

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe Escrito Final

**Cultivo de *Neochloris cohaerens* en un fotobiorreactor helicoidal tubular
para la producción de carotenoides con capacidad antioxidante**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar por el grado de
Licenciatura en Biotecnología**

**Luz Benavides Tercero
(206990525)**

**Campus Omar Dengo
Heredia 2022**

Este trabajo de graduación fue APROBADO por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.

RODOLFO
UMAÑA
CASTRO
(FIRMA)

Firmado digitalmente por
RODOLFO UMAÑA
CASTRO (FIRMA)
Fecha: 2023.03.07
15:53:02 -06'00'

M.Sc. Rodolfo Umaña Castro

Representante, Decano, quién preside

ANGEL
FRANCISCO
HERRERA ULLOA
(FIRMA)

Firmado digitalmente por
ANGEL FRANCISCO
HERRERA ULLOA (FIRMA)
Fecha: 2023.03.07
14:43 -06'00'

Director

NARCY
VILLALOBOS
SANDI (FIRMA)

Firmado digitalmente
por NARCY VILLALOBOS
SANDI (FIRMA)
Fecha: 2023.03.07
14:00:23 -06'00'

Licda. Nancy Villalobos Sandí

Tutora

MARIA DEL
MILAGRO CARVAJAL
OSES (FIRMA)

Firmado digitalmente por
MARIA DEL MILAGRO
CARVAJAL OSES (FIRMA)
Fecha: 2023.03.07 13:51:22
-06'00'

M.Sc. Milagro Carvajal Oses

Asesora

Dr. Felix López Figueroa

Asesor

SILVIA MARIA
RAMIREZ
FLORES (FIRMA)

Firmado digitalmente
por SILVIA MARIA
RAMIREZ FLORES
(FIRMA)
Fecha: 2023.03.07
16:01:09 -06'00'

Licda. Silvia Ramírez Flores

Invitada especial

Agradecimiento

Agradezco especialmente a mi familia por darme ánimos e impulsarme a trabajar en mi crecimiento y formación profesional. Gracias por acompañarme en todo momento.

Al Parque Marino de Pacífico y a los profesores, Luis Vega Corrales, Carola Scholz, Víctor Álvarez Valverde, Frank Solano Campos, Luis Roberto Villegas Peñaranda y Abad Rodríguez Rodríguez por abrirme las puertas de sus laboratorios.

A mi tutora por la ayuda, tiempo y confianza para permitirme realizar este trabajo bajo su proyecto y hacer de su laboratorio una segunda casa.

A mis asesores Milagro Carvajal Oses y Félix López Figueroa por sus consejos y por guiarme durante todo este proceso.

A mis compañeros de la UNA, Lucía, Alex, Kenneth, Tahiris y Lolita por su apoyo y consejos.

Agradezco a la Universidad Nacional por su financiamiento mediante el fondo FOCAES-INVESTIGACIÓN 2018. Estos fondos se destinaron en parte a la construcción de un sistema de cultivo y a la compra de reactivos, entre otros.

Dedicatoria

Le dedico este trabajo final a mi familia por su dedicación y sacrificio durante todos estos años. Gracias por ser un ejemplo para mí de perseverancia y apoyo incondicional.

Índice

Miembros del tribunal	I
Agradecimiento	III
Dedicatoria.....	IV
Índice	V
Índice de cuadros	VI
Índice de figuras	VII
Abreviaturas o acrónimos.....	VIII
Resumen	IX
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2. Justificación	5
1.3. Planteamiento del problema.....	7
1.4. Objetivos.....	7
1.4.1. Objetivo general	7
1.4.2. Objetivos específicos.....	8
2. Marco Teórico	8
3. Marco Metodológico	21
4. Resultados.....	28
5. Discusión	36
6. Conclusiones.....	50
7. Recomendaciones	51
8. Referencias	52
9. Anexos	71

Índice de cuadros

Cuadro 1. Características hidrodinámicas y de diseño	31
Cuadro 2. Cinética de crecimiento	32
Cuadro 3. Ecuaciones de regresión lineal	32

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del fotobiorreactor helicoidal tubular de 30 L de capacidad.	19
Figura 2. Esquema de la columna de 5 L de capacidad.....	20
Figura 3. Curvas de crecimiento de <i>N. cohaerens</i> por peso seco en la columna (A) en el fotobiorreactor helicoidal tubular (B).....	28
Figura 4. Curvas de crecimiento de <i>N. cohaerens</i> por contenido de pigmentos en la columna (A), en el fotobiorreactor helicoidal tubular (B) y contenido de clorofilas totales por gramo de biomasa seca (C).....	29
Figura 5. Curva de rendimiento cuántico efectivo YII (A) y pH (B) en ambos sistemas de cultivo.....	30
Figura 6. Contenido de pigmentos en extractos de biomasa verde y estresada obtenida de ambos sistemas de cultivo.	33
Figura 7. Cromatogramas de extractos de la biomasa verde y estresada obtenida de la columna de 5L (A) y (B) y de la biomasa verde y estresada obtenida del fotobiorreactor helicoidal (C) y (D). (Luteína (1) y β -Caroteno (2)).....	34
Figura 8. Porcentaje de inhibición de los extractos de biomasa verde y estresada obtenidos de ambos sistemas de cultivo.....	35

Abreviaturas o acrónimos

UNA	Universidad Nacional de Costa Rica
LABMA	Laboratorio de Biotecnología en Microalgas
ECB	Escuela de Ciencias Biológicas
UTEX	Universidad de Texas

Resumen

Las microalgas constituyen una fuente de nuevos pigmentos y compuestos antioxidantes con potencial uso a nivel industrial. Así mismo el diseño de sistemas de cultivo mejora día con día para permitir la producción de nuevas especies de microalgas que no se han cultivado anteriormente. Se evaluó la eficiencia de un fotobiorreactor helicoidal tubular mediante el cultivo de *Neochloris cohaerens* (Chlorophyta) con el fin de producir carotenoides con capacidad antioxidante. El sistema fue capaz de proveer las condiciones necesarias para el cultivo de esta especie y rendir biomasa apta para procesos posteriores de estrés. Se obtuvo una concentración máxima de biomasa de 1.39 ± 0.08 g/L, la productividad promedio fue de 76.52 ± 17.13 g/m³d¹ y la productividad aérea de 1.70 ± 0.38 g/m²d¹. Se identificaron deficiencias en el sistema en cuanto a la mezcla del cultivo y productividad de biomasa por área iluminada, así mismo, fue evidente la necesidad de un control de pH frecuente y ajuste de la irradiancia dentro del cultivo para evitar fluctuaciones que perjudiquen su desempeño. En cuanto a la presencia de carotenoides, fue posible identificar la presencia de luteína y β -caroteno en la biomasa obtenida, sin embargo, se requiere más estudios para profundizar en el mecanismo de estrés y mejorar la producción de estos pigmentos. El estrés aplicado no rinde los resultados esperados ya que la biomasa verde no estresada mostró valores mayores en contenido de pigmentos y capacidad antioxidante de los extractos. Este trabajo sienta un punto de partida para el estudio de esta especie y muestra su potencial para su uso en la industria.

1. Introducción

Los microorganismos fotosintéticos representan una fuente alternativa de metabolitos de interés comercial debido a su rápido crecimiento y facilidad de cultivo. Entre los pigmentos que producen las microalgas, uno de los más relevantes son los carotenoides, esto por sus diversas aplicaciones para la industria. Estudios recientes también reconocen la importancia de los carotenoides para la salud humana debido a su actividad antioxidante por lo que la producción de estos de forma intensiva es importante para la industria farmacéutica.

1.1 Antecedentes

Las microalgas son ampliamente utilizadas con fines biotecnológicos para la obtención de metabolitos de interés comercial. Para este fin se han desarrollado diversos sistemas de cultivo que intensifican la producción y permiten satisfacer la demanda por las industrias (He et al., 2017). Las primeras iniciativas para el cultivo de microalgas en sistemas abiertos inician poco tiempo después la segunda guerra mundial. Posteriormente, en 1952 centros de investigación en Estados Unidos como el Instituto Carnegie de Washington destacan los principales obstáculos tecnológicos y el potencial de estos microorganismos como fuente de nutrientes (Grivalský et al., 2019).

En los años 60's y 70's países como Japón, Israel y Australia incursionan en el cultivo comercial de las microalgas. En Japón, se experimentó con sistemas abiertos de circulación de 20 m de diámetro para el cultivo de *Chlorella*, de modo que para finales de los 80 habían cerca de 46 plantas industriales en toda Asia, con producciones cercanas a los 1000kg de biomasa al mes (Ishika et al., 2017). A principios de los años 70 México inicia los primeros cultivos de *Spirulina*, mientras que a finales de los 80's, Australia se posiciona en tercer lugar entre los productores más grandes de la industria con dos plantas de producción para el cultivo de *Dunaliella salina* (Costa et al., 2019; Silva et al., 2020).

A finales de los 80's ya eran evidentes las limitaciones de productividad de los sistemas abiertos con fines comerciales y la necesidad de tener un cultivo aislado de toda contaminación (Grivalský et al., 2019). La implementación de fotobiorreactores cerrados

permitió ampliar la gama de microorganismos cultivables y mejorar el control sobre las condiciones. Desde entonces múltiples investigadores han diseñado y evaluado variantes de fotobiorreactores tubulares (Carlozzi & Torzillo, 1996; Lee et al., 1995; Molina et al., 2001).

Los fotobiorreactores helicoidales empleados actualmente derivan del diseño realizado por Robinson y compañía en 1987 (Hall et al., 2003). Estos sistemas, también conocidos como Biocoil, permiten trabajar con volúmenes de cultivo más grandes en espacios reducidos. Así mismo, la disposición de los tubos hace posible captar con mayor eficiencia la luz solar y controlar la temperatura, además, su escalamiento es más sencillo en comparación con otros diseños (Sukačová et al., 2021).

Para incrementar el volumen de trabajo en un fotobiorreactor helicoidal basta con aumentar el número de anillos del sistema; sin embargo, al incrementar el tamaño del fotobiorreactor se hacen evidentes algunas de sus limitaciones. El aumento de anillos, y por consiguiente de altura impide que la luz natural incida en el interior del sistema, lo que hace necesario compensarla con iluminación artificial desde el interior (Acién et al., 2013). Del mismo modo, la energía necesaria para bombear el medio de cultivo a los anillos superiores incrementa los costos. Este bombeo a pesar de promover el intercambio de nutrientes y mejorar la productividad puede ocasionar daños en las células por exceso de presión en el sistema (Hashemi et al., 2020).

A pesar de sus limitaciones, los fotobiorreactores helicoidales se han empleado con éxito en el cultivo continuo y semi-continuo de especies como *Nannochloropsis* sp., *Phaeodactylum tricornutum* y *Spirulina platensis* (Acién et al., 2003; Briassoulis et al., 2010). Recientemente se reportó el cultivo de *Chlorella sorokiniana* en un fotobiorreactor tipo Biocoil. En este estudio los autores concluyeron que el tipo de sistema de cultivo puede influenciar algunas de las características cualitativas de la biomasa obtenida como por ejemplo un menor contenido de metil esterres de ácidos grasos (FAMES) (Concas et al., 2016). En otro estudio realizado por el Laboratorio de Microalgas del Instituto Oceanográfico

de Venezuela se comparó el contenido de pigmentos del cultivo de *Arthrospira maxima* en dos tipos de fotobiorreactores en donde se demostró que el tipo de fotobiorreactor debe ser seleccionado de acuerdo con el microorganismo y el metabolito de interés ya que un sistema helicoidal puede ser más efectivo para la producción de pigmentos liposolubles. Por el contrario, un fotobiorreactor cilíndrico es más eficiente para la acumulación de ficobiliproteínas (Romero et al., 2017).

Los sistemas cerrados como los fotobiorreactores tubulares son los más empleados con fines comerciales para la obtención de metabolitos de alto valor. Este es el caso de *Haematococcus pluvialis* cultivada en plantas industriales en países como Israel, Nueva Zelanda y Estados Unidos, entre otros. Esta microalga posee pigmentos como la astaxantina el cual es de interés para el mercado de los productos farmacéuticos y de cuidado personal (Barsanti & Gualtieri, 2018; Morocho-Jácome et al., 2022). Otras microalgas como *D. salina* y *Nannochloropsis* sp. destacan por su producción de β -carotenos y ácido eicosapentanoico (EPA) respectivamente (Chua & Schenk, 2017; Koller et al., 2014). Por otra parte, representantes del género *Neochloris* constituyen una potencial fuente de lípidos para la industria bioenergética, por lo que han sido ampliamente estudiados (Norsker et al., 2021).

El conocimiento de que la síntesis de metabolitos secundarios responde a factores de estrés impulsó varias investigaciones en esta línea con *Neochloris oleoabundans*. Se encontró que la deficiencia de nitrógeno o fósforo en el medio podía promover el rendimiento de lípidos obtenido (Jaeger et al., 2018). Trabajos posteriores se centraron en encontrar la concentración óptima de nitrógeno considerando otros factores como la fuente de carbono y la temperatura (Gouveia et al., 2009; Safi et al., 2021).

El cultivo de *N. oleoabundans* en fotobiorreactores laminares -también conocidos como flat-panel- fue realizado por Pruvost et al. (2009). En este estudio se encontró que el rendimiento de triacilglicerol era similar con y sin limitación de nitrógeno. Además, contrario a lo esperado, la mayor productividad de lípidos totales se observó en el cultivo sin

limitación de nitrógeno, lo cual fue atribuido al alto contenido de lípidos totales de la microalga. Por su parte, Santos et al (2012) mediante el cultivo de *N. oleoabundans* en un fotobiorreactor semejante al del estudio anterior, demostraron el efecto sinérgico de combinar la ausencia de nitrógeno con otros factores como la alcalinidad del medio.

N. oleoabundans también es valorada como fuente de pigmentos, por lo que varios investigadores han caracterizado su composición de carotenoides y evaluado distintas técnicas para el procesamiento a gran escala de forma eficiente (Banskota et al., 2019). Castro-Puyana et al. (2017) optimizaron la extracción de los pigmentos empleando la técnica de extracción líquida presurizada con distintos solventes reconocidos como seguros. Otros han propuesto alternativas naturales de agentes floculantes como el quitosano, siendo éste más efectivo que el sulfato de hierro y de aluminio (Beach et al., 2012). Algunos investigadores ante la necesidad de reducir los costos de producción de biocombustibles, estudiaron la biomasa de *N. oleoabundans* como posible fuente de lípidos y co-productos de valor. Encontraron que las condiciones de cultivo que promueven la producción de lípidos, al mismo tiempo perjudican la acumulación de carotenoides (Hajar et al., 2017).

El potencial de *N. oleoabundans* es evidente y varios investigadores latinoamericanos así lo reconocen. La gran mayoría de estudios realizados se enfocan en el cultivo de este microorganismo para la obtención de biocombustibles (Fernández-Linares et al., 2008; Garibay-Hernández et al., 2013). En menor medida se encuentran las investigaciones sobre otros metabolitos de interés comercial como los carotenoides (Reyes et al., 2016).

En Costa Rica, el Parque Marino del Pacífico dispone de varios fotobiorreactores helicoidales empleados para producir algas que se utilizan para la alimentación de peces juveniles y otros organismos acuáticos. Este sistema les ha permitido optimizar la producción de *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis* sp. e *Isochrysis galbana* ya que es posible obtener cultivos de una alta densidad celular en un espacio reducido (Carvajal-Oses et al., 2018).

1.2. Justificación

Con el creciente mercado de los compuestos bioactivos, el cultivo de microorganismos para la obtención de metabolitos va en aumento. Entre estos, las microalgas constituyen un grupo polifilético de gran valor para la biotecnología debido a la variedad de metabolitos que producen, su eficiencia fotosintética y alta tasa de crecimiento (Moreno-García et al., 2017). El aporte nutricional de estos organismos y su capacidad para sintetizar compuestos antioxidantes e inmuno-estimulantes resulta importante para las industrias alimenticia y farmacéutica (Vieira et al., 2020).

El uso de las microalgas para diversos fines como la acuicultura, la industria bioenergética y farmacológica, promueve la búsqueda de nuevas formas de cultivo más eficientes y rentables. La necesidad de obtener grandes cantidades de biomasa para estas industrias ha derivado en el cultivo intensivo de las microalgas. Se han desarrollado varios sistemas de producción y la selección del mismo es crítica ya que depende de la finalidad del cultivo y de la especie (Acién et al., 2013). Los sistemas abiertos como los “raceways” son los más utilizados para la producción a gran escala de biomasa microalgal. Son más simples de operar y utilizan la energía solar, sin embargo, los cultivos tienden a ser bastante diluidos (D’Alessandro & Antoniosi Filho, 2016; Travieso et al., 2001).

Por el contrario, en los sistemas cerrados y reactores de capa fina es posible alcanzar una concentración celular más elevada y mantener una buena productividad sin verse afectada por el efecto sombra (Grivalský et al., 2019). Adicionalmente, es una de las mejores alternativas para obtener compuestos específicos libres de contaminación (Benavente-Valdés et al., 2016). Por otra parte, el control de las condiciones de cultivo hace posible dirigir la maquinaria metabólica hacia la producción de compuestos como lípidos de alto valor energético, proteínas y pigmentos para su uso como aditivos alimenticios (Urreta, Ikarán, Janices, Ibañez, Castro-Puyana, Castañón, Suarez-Alvarez, 2014).

Los fotobiorreactores son los sistemas de cultivo más utilizados para la producción de metabolitos específicos a partir de una sola especie de microalga. Estos sistemas permiten tener un control más efectivo sobre factores como la luz y la temperatura. Uno de los más utilizados es el fotobiorreactor tubular debido a su mayor superficie de iluminación y a su alto rendimiento de biomasa por área (Ugwu et al., 2008). Algunas variantes de estos sistemas se caracterizan por la disposición de los tubos la cual puede ser horizontal, vertical y en espiral. Esta última tiene la ventaja de que permite tener mayor volumen de cultivo en un espacio reducido, lo que permite su uso en interiores y bajo condiciones de laboratorio (Legrand et al., 2021).

Es posible obtener una gran variedad de pigmentos a partir de las microalgas, sin embargo, los que más relevancia han tomado son los carotenoides por sus diversas aplicaciones. Pigmentos producidos por *Hematococcus pluvialis* y *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Volvocales) como la astaxantina y el β -caroteno respectivamente, reciben especial atención ya que se acumulan en grandes cantidades y son fuertes antioxidantes (Solovchenko & Neverov, 2017). Muchos estudios han demostrado el efecto positivo de estos metabolitos para la salud humana; por ejemplo, son capaces de funcionar como neuroprotectores, previenen la aparición de problemas cardiovasculares, visuales y protegen la piel ante daños por luz UVA y UVB (Fernández-García, 2014). Además de los carotenoides mencionados anteriormente se tiene conocimiento de otros como la violaxantina y la fucoxantina que ayudan en la recuperación posterior a un esfuerzo físico (De Jesus Raposo et al., 2015).

Las microalgas pertenecientes al género *Neochloris* (Chlorophyceae) son ampliamente conocidas por su alto contenido lipídico bajo condiciones de estrés (Safi et al., 2021). Muchos estudios han evaluado las condiciones idóneas de cultivo para la obtención de biomasa apta para la producción de biocombustibles. De esa forma se ha establecido el efecto de la salinidad, el exceso de luz y la limitación o ausencia de nitrógeno en el medio sobre la composición de la biomasa obtenida (Santos et al., 2014).

Debido al evidente potencial de estos microorganismos como fuente de productos de interés para la industria, es que la implementación de un fotobiorreactor en donde se cultive en forma intensiva y a gran escala las microalgas es fundamental en la actualidad. Es por esto por lo que el propósito de esta investigación es la evaluación del cultivo de *Neochloris cohaerens* en un fotobiorreactor helicoidal tubular para producir carotenoides antioxidantes para valorar su potencial uso biotecnológico.

1.3. Planteamiento del problema

El creciente mercado para los compuestos nutracéuticos deriva en la necesidad de cultivar microorganismos de forma intensiva para obtener metabolitos de interés comercial, lo cual genera la siguiente pregunta, ¿Cuál es la eficiencia de un fotobiorreactor helicoidal tubular para la producción de carotenoides con actividad antioxidante utilizando la microalga *Neochloris cohaerens*?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la eficiencia de un fotobiorreactor tubular en la producción de carotenoides con actividad antioxidante mediante el cultivo de la microalga *Neochloris cohaerens* para su eventual uso en la industria.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Comparar la cinética de crecimiento de *Neochloris cohaerens* en un cultivo a pequeña escala (5 Litros) y en un fotobiorreactor helicoidal tubular (30 Litros) mediante la medición de algunos de sus parámetros fisiológicos.
2. Determinar la producción de carotenoides de *Neochloris cohaerens* en un cultivo a pequeña escala y en el fotobiorreactor mediante un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (UHPLC) acoplado a un detector de arreglo de diodos.
3. Determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de *Neochloris cohaerens* en ambos sistemas de producción mediante la técnica de estabilidad del radical DPPH.

