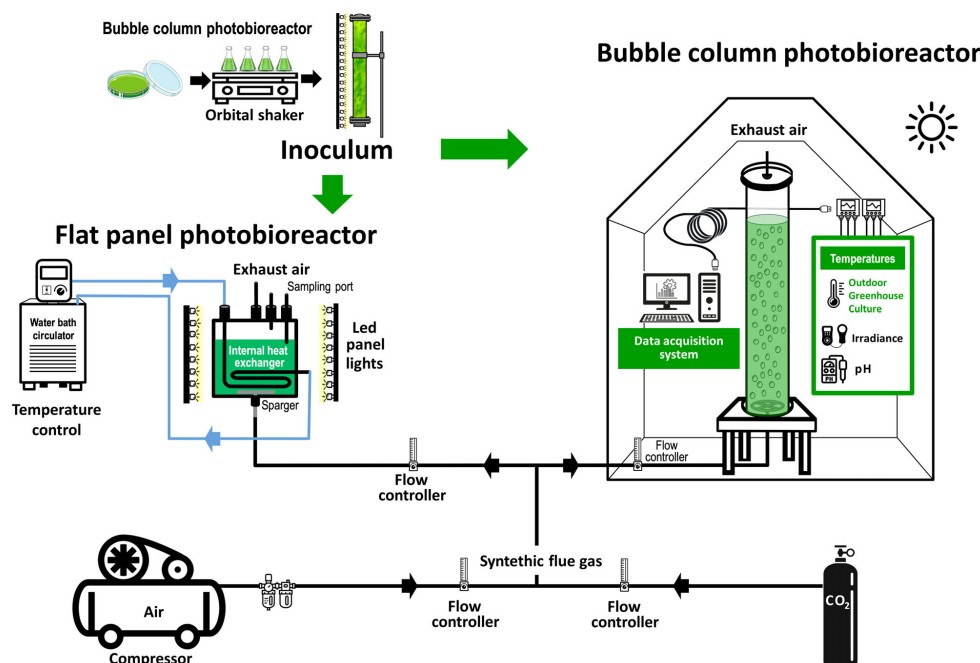


Figure 1. Schematic representation of the experimental system.

9 and 19 mg N g DCW⁻¹, respectively) in the BG11 medium, through 24 h N feast–famine cycles. The cycles consisted of an exchange of modified BG-11 medium supplemented with the corresponding N concentration to reach 6 mg N L⁻¹ (9 mg N g⁻¹ DCW) or 12 mg N L⁻¹ (19 mg N g⁻¹ DCW), respectively, on day 0 of each cycle. Biomass was harvested daily with the purpose of maintaining a concentration of approximately 890 mg TSS L⁻¹ in the cultivation broth.

Analytical methods

Environmental parameters, such as incident irradiance on the FP-PBR, were measured periodically with a 2 π quantum sensor, while BC-PBR was measured continuously with a 2 π quantum sensor (Sper Scientific 850 008, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). The pH and temperature were monitored online in the cultivation broth with an electrochemical sensor and thermocouple (ALSPHT1, AlgaeConnect, Boulder, CO, USA).

Biomass concentration was quantified as TSS according to standard methods.²⁰ N concentration was measured as nitrate (N-NO₃⁻) by a spectrophotometric method¹³ in filtered samples through a 0.2 μ m nitrocellulose membrane. A total of 1 mL of 1 mol L⁻¹ HCl solution was added to the mixture to remove possible interferences with either hydroxide or carbonate ions. Then, the absorbance was measured at 220 nm using a spectrophotometer (UV–visible model 752, HEB, Shaanxi, China). NaNO₃ was used

as standard. The TSS and N-NO₃⁻ concentrations in the cultivation broth were measured in the FP-PBR and the BC-PBR at the beginning and end of each tested condition.

The biochemical composition of the biomass (lipids, total carbohydrates and proteins) was assessed at the end of cycles for each tested condition, for both FP-PBR and BC-PBR. The lipid content was quantified using the sulfo-phospho-vanillin method.²¹ Aliquots of 100 μ L from the cultivation broth were mixed with 2 mL H₂SO₄ (98%) on a hot bath at 100 °C for 15 min. Then, 5 mL of a phosphate vanillin solution (1.2 g L⁻¹ vanillin at 68% H₃PO₄) was added and incubated for 20 min at 200 rpm in a dark incubator at 37 °C. Lastly, samples were read using a spectrophotometer (UV–visible model 752, HEB) at 530 nm. Canola oil was used as standard. The quantitative determination of total carbohydrates was estimated using a modified phenol–sulfuric acid method from a sample of 0.5 mL of biomass harvested from the cultivation broth by centrifugation (4000 rpm, 5 min).^{22,23} The protein content was determined with the modified Lowry method using aliquots of 1 mL biomass harvested from the cultivation broth by centrifugation at 14 000 rpm for 5 min.^{23,24} The biochemical composition of biomass was expressed as a percentage in DCW.

Kinetics and productivity calculations

Biomass productivity (P_b) (mg L⁻¹ d⁻¹) for batch cultivation was calculated using Eqn (1),¹⁶ where C_0 is the initial biomass

concentration as TSS (mg L^{-1}) in the culture at time t_0 (days), and C_f is the final biomass concentration (mg L^{-1}) of the culture at time t_f (days):

$$P_b = \frac{C_f - C_0}{t_f - t_0} \quad (1)$$

The average biomass productivity was calculated using Eqn (2) for semi-continuous²⁵ cultivation, where $C_{i,0}$ (mg L^{-1}) is the initial biomass concentration after mineral medium renewal, i , at time $t_{i,0}$ (days), and $C_{i,f}$ (mg L^{-1}) is the final biomass concentration of i renewing at time $t_{i,f}$ (days) under light exposure; n is the total number of partial liquid replacements completed and sc is semi-continuous operation:

$$P_{b,sc} = \frac{\sum_{j=0}^n \left(\frac{C_{i,f} - C_{i,0}}{t_{i,f} - t_{i,0}} \right)}{n} \quad (2)$$

