



“ESTUDIOS SOBRE LA UTILIZACIÓN DE BIOMASA ALGAL COMO MATERIA PRIMA ALTERNATIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL”

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

LIC. LARA SÁNCHEZ RIZZA
DIRECTOR: DR. LEONARDO CURATTI
CO-DIRECTORA: DRA. GRACIELA SALERNO



CONICET



INBIOTEC

AGENCIA

NACIONAL DE PROMOCION
CIENTIFICA Y TECNOLOGICA



CONICET



PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PUBLICACIONES

1. **Sánchez Rizza, et al.** A semi-closed loop microalgal biomass production-platform for ethanol from renewable sources of nitrogen and phosphorous. *Journal of cleaner production* 219, 217-224 (2019).
2. **Sánchez Rizza, et al.** Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. *Algal Research* 22, 140–147 (2017).
3. Do Nascimento & **Sánchez Rizza, et al.** Cyanobacterial biological nitrogen fixation as a sustainable nitrogen fertilizer for the production of microalgal oil. *Algal Research* 12, 142-148 (2015).
4. Do Nascimento, Ortiz Marquez, **Sánchez Rizza**, Echarte & Curatti. Bioprospecting for fast growing and biomass characterization of oleaginous microalgae from south-eastern Buenos Aires, Argentina. *Bioresource Technology* 125 283–290 (2012).

CAPÍTULOS DE LIBRO

5. Sanz Smachetti, **Sánchez Rizza**, Coronel, Do Nascimento & Curatti. Microalgal biomass as an alternative source of sugars for the production of bioethanol in *Principles and applications of fermentation technology*. Edited by Arindam Kuila and Vinay Sharma. Editorial, Wiley 484 p. (351-386). ISBN: 978-1-119-46026-8 (2018).
6. Do Nascimento, **Sánchez Rizza** & Curatti. Desarrollos de biotecnología algal como alternativa sustentable para la producción de biocombustibles y otros productos naturales en Tópicos selectos en biodiversidad y biotecnología. Editado por Berón, Covacevich, Curatti & Salerno. 179 p. (155-166). ISBN: 978-987-544-623-6 (2014).

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| Índice | I |
| Resumen | iv |
| Abstract | vii |
| Abreviaturas | x |
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| 1.1. <i>Desarrollo de la Humanidad y sistemas productivos convencionales</i> | 1 |
| 1.1.1. <i>Combustibles fósiles</i> | 2 |
| 1.1.2. <i>La agricultura como sostén para la producción de alimentos y bioenergía y los Acuerdos Internacionales para promover la energía a partir de recursos renovables</i> | 2 |
| 1.2.2.1. <i>Protocolo de Kyoto</i> | 3 |
| 1.2.2.2. <i>Organización de las Naciones Unidas: Agenda 2030</i> | 3 |
| 1.2 <i>Biocombustibles líquidos de primera generación</i> | 4 |
| 1.3. <i>Biocombustibles líquidos de segunda generación</i> | 5 |
| 1.4. <i>Biocombustibles líquidos de tercera generación: biomasa de microalgas como alternativa</i> | 7 |
| 1.5. <i>Biología, Ecología y Fisiología de microalgas</i> | 9 |
| 1.5.1. <i>Biodiversidad</i> | 9 |
| 1.5.2. <i>Metabolismo fotosintético del carbono en microalgas</i> | 9 |
| 1.5.2.1. <i>Metabolismo de lípidos</i> | 10 |
| 1.5.2.2. <i>Metabolismo de los hidratos de carbono</i> | 11 |
| 1.5.2.3. <i>Integración metabólica en microalgas</i> | 13 |
| 1.6. <i>Tecnologías de producción de biomasa algal</i> | 13 |
| 1.6.1. <i>Sistemas de cultivo masivo de microalgas</i> | 13 |
| 1.6.1.1. <i>Requerimientos de nutrientes para el cultivo masivo de biomasa algal: fertilizantes</i> | 14 |
| 1.7. <i>Procesamiento de la biomasa algal</i> | 16 |
| 1.8. <i>Análisis económico de los procesos basados en microalgas y biorrefinería de biomasa algal</i> | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL | 19 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 20 |
| 3.1. <i>Aislamiento de cepas de microalgas y cianobacterias</i> | 20 |
| 3.2. <i>Cultivo de microalgas y cianobacterias</i> | 21 |
| 3.2.1. <i>Medios de cultivo</i> | 21 |
| 3.2.2. <i>Sistemas de cultivo</i> | 22 |
| 3.3. <i>Colecta de la biomasa</i> | 25 |
| 3.4. <i>Estabilización de la biomasa</i> | 25 |
| 3.5. <i>Identificación de la cepa Nostoc sp. M2</i> | 25 |
| 3.6. <i>Extracción y purificación de proteínas</i> | 26 |
| 3.6.1. <i>Preparación de extractos de cianobacterias como fuente de nutrientes</i> | 26 |
| 3.6.2. <i>Purificación de R-ficoeritrina (R-FE)</i> | 26 |
| 3.6.3. <i>Purificación de bromelina</i> | 27 |
| 3.6.4. <i>Purificación de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH)</i> | 28 |
| 3.7. <i>Determinación de microcistina total (MC)</i> | 28 |
| 3.8. <i>Sacarificación de biomasa de algas y producción de etanol</i> | 28 |
| 3.9. <i>Aprovechamiento de la vinaza de fermentación alcohólica</i> | 29 |

| | |
|---|----|
| 3.10. <i>Métodos Analíticos</i> | 30 |
| 3.10.1. <i>Análisis del crecimiento</i> | 30 |
| 3.10.2. <i>Determinación de N y P</i> | 31 |
| 3.10.3. <i>Actividad proteolítica de los extractos de Nostoc libres de células</i> | 31 |
| 3.10.4. <i>Cuantificación de proteínas totales</i> | 31 |
| 3.10.5. <i>Cuantificación de carbohidratos totales</i> | 32 |
| 3.10.6. <i>Métodos de cuantificación de lípidos</i> | 32 |
| 3.10.6.1. <i>Tinción de vesículas de lípidos neutros con Rojo de Nilo</i> | 32 |
| 3.10.6.2. <i>Determinación gravimétrica de lípidos totales</i> | 33 |
| 3.10.6.3. <i>Determinación de metil-ésteres de ácidos grasos (FAME)</i> | 33 |
| 3.10.7. <i>Análisis de la composición química de la biomasa</i> | 34 |
| 3.10.8. <i>Cuantificación de Pi</i> | 34 |
| 3.10.9. <i>Determinación de etanol</i> | 35 |
| 4. CAPÍTULO I. BIOMASA DE MICROALGAS COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL | 36 |
| 4.1. INTRODUCCIÓN | 36 |
| 4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 38 |
| 4.2.1. <i>Biosprospección y selección de cepas nativas biotecnológicamente relevantes</i> | 38 |
| 4.2.1.1. <i>Escrutinio de la capacidad de acumulación de azúcares fermentables de un banco de cepas de microalgas de la provincia de Buenos Aires</i> | 38 |
| 4.2.2. <i>Optimización de la acumulación de azúcares fermentables de las cepas selectas</i> | 39 |
| 4.2.2.1. <i>Efecto de la deficiencia de otros nutrientes sobre la acumulación de hidratos de carbono en la cepa Desmodesmus sp. FG</i> | 40 |
| 4.2.2.2. <i>Evaluación del efecto de distintos niveles de deficiencia de N sobre el cultivo de Desmodesmus sp. cepa FG</i> | 42 |
| 4.2.3. <i>Sacarificación de la biomasa algal</i> | 43 |
| 4.2.3.1. <i>Efecto de la carga de sólidos algales</i> | 45 |
| 4.2.4. <i>Optimización de las condiciones de fermentación</i> | 47 |
| 4.2.4.1. <i>Producción de etanol y CO₂ a partir de la biomasa de algas sacarificada</i> | 49 |
| 4.3. CONCLUSIONES | 52 |
| 5. CAPÍTULO II. APROVECHAMIENTO DEL NITRÓGENO DEL AIRE PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS | 53 |
| 5.1. INTRODUCCIÓN | 53 |
| 5.1.1. <i>Producción de biomasa de microalgas y fertilización nitrogenada</i> | 53 |
| 5.1.2. <i>Síntesis química de fertilizante nitrogenado: el proceso de Haber & Bosch</i> | 53 |
| 5.1.2.1. <i>Alternativas al proceso de Haber & Bosch</i> | 54 |
| 5.1.2.1.1. <i>Uso de aguas residuales</i> | 54 |
| 5.1.2.1.2. <i>Reciclado de nutrientes a partir del procesamiento de la biomasa</i> | 55 |
| 5.1.2.1.3. <i>Fijación biológica del N₂</i> | 55 |
| 5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 57 |
| 5.2.1. <i>Aislamiento, propiedades y caracterización de la biomasa de Nostoc sp. cepa M2</i> | 57 |
| 5.2.2. <i>Producción de fertilizante orgánico a partir del N₂ del aire</i> | 61 |
| 5.2.3. <i>Uso del extracto de Nostoc libre de células, como fertilizante orgánico para el cultivo de microalgas</i> | 62 |
| 5.2.3.1. <i>Producción de aceites de microalgas a expensas del fertilizante de Nostoc sp. cepa M2</i> | 69 |