2. Marco Teórico

2.1. Microalgas

El término microalga se utiliza para referirse a aquellos microorganismos fotosintéticos, sean unicelulares o multicelulares. Constituyen un grupo polifilético puesto que se incluyen tanto procariotas como eucariotas (Alves et al., 2017). Son organismos cosmopolitas importantes para todos los ecosistemas en los que habitan (Hu et al., 2018) y su gran valor biotecnológico se debe a su rápido crecimiento, su capacidad de fijar carbono y por acumular una variedad de metabolitos de interés comercial (Moreno-Garcia et al., 2017).

Las microalgas cumplen un papel fundamental en los ambientes acuáticos y terrestres en donde son la base de la cadena alimenticia y los principales productores primarios, intervienen en el ciclo del carbono, y tienen efecto sobre el clima (Koutra et al., 2018; Ramanan et al., 2016). Así mismo, son las responsables de transformar grandes cantidades de compuestos inorgánicos en biomasa, algunos de ellos dañinos como es el caso del CO₂ y los nitratos. A su vez, las microalgas son buenas indicadoras de la salud del ecosistema ya que responden a los cambios en el ambiente. Su composición química brinda información importante, por lo que son una buena herramienta de monitoreo *in-situ* (Ogburn & Vogt, 2017).

A pesar de las importantes funciones que poseen las microalgas en todos los ambientes, también pueden ocasionar graves daños debido a su acelerado crecimiento. Las grandes cantidades de materia orgánica depositadas en las zonas costeras desencadenan floraciones algales. Estas traen consigo el deterioro del medio por anoxia, alteración de la cadenas alimenticia y en algunos casos, la producción de toxinas perjudiciales para la vida acuática y humana (Figuerola et al., 2018; Skulberg, 2000).

Para el sector industrial, las microalgas representan una excelente fuente de materia prima y metabolitos de alto valor. Su cultivo con fines comerciales inició en los años 60's y su biomasa se destinaba principalmente a la obtención de pigmentos y para el sector de la acuicultura (Koller et al., 2014; Matos, 2017). Actualmente estos microorganismos son

cultivados cada vez más para consumo humano y para la formulación de suplementos alimenticios, siendo *Chlorella* una de ellas. Una de las plantas de producción más grandes se ubica en Taiwán, con una producción de más de 400 toneladas al año (Milledge, 2011).

El uso comercial de los pigmentos microalgales ha permitido el desarrollo de nuevas tecnologías para su producción y procesamiento. El mercado para los pigmentos naturales se estimaba en 1,5 billones de dólares para el 2020 y su valor está por encima de otros compuestos como lípidos y proteínas (Ambati et al., 2019). Microalgas como *D. salina*, *H. pluvialis* y la cianobacteria *Spirulina platensis* son las principales fuentes de β -caroteno, astaxantina y ficocianinas respectivamente, siendo el mercado del β -caroteno el más grande (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016).

Por otro lado, las microalgas oleaginosas son muy valoradas para la producción de biodiesel ante la demanda de alternativas a los combustibles fósiles. Los biocombustibles a partir de estos microorganismos fotosintéticos tienen la ventaja de no ocupar tierras cultivables como es el caso de otras fuentes vegetales. Del mismo modo, su uso final permite aprovechar efluentes de otras industrias o aguas residuales como fuente de nutrientes (Oh et al., 2018). Compañías como Cellana Inc. y IHI Co. realizan el cultivo de especies como *Nannochloropsis* spp. y *Botryococcus braunii* para este fin (Maeda et al., 2018).

Otras especies como *N. oleoabundans* han sido ampliamente estudiadas por su alto contenido de lípidos, característica de gran valor para la producción de biodiesel. El género *Neochloris* fue descrito por primera vez en 1955 por Starr. En su estudio, se comparaban varias Chlorococcales productoras de zoosporas. Esto derivó en la caracterización de *Neochloris aquatica* la cual fue aislada de un acuario en la Universidad de Indiana (Archibald, 1973; Watanabe & Flod, 1989). En los siguientes tres años, Bold y sus estudiantes describieron seis especies más, *N. gelatinosa*, *N. terrestris*, *N. fuisopora*, *N. minuta*, *N. pyrenoidosa* y *N. alevolaris*. Bold, en los años posteriores continuó la

investigación con este género logrando identificar un total de 16 especies (Deason et al., 1991).

El género *Neochloris* se compone tanto de especies terrestres como de agua dulce las cuales se encuentran ampliamente distribuidas (Archibald & Smith, 1987). Algunas especies se han aislado de campos de caña de azúcar y maíz en Cuba y Jamaica, como es el caso de *N. minuta*, *N. pyrenoidosa*, *N. fuispora* y *N. terrestris*, de dunas de arena de Arabia Saudita como *N. oleoabundans*. Otras como *N. conjuncta*, *N. aquatica*. y *N. wimmeri* se han aislado de cuerpos de agua dulce en la República Checa, Eslovaquia, India y Estados Unidos (Hiibel et al., 2015; Jaiswar et al., 2017).

El potencial de *Neochloris* para la industria bioenergética se debe su composición bioquímica. Se ha documentados la capacidad de algunas de sus especies para hacer frente a condiciones de estrés lumínico o de nutrientes mediante la acumulación de triacilgliceroles (TAG). Esto ha promovido su uso para la producción de biocombustibles. Puede alcanzar valores de TAG hasta de 40 % de su peso seco, los que a su vez representan un 80% de los lípidos totales (Santos et al., 2014). Del mismo modo, de su biomasa se obtienen pigmentos como los carotenoides de utilidad como colorantes, antioxidantes y suplementos alimenticios (Safafar et al., 2015).

2.2. Sistemas de cultivo

El uso de las microalgas o sus metabolitos en los distintos sectores industriales ha requerido del desarrollo de sistemas de cultivo que permitan proporcionar todas las condiciones necesarias para el crecimiento de la forma más eficiente posible (Gupta et al., 2015). Para el cultivo de microorganismos fotosintéticos se dispone de una gran variedad de sistemas abiertos y cerrados. Cada uno de estos sistemas posee una serie de ventajas y

desventajas que deben ser consideradas para seleccionar el más adecuado. Esto dependerá de las necesidades, la especie y el propósito del cultivo (Bani et al., 2021).

El cultivo de las microalgas tradicionalmente se ha realizado en sistemas abiertos como lagunas naturales o artificiales de poca profundidad. El control sobre las condiciones de cultivo es mínimo y su diseño simple admite su construcción con materiales de bajo costo y facilita su operación, lo cual es una gran ventaja a nivel industrial (Legrand et al., 2021). Mejoras a estos sistemas como los mecanismos de circulación que poseen los “raceways” (o canales de flujo abierto), permiten tener una mejor circulación de los nutrientes y las células, asegurando que éstas se movilicen por toda la columna en zonas de luz y oscuridad (Rayen et al., 2019).

Entre sus ventajas se destaca los bajos costos de operación, ya que utilizan luz natural y en el caso de las especies marinas, el medio de cultivo consiste en agua marina enriquecida. Sin embargo la imposibilidad de evitar variaciones de temperatura, pH, dilución o evaporación excesiva limitan en gran medida su uso (Rodríguez-Torres et al., 2021). Al ser estos sistemas abiertos expuestos a contaminación, son pocas las especies cultivables. Hay microalgas que crecen rápidamente y compiten mejor que otras siendo capaces de alcanzar una buena densidad celular, aun cuando el cultivo presente contaminación. Sin embargo, la gran mayoría de especies requieren condiciones fijas y su cultivo en los sistemas abiertos se hace imposible o poco rentable (Lam et al., 2018).

En respuesta a las necesidades que dejaban los sistemas abiertos surgen los fotobiorreactores cerrados, en los cuales es posible tener un control estricto de las condiciones del cultivo. Lo anterior ha hecho posible el cultivo de las especies con una distribución limitada en todo el mundo al eliminar las barreras ambientales. Actualmente hay una gran variedad de diseños y variantes que han sido evaluados con múltiples especies. Se ha documentado su escalamiento y uso con fines comerciales (Deprá et al., 2019). Los sistemas cerrados son los más adecuados para el cultivo de cepas delicadas que requieren de

un control estricto de las condiciones. Así mismo, este tipo de fotobiorreactores son necesarios cuando el cultivo está dirigido hacia la producción de compuestos para la industria alimenticia o farmacéutica que deben estar libres de toda contaminación (Mobin & Alam, 2017).

Entre los principales fotobiorreactores cerrados están los tubulares, los laminares y de columna, siendo los primeros dos los más empleados con fines comerciales. Cada uno difiere en cuanto a tipo y velocidad del flujo dentro del sistema, la razón superficie- volumen, la transferencia de masa liquido-gas, la irradiancia, y los ciclos de luz y oscuridad que se empleen, entre otros. Estas características los hacen idóneos o no para el cultivo de ciertas especies (Gupta et al., 2015).

Los fotobiorreactores tubulares se pueden clasificar dependiendo de la disposición de los tubos en caso de ser vertical, horizontal o en espiral, sin embargo, generalmente todos poseen las mismas partes. Se componen de un sistema de tubos de material transparente y diámetro pequeño, y una bomba que mantiene el cultivo en constante movimiento. Acoplado a este sistema está un tubo colector y un desgasificador que permiten el escape de los gases generados por el cultivo y evita el exceso de presión (Ación et al., 2013). En algunos casos, de acuerdo con las necesidades es posible acoplar equipos de control y monitoreo que automatizan el proceso, como por ejemplo calentadores, sistemas de enfriamiento, sondas de oxígeno disuelto, CO₂, pH, y densidad óptica (Briassoulis et al., 2010).

La constante optimización de los fotobiorreactores condujo a un diseño que permitiera mejorar el rendimiento por área de los sistemas. La disposición en espiral de los tubos hace de los fotobiorreactores helicoidales una excelente alternativa que permiten su uso tanto en interiores como exteriores (Singh & Sharma, 2012). Este diseño, también llamado Biocoil, fue propuesto por Robinson y compañía en 1987, y se ha utilizado con diversas especies a pequeña y gran escala (Hall et al., 2003).

Los fotobiorreactores helicoidales poseen múltiples ventajas como una mayor productividad aérea. Esto debido a que al ocupar un menor espacio, el aprovechamiento de la luz por unidad de área que ocupa el sistema es mayor en comparación con los fotobiorreactores horizontales (De Vree et al., 2015). La disposición de los tubos permite que la captación de la luz solar sea más eficiente durante todo el año e incrementa la relación superficie/volumen. Además, de ser necesario es posible compensar con luz artificial desde el interior de la espiral (Carvalho et al., 2006; Raes et al., 2014).

La necesidad de obtener la mayor cantidad de biomasa de la forma más rápida y económica posible promueve el escalamiento de los sistemas de cultivo. En este sentido, los fotobiorreactores permiten incrementar la capacidad de producción al tiempo que se reducen los costos (Grobbelaar, 2012). El principal objetivo del cultivo a gran escala responde a la creciente demanda de biomasa como materia prima para la industria. Tal es el caso de los combustibles puesto que ante el inminente agotamiento de los combustibles fósiles la seguridad energética es primordial. A pesar de que aún no es comercialmente sostenible su producción, muchas empresas han incursionado en esta línea (Khan et al., 2018).

De hecho, muchos países han apostado por el desarrollo de plantas de cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles. Hawaii ha destinado fondos federales y estatales en investigación, y se ha construido varias plantas de cultivo a gran escala como General Atomics, Phycal y Cyanotech, esto con el objetivo de reducir su dependencia de combustibles fósiles, ya que más del 90% de su energía proviene de esta fuente (Quinn et al., 2012). En Brasil y México también se ubican empresas como TerraVia Holdings y Sapphire Energy que se dedican al cultivo de especies como *Chlorella* spp., *Prototheca* spp., *Scenedesmus dimorphus* y *Nannochloropsis* spp. Su producción se destina a la obtención de ácidos grasos poli-insaturados y lípidos en general para cosméticos y alimentos (Maeda et al., 2018).

2.3. Compuestos de las microalgas

Las microalgas además de ser atractivas como fuente de biocombustibles y nutrientes para la industria alimenticia producen compuestos bioactivos de gran potencial para la industria farmacéutica. Poseen ácidos grasos esenciales, pigmentos, proteínas y enzimas que representan beneficios para la salud (Villarruel-López, Ascencio, & Nuño, 2017). Algunos de estos metabolitos poseen actividad antioxidante lo cual es de gran valor para diversos sectores industriales. Por esta razón es importante conocer el metabolismo de las microalgas ya que este conocimiento permite su manipulación para la producción de compuestos específicos (Cirulis et al., 2013).

En un ambiente rico en oxígeno, el principal inconveniente con el que deben lidiar los sistemas biológicos es el estrés oxidativo; para ello, las microalgas poseen una serie de mecanismos que les permite afrontarlo (Cirulis et al., 2013). Este estrés oxidativo se debe a un desbalance entre las especies prooxidantes y antioxidantes, lo cual tiene efectos dañinos para otras moléculas importantes. Este proceso puede ser causado por procesos exógenos como la exposición a toxinas o radiación ionizante, y por procesos endógenos como la respiración celular (Sies, 2018).

Los antioxidantes son compuestos que al interactuar con otras especies reactivas inhiben o retardan la oxidación de sustratos evitando de este modo daños a moléculas vitales (Cirulis et al., 2013). Los antioxidantes se dividen en dos grupos, los enzimáticos como la catalasa, superóxido dismutasa, la glutatión reductasa y peroxidasa; y los no enzimáticos como las vitaminas, minerales, carotenoides, amino ácidos tipo micosporina y polifenoles. Así mismo, dependiendo de su origen se clasifican en endógenos, si son sintetizados por el organismo o exógenos si proviene de la dieta (Carocho & Ferreira, 2013).

Entre los metabolitos antioxidantes más relevantes extraídos de las microalgas se encuentran los pigmentos. Estos compuestos poseen una función fotoprotectora ante el

exceso de radiación y son muy utilizados en la formulación de alimentos funcionales y productos nutraceuticos. Los pigmentos se clasifican en tres grandes grupos, los carotenoides, las clorofilas y las ficobilinas (Koyande et al., 2019). Los que más relevancia han tomado por sus diversas aplicaciones son los carotenoides. Estos son compuestos lipofílicos que se encargan de absorber luz y proteger el aparato fotosintético de daños causados por exceso de energía (Gong & Bassi, 2016). Por su composición se clasifican en xantofilas y carotenos. Las primeras poseen oxígeno en su estructura, como la astaxantina y la zeaxantina extraídas de *Haematococcus pluvialis* y *Porphyridium cruentum*. Por el contrario, los carotenos no poseen oxígeno como los β carotenos y el licopeno extraídos de *Dunaliella salina* (De Jesus Raposo, De Morais, & De Morais, 2015).

Así mismo, se pueden diferenciar por las condiciones bajo las cuales se producen como carotenoides primarios o secundarios. Los primeros son sintetizados en condiciones óptimas o poseen funciones estructurales. Por el contrario, los carotenoides secundarios se generan como respuesta a un estímulo y su función es proteger al organismo en condiciones adversas (Guedes et al., 2011). Además de proteger los fotosistemas y complejos antena ante un exceso de luz UV, mantienen la integridad de las membranas en ambientes de baja temperatura y exceso de salinidad, factores que afectan la fluidez de las mismas (Varela et al., 2015).

La luteína es un pigmento amarillo perteneciente a las xantofilas, sintetizada por organismos fotoautotróficos en donde está asociado al fotosistema II y funciona como pigmento accesorio para la absorción de luz cercana a los 450nm. Su síntesis es regulada por las condiciones de cultivo como lo es la luz y la concentración de nitrógeno en el medio (Kijlstra et al., 2012). *Muriellopsis* sp., *Desmodesmus* sp. y *Chlorella sorokiniana* son las microalgas más aptas para la producción industrial debido a su alto contenido del luteína, facilidad de cultivo y requerimientos nutricionales simples (Safafar et al., 2015).

Por otro lado, otras xantofilas como la astaxantina y la cantaxantina reciben especial atención ya que se acumula en grandes cantidades en vesículas lipídicas fuera del cloroplasto

y es un fuerte antioxidante. La presencia de grupos hidroxilo que aumenta su polaridad y la capacidad de encontrarse en su forma esterificada le confiere características únicas. *H. pluvialis* es capaz de acumular astaxantina en concentraciones hasta de 8% por peso seco (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016; Guerin et al., 2003). Por su parte, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis* sp, *Chlorella zofingiensis* y *Dactylococcus dissociatus* son reconocidas como buenas fuentes de cantaxantina fucoxantina y violaxantina., cuyo consumo está aprobado en Australia, Nueva Zelanda, la Unión Europea y Estados Unidos (Esatbeyoglu & Rimbach, 2017; Matos, 2017)

De las microalgas también es posible obtener otros compuestos de valor como los polifenoles, los cuales también se asocian al control del estrés oxidativo. A pesar de que generalmente se obtiene de plantas, se ha demostrado que hay microalgas capaces de producirlo en cantidades comparables (Safafar et al., 2015). Hasta el momento se conocen más de 8000 compuestos polifenólicos que van desde los más simples y de bajo peso molecular hasta los más complejos como los taninos. El creciente interés por estos compuestos radica en su capacidad antioxidante, de aquí la importancia de la búsqueda de nuevas fuentes. Las plantas constituyen la fuente tradicional y más estudiada de polifenoles, sin embargo hay estudios que han demostrado que las microalgas podrían ser una fuente alternativa (Oroian & Escriche, 2015).

La capacidad antioxidante de los polifenoles se debe en gran medida a que poseen varios anillos aromáticos con grupos hidroxilo que actúan como donadores de electrones neutralizando de esta forma las especies reactivas (Zhang & Tsao, 2016). Dentro de los polifenoles se encuentran los ácidos fenólicos, los flavonoides y no flavonoides; algunos forman parte de las paredes celulares, mientras que otros se les asocia con funciones fotoprotectoras y reproductivas (Machu et al., 2015). Son pocos los estudios en los que se reporta la presencia de estos compuestos en microalgas, sin embargo se ha demostrado que

son capaces de sintetizar flavonoides e incluso que su producción incrementa con la exposición a factores de estrés (Goiris et al., 2012).

Múltiples estudios han confirmado la presencia de enzimas como la fenilalánina amonio liasa en cianobacterias como *Anabaena* y *Nostoc*. Esta enzima está involucrada en la ruta biosintética del ácido p-cumárico. La presencia de esta enzima supone la posibilidad de que estas microalgas sintetizen este y otros compuestos antioxidantes. Del mismo modo, se determinó la presencia de compuestos fenólicos como el galato y el cinamato en *Spirulina* sp., así como la queercetina y el kampferol en *Scenedesmus quadricauda* (Goiris et al., 2014; Kováčik et al., 2010). Por otra parte se encontró que *Chaetoceros calcitrans* e *I. galbana* poseen elevado contenido de ácido gálico, y que su contenido fenólico se correlaciona con la capacidad antioxidante de sus extractos (Foo et al., 2017).

Entre los principales usos comerciales de los pigmentos se destaca el β caroteno por su uso terapéutico. Sus propiedades anti-inflamatorias son atribuidas a su capacidad antioxidante. Este pigmento se comercializa en cápsulas como suplemento alimenticio para consumo humano ya que en cuanto a su actividad antioxidante, es 100 veces más potente que el α tocoferol, mejor conocido como vitamina E (Sathasivam et al., 2017). La industria cosmética también ha incorporado la astaxantina en la formulación de filtros solares, debido a que estudios previos han demostrado una mayor eficiencia en comparación con el licopeno y el β caroteno, en la reducción de la concentración de especies reactivas producto de la exposición a luz UVB (Fernández-García, 2014).

2.4. Producción intensiva de metabolitos antioxidantes en microalgas

Los pigmentos son los metabolitos antioxidantes más producidos comercialmente. Este es el caso del β caroteno el cual es obtenido de *D. salina*. Esta microalga es capaz de acumular hasta 100g de β caroteno por kg de peso seco. Este carotenoide es producido industrialmente

desde los 80's y algunos de los más grandes productores se encuentran en Australia, China e Israel (Gong & Bassi, 2016). El cultivo intensivo de esta microalga se realiza en dos fases, la primera se centra en la producción de "biomasa verde" bajo condiciones idóneas de crecimiento, y una segunda fase en donde se somete el cultivo a una alta salinidad (Hu et al., 2018).