In a similar way, the average lipid and carbohydrate productivity ($P_{l,sc}$ and $P_{ch,sc}$, respectively) ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) were determined using Eqns (3) and (4),⁸ where P_b ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) is the biomass productivity, and X_l and X_{ch} (% DCW) is the final lipid and carbohydrate content per milligram of biomass, respectively:

$$P_l = P_b \times X_l \quad P_{l,sc} = \frac{\sum_{j=0}^n (P_{b,j} X_{l,j})}{n} \quad (3)$$

$$P_{ch} = P_b \times X_{ch} \quad P_{ch,sc} = \frac{\sum_{j=0}^n (P_{b,j} X_{ch,j})}{n} \quad (4)$$

Equation (5) calculates the approximate energy productivity, E_T , expressed in $\text{cal L}^{-1} \text{d}^{-1}$. E_l (9.1 cal mg^{-1}) and E_{ch} (3.7 cal mg^{-1}) are the lipid and carbohydrate energy content, respectively²⁶:

$$E_T = (P_{l,sc} \times E_l) + (P_{ch,sc} \times E_{ch}) \quad (5)$$

Statistical treatment

All measurements were performed in triplicate. Results were expressed as mean value $\pm$ standard deviation (SD). Data of 72 and 24 h N feast-famine cycles in FP-PBR were analyzed using analysis of variance (ANOVA) with Tukey's honestly significant difference (HSD) test. Subsequently, data were analyzed using two-way ANOVA, with N concentration and the cycle time as analysis factors. ANOVA was performed in the software Origin V9 by considering probability values $P \leq 0.05$, with a confidence level of 95%.

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of N concentration and feast-famine cycles in FP-PBR

The FP-PBR was operated in two stages, to evaluate the effect of N concentration in the supplemented medium on the growth and biochemical biomass composition of *S. obtusiusculus* AT-UAM. The first stage consisted of batch operation using 12 mg N L^{-1} in the N-supplemented medium to stimulate lipid content. Then, the semi-continuous regime started with periodic 24 or 72 h N

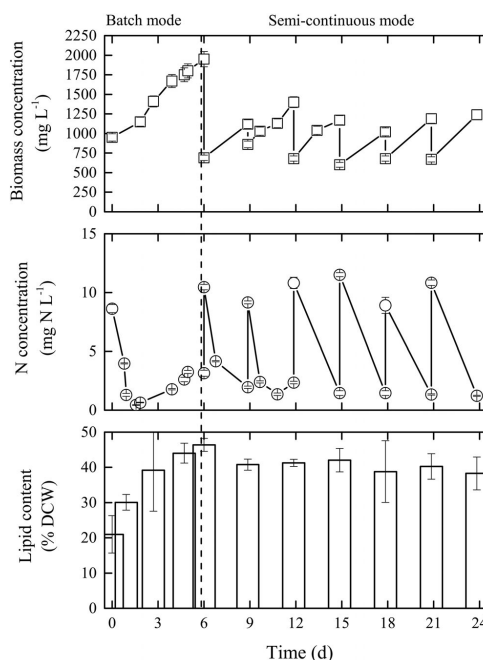


Figure 2. Time course of biomass concentration, nitrogen (N) concentration, and lipid content with operation in batch and semi-continuous mode, in the flat panel photobioreactor FP-PBR during 72 h N feast-famine cycles at 12 mg N L^{-1} or $18.6 \text{ mg N g}^{-1} \text{ DCW}$, in the cultivation broth.

feast-famine cycles with different initial nitrogen concentrations (6, 12 and 24 mg N L^{-1} or 9.3, 18.6 and $40.3 \text{ mg N g}^{-1} \text{ DCW}$).

Figure 2 represents in detail the behavior in these two stages. The first stage consisted of a 7-day initial batch period prior to six N feast-famine cycles. During the batch operation, the biomass content increased up to $1950 \pm 98 \text{ mg L}^{-1}$ and N was consumed in 6 h. At the end of this stage, the proximal biomass consisted of $46\% \pm 3\%$ DCW of lipids, $36\% \pm 7\%$ DCW of carbohydrates, and $15\% \pm 5\%$ DCW of proteins. Subsequently, the semi-continuous operation began with 72 h cycles having initially 12 mg N L^{-1} or $18.6 \text{ mg N g}^{-1} \text{ DCW}^{-1}$. Six biomass concentration peaks were observed due to the microalga growth after medium extraction, and replenishment with fresh mineral solution leading to the initial nitrogen concentration tested. The lipid content at the end of each cycle remained around $40\% \pm 3\%$ DCW.

Overall, the results of the average contents during the batch operation stage for all conditions of cycle times and N concentrations were similar: $41\% \pm 3\%$ DCW of lipids, $40\% \pm 7\%$ DCW of carbohydrates and $15\% \pm 5\%$ DCW of proteins. The biomass and lipid productivity were $301 \pm 15 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ and $122 \pm 8 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectively. In the following sections, the semi-continuous performances are described for each tested condition.

72 h N feast-famine cycles

Table 1 summarizes the average biochemical composition of the biomass obtained in the experiments using 6, 12 and 24 mg N L^{-1}

Table 1. Biochemical composition of *S. obtusiusculus* AT-UAM under semi-continuous operation in FP-PBR at different nitrogen (N) concentrations in the cultivation broth and 24 and 72 h feast–famine cycles

N concentration (mg N L ⁻¹) or (mg N g ⁻¹ DCW)	Lipids (% DCW)	Carbohydrates (% DCW)	Proteins (% DCW)
72 h feast–famine cycles			
6 (9.3)	40 ± 2	33 ± 5	19 ± 5
12 (18.6)	40 ± 3	40 ± 4	16 ± 5
24 (40.3)	34 ± 4	38 ± 4	20 ± 4
24 h feast–famine cycles			
6 (9.3)	32 ± 3	38 ± 9	22 ± 4
12 (18.6)	25 ± 4	36 ± 5	29 ± 3
24 (40.3)	20 ± 3	43 ± 3	31 ± 2

(9.3, 18.6 and 40.3 mg N g⁻¹ DCW) during the 72 h N feast–famine cycles. High lipidic content, up to 40% DCW, was obtained with 6 and 12 mg N L⁻¹ (9.3 and 18.6 mg N g⁻¹ DCW). Despite the high lipidic content attained, limited growth of *S. obtusiusculus* AT-UAM was recorded when the system was fed with 6 mg N L⁻¹ (9.3 mg N g⁻¹ DCW), resulting in a low biomass and lipid productivity (144 ± 7 and 58 ± 1 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively) (Fig. 3(a,b)). Medium additions leading to initial 12 and 24 mg N L⁻¹ (18.6 and 40.3 mg N g⁻¹ DCW) increased the biomass productivity 1.14- and 2.72-fold, respectively (Fig. 3(a)). Likewise, the lipid productivities increased by factors of 1.14 and 2.22, respectively.