| | |
|---|-----|
| 5.2.3.1.1. Rendimiento potencial en cultivos al aire libre de <i>C. sorokiniana</i> , creciendo a expensas del extracto de <i>Nostoc</i> | 71 |
| 5.2.3.2. Producción de carbohidratos de microalgas a expensas del fertilizante de <i>Nostoc sp. cepa M2</i> | 73 |
| 5.2.4. Análisis de toxicidad de <i>Nostoc sp. cepa M2</i> | 76 |
| 5.2.5. Aislamiento de productos de alto valor agregado | 77 |
| 5.2.5.1. Purificación de R-FE de <i>Nostoc sp. cepa M2</i> | 78 |
| 5.3. CONCLUSIONES | 80 |
| 6. CAPÍTULO III. PLATAFORMA SEMI-CERRADA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y BIORREFINERÍA: VALORIZACIÓN DE LA VINAZA Y RECICLADO DE REACTIVOS EN NUTRIENTES | 82 |
| 6.1. INTRODUCCIÓN | 82 |
| 6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 85 |
| 6.2.1. Diseño de una plataforma semi-cerrada de producción de biomasa algal para la obtención de etanol y suplementos nutricionales | 85 |
| 6.2.2. Aprovechamiento de la corriente sólida de la sacarificación de biomasa algal para su uso como suplemento para alimentación animal | 87 |
| 6.2.3. Uso de la vinaza de fermentación como fuente de nutrientes | 88 |
| 6.2.3.1. Preparación de la vinaza | 88 |
| 6.2.3.2. Calidad nutricional de la vinaza como fuente de N y P para el cultivo de microalgas | 89 |
| 6.2.4. Análisis de la deficiencia de P en cultivos diazotróficos de <i>Nostoc sp. cepa M2</i> | 90 |
| 6.2.5. Aprovechamiento de la corriente líquida de la sacarificación de biomasa algal para la solubilización de P proveniente de recursos naturales renovables | 90 |
| 6.2.5.1. Alcalinización de los productos de reacción entre el H_2SO_4 y las sales cálcicas de P | 93 |
| 6.2.5.2. Análisis de la calidad nutricional de la vinaza algal suplementada con P para el cultivo diazotrófico de <i>Nostoc sp. cepa M2</i> | 96 |
| 6.2.6. Plataforma semi-cerrada de producción de biomasa algal | 100 |
| 6.2.6.1. Balance de masas de la plataforma semi-continua de producción de biomasa y potencial productivo | 101 |
| 6.3. CONCLUSIONES | 103 |
| 7. CONCLUSIONES FINALES | 104 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA POR ORDEN ALFABÉTICO | 106 |
| 9. AGRADECIMIENTOS | 116 |

RESUMEN

El continuo incremento demográfico, así como la industrialización, demandan grandes cantidades de energía. La bioenergía cumple un rol muy importante en la mitigación de la emisión de gases de efecto invernadero, así como en el reemplazo de los combustibles fósiles (Demirbas & Demirbas, 2010).

Los biocombustibles líquidos, como el bioetanol y el biodiesel son importantes para el futuro debido a que reemplazan a los combustibles derivados del petróleo. El bioetanol deriva de recursos naturales renovables, típicamente de plantas como el trigo, remolacha azucarera, maíz, residuos lignocelulósicos y madera (Demirbas, 2009). El biodiesel es obtenido de plantas oleaginosas tales como la soja o colza (Rulli *et al.*, 2016).

El uso de cultivos agrícolas como materia prima para la producción de biocombustibles plantea serias dudas sobre su sustentabilidad debido a sus posibles efectos en la seguridad alimentaria y los problemas ambientales relacionados con el cambio en el uso de la tierra, la huella hídrica y la gran dependencia de los fertilizantes sintéticos, entre otras preocupaciones (Tilman *et al.*, 2002; Erisman *et al.*, 2008; Gerbens-Leenes *et al.*, 2009).

Las microalgas y las cianobacterias se consideran una alternativa cada vez más prometedora a los cultivos convencionales (y residuos lignocelulósicos), como materia prima para la producción de biocombustibles y suplementos para la alimentación animal, debido principalmente a su mayor productividad fotosintética y a una composición bioquímica más favorable (ausencia de lignina), así como la posibilidad de cultivo en tierras no aptas para la agricultura, entre otras características. Un impedimento para la implementación a gran escala del cultivo de estos organismos es el requerimiento insostenible de fertilizantes N y P, así como también los altos costos asociados a la colecta de la biomasa. Hay un acuerdo generalizado en que la obtención únicamente de biocombustibles a partir de biomasa de microalgas no es rentable económicamente, por lo que se presume que la co-producción de productos de alto valor agregado en el marco de una biorrefinería, incrementaría la rentabilidad de producir aceites o azúcares a partir de microalgas, con un mínimo de residuos y emisiones (Demirbas, 2009).

En esta tesis proporcionamos una prueba de concepto para una plataforma de ciclo semi-cerrado de producción de algas y la biorrefinería de la biomasa obtenida, para la producción de etanol y biodiesel a expensas del CO₂ y N₂ atmosféricos, y del P de harina de huesos. Esta plataforma brinda conceptos de economía circular en el campo de la biorrefinería de biomasa de microalgas. En esta plataforma, el N₂ se asimila en la biomasa de una cianobacteria fijadora de N₂ (*Nostoc* sp. cepa M2) que acumula niveles muy altos de biomasa (2 g peso seco.L⁻¹) y proteína (60 % p/p). Esta cepa se seleccionó debido a su rápido crecimiento y a la característica decantación de sus células en períodos muy cortos de tiempo (15-30 min).

La extracción acuosa de esta biomasa produjo un fertilizante orgánico, que sostuvo el crecimiento mixotrófico como única fuente de nutrientes, de una amplia diversidad de géneros de microalgas. Se demostró la completa sustitución de fertilizantes nitrogenados químicos mediante el proceso de fijación biológica del N₂ con una conversión eficiente de biomasa de la cianobacteria fijadora de nitrógeno en biomasa de microalgas con alto contenido de aceites o azúcares fermentables. Asimismo, se demostró la posibilidad de obtener ficobiliproteínas de alto valor agregado a partir de estos extractos libres de células, de inocuidad aparente.

Los rendimientos de producción de aceites de *Chlorella sorokiniana* (42 % lípidos p/p), en simulaciones en fotobiorreactores ambientales estuvieron en el rango de los rendimientos actuales obtenidos a expensas de fertilizantes sintéticos para microalgas cultivadas en piletas a cielo abierto (10.000-13.000 L⁻¹.ha.año⁻¹) y fueron 20 veces superiores al rendimiento reportado cuando se utilizan cultivos agronómicos (soja) como materia prima.

A partir de la bioprospección de microalgas nativas de nuestra colección se seleccionaron 3 cepas con potencial biotecnológico (*Desmodesmus* sp. cepa FG, *Chlorella* sp. cepa MI y la cepa SP2-3) para la producción de etanol mediante la evaluación de su capacidad para acumular azúcares fermentables en condiciones de estrés nutricional. Se seleccionó a la microalga *Desmodesmus* sp. cepa FG debido a que presentó rendimientos muy altos (8 g peso seco.L⁻¹), y un crecimiento robusto que acumuló altos niveles de carbohidratos (60 % p/p). La biomasa de algas se sacarificó y esta condición ácida se utilizó secundariamente para liberar fosfato soluble de diferentes

fuentes de P renovables, incluida la harina de huesos. Después de aumentar el pH, la preparación resultante se fermentó con levaduras para producir etanol con valores aproximados al 90 % de su rendimiento teórico. Se pudo demostrar tanto una alta eficiencia de conversión de biomasa a etanol de $0,25 \text{ g}\cdot\text{g biomasa}^{-1}$ como una alta concentración de etanol en el caldo de fermentación de $24 \text{ g etanol}\cdot\text{L hidrolizado}^{-1}$; así como también se ha obtenido CO_2 como una fuente puntual reutilizable a rendimientos cercanos al máximo teórico.

La simulación de la productividad de la microalga a expensas del fertilizante orgánico a base de *Nostoc* en fotobiorreactores ambientales, que imitan las condiciones de estanques abiertos dio como resultado que con la eficiencia de conversión de biomasa a etanol demostrada en esta tesis, esta plataforma podría producir, bajo las condiciones ambientales del Sudeste de la provincia de Buenos Aires, entre 7.600 y 10.800 L de $\text{etanol}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$, dependiendo de si *Nostoc* se cultiva en estanques al aire libre o en fotobiorreactores tubulares, respectivamente. Los rendimientos de producción de etanol fueron 2-3 o 5-7 veces superiores al rendimiento reportado cuando se utilizan como materia prima granos de maíz o residuos lignocelulósicos (Karlen *et al.*, 2011; Pimentel & Patzek, 2005).

La vinaza de fermentación resultante, suplementada con P, se recicló eficientemente como única fuente de macronutrientes para el cultivo de la biomasa de la cianobacteria fijadora de N_2 para cerrar un ciclo de producción.

También se muestra el reciclado de agua y la co-producción de biomasa residual como posible suplemento nutricional para producción animal y yeso, que puede utilizarse como material para la construcción o como una enmienda para suelos.

La plataforma de ciclo semi-cerrado de producción de biomasa algal a partir de materias primas económicas y renovables, el reciclado intensivo de nutrientes y la minimización de desechos, introducen conceptos de economía circular a la biotecnología algal. Se espera que diseños de este tipo contribuyan a la seguridad alimentaria y energética a largo plazo.