La compañía más grande en producción de β caroteno es BASF® (Nutrition & Health Division) en Australia con cerca de 740 hectáreas, que cultiva *D. salina* en sistemas abiertos (Maeda et al., 2018). Por otro lado, el productor más grande de *Spirulina* se encuentra en China, con una producción anual de más de 200 toneladas, y sule de materia prima a empresas en todo el mundo. Algunas de las más grandes se ubican en Estados Unidos, Israel, Japón, Taiwán, Tailandia, entre otras (Sathasivam et al., 2017).

Finalmente, hasta el momento se han publicado muchos estudios que evalúan el crecimiento de *N. oleoabundans* bajo diversas condiciones ambientales, de laboratorio, en sistemas cerrados y abiertos. Se ha determinado su composición bioquímica, factores que afectan su crecimiento y desencadenan la producción de metabolitos secundarios (Hajar et al., 2017). El potencial de esta especie para la producción de biocombustibles y otros compuestos de valor es ampliamente reconocido.

En Costa Rica son escasas las iniciativas en esta línea, con esta u otras microalgas. Se cuenta con cultivos unialgaes de *Neochloris* aislados en el país, sin embargo, aún no se ha estudiado sus capacidades. Sumado a esto, no se ha reportado un estudio de este género en fotobiorreactores helicoidales tubulares para la producción de algún metabolito de interés. Por este motivo son necesarias las investigaciones con especies aisladas en el país con el fin de estudiar tanto el crecimiento de las microalgas como sistemas de cultivo que permitan obtener pigmentos que puedan ser comercializables.

3. Marco Metodológico

Esta investigación se encuentra enmarcada dentro del proyecto de la Escuela de Ciencias Biológicas denominado “Producción de pigmentos a partir de microalgas en cultivo intensivo en un fotobiorreactor tubular helicoidal para la generación de productos de valor agregado para la industria” código SIA 0213-17. En dicho proyecto se tenía establecida la construcción de un biorreactor helicoidal tubular con el fin de cultivar varias microalgas y producir metabolitos de interés. Este sistema fue construido específicamente en el Parque Marino en el año 2018 y se trasladó al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas (LABMA) en donde se realizó el escalamiento de la cepa y los cultivos, mientras que procesamiento de la biomasa y extracciones se realizó en el Laboratorio de Docencia en Biotecnología (LABID). Por su parte, el análisis de los pigmentos por UHPLC y la capacidad antioxidante fue realizado en el Laboratorio de Fitoquímica (LAFIT).

Diseño de investigación y descripción de las variables:

Construcción de los sistemas de cultivo:

El fotobiorreactor helicoidal tubular estaba conformado por una malla de metal cilíndrica de 0.73 m de diámetro y 1.90 m de altura sobre la cual se enrollaron dos mangueras semitransparentes reforzadas de 48.4 m de largo (96.8 m en total), 2.54 cm de diámetro interno y con una inclinación de 2 grados. Un tubo de 10 cm de diámetro y 1.40 m de alto, acoplado al sistema de mangueras, sirvió como colector. En la parte superior del tubo colector se colocó un desgasificador para permitir el escape de la presión. En la parte inferior del sistema de mangueras se conectaron las entradas de aire que movilizaban el medio de cultivo de forma ascendente mientras que la inyección de CO₂ se realizó en el tubo colector. La inyección de aire se hizo mediante un soplador Hailea modelo ACO 9720 con una potencia de 20 W y un flujo de aire de 30 L/min. La fuente de luz artificial fue de 8 tubos LEDs de 15

W, una temperatura de 6500 K (Green Electric Light) y se ubicó en la parte interna de la estructura cilíndrica. Este sistema fue construido en Junio del 2018 y un esquema del mismo se muestra en la **Figura 1**.

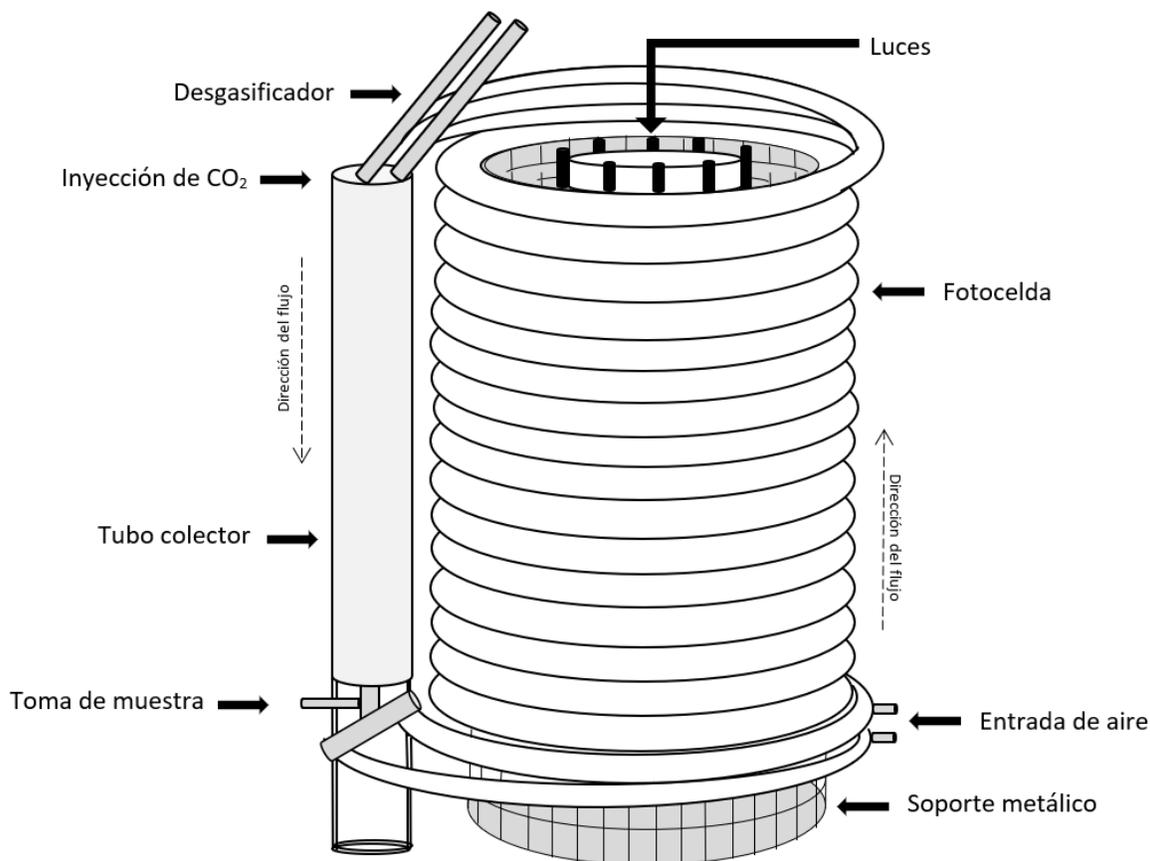


Figura 1. Esquema del fotobiorreactor helicoidal tubular de 30 L de capacidad.

Por otro lado, el sistema de cultivo de 5 L de capacidad fue construido en agosto del 2018 con una columna de acrílico transparente de 9.5 cm de diámetro y 90 cm de alto. A la base del tubo se adaptó un disco de acrílico para sellar el fondo. En la parte lateral inferior del tubo se colocó una llave de bronce para la toma de muestras, mientras que en la parte superior se adaptó una tapa de acrílico con previstas para la entrada de aire, CO₂ y la colocación de

las sondas de pH y temperatura. En la parte superior se ubicó una sonda de vidrio para la inyección de aire y CO₂ que llegó hasta el fondo del tubo terminando con un difusor flexible para pecera de 60 cm de largo colocado en forma de espiral. La agitación en el sistema la proporcionó la misma inyección de aire en el fondo de la columna por burbujeo constante. La fuente de luz artificial se colocó a un lado de la columna y constó 4 luces LEDs de 9 W (Green Electric Light) y una temperatura de 6500 K. En este sistema la inyección de aire se realizó con una bomba de aire Active Aqua AAPA con una potencia de 12 W y un flujo de aire de 15 L/min. Se muestra una imagen del sistema en la **Figura 2**.

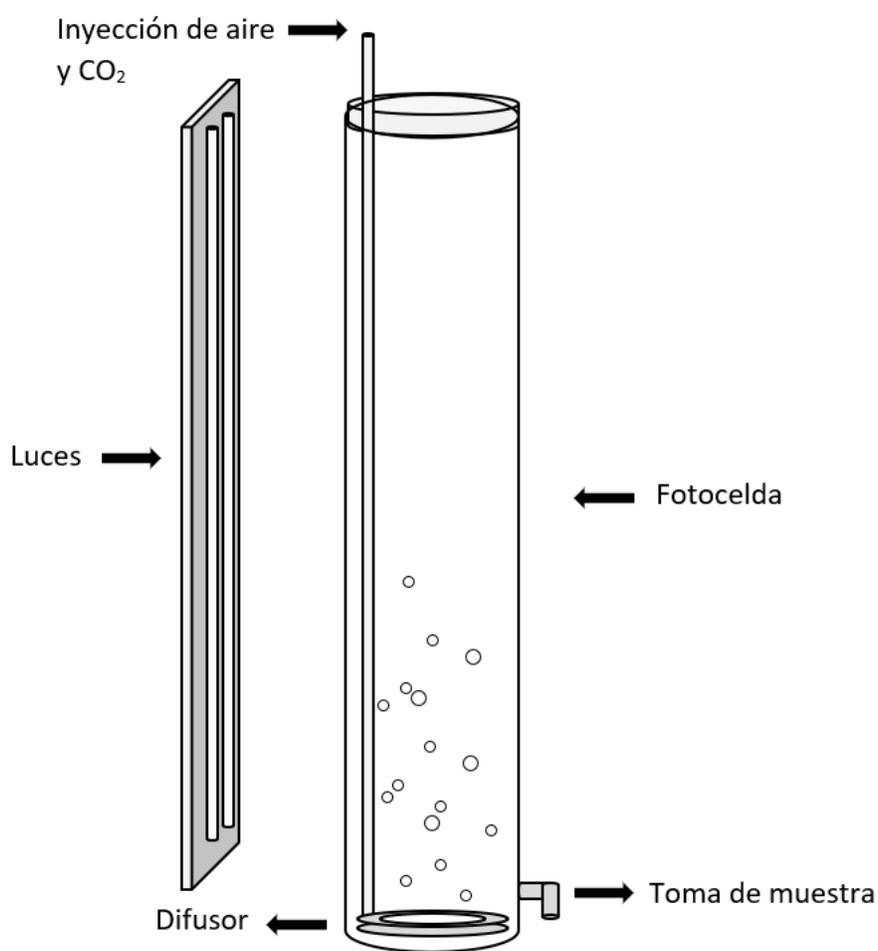


Figura 2. Esquema de la columna de
5 L de capacidad

Obtención de la cepa y preparación de los inóculos:

N. cohaerens (GC-24) fue obtenida de la Algoteca de la Escuela de Ciencias Biológicas (ECB) de la Universidad Nacional (UNA) la cual fue aislada de un suelo cafetalero en Barreal de Heredia, Costa Rica, el 23 de diciembre de 1981 e identificada en ese mismo año mediante características fenotípicas y claves dicotómicas. Esta especie fue descrita por R. D. Groover y H. C. Bold en 1969 y estudiada por Patricia A. Archibald (1973) mediante su cultivo en medio BBM con el tripe (3N) y con la décima parte (0.1N) de la concentración de nitrógeno normal. De esta forma, *N. cohaerens* se diferencia de otras especies del género por ser uninucleada y mantenerse las células adheridas unas con otras. En fase logarítmica las células vegetativas miden de 3 a 15 μm y mantienen su diámetro máximo en fase estacionaria. En un cultivo de 4 semanas en medio BBM con 3N, la biomasa se observa brillante, lisa, granular y de color verde oliva oscuro. Un cultivo de 4 semanas en BBM 0.1N la biomasa toma una coloración verde-amarillenta (Archibald, 1973; Komárek, 1989).

En le presente estudio *N. cohaerens* se cultivó en medio Bristol modificado compuesto por NaNO_3 (0.75 g/L), K_2HPO_4 (0.22 g/L), KH_2PO_4 (0.52 g/L), MgSO_4 (0.11 g/L), FeCl_3 (0.01 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.75 g/L) NaCl (0.75 g/L) y 3 mL de la solución A5 compuesta por EDTA-Fe (1.62 mg/L), H_3BO_3 (2.86 mg/L), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.81 mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (220 mg/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (79 mg/L), $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (39 mg/L) (Wang & Lan, 2011). Para obtener los inóculos se realizaron cultivos en erlenmeyers de 250 mL y se incrementó gradualmente el volumen hasta alcanzar la biomasa necesaria para cada sistema. A partir de un cultivo inicial de 250 mL se incrementó el volumen a 0.5 L luego a 1 L, 3.5 L y 7 L hasta llegar a 14 L en intervalos de 7 a 10 días. Para volúmenes mayores a 3.5 L se utilizó bidones

de agua de 18.9 L de capacidad. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de (24 ± 2) °C con fotoperiodo 16:8 horas luz:oscuridad con una intensidad de luz promedio de $80 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s (medidor PAR ULM 500 y sensor plano con corrección de coseno MQS-B Walz). El pH se mantuvo entre 6 a 7 (Oakton pH 700) mediante la inyección de CO_2 . Al menos dos veces por semana se realizó observaciones al microscopio de los cultivos de *N. cohaerens* con el fin de monitorear su estado en cuanto a contaminación. Además, se monitoreaba las fases que presentaban los cultivos debido a que esta especie presenta una fase pequeña, ovalada y otra fase grande y esférica que sedimenta fácilmente. Todas estas características permitían cuidar hasta cierto punto que se trabajó *N. cohaerens* y no con otra especie desde el escalamiento del inóculo hasta el día final de la cosecha de ambos sistemas.

Condiciones de operación y características hidrodinámicas:

Los sistemas de cultivo fueron desinfectados con cloro y lavados con abundante agua destilada al menos 3 días antes del inicio de la curva de crecimiento. Para el sistema de 5 L el medio de cultivo fue preparado y autoclavado un día antes del inicio de la curva y se estableció un inóculo inicial de 0.15 g/L de biomasa. Para el fotobiorreactor helicoidal se estableció un inóculo inicial de 0.19 g/L de biomasa, el medio de cultivo fue preparado minutos antes de iniciar el ensayo y no fue autoclavado. Todos los materiales utilizados para la preparación fueron desinfectados con alcohol al 70%. El pH fue monitoreado diariamente al momento de la toma de muestra y se ajustó entre 7 a 7.5 mediante la inyección de CO_2 .

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de (24 ± 2) °C sin fotoperiodo con una intensidad de luz promedio de $80\pm 2.65 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s . Este último fue medido previo al inicio del cultivo con un sensor de luz plano (sensor cuántico con coseno corregido MQS-B acoplado a un ULM-500 data logger, Walz). Se colocó el sensor en el centro de la columna o maguera, en caso del sistema helicoidal, sin cultivo ya que el sensor no era sumergible.

El tiempo de mezcla (T_m) el tiempo de circulación (T_c) fueron medidos utilizando como trazador una solución coloreada y una solución ácida respectivamente. El T_m fue medido por triplicado en ambos sistemas de cultivo mediante el método de dilución de colorante (Aubin et al., 2010). Se inyectó un pulso de solución colorante y se determinó el tiempo que le tomó al sistema homogeneizar el colorante en la totalidad del volumen de trabajo. Así mismo, se midió el T_c como el tiempo en que le tomó a un pulso de ácido, dar una vuelta completa en el sistema y ser detectada a la salida de la fotocelda. Para el fotobiorreactor helicoidal, con ayuda de una sonda, se inyectó 25 mL solución de ácido clorhídrico 3 M a la salida del tubo colector, mientras que en la columna de 5 L se inyectó cerca de la base. Con esta información se calculó la velocidad de flujo (U_L).

$$U_L \left(\frac{m}{s} \right) = \frac{d}{t}$$

Los cultivos en ambos sistemas fueron realizados entre noviembre del 2019 y octubre del 2020.

Cinética de crecimiento:

Se tomó una muestra de 40 mL de los cultivos diariamente a la misma hora para conocer la cinética de crecimiento mediante la determinación del peso seco y la fluorescencia de la clorofila por triplicado, mientras que el contenido de clorofila se realizó por duplicado. Para determinar el peso seco de la biomasa (g/L) se utilizaron filtros de fibra de vidrio pre-pesados (Whatman grado GF/F) con un tamaño de poro de 0.2 μ m. Se filtró 5 mL de muestra y los filtros se secaron en la estufa a 120 °C durante 2 horas para luego registrar su peso final (Kern ABJ 230-4NM). El cálculo de la concentración de la biomasa (C_b) por peso seco se obtuvo por diferencia entre el peso del filtro final (P_f) y el peso inicial (P_i) del filtro sin biomasa, dividido entre el volumen de muestra (V), como se muestra en la siguiente ecuación:

$$Cb \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{Pf - Pi}{V}$$

Para determinar el contenido de clorofila (mg/L de cultivo) se utilizó la biomasa húmeda y la extracción se realizó con metanol al 100%, para esto 10 mL de cultivo fueron centrifugados a 2910 g (Hermle z206A Labortechnik GmbH) durante 10 minutos para luego eliminar el sobrenadante. Se cubrió el tubo con papel aluminio para proteger la pastilla celular contra la fotooxidación. Se adicionó de 3 ml a 5 mL de metanol dependiendo de la concentración del cultivo y de los valores de absorbancia. La mezcla fue homogeneizada con ayuda de un vortex y esferas de vidrio para facilitar la disrupción celular. Posteriormente se sometió a un baño ultrasónico (Branson B-52) en hielo durante 10 min y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante 24 h. Luego de este periodo se sometió la mezcla a un segundo baño ultrasónico en hielo durante 10 min y fue centrifugada a 2910 g por 10 min para recuperar el extracto de pigmentos. Finalmente se determinó la absorbancia del extracto a 450, 630, 645, 663, 750 nm en un espectrofotómetro Jasco V-730. El cálculo de la concentración de clorofila *a* (Chla), clorofila *b* (Chlb) y carotenoides (Cx+c) se realizó según Lichtenthaler (1987).

El tercer parámetro para la determinación de la cinética de crecimiento fue la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* por pulsos de amplitud modulada (PAM). Esta técnica fue desarrollada ante la necesidad de estudiar procesos fotosintéticos de una forma no invasiva (Figuerola et al., 2003). Permite conocer el estado fisiológico de los organismos fotosintéticos así como otros procesos relacionados como la producción de oxígeno y la fijación de carbono (Figuerola et al., 2013). Parte de la energía proveniente de la luz es utilizada en procesos fotoquímicos, mientras que el excedente es disipado en forma de calor y reemitida como fluorescencia. La variación en alguna de estas rutas permite conocer el efecto de variables como nutrientes, temperatura, luz, entre otros, sobre la eficiencia fotosintética (Maxwell & Johnson, 2000; Moreno et al., 2008).

Al exponer un organismo fotosintético a un pulso de luz saturante, los centros de reacción se reducen y se inicia la cascada de reacciones redox que ocurren en la membrana tilacoidal. El exceso de energía se libera en forma de fluorescencia para así evitar el daño a los centros de reacción. Un fluorímetro de amplitud modulada (MINI PAM II Walz GmbH, Effeltrich, Germany) fue utilizado para medir la fluorescencia basal de la clorofila antes del pulso de luz saturante (F) y la fluorescencia máxima después del pulso (Fm). La medición se realizó a las muestras en condiciones de luz, para ello se colocó la fibra del fluorímetro sobre la muestra sin introducirla en el cultivo y se dio un pulso de luz saturante. Con estos valores fue posible determinar el rendimiento cuántico efectivo Y(II) mediante la siguiente ecuación:

$$Y(II) = \frac{\Delta F}{Fm'}$$

En donde ΔF representa la diferencia entre la fluorescencia basal y la fluorescencia máxima y Fm' es la fluorescencia máxima en condiciones de luz.

Una vez que el cultivo alcanzó la fase estacionaria, lo cual se verificó mediante análisis de las curvas de crecimiento diariamente, se cosechó toda la biomasa en recipientes para permitir la sedimentación y se almacenó en refrigeración. Al cabo de 24 h se colectó la biomasa sedimentada, se retiró el agua remanente mediante centrifugación a 2254 g (Eppendorf 5929R) por 5 min y se reservó parte de esta para realizar los ensayos de estrés. La biomasa verde restante se congeló -20 °C para luego ser liofilizada (Operon FDU-7012).