The carbohydrate productivity values were in the same range as those found for lipids, as shown in Fig. 3(b). During 72 h N feast–famine cycles, the energy accumulation, represented by the build-up of energy reserve molecules, seemed to be triggered rather

than growth. For 24 mg N L⁻¹ (40.3 mg N g⁻¹ DCW), the productivities were around twice as higher as those at 6 and 12 mg N L⁻¹ (9.3 and 18.6 mg N g⁻¹ DCW).

Protein content was around 18% DCW in the three assays. In the microalgal biomass, proteins are vital as they include mainly the required metabolic enzymes. The protein content is proportional to the number of cells rather than their mass. Cells rarely accumulate proteins as an energy reserve and thus their relative mass content is determined by the abundance of energy and structural molecules. This can be confirmed by the information in Table 1, where conditions, generally N starvation, promoted mainly lipid or carbohydrate accumulation, while constraining biomass growth and productivity.

24 h N feast–famine cycles

The lipidic content in the 24 h N feast–famine cycle assays was lower than that obtained for 72 h cycles (Table 1), with decrements of around 8% for initial N concentrations of 6 mg N L⁻¹ (9.3 mg N g⁻¹ DCW) and 14.5% for 12 and 24 mg N L⁻¹ (18.6 and 40.3 mg N g⁻¹ DCW). On the other hand, with shorter cycles, the biomass productivities increased 2.32-, 3.35- and 1.65-fold for initial N concentrations of 6, 12 and 24 mg N L⁻¹ (9.3, 18.6 and 40.3 mg N g⁻¹ DCW), respectively (Fig. 3(c)). Consequently, the lipid productivity reached 139 ± 4 mg L⁻¹ d⁻¹, when the system was fed with 12 mg N L⁻¹ (18.6 mg N g⁻¹ DCW) supplemented in the medium, despite the low lipid accumulation achieved in the biomass during 24 h N feast–famine cycles (Fig. 3(d)).

In brief, despite the high lipid content, up to ~40% DCW obtained during 72 h N feast–famine cycles, compared to a maximum of 32% ± 3% DCW during 24 h N feast–famine cycles (Table 1), the biomass and lipid productivity values were approximately 3.4 times lower compared to that of 24 h N feast–famine

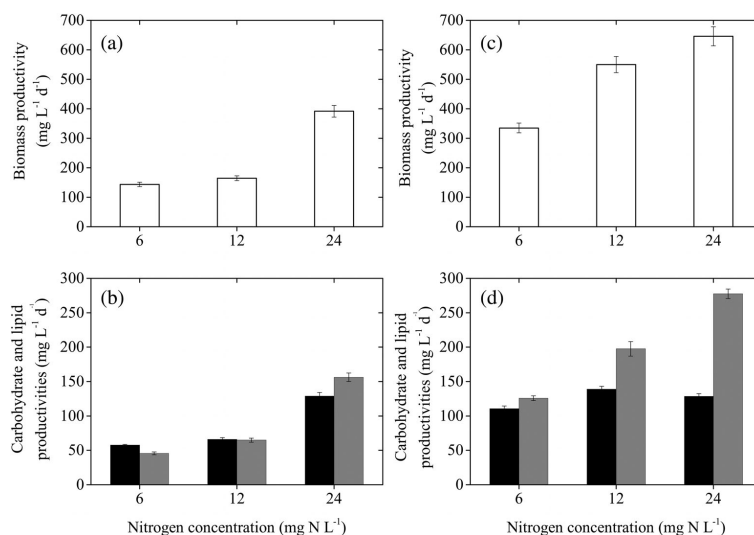


Figure 3. Biomass, lipid, and carbohydrates productivities for: (a,b) 72 h N feast–famine cycles and (c,d) 24 h N feast–famine cycles at different N concentrations in the cultivation broth in the flat panel photobioreactor FP-PBR. Lipid and carbohydrate productivities are represented in black and grey bars, respectively. Vertical bars represent the standard deviation (±SD, *n* = 3). 6, 12 and 24 mg N L⁻¹ correspond to 9.3, 18.6 and 40.3 mg N g⁻¹ DCW, respectively.

Table 2. Comparison of different strategies to enhance lipid and carbohydrate productivity by microalgae