ABSTRACT

The continuous demographic increase, as well as industrialization, demand large amounts of energy. Bioenergy plays a very important role in mitigating the emission of greenhouse gases, by replacing fossil fuels (Demirbas & Demirbas, 2010).

Bioethanol is derived from renewable natural resources, typically from plants such as sugarcane, sugar beet, corn, or lignocellulosic waste and wood (Demirbas, 2009). Biodiesel is obtained from oleaginous plants such as soybean or rapeseed (Rulli *et al.*, 2016).

The use of agricultural crops as raw material for the production of biofuels raises serious doubts about its sustainability. It has possible effects on food security and the environment such as changes in land use, water footprint and great dependence of synthetic fertilizers, among other concerns (Tilman *et al.*, 2002; Erisman *et al.*, 2008; Gerbens-Leenes *et al.*, 2009).

Microalgae and cyanobacteria are considered an increasingly promising alternative to conventional crops and lignocellulosic residues, as raw material for the production of biofuels and supplements for animal feed. This is mostly due to a higher photosynthetic productivity and a more favorable biochemical composition (absence of lignin), as well as the possibility of cultivation on land unfit for agriculture, among other characteristics. Some of the main obstacles to achieving large-scale cultures of these organisms is the unsustainable requirement of N and P fertilizers, as well as the high costs associated with the collection of biomass. There is a general agreement that obtaining only biofuels from microalgae biomass is not economically profitable, so it is presumed that the co-production of high value-added products within the framework of a biorefinery would increase the profitability of producing oils or sugars from microalgae, with a minimum of waste and emissions (Demirbas, 2009).

In this thesis we provide a proof-of-concept for a semi-closed loop platform for algae production and the biorefinery of the obtained biomass, for the production of ethanol and biodiesel at the expense of atmospheric CO₂ and N₂, and the P of bone meal. This platform provides concepts of circular economy in the field of microalgal biomass biorefinery. N₂ is assimilated by a N₂-fixing cyanobacterium (*Nostoc* sp. strain M2) that reaches high yields of biomass (2 g dry weight.L⁻¹) and protein (60 % w/w). This strain was selected due to its rapid growth and the characteristic decanting of its cells in very short periods of time (15-30 min).

The aqueous extract obtained from this biomass produced an organic fertilizer, which sustained the mixotrophic growth, of a wide diversity of microalgae, with no additional sources of nutrients. Complete substitution of chemical N-fertilizers was achieved, with an efficient conversion into microalgal biomass with high content of oils or fermentable sugars. It was also

demonstrated, the possibility of obtaining high added-value products from these cell-free extracts (phycobiliproteins).

Simulations in environmental photobioreactors showed that *Chlorella sorokiniana* produced oils (42% lipids w/w) in the range of current yields obtained from microalgae grown in raceway ponds at the expense of synthetic fertilizers (10.000-13.000 L.ha⁻¹.year⁻¹), and 20-times higher than the yield reported when using soy as feedstock.

Concurrently, a bioprospection of our collection of native microalgae allowed the selection of three strains with biotechnological potential (*Desmodesmus* sp., strain FG, *Chlorella* sp. strain MI and strain SP2-3) for the production of ethanol. They were evaluated for their capacity to accumulate fermentable sugars in conditions of nutritional stress. *Desmodesmus* sp. FG strain presented very high yields of biomass (8 g dry weight.L⁻¹), and a robust growth that accumulated high levels of carbohydrates (60 % w/w). The algae biomass was saccharified in the presence of H₂SO₄, and this acidic condition was also used to release soluble phosphate from different sources of P, including bone meal. After increasing the pH, the resulting preparation was fermented with *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol at values close to 90 % of its theoretical yield. Both a high conversion efficiency of biomass into ethanol of 0.25 g.g biomass⁻¹ and a high concentration of ethanol in the fermentation broth of 24 g ethanol.L hydrolyzed biomass⁻¹ was demonstrated. Additionally CO₂ was recovered as a reusable point source at yields close to the theoretical maximum. The simulation of the microalgal productivity at the expense of the *Nostoc*-based organic fertilizer in environmental photobioreactors mimicking the conditions of open ponds, under the environmental conditions of the south of the province of Buenos Aires, showed a conversion efficiency between 7.600-10.800 L of ethanol.ha⁻¹.year⁻¹, depending on whether *Nostoc* is grown in outdoor ponds or in tubular photobioreactors, respectively.

Ethanol production yields were 2-3 or 5-7 times higher than the reported yield when maize grains or lignocellulosic residues are used as feedstock (Pimentel & Patzek, 2005; Karlen *et al.*, 2011), respectively.

The resulting fermentation vinasse, supplemented with P, was efficiently recycled as the sole source of macronutrients for the culture of the biomass of the N₂-fixing cyanobacteria to close a production cycle.

The recycling of water and the co-production of residual biomass are also shown as a possible nutritional supplements for animal production, and gypsum, which can be used as a material for construction or as an amendment for soils.

The semi-closed cycle platform for the production of algal biomass from economical and renewable raw materials, the intensive recycling of nutrients and the minimization of waste, introduce concepts of circular economy to algal biotechnology. It is expected that designs of this type contribute to long-term food and energy security.

ABREVIATURAS POR ORDEN ALFABÉTICO

ac: acineto.
ACCasa: acetil-CoA carboxilasa
ACP: proteína transportadora de acilos
ADH: enzima alcohol deshidrogenasa
AF: almidón fosforilasas
AFC: alo-ficocianina
AG: ácidos grasos
AGPasa: ADP-glucosa pirofosforilasa
AS: almidón sintetasas
ATP: adenosina tri fosfato
Btons: miles de millones de toneladas
c.a.: circa (aproximadamente)
cv: célula vegetativa
DAG: diacilglicerol
DGAT: acil-CoA-di-acil-glicerol-acil-transferasa
DNA: ácido desoxirribonucleico
EDP: enzimas desproporcionadas (1 y 2)
EDR: enzimas deramificantes.
ePBRs: fotobiorreactores ambientales
ER: enzimas ramificantes
FAME: ésteres metílicos de ácidos grasos
FAS: sintasa de ácidos grasos
FatA y FatB: acil ACP tioesterasas
FBN: fijación biológica del N₂
FBP: ficobiliproteínas
FC: ficocianina
FGM, fosfo-gluco-mutasa plastidial
Glc: glucosa
GSA: di-kinasas de glucanos solubles en agua
hc: heterocisto
ISA: isoamilasas
KAS III: 3-cetoil ACP sintasa III
LPC: lisofosfatidilcolina
MC: microcistina total
MEX1: transportador de maltosa
MOS: malto-oligosacaridos
Mt: tonelada métrica.
ODS: Objetivos de Desarrollo Sustentable
PA: ácido fosfatídico
PBRs: fotobiorreactores de tipo "air-lift"
PC: fosfatidilcolina
PEP: fosfoenol piruvato
PGM: fosfo-gluco-mutasa plastidial
Pi: fosfato inorgánico
PPi: pirofosfato
PSA: polisacárido soluble en agua
RE: retículo endoplasmático
R-FE: R-ficoeritrina
SAG: síntesis de ácidos grasos
SFS: hidrólisis y fermentación por separado
SFS: sacarificación y fermentación simultáneas
SP: almidón fosforilasas
SS: almidón sintetasas
TAGs: triacilgliceroles
UDP-glucosa: uridil di fosfato-glucosa
 α AMY: α -amilasa.
 β AMY: β -amilasas.



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. *Desarrollo de la humanidad y sistemas productivos convencionales*

Según la Organización de las Naciones Unidas (ONU, 2017), se estima que la población mundial se incrementará de 7500 millones a 9800 millones de personas hacia el año 2050, a razón de 30 millones por año, principalmente en países en desarrollo Tabla 1 (Chen *et al.*, 2016; ONU, 2017). Se considera que este incremento demográfico propiciará un aumento proporcional de la demanda de alimentos (Tilman *et al.* 2002; Chen *et al.*, 2016).

El desarrollo global presenta una gran dependencia tanto de los combustibles fósiles (fuente de energía y materiales) como de la agricultura industrializada (producción de alimentos, suplementos alimenticios para animales y materias primas para la generación de biocombustibles). Este hecho resulta en un serio desafío en cuanto a la calidad del medioambiente y la sustentabilidad de los sistemas productivos actuales, siendo los parámetros más afectados: i) la tasa de pérdida de biodiversidad, ii) el clima, y iii) la interferencia antropogénica con el ciclo del N, debida mayormente a la producción y uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura (Rockstrom *et al.*, 2009; Borjesson & Tufvesson, 2011).

Tabla 1. Proyecciones de la población mundial y de las regiones entre 2017 y 2100

| Región | Población (millones) | | | |
|----------------------------|----------------------|-------|-------|--------|
| | 2017 | 2030 | 2050 | 2100 |
| Mundial | 7.550 | 8.551 | 9.772 | 11.184 |
| África | 1.256 | 1.704 | 2.528 | 4.468 |
| Asia | 4.504 | 4.947 | 5.257 | 4.780 |
| Europa | 742 | 739 | 716 | 653 |
| América Latina y el Caribe | 646 | 718 | 780 | 712 |
| Norte América | 361 | 395 | 435 | 499 |
| Oceanía | 41 | 48 | 57 | 72 |

ONU, 2017.