A partir de los resultados obtenidos de contenido de clorofila $a+b$ se obtuvo la velocidad de crecimiento μ (d^{-1}) como la pendiente de la ecuación de la recta que relaciona el logaritmo natural de la clorofila $a+b$ ($\mu g/mL$) y el tiempo (días). La productividad de biomasa (Pb) se calculó como la diferencia entre la concentración de biomasa máxima (Cm) y la biomasa inicial (Ci) dividido entre la diferencia de tiempo (t). La productividad por unidad de área ocupada (Pa) (Molina et al., 2001) se obtuvo como el producto de Pb y el volumen del bioreactor (V) entre el área ocupada por el mismo (A). La productividad por unidad de área

iluminada (P_i) se obtuvo de forma similar a P_a (Jorquera et al., 2010). A continuación, se muestran las fórmulas:

$$P_b \left(\frac{g}{m^2 \cdot d} \right) = \frac{C_m - C_i}{\Delta t}$$

$$P_a \left(\frac{g}{m^2 \cdot d} \right) = P_b \frac{V}{A \text{ (ocupada)}}$$

$$P_i \left(\frac{g}{m^2 \cdot d} \right) = P_b \frac{V}{A \text{ (iluminada)}}$$

Cuantificación de carotenoides:

Parte de la biomasa cosechada fue resuspendida en medio de cultivo fresco para ser estresada por agotamiento de nutrientes y promover la producción de carotenoides. La concentración de biomasa con la que se inició el estrés fue la misma concentración máxima alcanzada al final de la curva de crecimiento y el medio utilizado fue Bristol 1/3 de concentración sin nitrógeno. El pH fue monitoreado una vez por semana y no fue ajustado para acelerar el proceso de estrés. Los cultivos se mantuvieron con aireación a una temperatura de (24 ± 2) °C y una intensidad lumínica promedio de $80 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s sin fotoperiodo. Una vez por semana se tomó una muestra de los cultivos para monitorear la coloración de las células bajo el microscopio. Luego de 2 meses se cosechó la biomasa estresada mediante centrifugación a 2910 g (Hermle z206A Labortechnik GmbH), fue liofilizada y almacenada a -20 °C hasta su análisis.

La extracción de los pigmentos de la biomasa se realizó mediante disrupción mecánica (Retsch MM400) con balines de 15 mm y el disolvente empleado fue una mezcla de hexano:etanol 95% en partes iguales. Se pesó 150 mg de biomasa liofilizada y se distribuyó

en 3 tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se les adicionó 250 µL de disolvente y se aplicó 2 ciclos de disrupción de 5 min (30 hertz) alternando con intervalos de enfriamiento en un bloque frio a -20 °C por 2 minutos. Luego, los extractos fueron centrifugados para recuperar el sobrenadante. Se agregó otros 250 uL de disolvente a cada tubo para repetir el proceso de extracción, el volumen final aproximado de extracto recuperado fue de 1700 uL. Posteriormente se filtró el extracto (Millipore Millex-HN 0.45 µm) y se concentró hasta sequedad (Thermo Savant Speedvac SPD1010). El extracto fue resuspendido en un volumen de 2 mL de hexano:etanol 95% (1:1) para continuar con el análisis cromatográfico.

La cuantificación de los carotenoides se realizó en un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (UHPLC) Dionex Ultimate 3000 acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) Ultimate 3000. La separación se llevó a cabo en una columna Thermo C18 (4.6 x 250 mm de diámetro interno, 5µm de tamaño de partícula, Acclaim Polar Advantage II). Se utilizó disolventes grado HPLC tanto para la fase móvil como para las extracciones. Las fases móviles fueron agua acidificada 0.1% (A), metanol (B) y acetona (C) en el siguiente gradiente: a 9 min 9 % A, 76 % B y 15 % C, 15 min 5 % A, 45 % B y 50 % C, de 15 a 17 min 4 % A, 38 % B y 58 % C, de 17 a 25 min 3 % A, 27 % B y 70 % C, de 25 % a 26 % 100 % C, de 26 a 28 min 9 % A, 76 % B y 15 % C. La temperatura de la columna se mantuvo en 20 °C y la lectura se realizó a 440 nm y 480 nm. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 5 µL.

Las curvas de calibración fueron preparadas con estándares de luteína (PHR 1699 Sigma), β-caroteno (PHR 1239 Sigma) diluidos en etanol 95% y hexano respectivamente. Para la luteína se prepararon 6 disoluciones con concentraciones que iban desde 450 ppm hasta 75 ppm mg/mL. Para el β-caroteno se preparó una curva desde 20 ppm a 120 ppm. Las ecuaciones de la curva de calibración para cada uno de los pigmentos permitieron el cálculo de la concentración en los extractos.

Determinación de la actividad antioxidante:

La actividad antioxidante se determinó mediante la técnica de estabilidad del radical DPPH desarrollada por (Brand-Williams et al., 1995). Este método consiste en la neutralización del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo por parte de los compuestos antioxidantes presentes en las muestras observándose un cambio de color de morado a amarillo. Para ello se preparó una solución de DPPH de 0.04 mg/mL en buffer de metanol: agua MilliQ 80:20 (v/v).

Se aplicó el mismo procedimiento de extracción descrito previamente modificando el disolvente de hexano:etanol por metanol. Una vez filtrados los extractos se llevaron a sequedad y posteriormente fueron resuspendidos en metanol. Se prepararon 6 diluciones seriadas desde 1/2 hasta 1/32 utilizando como disolvente el buffer. En una microplaca se colocó 30µL de cada dilución en metanol y el blanco, ambos por triplicado, para luego agregar a cada pozo 270 µL de la solución DPPH. El blanco consistió únicamente en metanol: agua MilliQ 80:20 (v/v).

Adicionalmente se preparó un blanco de la muestra para contrarrestar el efecto del color del extracto el cual impide observar el cambio de color de la reacción. El blanco de la muestra consistía únicamente en 30 µL de cada extracto diluido y 270 µL de buffer, sin adicionar el DPPH. El valor absorbancia corregida de la muestra fue obtenido de la resta de la lectura de la muestra con DPPH y la muestra sin DPPH. Se realizó una lectura inicial de absorbancia a (517nm), incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad para luego tomar una lectura final en un lector de microplacas (Biotek Synergy HT). La actividad antioxidante fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición del DPPH\%} = \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs corregida de la muestra}}{\text{Abs blanco}} \times 100$$

Descripción del análisis a realizar:

Los resultados presentados son el promedio de tres experimentos independientes y su desviación estándar. Se comparó los resultados de ambos sistemas de cultivo en términos de productividad de biomasa, concentración de carotenoides y actividad antioxidante de los extractos para encontrar diferencias significativas aplicando pruebas de T de Student y Wilcoxon.

4. Resultados

Se obtuvo curvas de crecimiento de *N. cohaerens* en los dos sistemas de cultivo utilizados de una duración de 15 días. En la **Figura 3** se observa las curvas por biomasa seca en donde la concentración máxima de biomasa en la columna fue de 0.77 ± 0.04 g/L (**3.A**) mientras que en el fotobiorreactor helicoidal fue de 1.39 ± 0.08 g/L (**3.B**), ambas alcanzadas el día 14. Se observa una mayor desviación entre las réplicas en el fotobiorreactor helicoidal en comparación con la columna, a partir del día 8.

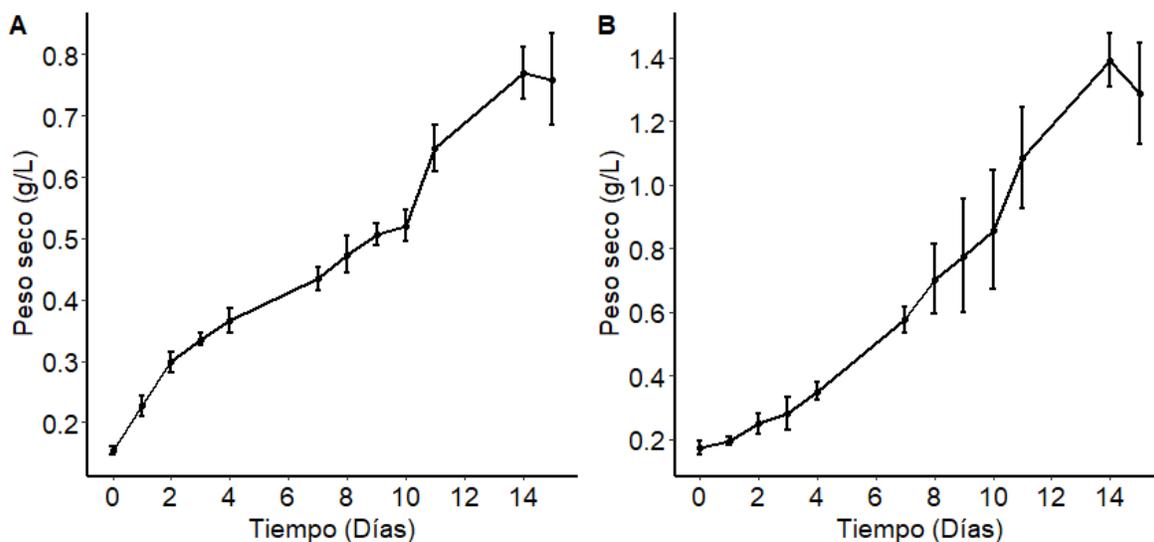


Figura 3. Curvas de crecimiento de *N. cohaerens* por peso seco en la columna (A) y en el fotobiorreactor helicoidal tubular (B).

En la **Figura 4** se muestra las curvas de crecimiento por contenido de pigmentos, en donde se obtuvo una concentración máxima de clorofila *a* de 9.81 ± 0.72 mg/L en la columna de 5L, el día 14 (**4.A**). El comportamiento de la clorofila *b* y carotenoides es muy similar entre sí, con un valor máximo de 3.67 ± 0.20 mg/L y 3.95 ± 0.18 mg/L respectivamente. En el fotobiorreactor helicoidal la concentración máxima de clorofila *a* fue de 19.89 ± 0.58 mg/L, alcanzada el día 9. La concentración máxima de clorofila *b* fue de 7.48 ± 0.31 mg/L registrado el día 10, mientras que el día 9 se registró el valor máximo de carotenoides que fue de 6.83 ± 0.76 mg/L (**4.B**).

Adicionalmente se obtuvo el contenido de clorofilas totales por gramo de biomasa seca (mg/g) (**Figura 4.C**). Se observa un comportamiento similar en ambos sistemas de producción, alcanzando valores máximos cerca de los días 9 y 10 de cultivo. La concentración máxima fue de 32.14 ± 0.47 mg/g en el fotobiorreactor helicoidal y de 23.56 ± 0.68 mg/g en la columna de 5 L.

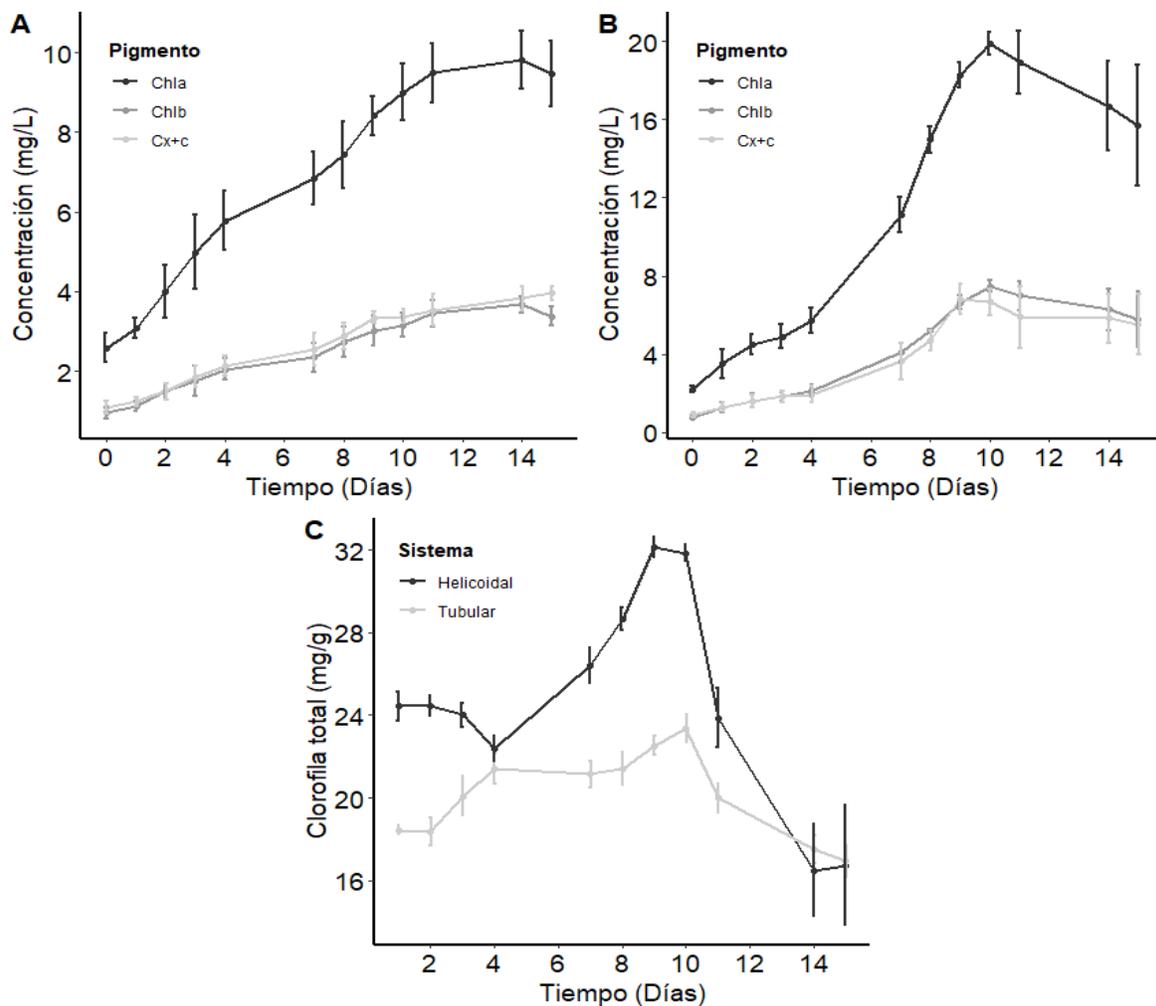


Figura 4. Curvas de crecimiento de *N. cohaerens* por contenido de pigmentos en la columna (A), en el fotobiorreactor helicoidal tubular (B) y contenido de clorofilas totales por gramo de biomasa seca (C).

En la **Figura 5A** se presenta la curva de rendimiento cuántico efectivo de *N. cohaerens* en ambos sistemas de cultivo. En la columna se obtuvo valores menores a 0.6 al inicio del cultivo y después del día 8, en donde se registra una disminución desde 0.64 ± 0.03 a

0.33 ± 0.07 . En el fotobioreactor helicoidal el rendimiento YII osciló entre 0.57 ± 0.05 y 0.68 ± 0.01 , se obtuvo valores mayores a 0.6 únicamente entre los días 7 y 11.

El comportamiento del pH de cultivo se presenta en la **Figura 5B**, en donde se observa los valores registrados previo a la inyección diaria de CO_2 . Ambos cultivos iniciaron con valores de pH cercanos a 6.6 ± 0.01 en la columna y 6.4 ± 0.04 en el fotobioreactor helicoidal. Gradualmente estos valores fueron incrementando hasta alcanzar máximos de 10.14 ± 0.05 y 9.67 ± 0.15 , respectivamente. Los valores diarios registrados en la columna fueron menores a los del cultivo en el sistema helicoidal hasta el día 14.

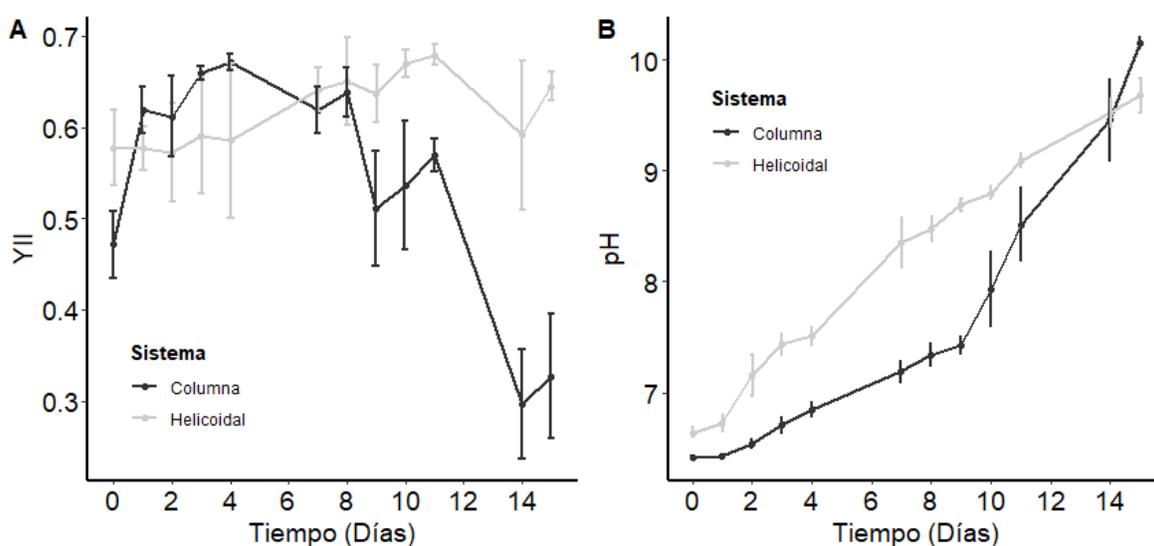


Figura 5. Curva de rendimiento cuántico efectivo YII (A) y pH (B) en ambos sistemas de cultivo.

En el **Cuadro 1** se muestran algunas características de diseño e hidrodinámicas de los sistemas de cultivo empleados. Se determinó el área ocupada como la superficie que ocupa la fotocelda y todos los equipos asociados a él como la bomba de aire, soportes y sistema de luces, que permite la correcta operación. Se observa que el área ocupada por el fotobioreactor helicoidal es cerca de 10 veces mayor al área ocupada por la columna. Por su parte, el área

iluminada definida como toda la superficie de la fotocelda que recibe luz directa artificial, difusa y reflejada del ambiente fue de 7.72 m² en el sistema helicoidal y 0.20 m² en la columna.

La razón S_o/V y S_i/V , parámetros que describen la eficiencia de uso de espacio y la captación de luz, fue de 45 m⁻¹ y 257 m⁻¹ para el fotobiorreactor helicoidal y de 28 m⁻¹ y 40 m⁻¹ para la columna. Por otro lado, la razón V/S que indica el volumen de cultivo que permite el fotobiorreactor por unidad de superficie ocupada, fue mayor para la columna, siendo esta de 35.71 L/ m² y de 22.22 L/ m² para el sistema helicoidal.

En cuanto al tiempo de mezcla (T_m) y de circulación (T_c) fue de 1023±10.41 s y 139±12.17 s respectivamente para el sistema helicoidal y de 22±2.08 s y de 12±2.08 s en la columna. Por último, la velocidad de flujo (U_L) fue de 0.06±0.01 m/s para la columna y de 0.36±0.03 m/s en el fotobiorreactor helicoidal.

Cuadro 1. Características hidrodinámicas y de diseño

Parámetros	Unidad	Columna	Helicoidal
Superficie ocupada (S_o)	m ²	0.14	1.35
Superficie iluminada (S_i)	m ²	0.20	7.72
Razón superficie iluminada/volumen (S_i/V)	m ⁻¹	40	257
Razón superficie ocupada/volumen (S_o/V)	m ⁻¹	28	45
Razón volumen/ superficie (V/S)	L/ m ²	35.71	22.22
Tiempo de mezcla (T_m)	s	22±2.08	1023±10.41
Tiempo de circulación (T_c)	s	12±2.08	139±12.17
Velocidad de flujo (U_L)	m/s	0.06±0.01	0.36±0.03

En cuanto a los parámetros de cinética de crecimiento (**Cuadro 2**) se observa que la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación en ambos sistemas de cultivo fue similar. En el fotobiorreactor helicoidal se obtuvo una velocidad de crecimiento de $0.23\pm 0.02\text{ d}^{-1}$ con un tiempo de duplicación de 3.02 ± 0.30 días, mientras que en la columna de 5L fue de $0.22\pm 0.05\text{ d}^{-1}$ y 3.20 ± 0.45 días, respectivamente.

De igual manera, no se encontró diferencias significativas en cuanto a la productividad de biomasa ($t = 3.51$, $p\text{-value} > 0.05$) y la productividad por área ocupada ($t = 0.97$, $p\text{-value} > 0.05$). En el fotobiorreactor helicoidal se obtuvo un promedio de productividad de biomasa de $76.52\pm 17.13\text{ g/m}^3\text{d}$ y de $1.70\pm 0.38\text{ g/m}^2\text{d}$ de productividad aérea, mientras que en la columna de 5 L fue de $41.29\pm 2.71\text{ g/m}^3\text{d}$ y de $1.47\pm 0.09\text{ g/m}^2\text{d}$, respectivamente.