Microalgae species	Culture system	Working volume (L)	Operated	Cultivation operation	Lipid productivity (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Carbohydrate productivity (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Reference
<i>C. sorokiniana</i> NIES-2168	PBR	—	Indoor	Semi-continuous	—	695	27
<i>Chlorella</i> sp. AE10	BC-PBR	0.35	Indoor	Semi-continuous	—	673	28
<i>C. vulgaris</i> FSP-E	PBR	1	Indoor	Batch	—	631	5
<i>Synechococcus</i>	Bottle	0.8	Indoor	Batch	—	535	29
<i>S. obliquus</i> CNW-N	PBR	1	Indoor	Batch	—	468	30
<i>S. obtusiusculus</i>	FP-PBR	1.8	Indoor	Semi-continuous	128	278	This work ^a
<i>Chlamydomonas</i> sp. JSC4	BC-PBR	1	Indoor	Gradient	223	—	31
<i>Chlorella</i> sp. HS2	Cylindrical column-PBR	0.5	Indoor	Two-stage	216.9	—	6
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FP-PBR	1.8	Indoor	Semi-continuous	139	198	This work ^b
<i>Chlamydomonas</i> sp. JSC4	BC-PBR	1	Indoor	Two-stages	184	—	31
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	BC-PBR	24	Outdoor	Semi-continuous	142	169	This work ^c
<i>C. salina</i>	Bottle	0.4	Indoor	Batch	—	170	32
<i>S. obliquus</i>	FP-PBR	80	Outdoor	Semi-continuous	170	—	33
<i>A. obliquus</i> UTEX 393 mutant (Slm1)	FP airlift-loop PBR	1.7	Indoor	Continuous	157	—	34
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FP-PBR	1.8	Indoor	Semi-continuous	129	156	This work ^d
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Flask	1	Indoor	Fed-batch	148	—	35
<i>N. oculata</i>	Erlenmeyer flask	80 mL	Indoor	Semi-continuous	146	—	18
<i>N. gaditana</i>	Tubular-PBR	310	Outdoor	Continuous	110	—	7
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	BC-PBR	24	Outdoor	Semi-continuous	118	137	This work ^e
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FP-PBR	1.8	Indoor	Semi-continuous	111	128	This work ^f
<i>Consortium</i> (main strain: <i>Geitlerinema</i> sp.)	FP-PBR	400	Outdoor	Semi-continuous	93	—	36
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FP-PBR	1.8	Indoor	Batch	85	—	8
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 and <i>Chlorella fusca</i> LEB 111	BC-PBR	1.5	Indoor	Semi-continuous	—	79	37
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FP-PBR	1.8	Indoor	Semi-continuous	66	65	This work ^g
<i>Chlorella</i> sp. GN1	FP-PBR	1	Outdoor	Batch	67	—	38
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	BC-PBR	24	Outdoor	Batch	66	—	8
<i>N. oceanica</i> IMET1	BC-PBR	0.5	Indoor	Batch	51	—	39
<i>Porphyridium purpureum</i>	Loop-PBR	600	Outdoor (greenhouse)	Semi-continuous	—	47	40
<i>S. obtusiusculus</i> AT-UAM	FP-PBR	1.8	Indoor	Semi-continuous	58	46	This work ^h
<i>Monoraphidium dybowskii</i> LB50	Raceway	4000	Outdoor	Semi-continuous	17	—	9
<i>Chlorella vulgaris</i> BDUG 91771	Raceway	5000	Outdoor	Semi-continuous	12	—	19
<i>Chlorella sorokiniana</i> str. SLA-04	BC-PBR	0.5	Indoor	Batch	17	12	41

^a 24 h – 24 mg N L⁻¹.

^b 24 h – 12 mg N L⁻¹.

^c 24 h – 12 mg N L⁻¹.

^d 72 h – 6 mg N L⁻¹.

^e 24 h – 6 mg N L⁻¹.

^f 24 h – 6 mg N L⁻¹.

^g 72 h – 12 mg N L⁻¹.

^h 72 h – 6 mg N L⁻¹.

cycles. Therefore, the performance of 72 and 24 h N feast–famine cycles showed statistically significant differences ($P \leq 0.05$) in the biomass and lipid productivity. Moreover, a two-way ANOVA test indicated that significant differences were also seen in the biochemical composition for the concentrations of 24 mg N L⁻¹ (40.3 mg N g⁻¹ DCW) and 6 mg N L⁻¹ (9.3 mg N g⁻¹ DCW),

supplemented in the modified BG11 medium and 72 and 24 h N feast–famine cycles ($P \leq 0.05$). Thus, N concentration and cycle time were key factors in these experiments, as both were impactful on the overall biochemical profile of *S. obtusiusculus* AT-UAM. Consequently, the FP-PBR operation in semi-continuous mode under controlled conditions and the implementation of 24 h N

feast–famine cycles showed the capacity of *S. obtusiusculus* AT-UAM to grow and accumulate energy storage compounds as lipids or carbohydrates.

Lipid and carbohydrate productivities depended on several factors, such as N concentrations, feast–famine cycles duration and cultivation mode. Table 2 compares different strategies to enhance lipid and carbohydrate productivity by different microalgae. In this context, authors have implemented different strategies to increase lipid accumulation in microalgae using N deprivation, different sources and concentrations of N, micronutrient limitation using Ca and Mg, controlled acidification, temperature, photoperiod and light intensity.^{5,8,14,15,41,42} However, stress conditions reduce biomass growth rates, directly affecting lipid productivity. For instance, during batch cultivation, *S. obtusiusculus* AT-UAM under N depletion and acid pulses showed low lipid productivity of 85 mg L⁻¹ d⁻¹, despite reaching a maximum lipid content of 60% DCW. As reported previously,³⁸ *Chlorella* sp. GN1 attained high lipid content (54% DCW) but low lipid productivity of 67 mg L⁻¹ d⁻¹. However, the lipid productivity and content have been already optimized in a few studies. For example, *Chlorella* sp. HS2, cultivated using a two-stage operation (5 days of N-replete conditions prior to 4 days of N-deplete conditions), showed high lipid content and productivity of ~37% DCW and 217 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively.⁶ The purpose of increasing biomass growth and lipid yields have validated cultivation strategies on semi-continuous mode combined with N-starvation.¹⁷ For example, *Nannochloropsis oculata*, cultivated in semi-continuous mode, reached a lipid productivity of ~146 mg L⁻¹ d⁻¹, slightly higher than our present work, while microalga cultivated on a batch mode achieved a lipid productivity of 2.2 times lower (Table 2).¹⁸

In contrast, the carbohydrate content increased to 43% ± 3% DCW, which corresponds to a carbohydrate productivity of 278 ± 7 mg L⁻¹ d⁻¹ (Fig. 3(d)) when the FP-PBR was fed with 24 mg N L⁻¹ (40.3 mg N g⁻¹ DCW) during 24 h N feast–famine cycles (Table 1). The carbohydrate productivities in our work were lower than those obtained using indoor cultivation with species of *Chlorella*, such as *C. sorokiniana* NIES-2168, *Chlorella* sp. AE10 and *C. vulgaris* FSP-E, which reached productivities of 695, 673 and 631 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively (Table 2).^{5,27,28} However, it is important to note that all these strains are not oleaginous microalgae. Interestingly, the carbohydrate biosynthetic pathway competes with the lipid pathway. As the lipid and carbohydrate biosynthesis share pyruvate as a common carbon precursor⁴³ during the Calvin–Bassham–Benson cycle, the N feast–famine cycles could induce the biosynthesis of carbohydrate in detriment of that of lipids.

Globally, the N feast–famine cycles resulted in the accumulation of energy compounds such as lipids and carbohydrates by *S. obtusiusculus* AT-UAM cultivated in a semi-continuous batch. However, the average protein content obtained in the biomass at higher N concentration in the modified BG11 medium, during 24 h N feast–famine cycles, revealed the prevalence of growth over energy reserve accumulation (Table 1).