1.1.1. *Combustibles fósiles*

Con las tendencias de consumo actuales se estima que las reservas mundiales de petróleo podrían agotarse en 2050 (Chen *et al.*, 2013) y se espera que la bioenergía derivada de recursos renovables podría proporcionar alrededor del 30 % de la demanda energética para esa fecha (Guo, *et al.* 2015). A fines de 2006, se calculó que se cuenta con reservas de petróleo, gas natural y carbón hasta aproximadamente el 2050, 2070 y 2150, respectivamente, con un total de emisiones de gases de efecto invernadero de 40,4 mil millones de toneladas (Btons), predichos para 2030 (Figura 1) (Liandong, 2015).

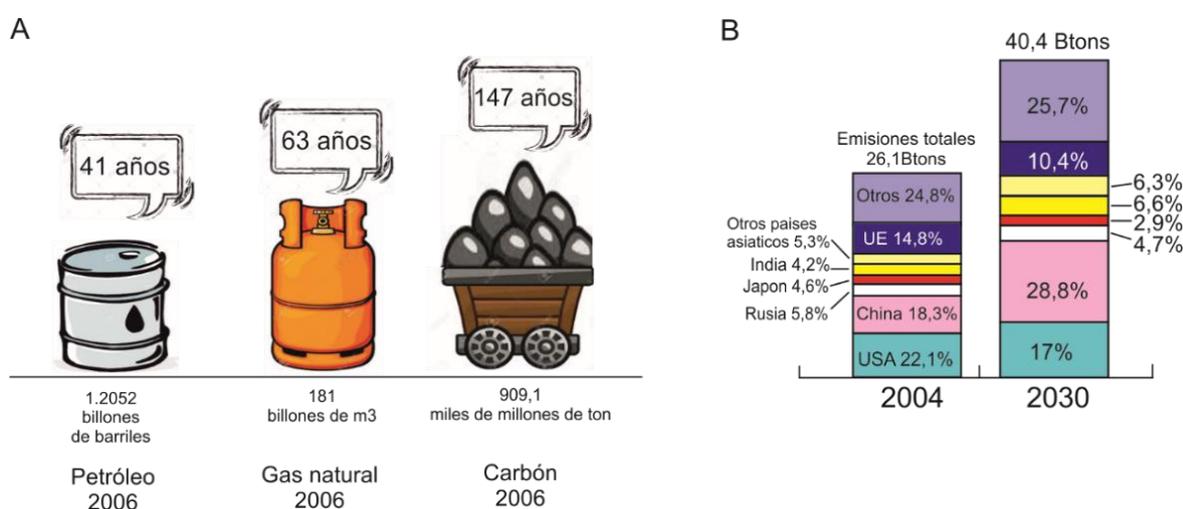


Figura 1. Crisis energética, calentamiento global y cambio climático. (A) Reservas de combustibles fósiles probadas. (B) Emisiones de CO₂ en 2004 y una perspectiva por países para 2030 (modificado de Liandong, 2015).

1.1.2. *La agricultura como sostén para la producción de alimentos y bioenergía y los Acuerdos Internacionales para promover la energía a partir de recursos renovables*

Los biocombustibles se producen actualmente directa o indirectamente a partir de biomasa vegetal y permiten reemplazar, al menos en parte, a los combustibles fósiles. Las energías alternativas a partir de recursos renovables (biomasa) poseen el carácter de C neutros, lo que significa que, al tener un ciclo cerrado de C, el CO₂ liberado a la atmósfera durante la combustión del biocombustible estaría balanceado con aquél fijado fotosintéticamente durante la acumulación de la biomasa (Chisti, 2007; Chisti, 2008; CARBIO, 2017).

1.1.2.1. *Protocolo de Kyoto*

En 2005 entró en vigor el Protocolo de Kyoto (Grubb *et al.*, 1997). Este acuerdo internacional tiene como objetivo reducir las emanaciones de gases de efecto invernadero de origen antrópico que provocan el cambio climático, mediante la disminución del uso de combustibles fósiles y el aumento de la captura neta en sumideros terrestres de C (Cheah *et al.*, 2016).

La República Argentina promulgó en 2006, la ley 26.093 para la regulación y promoción de la producción y uso sustentable de biocombustibles, estableciéndose como un incentivo fiscal, la exención de impuestos. Uno de los principales aspectos de la ley fue establecer que la nafta y el diesel, derivados de la destilería y refinería del petróleo, respectivamente, fueran mezclados con un 5 % de bioetanol y un 5 % biodiesel (Ax Elicegui, 2006).

Al protocolo de Kyoto, en su segundo período, se le aplica la enmienda de Doha, mediante la cual los países participantes se han comprometido a reducir las emisiones en un 18% (como mínimo) con respecto al año 1990. Argentina ratificó la enmienda en 2015 y desde abril de 2016, los cortes fueron del 10 % para el biodiesel y del 12 % para el bioetanol (decreto 543/2016).

Si bien se ha conseguido una reducción de las emanaciones de los 37 países firmantes, al no estar involucradas las principales potencias (China por no pertenecer al grupo de países desarrollados y Estados Unidos que no ratificó el protocolo), las emisiones globales se han seguido incrementando. En la cumbre de París en 2015, se discutió un protocolo, que sustituyera al de Kyoto, donde tanto países desarrollados como no desarrollados, deben presentar voluntariamente compromisos de reducción de emisiones de acuerdo a sus posibilidades, con el objetivo de reducir a fin de siglo la temperatura global en 2 ° C.

1.1.2.2. *Organización de las Naciones Unidas: Agenda 2030*

En 2015, en el marco de la Agenda 2030 de la Organización de las Naciones Unidas, los líderes mundiales adoptaron un conjunto de objetivos globales para erradicar la pobreza, proteger al planeta y asegurar la prosperidad para todos, como parte de una nueva agenda de desarrollo sostenible. Esta agenda cuenta con 17 Objetivos de Desarrollo Sustentable (ODS), cada uno de ellos con metas para el año 2030. Más allá del nexo establecido entre los alimentos, la energía y el agua (Chen *et al.*, 2016; Rulli *et al.*, 2016), existe un mapa aún más complejo de interacciones entre los 17 ODS, de la Agenda 2030, que depende del contexto, espacio y / o tiempo. Así, el acceso a la energía facilita el bombeo de agua y el riego,

aumenta la productividad de los cultivos, el procesamiento de alimentos, la preservación, el saneamiento y el transporte, promoviendo la seguridad alimentaria, el alivio de la pobreza y la salud, lo que permite la educación y los aspectos sociales vinculados; pero tiende a comprometer la preservación de la calidad del ambiente (Nilsson *et al.*, 2016; ONU, 2017). La agricultura está, por lo tanto, enfocada a alcanzar los principales ODS (Naciones Unidas, 2017) como la erradicación del hambre hacia 2050, donde se estima un aumento de la producción mundial de alimentos de entre 60 y 110 % (Rockström *et al.*, 2017). El desafío es enorme considerando que la agricultura es el principal impulsor mundial del cambio ambiental global (Tilman *et al.*, 2001; Rockström *et al.*, 2009) y, al mismo tiempo, se ve severamente afectada por estos cambios (Rosenzweig *et al.*, 2014). Esta demanda de alimentos, especialmente para los próximos años todavía no está totalmente garantizada y plantea una seria preocupación por el uso de alimentos con propósitos energéticos (Nigam *et al.*, 2011; Baeyens *et al.*, 2015).

1.2. Biocombustibles líquidos de primera generación

La biomasa puede ser convertida en biocombustibles líquidos o gaseosos mediante métodos bioquímicos o termoquímicos. La conversión bioquímica incluye la fermentación de componentes o la digestión anaeróbica para producir moléculas energéticas tales como el bioetanol, biobutanol, biohidrógeno y biogás.

Otra tecnología de conversión es la extracción de aceites para la producción de biodiesel. El biodiesel es un combustible basado en aceites vegetales (de microalgas u otra biomasa oleaginosa) o grasas animales. La reacción típica de transesterificación se produce a partir de los lípidos (TAG) con un alcohol, con la consecuente producción de ésteres de ácidos grasos de cadena larga (metil, etil o propil-ésteres) (Rulli *et al.*, 2016).

La conversión termoquímica incluye la combustión directa para la generación de calor y electricidad, así como también procesos indirectos como la pirólisis, la gasificación y la licuefacción termoquímica (Brennan & Owende, 2010; Chen *et al.*, 2013).

Los biocombustibles líquidos, como el biodiesel y el bioetanol de primera generación, son algunas de las alternativas y son de primordial interés para el sector del transporte, entre otros (Chen *et al.*, 2013; Dale *et al.*, 2014). Estos biocombustibles de primera generación son producidos a partir de cultivos de plantas destinadas a la alimentación como la soja, colza, girasol, palma oleífera (entre otras) para la producción de biodiesel y la caña de azúcar, remolacha azucarera, maíz, trigo o cebada para la producción de bioetanol (Figura 2 A-B). La

producción mundial de bioetanol y biodiesel en 2018 fue de 127 y 39 millones de litros, respectivamente (OCDE-FAO).