Por el contrario, se encontró diferencias significativas en la productividad de biomasa por área iluminada ($t = -13.439$, $p\text{-value} < 0.05$), siendo esta de $0.59\pm 0.13\text{ g/m}^2\text{d}$ en el helicoidal y de $2.06\pm 0.13\text{ g/m}^2\text{d}$ en la columna.

Cuadro2. Cinética de crecimiento

Parámetro	Unidad	Columna	Helicoidal
μ	d^{-1}	0.22 ± 0.05	0.23 ± 0.02
Td	d	3.20 ± 0.45	3.02 ± 0.30
Pb	$\text{g/m}^3\text{d}$	41.29 ± 2.71	76.52 ± 17.13
Pa	$\text{g/m}^2\text{d}$	1.47 ± 0.09	1.70 ± 0.38
Pi	$\text{g/m}^2\text{d}$	2.06 ± 0.13	0.59 ± 0.13

Nota: μ : Velocidad de crecimiento, Td: tiempo de generación, Pb: productividad de biomasa, Pa: Productividad por unidad de área, Pi: productividad por área iluminada.

En relación con los resultados del análisis por UHPLC se obtuvo las curvas de calibración de los pigmentos para su cuantificación en los extractos (**Cuadro 3**). El tiempo de retención para la luteína fue de 10.335 min, mientras que para el β -caroteno fue de 19.480 min.

Cuadro 3. Ecuaciones de regresión lineal		
Pigmento	Luteína	β -Caroteno
Rango de concentración (mg/mL)	0.075 - 0.450	0.020 – 0.120
Tiempo de retención (min)	10.335 ± 0.081	19.480 ± 0.030
Ecuación	$Y=0.7915X+0.3190$	$Y=0.4674X+2.1161$
R^2	0.995	0.998

Se logró identificar luteína en extractos tanto de la biomasa estresada como de la biomasa verde. Por el contrario, el betacaroteno fue identificado únicamente en la biomasa verde (**Figura 6**). Se observa que el contenido luteína obtenido fue mayor en la columna en comparación con el fotobioreactor helicoidal ($t = 3.33$, $p < 0.05$). El contenido de luteína en la biomasa verde del sistema tubular fue de 1.187 ± 0.214 (mg/g biomasa) mientras que en el helicoidal fue de 0.754 ± 0.017 (mg/g biomasa). Por su parte, en los extractos de la biomasa estresada no hubo diferencias significativas en la concentración de luteína ($W = 8$, $p\text{-value} > 0.05$), siendo esta de 0.434 ± 0.237 (mg/g biomasa) en el sistema helicoidal mientras y de 0.119 ± 0.066 (mg/g biomasa) en el tubular.

En cuanto al contenido de β -Caroteno, este fue mayor en los extractos de la biomasa verde obtenida del sistema tubular en comparación con el helicoidal ($t = 3.65$, $p\text{-value} < 0.05$). Se obtuvo una concentración de 0.195 ± 0.019 (mg/g biomasa) en el tubular y de 0.149 ± 0.023 (mg/g biomasa) en el helicoidal.

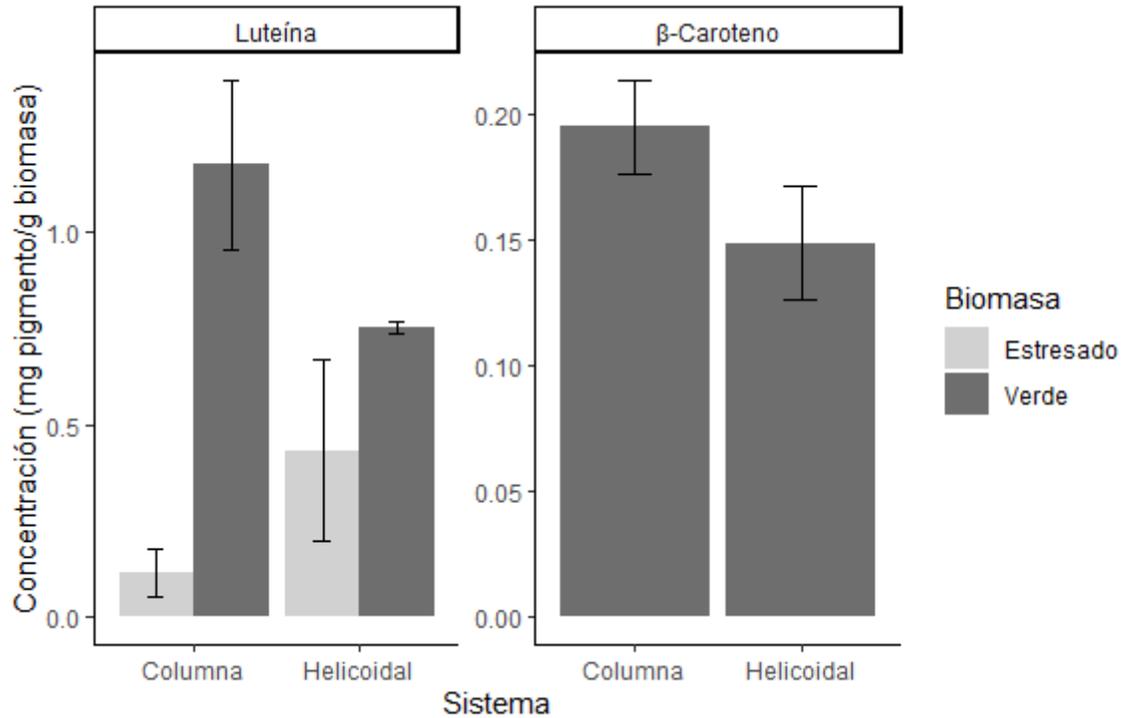


Figura 6. Contenido de pigmentos en extractos de biomasa verde y estresada obtenida de ambos sistemas de cultivo

En la **Figura 7** se observan los cromatogramas correspondientes a los extractos verdes y estresados obtenidos a partir de la columna (7A y 7C) y del fotobiorreactor helicoidal (7B y 7D), respectivamente. En todos los extractos analizados se observan picos que no fueron identificados. El pigmento más abundante en la biomasa verde fue la luteína, seguido por un compuesto no identificado a los 14.767 min (**Figura 7A**) y a los 13.903 min (**Figura 7C**). En la biomasa estresada el compuesto más abundante tuvo un tiempo de retención de 17.620 en el biorreactor helicoidal y de 18.243 en la columna, seguido por la luteína.

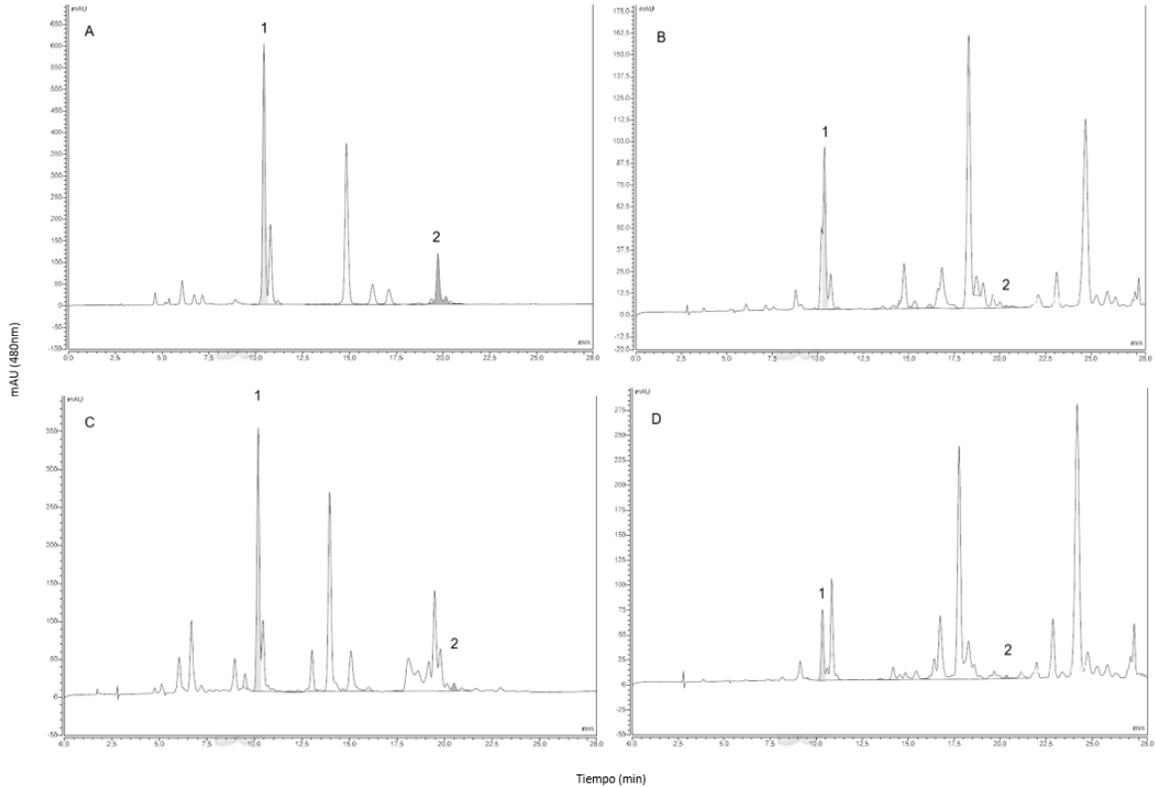


Figura 7. Cromatogramas de extractos de la biomasa verde y estresada obtenida de la columna de 5L (A) y (B) y de la biomasa verde y estresada obtenida del fotobiorreactor helicoidal (C) y (D). (Luteína (1) y β -Caroteno (2))

En relación con la capacidad antioxidante de los extractos (**Figura 8**), se no observó diferencias en el porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos comparando los dos sistemas de cultivo, sin embargo, si hubo diferencias significativas cuando se comparó los extractos de la biomasa verde y estresada en el mismo fotobiorreactor. El porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos del fotobiorreactor helicoidal fue de 25.26 % para la biomasa estresada y de 54.67 % para los extractos verdes ($t = -9.54$, $p\text{-value} < 0.05$). Por otro lado, el porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos de la columna fue de 52.23 % y de 25.24 % para la biomasa verde y estresada, respectivamente ($t = 4.04$, $p\text{-value} < 0.05$).

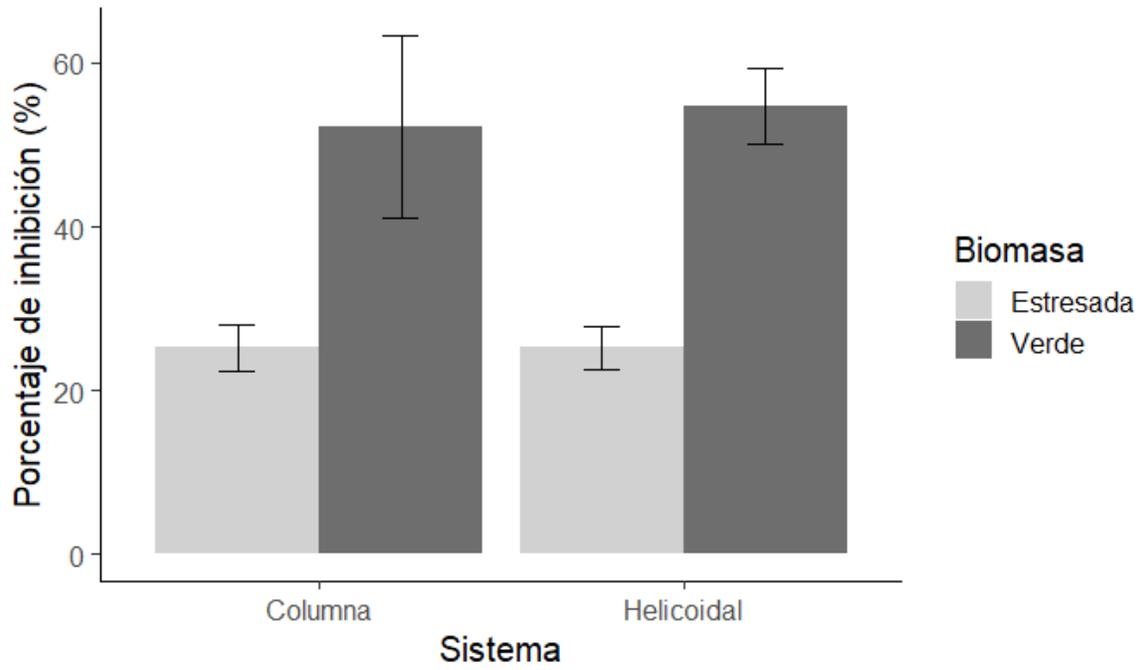


Figura 8. Porcentaje de inhibición de los extractos de biomasa verde y estresada obtenidos de ambos sistemas de cultivo

5. Discusión

Del género *Neochloris*, la especie *N. oleoabundans* es la más estudiada debido a sus características bioquímicas como potencial fuente para la producción biocombustibles (Hegel et al., 2017). Así mismo, se tiene reporte del cultivo de otras especies como *N. conjuncta*, *N. terrestris* y *N. texensis* (Krzemińska et al., 2014), sin embargo, hasta el momento se cuenta con poca información sobre *N. cohaerens*. De aquí la importancia de la presente investigación, para describir el comportamiento de esta alga bajo las condiciones establecidas, así como evaluar la eficiencia de un fotobiorreactor helicoidal para su cultivo.

La evaluación de la eficiencia de un fotobiorreactor involucra una serie aspectos de construcción, diseño y operación que en conjunto, permiten conocer si el sistema es capaz de mantener las condiciones óptimas para el microorganismo seleccionado (Morillas-España et al., 2020). En este estudio, se cultivó *N. cohaerens* en otro sistema de menor capacidad, con el fin de obtener más información sobre la eficiencia del fotobiorreactor helicoidal. Esta información, sirvió de base para conocer el comportamiento de la especie en volúmenes menores y así poder compararlo, ya que se esperaba obtener resultados iguales o mejores en el fotobiorreactor helicoidal.

Durante el cultivo de *N. cohaerens* se realizaron observaciones al microscopio desde que se obtuvo de la algoteca hasta que se inició el cultivo en los fotobiorreactores. Se observaron dos fases, una pequeña, ovalada y otra esférica y grande que sedimenta con facilidad (**Anexo 1**). Los cultivos se realizaron con inóculos compuestos por ambas fases presentes, pero con predominancia de la fase esférica. Durante el estrés también se examinaron los cultivos y se observó que únicamente la fase esférica tomaba una coloración naranja. (**Anexo 2**).

Cinética de crecimiento

Se encontró que la tasa de crecimiento de *N. cohaerens* en el fotobiorreactor helicoidal tubular fue de $0.23 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$, valor que es inferior a lo reportado por Popovich et al. (2012) de $0.73 \pm 0.21 \text{ d}^{-1}$ y por Santos et al. (2012) de 0.51 d^{-1} para *N. oleoabundans*. De forma similar, (Krzemińska et al., 2014) reporta para otras especies de *Neochloris* como *N. texensis* y *N. conjuncta* valores de 0.52 d^{-1} y 0.44 d^{-1} . Así mismo, la productividad (P_b) y la concentración máxima de biomasa obtenida en el sistema helicoidal fue de $76.52 \pm 17.13 \text{ g/m}^3\text{d}$ y $1.39 \pm 0.08 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente, valores que fueron mucho menores a los reportados por estudios previos con *N. oleoabundans*. Es posible que factores como la intensidad de luz aplicada o la mezcla no fuera la adecuada para mantener el cultivo en condiciones óptimas. No fue posible medir la irradiancia real dentro de los cultivos, únicamente se conoce la cantidad de luz que llegaba al centro del sistema sin cultivo.

Urreta et al. (2014) reportó una concentración máxima de 5.05 g/L alcanzada el día 11 de cultivo y una productividad de $0.46 \pm 0.07 \text{ g/Ld}$, utilizando Bold's Basal Medium (BBM) suplementado con 9 mM de KNO_3 , misma concentración de NaNO_3 utilizada en este estudio. Wang y Lan. (2011), por su parte, reportan una concentración máxima de 2.54 g/L y una productividad de 0.71 g/Ld utilizando medio Bristol optimizado.

En cuanto a la producción de clorofila, se alcanzó valores máximos de $32.14 \pm 0.47 \text{ mg/g}$ de biomasa seca al noveno día de cultivo, lo cual fue cercano a lo reportado para otras *Neochloris* a pesar de que la intensidad de luz utilizada fue bastante baja comparado con otros estudios ($80 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s). Sousa et al. (2013) obtuvieron concentraciones entre 23.8 y 28.2 mg/g de biomasa seca utilizando medio F/2 y $200 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s , mientras que Peng et al. (2016) reportan hasta 57 mg/g utilizando el mismo medio de cultivo (Bristol modificado) y una intensidad de luz de $920 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s .

Varios factores influyen en la producción de clorofila en las microalgas, entre ellas la intensidad de luz ya que a menor intensidad de luz, mayor es la acumulación de clorofila (Silva Ferreira & Sant'Anna, 2017). En el presente estudio se utilizó una intensidad de luz

semejante a la que tiene *N. cohaerens* en el algoteca de donde fue tomada ($80 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s), con el fin de evitar el estrés del cultivo. Lo anterior debido a que el estrés fue una respuesta observada en ensayos preliminares en donde se elevó la intensidad a $100 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s .

Al ser este el primer reporte del cultivo de *N. cohaerens* no es posible asegurar que intensidades de luz superiores a los $80 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s provocan el estrés en la especie, en este sentido se sabe que las algas tienen la capacidad de aclimatarse a las condiciones cambiantes de intensidad lumínica (Grobbelaar & Kurano, 2003). Cuando se desea escalar cultivos de condiciones de laboratorio a fotobiorreactores en el exterior, se debe de hacer de forma gradual (Scoma et al., 2012). De este modo, el microorganismo pasa por una serie de cambios fisiológicos en el contenido de clorofilas, pigmentos accesorios, la eficiencia fotosintética, entre otros (Grobbelaar, 2010). Se evidencia la necesidad de estudios en donde se evalúe el crecimiento de *N. cohaerens* bajo diferentes intensidades lumínicas, como es el caso del trabajo realizado por Sun et al. (2014), quienes encontraron que para *N. oleoabundans* es posible obtener concentraciones de biomasa máxima cuando se eleva la intensidad de luz desde 50 a $200 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s . En este mismo estudio se reporta una productividad de 113.25 mg/L cuando se mantuvo cultivos a una intensidad de luz de $100 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s .

Fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a*

El estudio de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* permite conocer el efecto de los diferentes factores que influyen en el metabolismo de los organismos fotosintéticos (Maxwell & Johnson, 2000). En esta investigación el comportamiento del YII fue más estable en el fotobiorreactor helicoidal en comparación con la columna de 5 L , este valor osciló entre 0.57 ± 0.05 y 0.68 ± 0.01 en el primero. En contraste, el YII descendió hasta valores de 0.33 ± 0.07 en la columna de 5 L , lo cual indica que el cultivo se vio estresado a partir del día 8. Lo anterior indica que a pesar de que el fotobiorreactor es un sistema abierto en donde el

control de las condiciones es menor, es capaz de mantener condiciones que permiten el crecimiento del alga sin generar estrés en los primeros días. A pesar de que el YII refleja el efecto de ciertos factores de estrés en el cultivo, el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) es más adecuado para determinar el estrés nutritivo. El YII es un buen indicador de fotoinhibición principalmente por aumento de la irradiancia además de otros factores de como la limitación de nutrientes, elevadas temperaturas o concentración de oxígeno disuelto (Malapascua et al., 2014).

La fluorescencia de la clorofila se ha utilizado en el estudio de varias especies que se someten a un estrés ambiental como por ejemplo la irradiancia y la temperatura. Hindersin et al., 2013 demostraron que cultivos de *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactores planos al exterior se ven afectados por un exceso de luz a ciertas horas del día, lo cual se evidencia con valores bajos de eficiencia cuántica efectiva de 0.2. Además, encontraron que este parámetro se relaciona con la densidad celular ya que conforme incrementa la densidad celular, incrementa el YII, aunque la radiación sea alta (Hindersin et al., 2013).

Así mismo se conoce que variaciones de temperatura durante el día tiene un efecto en el rendimiento cuántico efectivo del cultivo. La exposición de cultivos de *Monodus subterraneus* en fotobiorreactores tubulares de 40 L en a bajas temperaturas durante la mañana se tradujo en un descenso del rendimiento cuántico efectivo y una reducción del 60% de la productividad (Vonshak et al., 2001). En el presente estudio el YII de los cultivos fue monitoreado una vez al día. Los mismos se mantuvieron sin fotoperiodo en condiciones de laboratorio en donde se controlaba la temperatura, por lo que se descarta algún efecto de alguno de estos dos parámetros.