Strategy for lipid and carbohydrate accumulation under greenhouse conditions in BC-PBR

The BC-PBR operation under greenhouse conditions experienced wide climate variations as a result of the fall season transition. Thus, while the ambient temperatures ranged between 3 and 25 °C, the greenhouse conditions attained 4–41 °C (Fig. 4), due to solar radiation. Despite these extreme temperatures, the cultivation medium only varied between 7 and 35 °C (Fig. 4), which

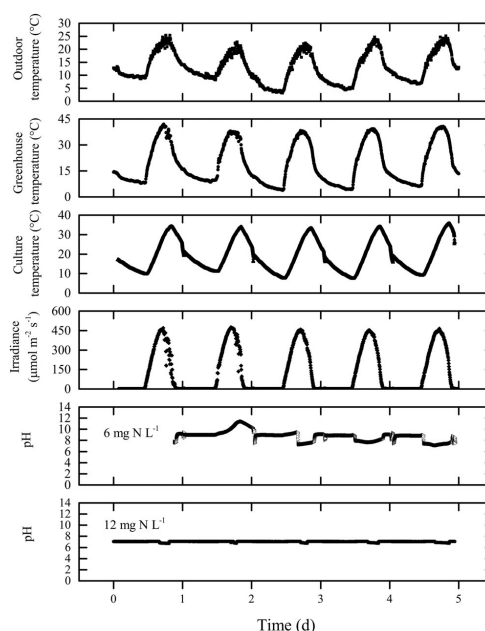


Figure 4. Time course of environmental parameters during operation of bubble column photobioreactor BC-PBR in greenhouse conditions. 6, and 12 mg N L⁻¹ correspond to 9 and 19 mg N g⁻¹ DCW, respectively.

was lower than the 40 °C reported in outdoor conditions during the fall and winter seasons for the cultivation of *S. obtusiusculus*.⁸ The greenhouse reduced considerably the incident irradiance on BC-PBR and reached up to 475 μmol m⁻² s⁻¹ during the daytime (Fig. 4). This condition was lower compared to that reported earlier⁸ and from 2300 to 3000 μmol m⁻² s⁻¹ from the outdoor conditions.³⁸ During 24 h N feast–famine cycles, the pH varied from 7 to 11 when the system was operated at a semi-continuous mode and with an initial N concentration of 6 mg N L⁻¹ (9 mg N g⁻¹ DCW) in the BG-11 modified medium (Fig. 4), compared to the stable pH around 7 with 12 mg N L⁻¹ (19 mg N g⁻¹ DCW). At higher N concentration, the pH is maintained through the CO₂ supply to the culture medium, to compensate for the alkalization induced by both the CO₂ uptake and nitrate consumption by microalgae.^{44,45}

The BC-PBR was operated in batch mode for about 7 days before starting the 24 h N feast–famine cycle. The average specific concentrations per cycle were 9 and 19 mg N g⁻¹ DCW, respectively, for each N concentration of 6 and 12 mg N L⁻¹. Despite the temperature in the cultivation broth being outside the optimum reported for microalga growth (35 °C),¹⁶ biomass productivity attained an average of 536 ± 27 and 667 ± 33 mg L⁻¹ d⁻¹ when the system was fed with 6 and 12 mg N L⁻¹ (9 and 19 mg N g⁻¹ DCW) at the onset of each cycle under semi-continuous operation, respectively. The enhanced biomass productivity was in accordance with the increase in the N load to the BC-PBR. Consequently, lipid productivity reached values of 118 ± 7 and 142 ± 10 mg L⁻¹ d⁻¹ during

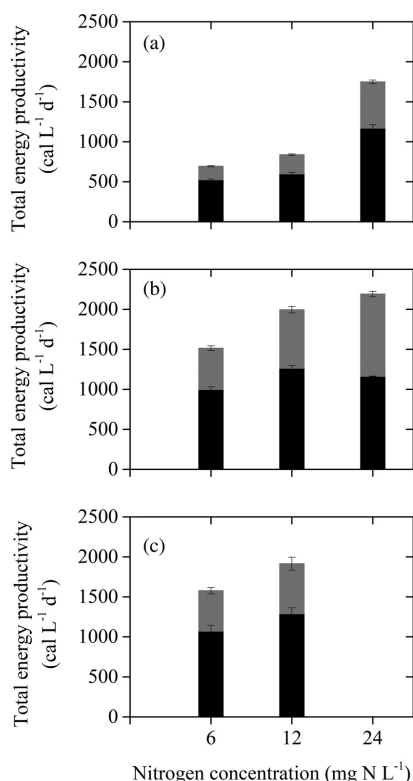


Figure 5. Energy productivity obtained at different N feast–famine cycles with different N concentrations in the flat panel photobioreactor FP-PBR for (a) 72 h cycle, (b) 24 h cycle and (c) in the bubble column photobioreactor BC-PBR for 24 h cycle at greenhouse conditions. Lipid (black bars) and carbohydrates (grey bars). In the FP-PBR 6, 12 and 24 mg N L⁻¹ correspond to 9.3, 18.6 and 40.3 mg N g⁻¹ DCW, respectively; and in the BC-PBR 6 and 12 mg N L⁻¹ correspond to 9 and 19 mg N g⁻¹ DCW, respectively.

24 h N feast–famine cycles with an N concentration of 6 and 12 mg N L⁻¹ (9 and 19 mg N g⁻¹ DCW) in the fresh medium, respectively. Similarly, *S. obliquus* in a semi-continuous cultivation outdoors reached a lipid productivity of 183 mg L⁻¹ d⁻¹ under N depletion (Table 2).³³ Lower values were obtained with *Chlorella* sp. GN1 under continuous cultivation (54% DCW)³⁸ and *S. obtusiusculus* AT-UAM (45% DCW) under batch operation.⁸ However, the reported low lipid productivity ranging from 17 to 67 mg L⁻¹ d⁻¹ (Table 2) was not considered, as the cost efficiency of biodiesel production is focused on high lipid productivity.⁴⁶