En la República Argentina, en el primer trimestre del año 2018, la producción de biodiesel presentó un crecimiento del 10,5 %. Las exportaciones en toneladas registraron un incremento de 76,5 % y los despachos al mercado interno mostraron un descenso de 4,7 %, en comparación con el mismo período del año anterior. Los valores de producción de biodiesel fueron de 177.939 toneladas, los despachos al mercado interno 94.027 toneladas y las exportaciones fueron de 60.200 toneladas.

En 2018, la producción nacional de bioetanol fue de 67.486 toneladas, de los cuales 17.968 toneladas se produjeron a partir de la caña de azúcar y 49.519 toneladas a partir del maíz (Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC), 2018).

Sin embargo, y a pesar del gran beneficio sobre la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero, la presión adicional sobre la agricultura para suministrar materias primas con fines energéticos (biocombustibles) usando cultivos convencionales, plantea dudas sobre su sostenibilidad debido a que los mismos se elaboran a partir de cultivos que pueden destinarse a la alimentación humana o del ganado, derivando en una situación de competencia con la producción primaria de alimentos, además de influir en el alza de los precios de los alimentos porque compiten con la producción de los mismos.

Por lo tanto, se deben tomar en consideración sus posibles efectos en la seguridad alimentaria y los problemas ambientales relacionados con el cambio en el uso de la tierra, la huella hídrica y la gran dependencia de los fertilizantes sintéticos, entre otras preocupaciones (Tilman *et al.*, 2002; Crutzen, *et al.*, 2008; Erisman *et al.*, 2008; Gerbens-Leenes *et al.*, 2009; Graham-Rowe *et al.*, 2011; Sutton *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Parvatkter, 2013; Lelieveld, *et al.*, 2015).

1.3. *Biocombustibles líquidos de segunda generación*

Se ha incrementado el interés a nivel mundial, en la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos, especialmente los considerados como residuos agrícolas y/o forestales (bagazo, rastrojo de maíz, paja de arroz, cultivos energéticos, etc.) (Figura 2 A).

Los biocombustibles de segunda generación presentan ventajas sobre sus predecesores, principalmente relacionadas con i) la disponibilidad, ii) bajo costo, iii) no competencia con los alimentos, y iv) reducido impacto ambiental, en términos de cambio en el uso de la tierra.

Sin embargo, enfrentan desventajas difíciles de superar debido a la composición y estructura de la biomasa que requiere altos costos asociados con la conversión de los materiales lignocelulósicos en etanol (Nigam *et al*, 2011; Baeyens *et al*, 2015).

La conversión de la biomasa lignocelulósica requiere de pre-tratamientos mecánicos y fisicoquímicos bastante intensivos y enzimas de sacarificación costosas para la producción del biocombustible deseado. Estos tratamientos frecuentemente promueven la generación de inhibidores de la fermentación tales como ácidos débiles, furanos y compuestos fenólicos, formados o liberados durante la hidrólisis. Aunque se han demostrado algunas alternativas para la desintoxicación de estos compuestos, su implementación aumenta los costos de producción. En vista de estas dificultades, se ha previsto mejorar tanto la composición como la estructura de la biomasa vegetal empleada como materia. Por ejemplo, se modificó genéticamente la vía de síntesis de lignocelulosa. Sin embargo, esta estrategia alteró la integridad estructural de las plantas y su defensa frente a insectos y microorganismos patógenos (Sticklen, 2008).

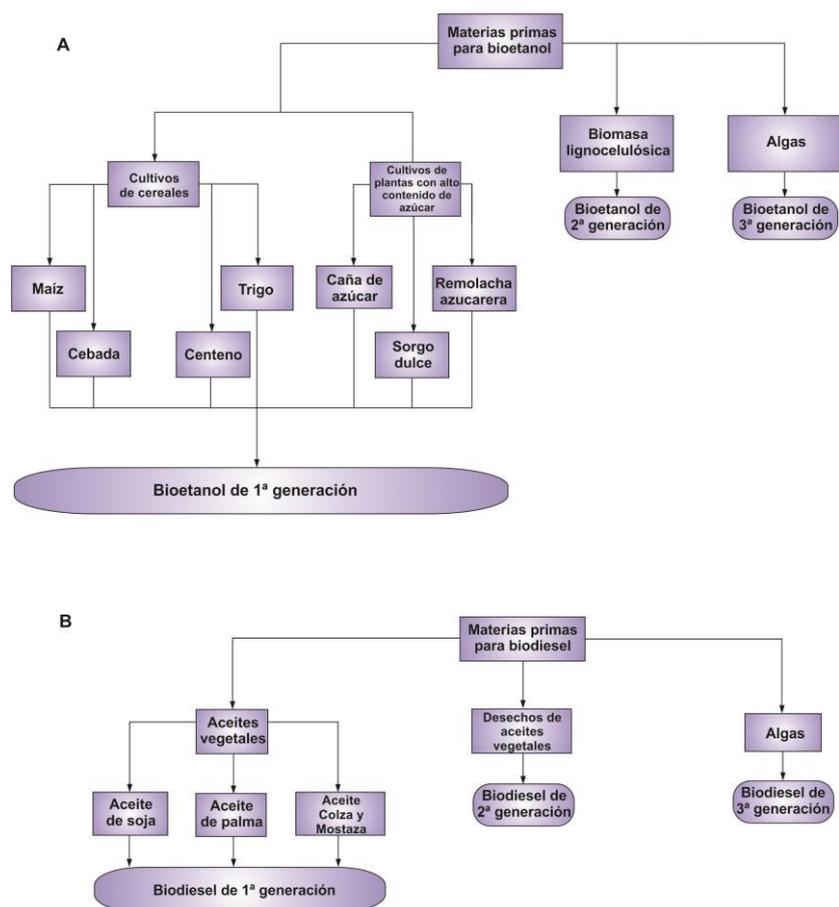


Figura 2. Materias primas para producción de biocombustibles. (A) El bioetanol es obtenido mediante fermentación alcohólica, a partir de carbohidratos de cultivos de organismos fotosintéticos con alto contenido de

azúcares o de almidón, convirtiendo azúcares como la glucosa, fructosa y sacarosa, en etanol. (B) El biodiesel es un combustible basado en aceites vegetales o grasas animales; constituido por ésteres de ácidos grasos de cadena larga (metil, etil o propil-ésteres). La reacción típica es a partir de los lípidos con un alcohol, con la consecuente producción de ésteres de ácidos grasos en un proceso denominado transesterificación (modificado de Rulli *et al.*, 2016).

1.4. *Biocombustibles líquidos de tercera generación: biomasa de microalgas como alternativa*

Las microalgas presentan algunas características que las hacen muy atractivas como materia prima para biocombustibles en comparación con sus predecesores de primera y segunda generación:

i) Presentan mayor productividad fotosintética, con una tasa de fijación de CO₂ alrededor de 10-50 veces mayor (Yen *et al.*, 2013), aumentando de esta manera la captura de CO₂, disminuyendo la cantidad de gases de efecto invernadero emitidos. La mayor eficiencia en la conversión de energía solar en biomasa, es en parte consecuencia de su mayor relación superficie-volumen lo que les permite la absorción de mayores cantidades de nutrientes debido especialmente a que se encuentran sumergidas en un ambiente acuoso (Chisti, 2007). Por ejemplo, presentan una productividad 4 a 5 veces mayor de aceite, comparada con las plantas terrestres más productivas utilizadas actualmente como materia prima para biodiesel (Moheimani & Borowitzka, 2006). A su vez, presentan ciclos de cosecha muy cortos (1-10 días) comparados con otros cultivos convencionales (que se cosechan una o dos veces al año).

ii) Se caracterizan por presentar una composición bioquímica y propiedades estructurales de la biomasa más favorables con respecto a los cultivos terrestres convencionales (por ejemplo, alto contenido de lípidos neutros y / o polisacáridos, ausencia de lignina y bajo contenido de hemicelulosa), requiriendo por lo tanto pre-tratamientos más sencillos para su conversión en biocombustibles.

iii) Presentan la posibilidad de producir biomasa en tierras no cultivables (por ej. desiertos o tierras costeras) y de utilizar aguas residuales domésticas y/o industriales como fuente de nutrientes de bajo costo (especialmente CO₂, N y P). De esta manera se evitaría la competencia por tierras fértiles y se mejoraría la economía del agua y los nutrientes mediante un reciclado efectivo. La agricultura representa más del 70 % del consumo global de agua dulce (Tilman *et al.*, 2002; Salmon *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016), y la producción de biocombustibles a partir de cultivos de algas insumiría sólo el 2-3 % del agua y de las tierras, con respecto a las utilizadas para la agricultura (Rulli *et al.*, 2016). Se sugirió que sólo el 1,1-

2,5 % de las áreas destinadas a cultivos en E.E.U.U. serían suficientes para producir biomasa de algas y satisfacer el 50 % de las necesidades de combustibles para transporte (Yujie *et al.*, 2017).

iv) A pesar de su naturaleza acuática, las microalgas presentan una huella hídrica más favorable que los cultivos terrestres, (Gerbens-Leenes *et al.*, 2014; Rulli *et al.*, 2016), especialmente si se optimiza el reciclaje de agua dulce y/o el uso de agua de mar (National Research Council of the National Academies, 2013; Huntley *et al.*, 2015; Laurens *et al.*, 2017). La huella hídrica de algunos cultivos para la producción de biocombustibles de primera generación, es de 50 a 600 m³/ GJ para los casos más a menos favorables analizados, lo que plantea dudas sobre la sostenibilidad de su expansión (Gerbens-Leenes *et al.* 2009; Graham-Rowe, 2011). El cultivo de microalgas, ya sea en estanques abiertos o en fotobiorreactores, ubicados en diferentes zonas geográficas, conducirían a una huella hídrica de 8 a 193 m³/ GJ, superando a la mayoría de los cultivos terrestres en este parámetro medioambiental (Rulli *et al.*, 2016; Gerbens-Leenes *et al.*, 2014).

v) Son compatibles con la producción integrada de combustibles y co-productos en el marco de biorrefinerías avanzadas (Georgianna & Mayfield, 2012; National Research Council of the National Academies (2013); Chen *et al.*, 2013).