Características hidrodinámicas y de diseño

Cuando se evalúan sistemas de cultivo, se consideran una serie de variables ambientales, de diseño y operación que determinan su desempeño (Jeremy Pruvost et al., 2016). Variables

como la luz, la mezcla, el pH, la temperatura, el consumo energético, entre otros, además de influir sobre la productividad general del sistema, se relacionan entre sí (Huang et al., 2017; Tredici, 2004). Por ejemplo, se puede mejorar la disponibilidad de luz dentro del sistema al modificar el mecanismo de mezcla e incrementar la turbulencia. Sin embargo, esto implica un aumento en el consumo energético lo cual afecta la eficiencia (Acién et al., 2013).

Uno de los aspectos más importante a tener en cuenta en el diseño de un fotobiorreactor, es la disponibilidad de luz en el cultivo (Díaz et al., 2019). Esta depende de la irradiancia sobre el cultivo, la distancia de la trayectoria de la luz y la atenuación producto de las células (Acién Fernández et al., 1998). Se sabe que la irradiancia promedio desciende exponencialmente hacia el centro del cultivo con forme aumenta la concentración celular, por un efecto de ensombrecimiento (Richmond, 2004). Durante el cultivo de *N. cohaerens* no se determinó la irradiancia promedio, sin embargo, es posible que este parámetro pudo no ser el óptimo a medida que la concentración celular fue aumentando.

El régimen de luz dentro de los fotobiorreactores permite diferenciar una zona de luz y una zona oscura (Molina et al., 2001). Por lo anterior es posible que las células experimenten de forma simultánea condiciones óptimas de luz, así como de fotolimitación en las zonas más oscuras y de fotoinhibición en las zonas con mayor iluminación (Acién Fernández et al., 1998).

Antes de iniciar el cultivo se midió la luz que llegaba al centro de los tubos tanto del sistema helicoidal como el tubular y en promedio fue de $80 \pm 2.65 \mu\text{mol}$ de fotones/ m^2s . Es posible que hacia el final de la curva de crecimiento el cultivo se viera fotolimitado por un incremento en la concentración de células dentro de los tubos (Molina Grima et al., 2000). Lo anterior se puede contrarrestar aplicando modelos que permitan estimar el comportamiento de la luz dentro del sistema (Acién Fernández et al., 1998). De este modo se podría incrementar la irradiancia conforme incrementa la concentración de biomasa.

Además de conocer el perfil de la luz dentro del sistema, es necesario identificar las partes del fotobiorreactor que captan la luz y su volumen (Kazbar et al., 2020). Lo anterior debido a que se recomienda mantener al mínimo la fracción oscura, con el fin de incrementar la productividad del sistema. La fracción oscura corresponde a las áreas que no reciben iluminación alguna y en donde el cultivo puede verse fotolimitado o realizar respiración, sin embargo, esta fracción también es importante para evitar la saturación del cultivo (Jeremy Pruvost et al., 2016).

En el fotobiorreactor helicoidal utilizado, la fracción oscura se encuentra en el tubo colector el cual es de PVC oscuro con una capacidad de 10 L. Este tubo colector podría sustituirse por un material transparente ya que representa un tercio de la capacidad total del sistema. De igual forma, el material de las mangueras del sistema helicoidal era semitransparente lo que podría sustituirse por un material que incremente la cantidad de luz que llega al cultivo.

Otro parámetro que puede ser ajustado es el fotoperiodo, sobre todo según la especie que se esté trabajando para modificar las características de la biomasa y la productividad general del sistema (De Winter et al., 2013). Se ha comprobado que la ausencia de fotoperiodo puede incrementar la productividad en *N. oleoabundans* de 0.9 g/Ld a 1.3 g/Ld (De Winter et al., 2017). Por el contrario, también se tiene evidencia de que el fotoperiodo en algunas *Neochloris* puede tener el efecto opuesto. Tal es el caso de *N. conjuncta*, de la cual sin fotoperiodo se obtuvo 0.098 g/Ld, mientras que con un fotoperiodo de 12h se obtuvo 0.125 g/Ld (Krzemińska et al., 2014). Por lo anterior, es necesario conocer las condiciones óptimas para *N. cohaerens* ya que en el presente estudio únicamente se realizó cultivos sin fotoperiodo, obteniéndose resultados semejantes a los de Krzemińska et al, 2014, con una productividad de biomasa de 0.08 g/Ld.

La capacidad de un fotobiorreactor para captar la luz es una característica importante, la cual está relacionada con la superficie iluminada (S_i), la razón área iluminada por unidad de

volumen (S_i/V) y la productividad (P_i) (Jeremy Pruvost et al., 2016; Ugwu et al., 2008). La razón S_i/V determina la cantidad de luz que ingresa al sistema por unidad de volumen, con forme incrementa este valor, incrementa la productividad volumétrica. Lo anterior debido a que el aprovechamiento de la luz es mayor cuando se disminuye la profundidad del cultivo (Tredici, 2004). Del mismo modo, el uso del espacio es un aspecto a tener en cuenta cuando se selecciona un fotobiorreactor que incide sobre la productividad por área ocupada (P_a). La ventaja de los sistemas helicoidales sobre otros diseños es que permiten un mejor aprovechamiento de la luz y el espacio (Briassoulis et al., 2010). La disposición de los tubos en forma de hélice, además de reducir el espacio ocupado, permite que se pueda adaptar tanto a condiciones de laboratorio con luz artificial, como en el exterior con luz natural (Hall et al., 2003).

El fotobiorreactor helicoidal utilizado tenía una S_i de 7.72 m^2 y una razón S_i/V de 257 m^{-1} , parámetros que fueron mayores en este sistema en comparación con la columna de 5L, con excepción de la productividad por área iluminada (P_i). Esta última fue de $0.59 \pm 0.13 \text{ g/m}^2\text{d}$ en el fotobiorreactor helicoidal y de $2.06 \pm 0.13 \text{ g/m}^2\text{d}$ en la columna. Así mismo, no se encontró diferencias significativas en la productividad por área ocupada (P_a) de ambos sistemas, en el fotobiorreactor helicoidal de $1.70 \pm 0.38 \text{ g/m}^2\text{d}$ y de $1.47 \pm 0.09 \text{ g/m}^2\text{d}$ en la columna de 5 L. Esta baja productividad por área iluminada y área ocupada se explica por la forma de operar del sistema. El movimiento del cultivo se realiza por la inyección de aire el cual reduce el volumen de líquido en la fotocelda. De este modo, a pesar de que el fotobiorreactor helicoidal posee una mayor superficie iluminada y hace un mejor uso del espacio aéreo, solo una fracción de este es ocupada por el cultivo (**Anexo 3 y 4**).

La mezcla es el segundo aspecto de mayor importancia en un fotobiorreactor debido a su gran impacto sobre la eficiencia. Su relación con otras características como la disponibilidad de luz, la transferencia de masa, la formación de gradientes, la eliminación del oxígeno disuelto, entre otros, determina la especie a cultivar (Huang et al., 2017; Richmond, 2004).

Para el cultivo de microalgas frágiles, filamentosas o flageladas no se recomienda el uso de agitadores mecánicos que dañen sus estructuras o velocidades de flujo muy altas que les genere estrés. Por otro lado, una buena mezcla asegura que las células se mantengan suspendidas y evita que se adhieran a las superficies (Burns, 2012).

Al inyectar un pulso de colorante para determinar la velocidad de flujo se observó diferencias en cuanto al recorrido el líquido dentro de los sistemas. En el fotobiorreactor helicoidal el pulso de colorante dio varias vueltas como un bloque antes de homogeneizarse en todo el volumen (**Anexo 5**). Los puntos de mejor mezcla se encuentran a la salida de la fotocelda y entrada al tubo colector y dentro de la fotocelda en los puntos donde el líquido retrocede en forma de oleaje. Por el contrario, en la columna de 5L el movimiento es lento, el pulso de colorante asciende y desciende en espiral de forma desordenada.

Bajo las condiciones evaluadas, en ambos sistemas se observó deficiencias en relación con la mezcla. En ambos sistemas se requirió homogenizar de forma manual el cultivo diariamente, debido a que la mezcla no fue suficiente para mantener las células en suspensión. En el fotobiorreactor helicoidal la velocidad de flujo (U_L) fue de 0.36 ± 0.03 m/s, lo cual está entre los valores que se acostumbra mantener en sistemas tubulares (0.2 m/s a 0.3 m/s) (Tredici, 2004). Es posible elevar la velocidad hasta 0.4 m/s o 0.5 m/s con el fin de mantener una mejor mezcla e incrementar la productividad del sistema, sin embargo, esto disminuiría la eficiencia en cuanto al consumo energético (Molina Grima et al., 2000).

En la columna la U_L fue de 0.06 ± 0.01 m/s, sin embargo, se debe considerar que el mecanismo de mezcla es distinto, ya que lo realiza el mismo burbujeo. Tanto la velocidad de flujo como el diámetro de la columna permite identificar dos tipos de regímenes, homogéneo y heterogéneo (Manjrekar & Dudukovic, 2019). En la columna utilizada se observó un flujo que se encuentra en una zona de transición, por lo que toma características de ambas regiones. A una velocidad de flujo de 0.05 m/s y diámetro de 0.1 m por lo general en estos sistemas las burbujas son de tamaño relativamente homogéneo y pequeño. También se caracterizan

por la formación de una pluma central en donde la mayoría de las burbujas ascienden, mientras que hacia las paredes del cilindro se encuentra la zona de descenso y recirculación (Joshi et al., 2002).

Otro régimen de flujo que se presenta en sistemas bifásicos (líquido-gaseoso) es el slug flow. Este se caracteriza por tener una fase gaseosa amplia o del diámetro del tubo seguida de bloques de líquido. Este régimen es más frecuente en sistemas de diámetro pequeño mostrando fluctuaciones en la presión y el flujo (Vianna & Nichele, 2010). Este tipo de flujo se observó en el fotobiorreactor helicoidal en donde bloques de cultivo eran impulsados por bloques de aire desde la parte inferior del sistema. Además, se observó un efecto de oleaje en donde el líquido avanzaba y retrocedía producto de la fluctuación de presión y la inclinación del tubo.

El control estricto del pH en cultivos de alta densidad es necesario para evitar cambios bruscos que puedan comprometer la productividad del sistema (Huang et al., 2017; Moraes et al., 2020). Estos cambios de pH son producto de la fotosíntesis, respiración y excreción de compuestos que pueden limitar la disponibilidad de nutrientes y la eficiencia fotosintética (Granum & Myklestad, 2002). La forma más conveniente de ajustar este parámetro es mediante la inyección de CO₂, ya que simultáneamente se suministra la fuente de carbono (Grobelaar, 2013).

Durante los cultivos de *N. cohaerens* en el fotobiorreactor helicoidal, el monitoreo y control del pH se realizó una vez al día mediante la inyección de CO₂ de forma manual. Lo anterior fue insuficiente después del cuarto día, en donde hubo un incremento brusco llegando a valores de 9.67 ± 0.15 . Debido a que no se monitoreaba este parámetro de forma continua, no es posible saber cuántas horas diarias permanecía el cultivo bajo condiciones de pH no adecuadas o cuál era su comportamiento a lo largo del día.

Así mismo, no fue posible monitorear el oxígeno disuelto, el cual se sabe, se puede acumular en altas concentraciones en fotobiorreactores causando estrés foto-oxidativo e inhibición de la fotosíntesis (Sousa et al., 2013). A pesar de que se conoce que cultivos de *N. oleoabundans* no se ven afectados por valores de oxígeno disuelto de 185% de saturación de aire en cuanto a concentración de biomasa y productividad (Peng et al., 2016), se requieren más estudios para determinar que efecto tiene tanto el pH como el oxígeno disuelto en *N. cohaerens*.

Por otro lado, se evaluó si había una correlación entre el incremento del pH y la caída del YII. Se encontró una leve correlación negativa entre ambos parámetros en el sistema tubular, sin embargo, esta fue no significativa ($\rho=-0.483$, $p\text{-value}=0.111$). Por el contrario, existe una correlación positiva entre el pH y el YII en el fotobiorreactor helicoidal la cual si fue significativa ($\text{cor}=0.692$, $p\text{-value}=0.012$). Es posible que las condiciones en el sistema tubular no fueran las adecuadas a partir del día 8 y 9 de cultivo que se vería reflejado en el descenso del YII, mientras que el sistema helicoidal fuera capaz de mantener condiciones óptimas durante todo el cultivo, manteniendo valores de YII altos a pesar del incremento del pH.

Del mismo modo, en el fotobiorreactor helicoidal se encontró una moderada correlación positiva entre el YII y el peso seco ($\text{cor}=0,586$, $p\text{-value}=0,045$) y una fuerte correlación positiva entre el pH y el peso seco ($\text{cor}=0,970$, $p\text{-value}=1,7 \times 10^{-7}$), ambas significativas. Nuevamente, los resultados sugieren que las condiciones para el cultivo son mas estables o favorables en el sistema helicoidal y que valores altos de pH no representan un estrés para la especie.

No es posible correlacionar los resultados obtenidos de las variables fisiológicas (YII y pH), con las bioquímicas como el contenido de pigmentos o la capacidad antioxidante debido a que no se tienen datos diarios de estas últimas. La cuantificación de los pigmentos se realizó a la biomasa obtenida al final de la curva. Se hace evidente la necesidad de evaluar la biomasa obtenida diariamente del fotobiorreactor helicoidal para observar alguna tendencia.

Otro reto al que se enfrenta los investigadores en el escalamiento de cultivos es el requerimiento de agua. Al incrementar el volumen de cultivo en sistemas abiertos se aumenta la pérdida de agua por evaporación, por lo que se convierte en un parámetro más a monitorear para mantener el funcionamiento óptimo (Poddar et al., 2022). En pruebas de funcionamiento realizadas en el fotobiorreactor helicoidal previo al cultivo de *N. cohaerens*, se observó que mantener el nivel de agua en el tubo colector es necesario para estabilizar la velocidad de flujo del sistema. Cuando el nivel de agua estaba por debajo de lo óptimo, la velocidad a la que se desplazaba el agua era menor o no lograba hacer todo el recorrido hasta la salida de la fotocelda. Durante los cultivos se registró una pérdida de agua diaria de 1 L que fue repuesto para mantener el sistema operando a un nivel óptimo.

Una forma de optimizar el funcionamiento y la productividad de estos sistemas de cultivo es automatizar el monitoreo y control de parámetros como la temperatura, oxígeno disuelto, pH, entre otros (Acién et al., 2013). Actualmente se han evaluado dos estrategias para realizar este control, mediante el ajuste por demanda (Moraes et al., 2020) o utilizando modelos predictivos. El primero utiliza un sistema sencillo de encendido-apagado cuando el pH sobrepasa un límite establecido (Berenguel et al., 2004). Por el contrario, los modelos permiten anticiparse según el comportamiento esperado del cultivo a cierta hora del día. (Fernández et al., 2010).

Otro factor a tener en cuenta son las características de construcción de los fotobiorreactores, ya que se conoce que se pueden crear gradientes de pH en las diferentes secciones de estos sistemas (Acién et al., 2013). Por ejemplo, en fotobiorreactores tubulares, con forme se incrementa la longitud de los tubos, se incrementa la diferencia de pH y oxígeno disuelto a la entrada y a la salida de los mismos (Huang et al., 2017). El fotobiorreactor utilizado tiene dos tubos de 48.4 m de largo lo cual da espacio al escalamiento del sistema sin crear gradientes de pH que puedan comprometer la productividad, ya que lo máximo recomendable en sistemas tubulares es de 80 m (Burns, 2012).

Contenido de carotenoides

En relación con el contenido de pigmentos se observó que la biomasa obtenida de ambos sistemas de cultivo fue distinta en cuanto al perfil de carotenoides. Opuesto a lo esperado, de la biomasa verde fue posible recuperar una mayor cantidad de luteína y betacaroteno en comparación con la biomasa estresada. Así mismo, la presencia de β -caroteno fue confirmada únicamente en la biomasa verde. Considerando únicamente el perfil de la biomasa verde, los resultados obtenidos se corresponden con lo reportado en *N. oleoabundans* siendo la luteína el principal pigmento acumulado (María Castro-Puyana et al., 2013). No se tiene registro del perfil de pigmentos de *N. cohaerens* por lo que no se descarta la presencia de algún otro carotenoide en ambos tipos de biomasa. Esto debido a que en los cromatogramas se observan otros compuestos que no fue posible identificar.

El mayor contenido de β -caroteno fue obtenido de la biomasa verde de la columna de 5L siendo de 0.195 ± 0.019 (mg/g biomasa). Este valor es menor al que se ha reportado en otras especies dedicadas a la producción industrial de este pigmento. *D. salina*, es capaz de producir hasta 4.85 mg/g de biomasa seca (Hashemi et al., 2020). De forma similar, el máximo contenido de luteína de 1.187 ± 0.214 (mg/g biomasa) fue obtenido de la biomasa verde del fotobiorreactor helicoidal, lo cual fue menor a lo reportado anteriormente en otras especies. Del cultivo de *C. protothecoides* y *Desmodesmus* sp. se ha obtenido valores como 7.27 mg/g y 2.2 mg/g, respectivamente. McClure et al. cultivando *Chlorella vulgaris* en un biorreactor tubular de 5 L lograron obtener hasta 7.4 ± 2.1 mg de luteína/g biomasa (2019).

La producción de estos pigmentos responde a condiciones distintas de cultivo, la luteína al ser un pigmento primario, se produce en fase de crecimiento con óptimas condiciones de luz y nitrógeno (Zheng et al., 2022). El β -caroteno por el contrario, está asociado a mecanismos de protección por lo que se produce bajo estrés (Gong & Bassi, 2016). Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos para la luteína, el contenido de este

pigmento fue mayor en la biomasa verde antes de ser sometida a estrés, y disminuyó en la biomasa posterior al estrés.

En caso del β -caroteno no se observó el comportamiento esperado y la concentración de este pigmento fue menor al finalizar el estrés. Debido a que son varios los factores que intervienen en la síntesis del β -caroteno es posible que el estrés aplicado no fuera el adecuado para *N. cohaerens*. Las microalgas requieren de al menos 30 elementos distintos para sobrevivir (Gauthier et al., 2020). Al ser esta una especie poco estudiada no es posible saber cuál es el consumo de los nutrientes o como afecta la deficiencia de uno o varios de forma simultánea.

En estudios previos se encontró que si bien, la presencia de nitrógeno en una concentración óptima para el cultivo supone un incremento en la luteína, también es posible que la deficiencia de nitrógeno provoque el mismo efecto (Rio-Chanona et al., 2017). La deficiencia de nitrógeno resultó en una reducción de compuestos antioxidantes y carotenoides en *C. vulgaris*, *P. tricornutum* y *T. suecica* (Goiris et al., 2015). Por el contrario, en *H. pluvialis* la limitación de nitrógeno estimula la acumulación de astaxantina (Solovchenko & Neverov, 2017). Durante el cultivo de *N. cohaerens* el nitrógeno fue suministrado al triple de la concentración en la que se mantenía en la algoteca, sin embargo, no se conoce como fue el consumo de los nutrientes hacia el final del cultivo o durante la fase de estrés aplicado. Es necesario estudios con más detalle sobre los requerimientos nutricionales de la especie y como la deficiencia de los principales macroelementos afecta la composición de la biomasa.

La síntesis de los carotenoides es un proceso complejo que aún no se conoce completamente en las algas y varía entre especies, sin embargo, comparte similitudes con el metabolismo de las plantas (Varela et al., 2015). El proceso se lleva a cabo en el cloroplasto en donde el isopentil pirofosfato (IPP) es el principal precursor. Posteriormente una serie de pasos de elongación y condensación de dos moléculas de geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP)

da origen al primer carotenoide, el fitoeno (Gong & Bassi, 2016). Finalmente, la biosíntesis de la luteína, β -caroteno, zeaxantina, entre otros, parte del fitoeno (Solovchenko & Neverov, 2017).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos tuvo un comportamiento similar al contenido de pigmentos, la mayor actividad se observó en los extractos de la biomasa verde. Estos resultados no concuerdan con lo esperado, sin embargo, son consistentes con los resultados discutidos en la sección anterior. La biomasa verde rindió extractos con una mayor capacidad antioxidante, el porcentaje de inhibición fue de 54.67 % y 52.23 %, lo cual fue el doble del porcentaje de inhibición observado en la biomasa estresada. Comparando la biomasa de ambos sistemas, nuevamente los resultados no fueron los esperados, ya que no hubo diferencias entre la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de cada sistema de cultivo.