Regarding carbohydrate productivity in *S. obtusiusculus* AT-UAM, 137 ± 18 and 169 ± 14 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively, were obtained through 24 h N feast–famine cycles with an N concentration of 6 and 12 mg N L⁻¹ (9 and 19 mg N g⁻¹ DCW) at the onset of each cycle in a semi-continuous operation. In our study, the carbohydrate productivity was higher than the 47 mg L⁻¹ d⁻¹ achieved by *Porphyridium purpureum* cultured outdoors (Table 2).⁴⁰

Fig. 5 shows the total energy production and the contribution of lipids and carbohydrates for all experiments. The energy was accumulated mainly into lipids for the 72 h N feast–famine cycle, rather than into carbohydrates. The lipid contribution represented around 71% of the energy produced and carbohydrates supplied only 29%. For the 24 h N feast–famine cycle, the balance changed, as the lipid share was of around 62% and that of carbohydrates was 38%. Besides, the 24 h N feast–famine cycles obtained an increase of 2.2, 2.4 and 1.3 times in energy productivity for an initial N concentration 6, 12 and 24 mg N L⁻¹ (9.3, 18.6, and 40.3 mg N g⁻¹ DCW), compared to that of the 72 h N feast–famine cycles. The total energy productivity reached under greenhouse conditions was similar to that found in indoor conditions (24 h N feast–famine cycles). The lipid energy content was slightly higher than that in indoor conditions (Fig. 5). Globally, *S. obtusiusculus* AT-UAM preferably stored energy as lipids.

Therefore, the greenhouse conditions created a favorable environment for the growth and improved productivities of *S. obtusiusculus* AT-UAM in the BC-PBR, as opposed to cultivation under controlled condition in FP-PBR during 24 h N feast–famine cycles.

Biotechnological application and techno-economic feasibility

Through the cultivation of microalgae, multiple benefits can be obtained such as the capture of CO₂, wastewater treatment and production microalgae biomass, which has the potential to be valorized as a bioproduct.⁴⁷ The results demonstrated the ability of *S. obtusiusculus* AT-UAM to accumulate high-energy compounds as lipids and carbohydrates during N feast–famine cycles under semi-continuous operation. Besides, biomass productivity optimized under outdoor conditions resulted in an increase in lipid productivity. Thus, *S. obtusiusculus* AT-UAM confirmed its potential as a biofuel source. Nevertheless, the biotechnological application and techno-economic feasibility of the process must be carefully assessed on a case-by-case basis. The cost competitiveness of biofuel from microalgal biomass over fossil fuels is dependent on biomass yields and their high calorific value.⁴⁸ The maximum energy productivity yielded per day of lipid reached in this work was observed during 24 h N feast–famine cycles under indoor and outdoor conditions, while carbohydrates energy productivity was lower than that of lipids (Fig. 5).

Factors such as cultivation mode, biomass harvesting, oil extraction and conversion of lipids to biodiesel are key for biodiesel production from microalgae.⁴⁶ Likewise, the lipid profile as fatty acid methyl esters is a determining factor in biodiesel production.⁴⁹ The palmitic and oleic acids present in the lipids *S. obtusiusculus* AT-UAM biomass can be used as suitable feedstock for the production of biodiesel.^{8,13} Biodiesel production through the transesterification process can yield 1 g of biodiesel for 1 g of lipids of algal biomass, whereas 10 000 tons of microalgae biomass containing 30% DCW of lipid could reach a price of US \$2.8 L⁻¹, including investment cost, tax and marketing cost, where the biodiesel cost was US \$4.34 per gallon.⁵⁰ Nevertheless, bioethanol production from *Chlorella vulgaris* biomass with 55% DCW of carbohydrates was investigated at an industrial scale where the techno-economic analysis revealed a total bioethanol production cost of US \$2.22 million per annum with a bioethanol yield of approximately 92%.¹¹ Moreover, the use of flue gas as a carbon source during aeration can increase microalgal biomass productivity and reduce costs by 19–39%.¹⁷

The biomass of *S. obtusiusculus* AT-UAM can serve as a viable substrate for anaerobic digestion to produce biogas;⁵¹ production of up to 193 mL CH₄ g volatile solids added⁻¹ from thermally hydrolysed microalga biomass was reported. Similarly, the methane content in the biogas was enhanced up to 83% v/v from the monodigestion of thermochemical microalgal hydrolysate biomass of *S. obtusiusculus* AT-UAM and co-digestion with cheese whey.⁵² Furthermore, the potential to produce biohydrogen by *S. obtusiusculus* AT-UAM has been explored through a thermochemical pre-treatment.⁵³ Thus, *S. obtusiusculus* AT-UAM biomass can be used as feedstock to produce biofuels such as biodiesel, bioethanol and methane contained in the biogas or biohydrogen.

The strategy was successfully implemented under controlled conditions, at a lab scale, and under greenhouse conditions for culturing *S. obtusiusculus* for lipid accumulation under nutritional stress. Future works should be focused on adapting operations under real conditions, defining a feeding/dosing strategy for a low-cost N source and CO₂ from flue gas (by dilution or on demand), and long-term operations. Finally, it is important to consider the susceptibility of biological contamination and displacement of inoculated strain under the semicontinuous regime.

CONCLUSIONS

Novel operation strategies (semi-continuous cultivation and N feast–famine cycles) were evaluated in *S. obtusiusculus* AT-UAM. The microalga was able to accumulate energy compounds as lipids and carbohydrates during N feast–famine cycles. Through 24 h N feast–famine cycles, the maximum biomass productivity indoors and under greenhouse conditions were 536 and 667 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively. Besides, increased lipid productivity was achieved with values of 139 ± 4 and 142 ± 10 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively, while the maximum carbohydrate productivity reached an average of 198 ± 7 mg L⁻¹ d⁻¹ in indoor conditions. This study therefore reasserts the potential of *S. obtusiusculus* AT-UAM to simultaneously produce renewable energy and capture CO₂ under various conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financial supported by FSE SENER-CONACYT (247006) cluster gaseous biofuels and the CEMIEBIO gaseous biofuels. Support from the Regional Government of Castilla y León and the EU-FEDER (CLU 2017-09 and UIC 071) is also gratefully acknowledged. The authors thank the National Council of Science and Technology (CONACYT, Mexico) for the PhD grant of Pierre Louis Gorry, and Fundación Carolina (Spain) for the mobility grant of Roxana Ángeles.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Pierre-Louis Gorry: data curation, investigation, writing – original draft preparation; Roxana Ángeles: visualization, data curation, writing – original draft preparation; Sergio Revah: supervision, formal data analysis and discussion, writing –review and editing; Marcia Morales-Ibarria: conceptualization, experimental design, data curation and analysis, funding acquisition, supervision,

writing – review and editing. All authors have approved the final manuscript.