La gran mayoría de las investigaciones para la producción de biocombustibles a partir de microalgas correspondió a la posible producción de biodiesel (Chisti, 2007; Wijffels & Barbosa, 2010). Sin embargo, existen cepas de microalgas que acumulan niveles elevados de hidratos de carbono en su biomasa (Sheehan *et al.*, 1998; Dragone *et al.*, 2011; John *et al.*, 2011; Domozych *et al.*, 2012; Wijffels *et al.*, 2013; Chaudhary *et al.*, 2014). La glucosa es el principal azúcar en la biomasa de las microalgas y, en algunos casos, puede representar hasta el 90 % de los azúcares totales, cuando las células se inducen adecuadamente (Markou *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2013). Esta composición sugiere que la biomasa de microalgas también podría considerarse una materia prima alternativa para la producción de bioetanol y/u otros productos de fermentación.



Figura 3: Procesamiento de la biomasa para producción de bioetanol. Comparación de los procesamientos de la biomasa de diferentes materias primas para la producción de bioetanol (modificado de Sanz Smachetti *et al.*, 2018).

1.5. Biología, Ecología y Fisiología de microalgas

1.5.1. Biodiversidad

Las microalgas presentan una gran biodiversidad con unas 100.000 especies. Las clases más importantes en términos de abundancia y significado biotecnológico son las diatomeas (Bacillariophyceae), las algas verdes (Chlorophyceae) y las algas doradas (Chrysophyceae). Por otro lado, las cianobacterias (algas verde-azuladas) (Cyanophyceae) son un grupo taxonómico y filogenético divergente de los mencionados anteriormente, pero biotecnológicamente hablando, también se suelen incluir bajo el nombre de microalgas (Demirbas, 2017).

1.5.2. Metabolismo fotosintético del carbono en microalgas

Tanto el metabolismo fotosintético de las microalgas como el metabolismo de carbohidratos y lípidos, es a grandes rasgos, similar al de las plantas terrestres (Salerno & Curatti, 2003; Gonzalez Fernandez & Ballesteros, 2012). Sin embargo, presentan una eficiencia fotosintética en el rango de 6-10%, superando el 1-2% de las plantas terrestres (Peccia *et al.*, 2013).

La síntesis y acumulación de componentes celulares carbonados por parte de las microalgas es el resultado final de la fijación del CO₂, durante el proceso de fotosíntesis. El CO₂ es asimilado a través de la vía metabólica conocida como ciclo de Calvin, que ocurre en el estroma del cloroplasto cuyo primer paso es catalizado por la enzima RuBisCo (ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa) (Chen *et al.*, 2013). Este proceso biológico utiliza energía y poder reductor sintetizados en la fase lumínica, en forma de ATP y NADPH,

respectivamente, para reducir al CO₂ y producir moléculas de triosas fosfato: dihidroxiacetona-fosfato en equilibrio con gliceraldehido-3-fosfato (G3P); que es el precursor de biomoléculas más complejas.

1.5.2.1. *Metabolismo de lípidos*

El metabolismo de los lípidos en las microalgas sería similar al de las plantas terrestres debido a que poseen en su genoma homólogos de muchos de los genes involucrados en dicho proceso (Radakovits *et al.*, 2010, Beligni *et al.*, 2015). En la Figura 5 se muestran las vías simplificadas del metabolismo de triacilgliceroles (TAGs), así como las enzimas que intervienen en el proceso. Los ácidos grasos (AGs) libres son sintetizados en el cloroplasto, mientras que el ensamblado de los TAGs ocurre en el retículo endoplasmático (RE). El primer paso en la biosíntesis de AGs de muchos organismos es la conversión de acetil-coenzima A (CoA) a malonil-CoA, catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) (Radakovits *et al.*, 2010). El malonil-CoA formado en esta reacción es el donador de carbono central para la síntesis de AGs (Ohlrogge & Browse, 1995; Durret *et al.*, 2008). Los pasos siguientes involucran la formación del complejo malonil CoA-proteína transportadora de acilos (ACP) del complejo multi-enzimático sintasa de ácidos grasos (FAS), que participa en ciclos sucesivos, de reacciones de condensación con acil ACP o acetil CoA. Luego de una serie de cuatro reacciones catalizadas por las enzimas, 3-cetoil ACP sintasa III (KASIII o KASI para cadenas más largas), 3-cetoilACP reductasa, hidroxiacil ACP deshidratasa y enoil ACP reductasa, se incrementa el largo de la cadena naciente del ácido graso en dos átomos de carbono. La enzima soluble esteroil ACP reductasa introduce dobles enlaces durante la producción de ácidos grasos insaturados. La elongación cesa cuando la enzima acil ACP-tio esterasa hidroliza el acil ACP y libera el ácido graso libre o por medio de acil transferasas que transfieren el ácido graso desde la ACP directamente al glicerol 3-P. Durante la síntesis de TAGs, los AGs son secuencialmente transferidos desde la CoA a las posiciones 1 y 2 del glicerol 3-P formado durante la síntesis del ácido fosfatídico, el cual da lugar al diacilglicerol después de una reacción de desfosforilación. Finalmente, la síntesis de TAGs es catalizada por la enzima acil-CoA: diacilglicerolacil-transferasa (DGAT), la cual incorpora un tercer grupo acil-CoA a la molécula de diacilglicerol, finalmente los TAGs resultantes son almacenados en las vesículas o cuerpos lipídicos en el interior de la célula (Murphy, 2001; Wang *et al.*, 2009) (Figura 5).

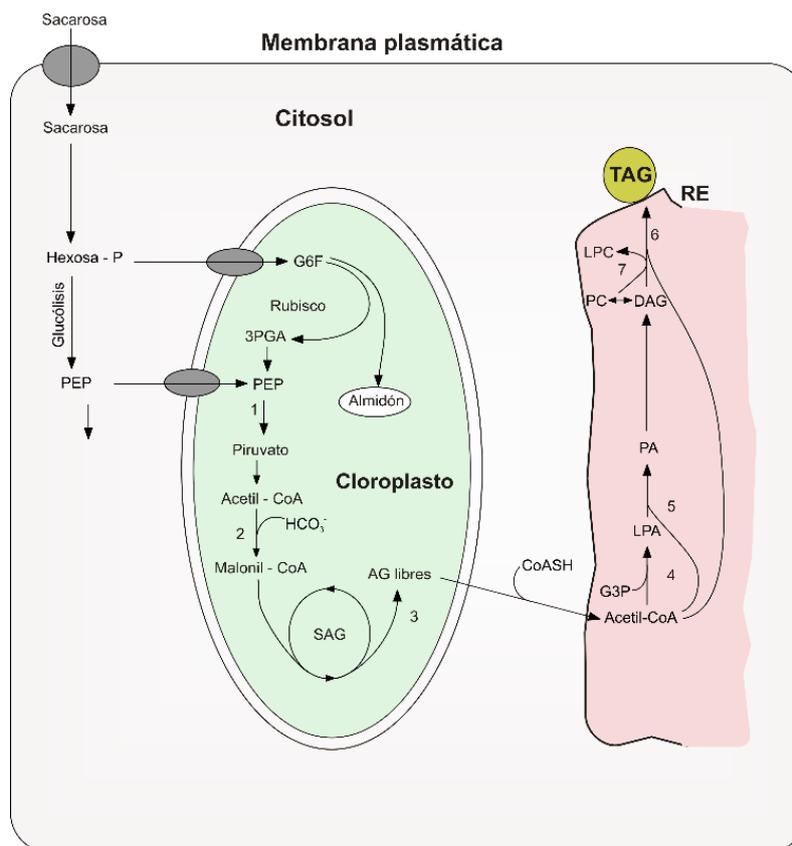


Figura 5. Esquema de la síntesis de ácidos grasos y triacilglicerol. Sólo se muestran las enzimas principales: 1, piruvato kinasa plastídica; 2, acetil CoA carboxilasa; 3, acil ACP tioesterasas (FatA y FatB); 4, glicerol-3-P acil transferasa; 5, ácido liso-fosfatídico aciltransferasa; 6, diacilglicerol aciltransferasa; 7, liso-fosfatidilcolina aciltransferasa. 3PGA, 3-P glicerato; AG, ácidos grasos; DAG, diacilglicerol; RE, retículo endoplasmático; SAG, síntesis de ácidos grasos; G3P, glicerol 3-P; G6P, glucosa 6-P; LPA, ácido liso-fosfatídico; LPC, lisofosfatidilcolina; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; PEP, fosfoenol piruvato; TAG, triacilglicerol. Modificado de Durret *et al.*, 2008.