Se sabe que son los pigmentos uno de los mayores contribuyentes a la capacidad antioxidante en las algas (Goiris et al., 2012), sin embargo, en el presente estudio no es posible asegurar esto. A pesar de que los extractos de la biomasa verde tuvieron una mayor capacidad antioxidante se requiere conocer su composición en cuanto a otros compuestos con esta misma propiedad. La capacidad antioxidante de la biomasa y sus extractos depende de una mezcla de compuestos como compuestos fenólicos y aminoácidos, entre otros, además de los pigmentos (Almendinger et al., 2021).

Ante la limitación de nutrientes, *N. cohaerens* modifica su metabolismo de modo que provoca una disminución de los pigmentos presentes, así como la capacidad antioxidante. Nuevamente se hace evidente la necesidad de valorar otros factores para generar estrés y determinar si efectivamente ante este estímulo, la respuesta de la especie es la acumulación de pigmentos y otros compuestos con capacidad antioxidante.

La clase de antioxidantes presentes depende no solo de la especie, sino también de las condiciones a las que esté expuesto el cultivo (Gauthier et al., 2020). En este estudio se analizó la biomasa obtenida hacia el final de la fase estacionaria, por este motivo, se requiere estudiar la composición de *N. cohaerens* en condiciones óptimas de cultivo ya que hasta el momento se desconoce su perfil bajo estas condiciones. Con esta información se podría comparar su composición bajo diferentes estados fisiológicos y así determinar las condiciones idóneas que permitan obtener compuestos de mayor valor.

Almendinger et al (2021) comparando 13 especies diferentes encontraron que *N. oleoabundans* rindió extractos con una alta actividad antioxidante gracias a su contenido de compuestos fenólicos. Así mismo, Goiris et al (2012) observaron que varias clorofitas, entre ellas *N. oleoabundans* obtuvieron altos porcentajes de inhibición por métodos como el potencial reductor férrico (FRAP) y la actividad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC).

Finalmente, en cuanto a la microalga utilizada en este estudio es necesario realizar identificación molecular para confirmar la identificación realizada mediante claves dicotómicas y características morfológicas. La forma, la posición de cloroplastos, pirenoides y la presencia de flagelos son características que se han empleado para la clasificación de clorofitas mientras que el ancho de los tricomas, polaridad o la presencia de vacuolas de gas generalmente permiten clasificar cianobacterias (Ballesteros et al., 2021). Entre las limitantes, la necesidad de equipo de alta resolución y la plasticidad fenotípica hacen que los métodos moleculares sean un complemento necesario (Rimet et al., 2021). El uso de marcadores moleculares o códigos de barras de ADN han permitido la clasificación de una gran diversidad de nuevos microorganismos (Abed et al., 2018; Franco-Duarte et al., 2019).

El presente trabajo permitió conocer los requerimientos básicos para el cultivo de *N. cohaerens*, además de brindar información sobre el desempeño de un fotobiorreactor helicoidal para este microorganismo. Se hace evidente la necesidad de valorar condiciones

de cultivo diferentes con el fin de encontrar las condiciones óptimas para la especie. Lo anterior debido a que según las necesidades metabólicas de la microalga se escoge el sistema de cultivo que mejor se adapte y le proporcione las condiciones necesarias para su crecimiento. A pesar de que mediante los cultivos en la columna se pudo conocer más de esta especie, se requiere profundizar aún más en su comportamiento y las variables que interviene en la producción (Acién et al., 2013).

6. Conclusiones

El fotobiorreactor helicoidal tubular evaluado en el presente estudio proporciona las condiciones necesarias para la producción de *N. cohaerens*. Al ser esta una especie poco estudiada, además de ser el primer trabajo que se registra, sienta las bases para investigaciones posteriores que permitan profundizar en aspectos metabólicos.

Tanto la tasa de crecimiento como la productividad de biomasa fueron menores en el presente estudio en comparación con otras especies del mismo género. Así mismo la productividad por área iluminada estuvo muy por debajo de la obtenida en la columna. A pesar de estos inconvenientes, la calidad de la biomasa obtenida al final de las curvas de crecimiento permitió confirmar la presencia de β -caroteno y luteína.

Por último, la capacidad antioxidante de los extractos deja ver que el valor de la especie no solo se concentra en la fase estresada, ya que la biomasa verde tuvo porcentajes de inhibición mayores a la biomasa estresada. Lo anterior es consistente con los resultados de contenido de pigmentos ya que son uno de los mayores contribuyentes a la capacidad antioxidante.

Es posible mejorar los resultados obtenidos en el sistema probando otros sistemas de crecimiento o valorando otra formulación de medio de cultivo, sin embargo, queda claro el potencial de la especie en cuanto a la producción de los pigmentos y a la capacidad antioxidante de sus extractos. Esto amplía las posibilidades de uso del microorganismo y permite valorar múltiples rutas de procesamiento que agregan valor.

7. Recomendaciones

Al comparar la eficiencia del fotobiorreactor con una columna de menor volumen se evidencia aspectos de diseño y funcionamiento que se necesita mejorar. El sistema es capaz de mantener el cultivo de *N. cohaerens*, sin embargo, se requiere mejorar su productividad para proyectar su uso a nivel industrial. En relación con la productividad por área iluminada, se requiere valorar si el mecanismo para mover el cultivo dentro del fotobiorreactor helicoidal podría sustituirse por una bomba que impulse el medio de forma ascendente por el sistema. De esta forma se incrementaría el volumen de cultivo y se aprovecharía la totalidad de la superficie iluminada.

Por otro lado, se obtuvo información sobre las características hidrodinámicas, de diseño y sus limitaciones cuando se escala ese tipo de sistemas de cultivo. Se requiere mejorar aspectos de mezcla, uso de la luz y control de pH para mantener la disponibilidad de los nutrientes en el medio y la sedimentación del cultivo. El control del pH de forma automatizada podría evitar estrés en el cultivo por la alcalinización del medio. Esto implicaría una fluctuación menor del pH que permite mantener condiciones óptimas para el cultivo durante todo el día.

Es necesario estudiar el metabolismo de la especie y el efecto de diferentes factores de estrés en la calidad de la biomasa. En el presente estudio se definieron las condiciones de cultivo y de estrés a utilizar en base con la literatura disponible de otras especies del género *Neochloris*. Así mismo se valoró información obtenida de ensayos preliminares y el mantenimiento de la cepa en la algoteca para seleccionar el medio de cultivo, el fotoperiodo y la irradiancia. El estudio del comportamiento de la especie bajo diferentes condiciones podría mejorar su desempeño en el escalamiento y procesamiento posterior.

Finalmente, es necesario obtener un perfil de la especie para identificar otros compuestos de valor, así como evaluar metodologías diferentes para determinar capacidad antioxidante. Se recomienda utilizar varios métodos para evitar una visión sesgada y obtener más información sobre la contribución de distintos compuestos en la capacidad antioxidante de la biomasa. Métodos como el ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno) que podría complementar la información obtenida en el presente estudio. Este método se basa en la actividad antioxidante de compuestos frente a radicales peroxilo. En extractos antioxidantes de microalgas con mezclas de compuestos complejas, el ORAC ha demostrado rendir mejores resultados en comparación con otros métodos como el DPPH (Coulombier et al., 2020)

8. Referencias

- Abed, I. J., Ghusoon, A. A., & Ali, N. M. (2018). Genotype versus phenotype to determine the definitive identification of the genera *Chlorella* Beijerinck, 1890 (Chlorellaceae) and *Coelastrella* Chodat, 1922 (Scenedesmaceae). *Bulletin of the Iraq Natural History Museum*, 15(1), 101–111.
- Acién, F. G., Hall, D. O., Cañizares, E., Krishna, K., & Molina, E. (2003). Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. *Journal of Biotechnology*, 103(2), 137–152. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00101-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00101-9)
- Acién, F. G., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., Zittelli, G. C., Sepúlveda, C., & Masojídek, J. (2013). Photobioreactors for the production of microalgae. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12, 131–151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7>
- Acién Fernández, F. G., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M., & Molina Grima, E. (1998). Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(6), 605–616. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980620\)58:6<605::AID-BIT6>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980620)58:6<605::AID-BIT6>3.0.CO;2-M)
- Almendinger, M., Saalfrank, F., Rohn, S., Kurth, E., Springer, M., & Pleissner, D. (2021). Characterization of selected microalgae and cyanobacteria as sources of compounds with antioxidant capacity. *Algal Research*, 53(December 2020), 102168. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102168>
- Alves, B. dos S., Siqueira, D. G., Gonçalves, F., Chan, T. F., Zanette, C. M., & Spier, M. R. (2017). Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. *Algal Research*, 25, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.035>

- Ambati, R. R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R. G., Ravi, S., Bikkina, P. N., Bo, L., & Yuepeng, S. (2019). Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(12), 1880–1902. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1432561>
- Archibald, P. A. (1973). The genus *Neochloris* Starr (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Phycologia*, 12(3 and 4), 187–193. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-12-3-187.1>
- Archibald, P. A., & Smith, V. J. (1987). Notes on Variation in Physiological Attributes between Aquatic and Edaphic Species of the Chlorophycean Algal Genus *Neochloris*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 106(2), 179. <https://doi.org/10.2307/3226317>
- Aubin, J., Ferrando, M., & Jiricny, V. (2010). Current methods for characterising mixing and flow in microchannels. *Chemical Engineering Science*, 65(6), 2065–2093. <https://doi.org/10.1016/J.CES.2009.12.001>
- Ballesteros, I., Terán, P., Guamán-Burneo, C., González, N., Cruz, A., & Castillejo, P. (2021). DNA barcoding approach to characterize microalgae isolated from freshwater systems in Ecuador. *Neotropical Biodiversity*, 7(1), 170–183. <https://doi.org/10.1080/23766808.2021.1920296>
- Bani, A., Fernandez, F. G. A., D'Imporzano, G., Parati, K., & Adani, F. (2021). Influence of photobioreactor set-up on the survival of microalgae inoculum. *Bioresource Technology*, 320(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124408>
- Banskota, A. H., Sperker, S., Stefanova, R., McGinn, P. J., & O'Leary, S. J. B. (2019). Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1523-1>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2018). Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? *Algal Research*, 31, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.001>
- Beach, E. S., Eckelman, M. J., Cui, Z., Brentner, L., & Zimmerman, J. B. (2012).

- Preferential technological and life cycle environmental performance of chitosan flocculation for harvesting of the green algae *Neochloris oleoabundans*. *Bioresource Technology*, *121*, 445–449. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.012>
- Benavente-Valdés, J. R., Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J. C., Méndez-Zavala, A., & Montañez, J. (2016). Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*, *10*, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.001>
- Berenguel, M., Rodríguez, F., Ación, F. G., & García, J. L. (2004). Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*, *14*(4), 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2003.07.001>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Briassoulis, D., Panagakis, P., Chionidis, M., Tzenos, D., Lalos, A., Tsinos, C., Berberidis, K., & Jacobsen, A. (2010). An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, *101*(17), 6768–6777. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.103>
- Burns, A. (2012). Photobioreactor Design for Improved Energy Efficiency of Microalgae Production. *Bioresource Technology*, *11*(1), 1–180. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876211004722%5Cnhttp://jexp-sciences.com/index.php/jexp/article/viewArticle/9559%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894715012012%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S01681656>
- Carlozzi, P., & Torzillo, G. (1996). Productivity of *Spirulina* in a strongly curved outdoor tubular photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *45*(1–2), 18–23. <https://doi.org/10.1007/s002530050642>
- Carvajal-Oses, M. D. M., Chacón-Guzmán, J., & Herrera-Ulloa, Á. (2018). Optimización

- en la producción de la microalga marina *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor tubular helicoidal. *Revista Tecnología En Marcha*, 31(2), 117. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i2.3629>
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006). Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnology Progress*, 22(6), 1490–1506. <https://doi.org/10.1021/bp060065r>
- Castro-Puyana, M., Pérez-Sánchez, A., Valdés, A., Ibrahim, O. H. M., Suarez-Álvarez, S., Ferragut, J. A., Micol, V., Cifuentes, A., Ibáñez, E., & García-Cañas, V. (2017). Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. *Food Research International*, 99, 1048–1055. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.021>
- Castro-Puyana, María, Herrero, M., Urreta, I., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., Ibáñez, E., & Suárez-Alvarez, S. (2013). Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(13), 4607–4616. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6687-y>
- 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*, 244, 1416–1424. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.124>
- Cirulis, J. T., Scott, J. A., & Ross, G. M. (2013). Management of oxidative stress by microalgae¹. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(1), 15–21. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0249>
- Concas, A., Malavasi, V., Costelli, C., Fadda, P., Pisu, M., & Cao, G. (2016). Autotrophic growth and lipid production of *Chlorella sorokiniana* in lab batch and BIOCOIL photobioreactors: Experiments and modeling. *Bioresource Technology*, 211, 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.089>

- Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Rosa, G. M., Moraes, L., Morais, M. G., & Mitchell, B. G. (2019). Operational and economic aspects of Spirulina-based biorefinery. *Bioresource Technology*, 292(June), 121946. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121946>
- Coulombier, N., Nicolau, E., Le Déan, L., Antheaume, C., Jauffrais, T., & Lebouvier, N. (2020). Impact of light intensity on antioxidant activity of tropical microalgae. *Marine Drugs*, 18(2). <https://doi.org/10.3390/md18020122>
- 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>
- da Silva Ferreira, V., & Sant'Anna, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2181-6>
- De Jesus Raposo, M. F., De Morais, A. M. M. B., & De Morais, R. M. S. C. (2015). Carotenoids from marine microalgae: A valuable natural source for the prevention of chronic diseases. *Marine Drugs*, 13(8), 5128–5155. <https://doi.org/10.3390/md13085128>
- De Vree, J. H., Bosma, R., Janssen, M., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2015). Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0400-2>
- De Winter, L., Cabanelas, I. T. D., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2017). The influence of day/night cycles on biomass yield and composition of *Neochloris oleoabundans*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0762-8>
- de Winter, L., Klok, A. J., Cuaresma Franco, M., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2013). The synchronized cell cycle of *Neochloris oleoabundans* and its influence on biomass composition under constant light conditions. *Algal Research*, 2(4), 313–320.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.001>

- Deason, T. R., Silva, P. C., Watanabe, S., & Floyd, G. L. (1991). Taxonomic status of the species of the green algal genus *Neochloris*. *Plant Systematics and Evolution*, 177(3–4), 213–219. <https://doi.org/10.1007/BF00937958>
- Deprá, M. C., Mérida, L. G. R., de Menezes, C. R., Zepka, L. Q., & Jacob-Lopes, E. (2019). A new hybrid photobioreactor design for microalgae culture. *Chemical Engineering Research and Design*, 144(February), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.01.023>
- Díaz, J. P., Inostroza, C., & Acién Fernández, F. G. (2019). Fibonacci-type tubular photobioreactor for the production of microalgae. *Process Biochemistry*, 86(July), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.008>
- Esatbeyoglu, T., & Rimbach, G. (2017). Canthaxanthin: From molecule to function. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(6), 1–49. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600469>
- Fernández-García, E. (2014). Skin protection against UV light by dietary antioxidants. *Food & Function*, 5(9), 1994. <https://doi.org/10.1039/C4FO00280F>
- Fernández-Linares, L. C., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A., & Badillo-Corona, J. A. (2008). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai - Revista De Sociedad, Cultura, Desarrollo*, 4(3), 543–558. <https://doi.org/ISSN:1665-0441>
- Fernández, I., Peña, J., Guzman, J. L., Berenguel, M., & Acién, F. G. (2010). Modelling and control issues of pH in tubular photobioreactors. *IFAC Proceedings Volumes*, 43(6), 186–191. <https://doi.org/10.3182/20100707-3-BE-2012.0046>
- Figueroa, F. L., Conde-Álvarez, R., & Gómez, I. (2003). Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynthesis Research*, 75(3), 259–275. <https://doi.org/10.1023/A:1023936313544>
- Figueroa, F. L., Jerez, C. G., & Korbee, N. (2013). *Use of in vivo chlorophyll fluorescence*

to estimate photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture systems. Lat. Am. J. Aquat. Res.

https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-560X2013000500001&lng=es&nrm=iso&tlng=en

- Figuerola, R. I., Estrada, M., & Garcés, E. (2018). Life histories of microalgal species causing harmful blooms: Haploids, diploids and the relevance of benthic stages. *Harmful Algae*, 73, 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.01.006>
- Foo, S. C., Yusoff, F. M., Ismail, M., Basri, M., Yau, S. K., Khong, N. M. H., Chan, K. W., & Ebrahimi, M. (2017). Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. *Journal of Biotechnology*, 241, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.026>
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Tintino, S. R., de Souza, V. C. A., Sharifi-Rad, J., Coutinho, H. D. M., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms— from past to present. *Microorganisms*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Garibay-Hernández, A., Vazquez-Duhalt, R., Serrano-Carreón, L., & Martinez, A. (2013). Nitrogen limitation in neochloris oleoabundans: A reassessment of its effect on cell growth and biochemical composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(7), 1775–1791. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0454-1>
- Gauthier, M. R., Senhorinho, G. N. A., & Scott, J. A. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal Research*, 52(October), 102104. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104>
- Goiris, K., Muylaert, K., & De Cooman, L. (2015). Microalgae as a Novel Source of Antioxidants for Nutritional Applications. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00017-0>

- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1477–1486.
<https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., E Baart, G. J., & De Cooman, L. (2014). Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal of Phycology*, 50(3), 483–492. <https://doi.org/10.1111/jpy.12180>
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396–1412.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>
- Gouveia, L., Marques, A. E., Da Silva, T. L., & Reis, A. (2009). Neochloris oleabundans UTEX #1185: A suitable renewable lipid source for biofuel production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(6), 821–826.
<https://doi.org/10.1007/s10295-009-0559-2>
- Granum, E., & Mykkestad, S. (2002). A photobioreactor with pH control: demonstration by growth of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Journal of Plankton Research*, 24, 557–563.
- Grivalský, T., Ranglová, K., da Câmara Manoel, J. A., Lakatos, G. E., Lhotský, R., & Masojídek, J. (2019). Development of thin-layer cascades for microalgae cultivation: milestones (review). *Folia Microbiologica*, 64(5), 603–614.
<https://doi.org/10.1007/s12223-019-00739-7>
- Grobbelaar, J. U. (2010). Microalgal biomass production: Challenges and realities. *Photosynthesis Research*, 106(1–2), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9573-5>
- Grobbelaar, J. U. (2012). Microalgae mass culture : the constraints of scaling-up. *Journal of Applied Microbiology*, 24, 315–318. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9728-6>
- Grobbelaar, J. U. (2013). Inorganic Algal Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture:*

Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition (pp. 123–133).