STATEMENT OF INFORMED CONSENT, HUMAN/ANIMAL RIGHTS

No conflicts, informed consent, or human or animal rights are applicable to this study.

REFERENCES

- Wilberforce T, Olabi AG, Sayed ET, Elsaid K and Abdelkareem MA, Progress in carbon capture technologies. *Sci Total Environ* **761**:143203 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143203>.
- Steffen W, Rockström J, Richardson K, Lenton TM, Folke C, Liverman D *et al.*, Trajectories of the earth system in the anthropocene. *Proc Natl Acad Sci* **115**:8252–8259 (2018). <https://doi.org/10.1073/pnas.1810141115>.
- Kamkeng ADN, Wang M, Hu J, Du W and Qian F, Transformation technologies for CO₂ utilisation: current status, challenges and future prospects. *Chem Eng* **409**:128138 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128138>.
- Chisti Y, Biodiesel from microalgae. *Trends Biotechnol* **26**:126–131 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.
- Ho SH, Huang SW, Chen CY, Hasunuma T, Kondo A and Chang JS, Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresour Technol* **135**:157–165 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100>.
- Nayak M, Suh WI, Chang YK and Lee B, Exploration of two-stage cultivation strategies using nitrogen starvation to maximize the lipid productivity in *Chlorella* sp. HS2. *Bioresour Technol* **276**:110–118 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.111>.
- San Pedro A, González-López CV, Acien FG and Molina-Grima E, Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: influence of culture parameters and lipid production rates in tubular photobioreactors. *Bioresour Technol* **169**:667–676 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.052>.
- Sánchez-García L, Cabello J, Jiménez-García LF, Revah S and Morales-Ibarria M, Enhancing the lipid content of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM by controlled acidification under indoor and outdoor conditions. *Algal Res* **51**:102024 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102024>.
- Yang H, He Q and Hu C, Feasibility of biodiesel production and CO₂ emission reduction by *Monoraphidium dybowskii* LB50 under semi-continuous culture with open raceway ponds in the desert area. *Bio-technol Biofuels* **11**:1–14 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1068-1>.
- Bhatia SK, Bhatia RK, Jeon JM, Kumar G and Yang YH, Carbon dioxide capture and bioenergy production using biological system: a review. *Renew Sustain Energy Rev* **110**:143–158 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.070>.
- Hossain N, Mahlia TMI, Zaini J and Saidur R, Techno-economics and sensitivity analysis of microalgae as commercial feedstock for bioethanol production. *Environ Prog Sustain Energy* **38**:1–14 (2019). <https://doi.org/10.1002/ep.13157>.
- Xue Z, Yu Y, Yu W, Gao X, Zhang Y and Kou X, Development prospect and preparation technology of edible oil from microalgae. *Front Mar Sci* **7**:402 (2020). <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00402>.
- Toledo-Cervantes A, Morales M, Novelo E and Revah S, Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresour Technol* **130**:652–658 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.081>.
- Santos AM, Wijffels RH and Lamers PP, pH-upshock yields more lipids in nitrogen-starved *Neochloris oleoabundans*. *Bioresour Technol* **152**:299–306 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.079>.
- Gour RS, Garlapati VK and Kant A, Effect of salinity stress on lipid accumulation in *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp.: feasibility of stepwise culturing. *Curr Microbiol* **77**:779–785 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01860-z>.
- Cabello J, Toledo-Cervantes A, Sánchez L, Revah S and Morales M, Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and