1.5.2.2. Metabolismo de los hidratos de carbono

En la Figura 6 se muestran los metabolitos y las vías simplificadas del metabolismo del almidón, así como las enzimas involucradas en el proceso.

Los polisacáridos se clasifican en estructurales (celulosa en pared celular) y de reserva (almidón). El almidón es sintetizado y almacenado alrededor de un núcleo cristalizado y está presente como un gránulo amorfo en cloroplastos de microalgas verdes. Las cianobacterias almacenan glucógeno en el citosol como carbohidrato de reserva (Markou *et al.*, 2012; Lehninger, 2012; Radakovits *et al.*, 2010). Durante la biosíntesis del almidón en microalgas, los glucanos se agregan al polisacárido soluble en agua (PSA) mediante enlaces glucosídicos α -1,4 (PSA1) hasta que una enzima ramifica los extremos (PSA2). Algunas de estas ramas se recortan (PSA3), y este proceso se repite hasta formar el gránulo de almidón (Figura 6). El almidón puede ser degradado mediante mecanismos hidrolíticos o fosforolíticos. La degradación hidrolítica del almidón requiere enzimas capaces de hidrolizar glucanos semi-

cristalinos de la superficie del gránulo de almidón insoluble. Se muestran las vías de degradación fosforolíticas [Almidón-(P)_n] e hidrolíticas del almidón (Radakovits *et al.*, 2010) (Figura 6).

En *Chlamydomonas reinhardtii* se han encontrado genes homólogos al codificante de la α -amilasa (AMY3) de *A. thaliana*, la cual participa en la degradación hidrolítica del almidón. La degradación plastidial del almidón es estimulada por fosforilación de residuos de glucosa por di-quinasas de glucanos solubles en agua (GSA), tal como la amilopectina. Estas fosforilaciones son capaces de ayudar a desestabilizar la estructura cristalina de los gránulos de almidón permitiendo el acceso de enzimas hidrolíticas.

Al igual que en las plantas, la celulosa es un componente integral de la pared celular (la cual carece de lignina y contiene bajas cantidades de hemicelulosa) y sus niveles se mantienen constantes para una cepa determinada (Domozych *et al.*, 2012). La celulosa es sintetizada en un proceso complejo que incluye muchas reacciones enzimáticas, el sustrato de partida para la síntesis de celulosa es el UDP-glucosa (uridil di fosfato-glucosa) (Chen *et al.*, 2013).

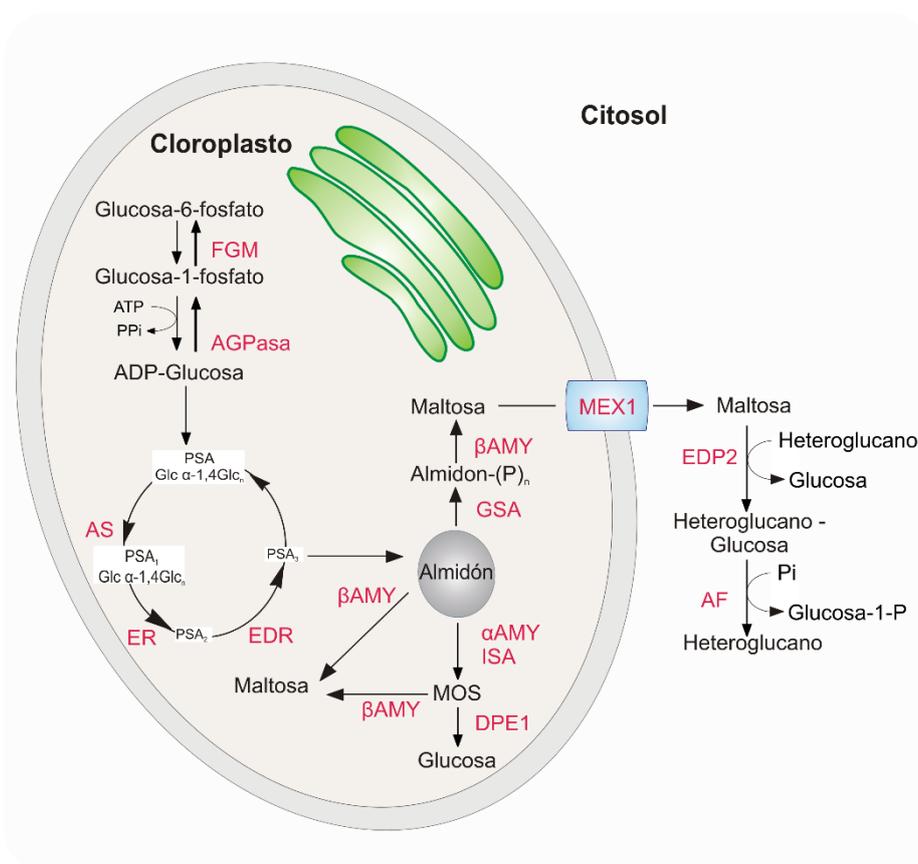


Figura 6. Metabolismo del almidón en microalgas verdes. Se muestran en negro los metabolitos y las vías simplificadas del metabolismo del almidón y en rojo las enzimas. α AMY, α -amilasa; AGPasa, ADP-glucosa pirofosforilasa; β AMY, β -amilasas; ER enzimas ramificantes; EDR, enzimas deramificantes; EDP, enzimas

desproporcionadas (1 y 2), α -1,4 glucanotransferasa; Glc, glucosa; GSA, di-kinasas de glucanos solubles en agua; ISA, isoamilasas; MEX1, transportador de maltosa; MOS, malto-oligosacáridos; FGM, fosfo-glucosutasa plastidial; P, fosfato, Pi, fosfato inorgánico; PPI, pirofosfato; AF almidón fosforilasas; AS, almidón sintetasas (modificado de Radakovits *et al.*, 2010).

1.5.2.3. Integración metabólica en microalgas

Las rutas metabólicas de las moléculas ricas en energía (por ej., carbohidratos y lípidos) están estrechamente relacionadas (Figura 7). Se demostró que existe una competencia entre la síntesis de lípidos y almidón, en condiciones de estrés, porque el principal precursor de la síntesis de TAGs es el glicerol-3-fosfato (G3P), que se produce por catabolismo de la glucosa en el citosol (glucólisis) (Rismani-Yazdi *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2012). La degradación del almidón provee metabolitos para la producción de acetil-CoA, el cual es el precursor para la síntesis de ácidos grasos. Así en algunos casos una disminución de la degradación de almidón mediante ingeniería genética, podría bloquear la síntesis de lípidos (Chen *et al.*, 2013). Otros autores informan que, en la mayoría de las microalgas, el almidón se acumula como fuente primaria de energía y reserva de C, mientras los lípidos sirven como un almacenamiento secundario (de Farías Silva *et al.*, 2019).

1.6. Tecnologías de producción de biomasa algal

1.6.1. Sistemas de cultivo masivo de microalgas

Uno de los sistemas más utilizados actualmente para producción de biomasa de microalgas a escala comercial, son los estanques abiertos (“raceway ponds”) debido a su escalado relativamente sencillo y costo moderado a bajo (Mata *et al.*, 2010; Brennan & Owende, 2010; Cai *et al.*, 2013). La mezcla y circulación de agua, nutrientes y biomasa se realizan mediante una rueda de paletas que guía el flujo del medio de cultivo (Chisti, 2007; Brennan & Owende, 2010). Normalmente, los requerimientos de CO₂ provienen del aire superficial, pero a menudo debe suplementarse al medio de cultivo (Terry & Raymond, 1985). Sin embargo, los estanques abiertos presentan muchas desventajas, siendo una de las más comunes, la evaporación del agua a temperaturas que favorecen la proliferación celular. La contaminación y/o depredación también son aspectos críticos que afectan la productividad (Borowitzka, 1999; Cai *et al.*, 2013).

Los reactores cerrados típicos incluyen sistemas de bolsas, fotobiorreactores tubulares (PBRs) y reactores de placa plana donde se introduce aire o aire enriquecido con CO₂ (Borowitzka, 1999; Wang *et al.*, 2012). En contraste con los sistemas de estanques abiertos, los fotobiorreactores permiten un mejor control sobre la evaporación del agua, la

contaminación y la depredación, y una mayor productividad; sin embargo, los costos de instalación y mantenimiento son mucho más altos que los de los estanques abiertos y representan el factor limitante para su comercialización (Schenk *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2013; Huntley *et al.*, 2015).

Por lo tanto, se han desarrollado sistemas híbridos, que aprovechan las mejores características de los estanques abiertos y de los PBRs, para aumentar la productividad de la biomasa. Los sistemas híbridos acoplan una primera etapa en PBR, para mantener condiciones constantes que favorezcan la división celular continua, previniendo la contaminación del cultivo, y una segunda etapa en estanques abiertos para exponer las células a la privación de nutrientes y otras tensiones ambientales que conducen a la síntesis y acumulación de sustancias de reserva (carbohidratos y/o lípidos) (Huntley *et al.*, 2015).

Los cultivos pueden ser operados en lote, en lote alimentado, o en sistemas continuos. En el modo en lote el principal objetivo es la productividad de biomasa, y se requieren dos operaciones unitarias: la primera (con exceso de nutrientes) donde se acumula biomasa hasta consumir los nutrientes, y una segunda etapa de crecimiento desacelerado que promueve la acumulación de reservas de C y energía, tales como lípidos o hidratos de carbono (de Farías Silva *et al.*, 2019). En el modo continuo habitualmente se utiliza la menor concentración de nutrientes que permita la proliferación celular y acumulación de lípidos o carbohidratos en forma simultánea (de Farías Silva *et al.*, 2019; Burrows *et al.*, 2008).