<https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch8>

- Grobbeelaar, J. U., & Kurano, N. (2003). Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation. *Journal of Applied Phycology*, *15*(2–3), 121–126. <https://doi.org/10.1023/A:1023802820093>
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, *9*(4), 625–644. <https://doi.org/10.3390/md9040625>
- Guerin, M., Huntley, M. E., & Olaizola, M. (2003). Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, *21*(5), 210–216. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7)
- Gupta, P. L., Lee, S. M., & Choi, H. J. (2015). A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(9), 1409–1417. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1892-4>
- Hajar, H. A. A., Riefler, R. G., & Stuart, B. J. (2017). Cultivation of the Microalga *Neochloris oleoabundans* for Biofuels Production and Other Industrial Applications (a Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *53*(6), 640–653. <https://doi.org/10.1134/S0003683817060096>
- Hall, D. O., Acien, F. G., Cañizares, E., Krishna, K., & Molina, E. (2003). Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: Modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity. *Biotechnology and Bioengineering*, *82*(1), 62–73. <https://doi.org/10.1002/bit.10543>
- Hashemi, A., Moslemi, M., Pajoum Shariati, F., & Delavari Amrei, H. (2020). Beta-carotene production within *Dunaliella salina* cells under salt stress condition in an indoor hybrid helical-tubular photobioreactor. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, *98*(1), 69–74. <https://doi.org/10.1002/cjce.23577>
- He, L., Yang, W., Guan, C., Yan, H., & Fu, P. (2017). Microalgal cultivation and hydrodynamic characterization using a novel tubular photobioreactor with helical

- blade rotors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(12), 1743–1751.
<https://doi.org/10.1007/s00449-017-1829-4>
- Hegel, P., Martín, L., Popovich, C., Damiani, C., Pancaldi, S., Pereda, S., & Leonardi, P. (2017). Biodiesel production from *Neochloris oleoabundans* by supercritical technology. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 121(September), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.08.018>
- Hübel, S. R., Lemos, M. S., Kelly, B. P., & Cushman, J. C. (2015). Evaluation of Diverse Microalgal Species as Potential Biofuel Feedstocks Grown Using Municipal Wastewater. *Frontiers in Energy Research*, 3(May), 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2015.00020>
- Hindersin, S., Leupold, M., Kerner, M., & Hanelt, D. (2013). Irradiance optimization of outdoor microalgal cultures using solar tracked photobioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(3), 345–355. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0790-5>
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>
- Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., & Yang, C. (2017). Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering*, 3(3), 318–329.
<https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>
- Ishika, T., Moheimani, N. R., & Bahri, P. A. (2017). Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78(March), 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.110>
- Jaeger, L., Carreres, B. M., Springer, J., Schaap, P. J., Eggink, G., Martins Dos Santos, V. A. ., Wijffels, R. H., & Martens, D. E. (2018). *Neochloris oleoabundans* is worth its salt Transcriptomic analysis under salt and nitrogen stress. *PLoS ONE*, 13(4), 1–21.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194834>
- Jaiswar, S., Balar, N., Kumar, R., Patel, M. K., & Chauhan, P. S. (2017). Morphological

- and molecular characterization of newly isolated microalgal strain *Neochloris aquatica* SJ-1 and its high lipid productivity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *9*, 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.12.009>
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E. A., Embiruçu, M., & Ghirardi, M. L. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, *101*(4), 1406–1413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.038>
- Joshi, J. B., Vitankar, V. S., Kulkarni, A. A., Dhotre, M. T., & Ekambara, K. (2002). Coherent flow structures in bubble column reactors. *Chemical Engineering Science*, *57*(16), 3157–3183. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(02\)00192-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(02)00192-6)
- Kazbar, A., Marec, H., Takache, H., Ismail, A., & Pruvost, J. (2020). Effect of design dark fraction on the loss of biomass productivities in photobioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *43*(2), 207–216. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02217-3>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae : current status , challenges , and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels , feed , and other products. *Microbial Cell Factories*, *17*(36), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kijlstra, A., Tian, Y., Kelly, E. R., & Berendschot, T. T. J. M. (2012). Lutein: More than just a filter for blue light. *Progress in Retinal and Eye Research*, *31*(4), 303–315. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.03.002>
- Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, *6*(PA), 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Komárek, R. (1989). Polynuclearity of vegetative cells in coccal green algae from the family neochloridaceae. *Archiv Fur Protistenkunde*, *137*(3), 255–273. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(89\)80033-8](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(89)80033-8)
- Koutra, E., Economou, C. N., Tsafrafidou, P., & Kornaros, M. (2018). Bio-Based Products

- from Microalgae Cultivated in Digestates. *Trends in Biotechnology*, xx.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.015>
- Kováčik, J., Klejdus, B., & Bačkor, M. (2010). Physiological responses of *scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to UV-A and UV-C light. *Photochemistry and Photobiology*, 86(3), 612–616. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00708.x>
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D. T., & Show, P. L. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>
- Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcińska, M., & Tys, J. (2014). Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(4), 735–741.
<https://doi.org/10.1007/s00449-013-1044-x>
- Lam, T. P., Lee, T. M., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2018). Strategies to control biological contaminants during microalgal cultivation in open ponds. *Bioresource Technology*, 252, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.088>
- Lee, Y. K., Ding, S. Y., Low, C. S., Chang, Y. C., Forday, W. L., & Chew, P. C. (1995). Design and performance of an alpha-type tubular photobioreactor for mass cultivation of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 47–51.
<https://doi.org/10.1007/BF00003549>
- Legrand, J., Artu, A., & Pruvost, J. (2021). A review on photobioreactor design and modelling for microalgae production. *Reaction Chemistry and Engineering*, 6(7), 1134–1151. <https://doi.org/10.1039/d0re00450b>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., & Jurikova, T. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products.

- Molecules*, 20(1), 1118–1133. <https://doi.org/10.3390/molecules20011118>
- Maeda, Y., Yoshino, T., Matsunaga, T., Matsumoto, M., & Tanaka, T. (2018). Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.018>
- Malapascua, J. R. F., Jerez, C. G., Sergejevová, M., Figueroa, F. L., & Masojídek, J. (2014). Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: Application of chlorophyll fluorescence techniques. *Aquatic Biology*, 22, 123–140. <https://doi.org/10.3354/ab00597>
- Manjrekar, O. N., & Dudukovic, M. P. (2019). Identification of flow regime in a bubble column reactor with a combination of optical probe data and machine learning technique. *Chemical Engineering Science: X*, 2, 100023. <https://doi.org/10.1016/j.cesx.2019.100023>
- Matos, Â. P. (2017). The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(11), 1333–1350. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-3050-7>
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.345.659>
- McClure, D. D., Nightingale, J. K., Luiz, A., Black, S., Zhu, J., & Kavanagh, J. M. (2019). Pilot-scale production of lutein using *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 44(October), 101707. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101707>
- Milledge, J. J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9214-7>
- Mobin, S., & Alam, F. (2017). Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: A review. *Energy Procedia*, 110(December 2016), 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.177>

- Molina, E., Fernández, J., Acién, F. G., & Chisti, Y. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 92(2), 113–131. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00353-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00353-4)
- Molina Grima, E., Acién Fernández, F. G., García Camacho, F., Camacho Rubio, F., & Chisti, Y. (2000). Scale-up of tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), 355–368. <https://doi.org/10.1023/A:1008110819338>
- Moraes, L., Rosa, G. M., Cara, I. M., Santos, L. O., Morais, M. G., Grima, E. M., Costa, J. A. V., & Fernández, F. G. A. (2020). Bioprocess strategies for enhancing the outdoor production of *Nannochloropsis gaditana*: an evaluation of the effects of pH on culture performance in tubular photobioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(10), 1823–1832. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02373-x>
- Moreno-Garcia, L., Adjallé, K., Barnabé, S., & Raghavan, G. S. V. (2017). Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76(January), 493–506. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.024>
- Moreno, S. G., Vela, H. P., & Alvarez, M. O. S. (2008). LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA a COMO HERRAMIENTA EN LA INVESTIGACIÓN DE EFECTOS TÓXICOS EN EL APARATO FOTOSINTÉTICO DE PLANTAS Y ALGAS. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119–129.
- Morillas-España, A., Lafarga, T., Gómez-Serrano, C., Acién-Fernández, F. G., & González-López, C. V. (2020). Year-long production of *Scenedesmus almeriensis* in pilot-scale raceway and thin-layer cascade photobioreactors. *Algal Research*, 51(September), 102069. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102069>
- Morocho-Jácome, A. L., Dos Santos, B. B., de Carvalho, J. C. M., de Almeida, T. S., Rijo, P., Velasco, M. V. R., Rosado, C., & Baby, A. R. (2022). Microalgae as a Sustainable, Natural-Oriented and Vegan Dermocosmetic Bioactive Ingredient: The Case of *Neochloris oleoabundans*. *Cosmetics*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/cosmetics9010009>

- Norsker, N. H., Cuaresma, M., de Vree, J., Ruiz-Domínguez, M. C., García, M. C. M., Uronen, P., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. (2021). Neochloris oleoabundans oil production in an outdoor tubular photobioreactor at pilot scale. *Journal of Applied Phycology*, *33*(3), 1327–1339. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02400-8>
- Ogburn, Z. L., & Vogt, F. (2017). Microalgae as embedded environmental monitors. *Analytica Chimica Acta*, *954*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.058>
- Oh, Y. K., Hwang, K. R., Kim, C., Kim, J. R., & Lee, J. S. (2018). Recent developments and key barriers to advanced biofuels: A short review. *Bioresource Technology*, *257*(February), 320–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.089>
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, *74*, 10–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>
- Peng, L., Zhang, Z., Cheng, P., Wang, Z., & Lan, C. Q. (2016). Cultivation of Neochloris oleoabundans in bubble column photobioreactor with or without localized deoxygenation. *Bioresource Technology*, *206*, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.081>
- Poddar, N., Scofield, J., Shi, S., Prime, E. L., Kentish, S. E., Qiao, G. G., & Martin, G. J. O. (2022). Evaporation reduction and salinity control in microalgae production ponds using chemical monolayers. *Algal Research*, *66*(July), 102783. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102783>
- Popovich, C. A., Damiani, C., Constenla, D., Martínez, A. M., Freije, H., Giovanardi, M., Pancaldi, S., & Leonardi, P. I. (2012). Neochloris oleoabundans grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition. *Bioresource Technology*, *114*, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.121>
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., & Legrand, J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with Neochloris oleoabundans in photobioreactor. *Bioresource*

- Technology*, 100(23), 5988–5995. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.004>
- Pruvost, Jeremy, Le Borgne, F., Artu, A., Cornet, J. F., & Legrand, J. (2016). Industrial Photobioreactors and Scale-Up Concepts. In *Advances in Chemical Engineering* (Vol. 48, pp. 257–310). <https://doi.org/10.1016/bs.ache.2015.11.002>
- Quinn, J. C., Catton, K., Wagner, N., & Bradley, T. H. (2012). Current Large-Scale US Biofuel Potential from Microalgae Cultivated in Photobioreactors. *Bioenergy Research*, 5, 49–60. <https://doi.org/10.1007/s12155-011-9165-z>
- Raes, E. J., Isdepsky, A., Muylaert, K., Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2014). Comparison of growth of *Tetraselmis* in a tubular photobioreactor (Biocoil) and a raceway pond. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 247–255. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0077-5>
- Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2016). Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*, 34(1), 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003>
- Rayen, F., Behnam, T., & Dominique, P. (2019). Optimization of a raceway pond system for wastewater treatment: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(3), 422–435. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1571007>
- Reyes, F. A., Mendiola, J. A., Suárez-Alvarez, S., Ibañez, E., & Del Valle, J. M. (2016). Adsorbent-assisted supercritical CO₂ extraction of carotenoids from *Neochloris oleoabundans* paste. *Journal of Supercritical Fluids*, 112, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.02.005>
- Richmond, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. In *Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges*. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0944-7_5
- Rimet, F., Aylagas, E., Borja, A., Bouchez, A., Canino, A., Chauvin, C., Chonova, T., Čiampor, F., Costa, F. O., Ferrari, B. J. D., Gastineau, R., Goulon, C., Gugger, M., Holzmann, M., Jahn, R., Kahlert, M., Kusber, W. H., Laplace-Treytoure, C., Leese, F.,

- ... Ekrem, T. (2021). Metadata standards and practical guidelines for specimen and DNA curation when building barcode reference libraries for aquatic life. *Metabarcoding and Metagenomics*, 5, 17–33. <https://doi.org/10.3897/mbmg.5.58056>
- Rio-Chanona, E. A., Ahmed, N. rashid, Zhang, D., Lu, Y., & Jing, K. (2017). Kinetic modeling and process analysis for *Desmodesmus* sp. lutein photo-production. *AIChE Journal*, 63(7), 2546–2554. <https://doi.org/DOI 10.1002/aic.15667>
- Rodríguez-Torres, M. J., Morillas-España, A., Guzmán, J. L., & Acién, F. G. (2021). Modelling and pH control in raceway and thin-layer photobioreactors for wastewater treatment. *Energies*, 14(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/en14041099>
- Romero, L. D. los Á., Guevara, M. Á., Gómez, B. J., Arredondo-Vega, B., Cortez, R., & Licet, B. (2017). Producción de pigmentos procedentes de *Arthrospira maxima* cultivada en fotobiorreactores. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 108. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.59671>
- Safar, H., Wagenen, J. Van, Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine Drugs*, 13(12), 7339–7356. <https://doi.org/10.3390/md13127069>
- Safi, C., Pollio, A., & Olivieri, G. (2021). *Neochloris oleoabundans* from nature to industry: a comprehensive review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09593-x>
- Santos, A. M., Janssen, M., Lamers, P. P., Evers, W. A. C., & Wijffels, R. H. (2012). Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. *Bioresource Technology*, 104, 593–599. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.084>
- 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. (2017). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>
- Scoma, A., Giannelli, L., Faraloni, C., & Torzillo, G. (2012). Outdoor H₂ production in a 50-L tubular photobioreactor by means of a sulfur-deprived culture of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, *157*(4), 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.040>
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, *7*, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>
- Silva, S. C., Ferreira, I. C. F. R., Dias, M. M., & Barreiro, M. F. (2020). Microalgae-derived pigments: A 10 year bibliometric review and Industry and Market Trend Analysis. *Molecules*, *25*(3406), 1–23.
- Singh, R. N., & Sharma, S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *16*(4), 2347–2353. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>
- Skulberg, O. M. (2000). Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology*, *12*(3–5), 341–348. <https://doi.org/10.1023/A:1008140403621>
- Solovchenko, A., & Neverov, K. (2017). Carotenogenic response in photosynthetic organisms: a colorful story. *Photosynthesis Research*, *133*(1–3), 31–47. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0358-y>
- Sousa, C., Compadre, A., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2013). Effect of oxygen at low and high light intensities on the growth of *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research*, *2*(2), 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.007>
- Sukačová, K., Lošák, P., Brummer, V., Máša, V., Vícha, D., & Zavřel, T. (2021). Perspective design of algae photobioreactor for greenhouses—A comparative study.

- Energies*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/en14051338>
- Sun, X., Cao, Y., Xu, H., Liu, Y., Sun, J., Qiao, D., & Cao, Y. (2014). Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. *Bioresource Technology*, 155, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.109>
- Travieso, L., Hall, D. O., Krishna, K., Benítez, F., Sánchez, E., & Borja, R. (2001). A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 47(3), 151–155. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00043-9)
- Tredici, M. R. (2004). Mass production of microalgae Photobioreactors. In *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (Issue 1986, pp. 178–214).
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10), 4021–4028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>
- Urreta, I., Ikarán, Z., Janices, I., Ibañez, E., Castro-Puyana, M., Castañón, S., & Suárez-Alvarez, S. (2014). Revalorization of *Neochloris oleoabundans* biomass as source of biodiesel by concurrent production of lipids and carotenoids. *Algal Research*, 5(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.05.001>
- Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., & León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. *Photosynthesis Research*, 125(3), 423–436. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0149-2>
- Vianna, A. S., & Nichele, J. (2010). Modeling an annular flow tubular reactor. *Chemical Engineering Science*, 65(14), 4261–4270. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.04.016>
- Vieira, M. V., Pastrana, L. M., & Fuciños, P. (2020). Microalgae Encapsulation Systems for Food, Pharmaceutical and Cosmetics Applications. *Marine Drugs*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/md18120644>
- Vonshak, A., Torzillo, G., Masojidek, J., & Boussiba, S. (2001). Sub-optimal morning

temperature induces photoinhibition in dense outdoor cultures of the alga *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta). *Plant, Cell and Environment*, 24(10), 1113–1118.
<https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00759.x>

Wang, B., & Lan, C. Q. (2011). Optimising the lipid production of the green alga *Neochloris oleoabundans* using box-behnken experimental design. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 89(4), 932–939. <https://doi.org/10.1002/cjce.20513>

Watanabe, S., & Flod, G. L. (1989). Comparative ultrastructure of the zoospores of nine species of *Neochloris* (Chlorophyta). *Plant Systematics and Evolution*, 168(3–4), 195–219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00936099>

Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>

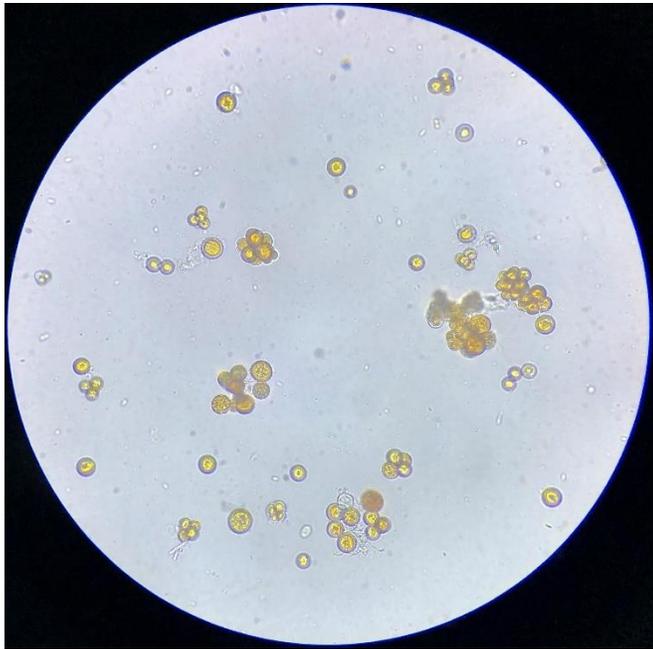
Zheng, H., Wang, Y., Li, S., Nagarajan, D., Varjani, S., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2022). Recent advances in lutein production from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 153(December 2020), 111795.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111795>

9. Anexos

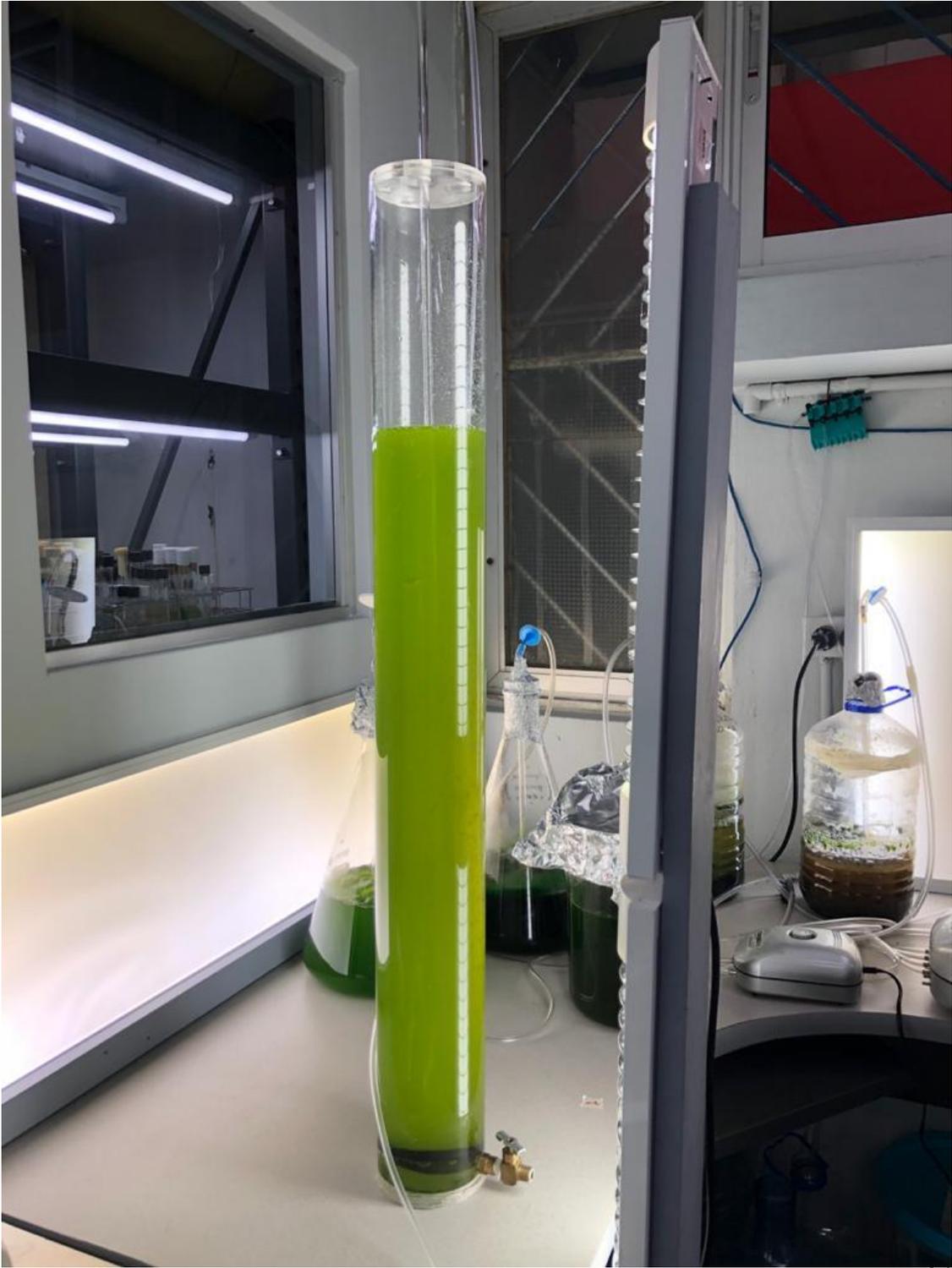
Anexo1. Cultivo de *N. cohaerens*



Anexo2. Cultivo estresado de *N. cohaerens*



Anexo 3. Columna tubular de 5 L.



Anexo 4. Fotobiorreactor helicoidal tubular



Anexo 5. Pulso de colorante en el fotobiorreactor helicoidal