- deplete conditions. *Bioresour Technol* **181**:128–135 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.034>.
- 17 Aziz MMA, Kassim KA, Shokravi Z, Jakarni FM, Lieu HY, Zaini N et al., Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: a review. *Renew Sustain Energy Rev* **119**:109621 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109621>.
 - 18 Martínez-Macias R, Meza-Escalante E, Serrano-Palacios D, Gortáres-Moroyoqui P, Ruiz-Ruiz PE and Ulloa-Mercado G, Effect of fed-batch and semicontinuous regimen on *Nannochloropsis oculata* grown in different culture media to high-value products. *J Chem Technol Biotechnol* **93**:585–590 (2018). <https://doi.org/10.1002/jctb.5405>.
 - 19 Mathimani T, Bhumathi D, Shan Ahamed T, Dineshbabu G, Deviram G, Uma L et al., Semicontinuous outdoor cultivation and efficient harvesting of marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 with minimum solid co-precipitation and high floc recovery for biodiesel. *Energy Convers Manage* **149**:13–25 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.06.077>.
 - 20 APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd edn. American Public Health Association, Washington, DC (2017).
 - 21 Mishra SK, Suh WI, Farooq W, Moon M, Shrivastav A, Park MS et al., Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresour Technol* **155**:330–333 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>.
 - 22 Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**:350–356 (1956). <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
 - 23 Toledo-Cervantes A, Garduño Solórzano G, Campos JE, Martínez-García M and Morales M, Characterization of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for high-energy molecules accumulation: deeper insight into biotechnological potential of strains of the same species. *Biotechnol Rep* **7**:16–23 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.11.009>.
 - 24 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265–275 (1951). [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
 - 25 Han F, Huang J, Li Y, Wang W, Wan M, Shen G et al., Enhanced lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* through the culture strategy of semi-continuous cultivation with nitrogen limitation and pH control by CO₂. *Bioresour Technol* **136**:418–424 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.017>.
 - 26 Subramanian S, Barry AN, Pieris S and Sayre RT, Comparative energetics and kinetics of autotrophic lipid and starch metabolism in chlorophytic microalgae: implications for biomass and biofuel production. *Biotechnol Biofuels* **6**:1–12 (2013). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-150>.
 - 27 Wang Y, Chiu SY, Ho SH, Liu Z, Hasunuma T, Chang TT et al., Improving carbohydrate production of *Chlorella sorokiniana* NIES-2168 through semi-continuous process coupled with mixotrophic cultivation. *Biotechnol J* **11**:1072–1081 (2016). <https://doi.org/10.1002/biot.201500270>.
 - 28 Yuan Y, Liu H, Li X, Qi W, Cheng D, Tang T et al., Enhancing carbohydrate productivity of *Chlorella* sp. AE10 in semi-continuous cultivation and unraveling the mechanism by flow cytometry. *Appl Biochem Biotechnol* **185**:419–433 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2667-1>.
 - 29 Möllers KB, Cannella D, Jørgensen H and Frigaard NU, Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation. *Biotechnol Biofuels* **7**:1–12 (2014). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-64>.
 - 30 Ho SH, Li PJ, Liu CC and Chang JS, Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour Technol* **145**:142–149 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.119>.
 - 31 Ho SH, Nakanishi A, Ye X, Chang JS, Hara K, Hasunuma T et al., Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy. *Biotechnol Biofuels* **7**:1–16 (2014). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-97>.
 - 32 Mayers JJ, Vaiciulyte S, Malmhäll-Bah E, Alcaide-Sancho J, Ewald S, Godhe A et al., Identifying a marine microalgae with high carbohydrate productivities under stress and potential for efficient flocculation. *Algal Res* **31**:430–442 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.034>.
 - 33 Feng P, Yang K, Xu Z, Wang Z, Fan L, Qin L et al., Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. *Bioresour Technol* **173**:406–414 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.123>.
 - 34 Remmers IM, Hidalgo-Ulloa A, Brandt BP, Evers WAC, Wijffels RH and Lamers PP, Continuous versus batch production of lipids in the microalgae *Acutodesmus obliquus*. *Bioresour Technol* **244**:1384–1392 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.093>.
 - 35 Cheirsilp B and Torpee S, Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour Technol* **110**:510–516 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125>.
 - 36 Romero-Villegas GI, Fiamengo M, Acien-Fernández FG and Molina-Grima E, Utilization of centrate for the outdoor production of marine microalgae at the pilot-scale in raceway photobioreactors. *J Environ Manage* **228**:506–516 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.006>.
 - 37 Moreira JB, Terra ALM, Costa JAV and Morais MG, Utilization of CO₂ in semi-continuous cultivation of *Spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass composition. *Braz J Chem Eng* **33**:691–698 (2016). <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160333s20150135>.
 - 38 Feng P, Xu Z, Qin L, Asrafal Alam M, Wang Z and Zhu S, Effects of different nitrogen sources and light paths of flat plate photobioreactors on the growth and lipid accumulation of *Chlorella* sp. GN1 outdoors. *Bioresour Technol* **301**:122762 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122762>.
 - 39 Liu J, Yao C, Meng Y, Cao X, Wu P and Xue S, The Δf/Fm'-guided supply of nitrogen in culture medium facilitates sustainable production of TAG in *Nannochloropsis oceanica* IMET1. *Biotechnol Biofuels* **11**:168 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1168-y>.
 - 40 Fuentes-Grünewald C, Bayliss C, Zanain M, Pooley C, Scalamacchia M and Silkina A, Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using fourier transform infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production. *Bioresour Technol* **189**:357–363 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.042>.
 - 41 Hanifzadeh MM, García EC and Viamajala S, Production of lipid and carbohydrate from microalgae without compromising biomass productivities: role of Ca and Mg. *Renew Energy* **127**:989–997 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.05.012>.
 - 42 Brindhadevi K, Mathimani T, Rene ER, Shanmugam S, Chi NTL and Pugazhendhi A, Impact of cultivation conditions on the biomass and lipid in microalgae with an emphasis on biodiesel. *Fuel* **284**:119058 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119058>.
 - 43 Liang M-H, Wang L, Wang Q, Zhu J and Jiang J-G, High-value bioproducts from microalgae: strategies and progress. *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**:2423–2441 (2019). <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1455030>.
 - 44 Chi Z, O'Fallon JV and Chen S, Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends Biotechnol* **29**:537–541 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.006>.
 - 45 Scherholz ML and Curtis WR, Achieving pH control in microalgal cultures through fed-batch addition of stoichiometrically-balanced growth media. *BMC Biotechnol* **13**:39 (2013). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-39>.
 - 46 Ananthi V, Raja R, Carvalho IS, Brindhadevi K, Pugazhendhi A and Arun A, A realistic scenario on microalgae based biodiesel production: third generation biofuel. *Fuel* **284**:118965 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118965>.
 - 47 Angeles R, Rodero R, Carvajal A, Muñoz R and Lebrero R, Potential of microalgae for wastewater treatment and its valorization into added value products, in *Application of Microalgae in Wastewater Treatment*, ed. by Gupta S and Bux F. Springer, Cham, pp. 281–315 (2019). https://doi.org/10.1007/978-3-030-13909-4_13.
 - 48 Borowitzka MA and Moheimani NR, Sustainable biofuels from algae. *Mitig Adapt Strat Glob Chang* **18**:13–25 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10227-010-9271-9>.
 - 49 Shuba ES and Kifle D, Microalgae to biofuels: 'promising' alternative and renewable energy, review. *Renew Sustain Energy Rev* **81**:743–755 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.042>.
 - 50 Rajesh Banu J, Preethi, Kavitha S, Gunasekaran M and Kumar G, Microalgae based biorefinery promoting circular bioeconomy: techno

- economic and life-cycle analysis. *Bioresour Technol* **302**:122822 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122822>.
- 51 Cortés-Carmona M, Tapia-Rodríguez A, Morales M, Celis LB, Alatríste-Mondragón F and Razo-Flores E, Methane production from thermally pretreated *Scenedesmus obtusiusculus* biomass in semi-batch reactors at low reaction times. *Biochem Eng J* **136**:61–68 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.05.006>.
- 52 Rincón-Pérez J, Celis LB, Morales M, Alatríste-Mondragón F, Tapia-Rodríguez A and Razo-Flores E, Improvement of methane production at alkaline and neutral pH from anaerobic co-digestion of microalgal biomass and cheese whey. *Biochem Eng J* **169**:107972 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107972>.
- 53 Rincón-Pérez J, Razo-Flores E, Morales M, Alatríste-Mondragón F and Celis LB, Improving the biodegradability of *Scenedesmus obtusiusculus* by thermochemical pretreatment to produce hydrogen and methane. *Bioenergy Res* **13**:477–486 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10067-w>.