1.6.1.1. *Requerimientos de nutricionales para el cultivo masivo de biomasa algal: fertilizantes*

El medio de cultivo debe contener todos los elementos constituyentes de la célula como lo son el nitrógeno (N), el fósforo (P), el hierro (Fe) y los micronutrientes (Berberoglu *et al.*, 2009). El N es un nutriente esencial, el cual se asimila principalmente en forma de proteínas y secundariamente en forma de ácidos nucleicos y otros componentes celulares. El P es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y al igual que el N su déficit estimula la acumulación de sustancias de reserva (lípidos) en varias cepas de microalgas (Xin *et al.*, 2010). El CO₂ es la fuente de carbono para los organismos autotróficos y, como se mencionó con anterioridad, los cultivos de microalgas pueden suplementarse constantemente, sin embargo, la concentración óptima varía entre especies y un exceso de CO₂ en el medio de cultivo afecta negativamente el desarrollo de las algas debido a que genera una disminución

de pH del medio de cultivo si este no se encuentra equilibrado mediante soluciones tampón (Wang *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2010).

Una ventaja de las microalgas como fuente alternativa de biomasa es su gran capacidad para tomar nutrientes diluidos del medio de cultivo, lo que les permite una eficiencia de utilización de fertilizantes considerablemente mayor con respecto a los cultivos terrestres convencionales (Tuantet *et al.*, 2014). Sin embargo, una alta productividad de biomasa algal demandaría cantidades insostenibles de fertilizantes (N, P y CO₂) (Brennan & Owende, 2010; National Research Council of the National Academies, 2013; Laurens *et al.*, 2017).

Basados en la composición de la biomasa de microalgas (C₁₀₆H₁₈₁O₄₅N₁₆P), y asumiendo un consumo del 100 % de los nutrientes, para la producción de una tonelada de biomasa, serían necesarios alrededor de 40-90 kg de N y 3-15 kg de P. Estas cantidades de fertilizantes no pueden alcanzarse de forma sostenible para el cultivo de microalgas. Por ejemplo, para la producción de 1 L de biodiesel a partir de biomasa de microalgas, serían necesarios 0.23-1.55 kg de N y 0.029-0.145 kg de P, dependiendo de las condiciones de cultivo. Además, la producción de 19 mil millones L.año⁻¹ de biocombustibles basados en aceites de microalgas (aproximadamente el 25 % del objetivo establecido por la Ley de Seguridad e Independencia Energética de los Estados Unidos para el 2022), requeriría un incremento del uso de fertilizantes nitrogenados y fosforados del 41-56 % y 32-49 %, respectivamente (Canter *et al.*, 2015).

La demanda mundial de fertilizantes nitrogenados y fosforados ascendió a 120 Mt de N elemental y 47 Mt de P₂O₅, en 2018 (Heuer *et al.*, 2017). Los fertilizantes fosforados se producen a partir de rocas o sedimentos, cuyas reservas están distribuidas de manera desigual entre las regiones y son altamente susceptibles al agotamiento (Simons *et al.*, 2013; Cordell *et al.*, 2009). El fertilizante nitrogenado se obtiene principalmente mediante el proceso industrial de Haber-Bosch a partir del N₂ atmosférico, en un proceso energéticamente intensivo, que consume grandes cantidades de combustible fósil (Sutton *et al.*, 2011; Peccia *et al.*, 2013).

De esta manera, la producción de biomasa algal podría representar una amenaza potencial para la seguridad alimentaria debido a la competencia por suministros con la agricultura convencional y para la conservación del medio ambiente, (Rosh *et al.*, 2012; National Research Council of the National Academies, 2013; Peccia *et al.*, 2013).

Se han propuesto varias alternativas como sustitutos parciales o totales de nutrientes/fertilizantes para el cultivo masivo de microalgas, tales como el uso de aguas residuales y/o el reciclado interno del N de la biomasa residual (Canter *et al.*, 2015; Burén & Rubio, 2017).

1.7. Procesamiento de la biomasa algal

El proceso de recolección o cosecha de la biomasa de microalgas es más complejo y costoso que para los cultivos terrestres convencionales debido principalmente al pequeño tamaño de las células de las microalgas, que varía entre 2 y 40 μm (Molina Grima *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008; Milledge & Heaven, 2013). Los costos de concentración de las células representan el 20-30 % del costo total de producción de esta materia prima (Molina Grima *et al.*, 2003). Los métodos utilizados incluyen cosecha por flotación, floculación, sedimentación por gravedad, concentración por centrifugación y/o filtración (que son pasos que requieren una cantidad sustancial de energía) (Molina Grima *et al.*, 2003; Mollah *et al.*, 2004; Brennan & Owende, 2010; Hanotu *et al.*, 2013).

Los métodos de secado para la estabilización de la biomasa pueden incluir secado al sol o técnicas más avanzadas como liofilización, secado en horno, secado por pulverización y secado en lecho fluidizado (Figura 4) (Guldhe *et al.*, 2014).

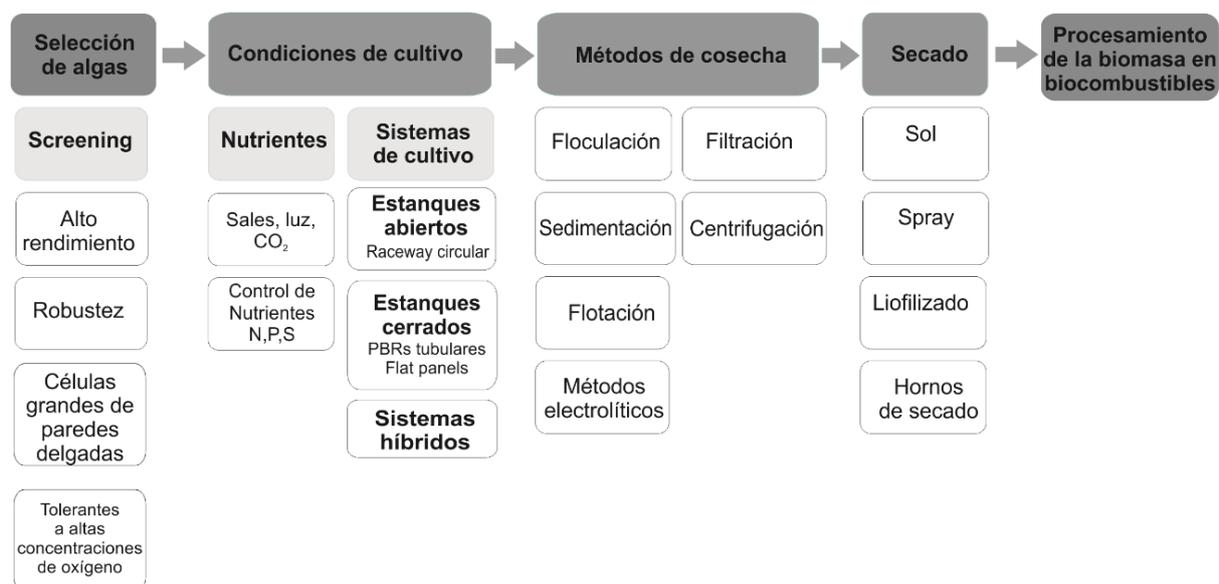


Figura 4: Esquema general de alternativas para la producción de biomasa algal y su conversión en biocombustibles (Modificado de Sanz Smachetti, 2018).

1.8. *Análisis económico de los procesos basados en microalgas y biorrefinería de biomasa algal*

El escalado de los procesos a base de microalgas y el procesamiento de la biomasa son los principales cuellos de botella para el desarrollo de esta industria y para el establecimiento de una tecnología madura. Para poder producir biomasa algal a un precio razonable debe mejorarse la eficiencia de la tecnología actual y deben reducirse los costos de cultivo, cosecha y secado de la biomasa resultante, así como del procesamiento posterior de la biomasa, entre otros. Los análisis de costos indican que la etapa de cultivo es la más cara en la producción de microalgas debido al costo de las piletas a cielo abierto o, especialmente, de los fotobiorreactores. Asimismo, sería necesario un aumento en la eficiencia de la utilización de recursos (fertilizantes y energía) (Acién *et al.*, 2017).

El costo de la propagación, recolección y deshidratación de las microalgas representa más del 70 % del costo de producción de los biocombustibles a partir de este tipo de biomasa (Moreno García, 2017; Coronel *et al.*, 2019). Según Parvatker (2013), la cosecha de la biomasa es el paso más intensivo energéticamente en el cultivo de microalgas, consumiendo alrededor del 40 % del total de la energía requerida para el proceso (Parvatker, 2013) y representando un 20-30 % de los costos totales de producción de biomasa de microalgas (Molina Grima *et al.*, 2003; Karemore & Sen, 2016).

Existe un acuerdo generalizado en que la obtención de biocombustibles como único producto a partir de biomasa algal es inviable desde un punto de vista ambiental y económico (Zhu, 2015). La separación de varios componentes comercializables a partir de la biomasa en una biorrefinería presenta una gran oportunidad para soslayar los altos costos de obtención de biocombustibles a partir de microalgas (Karemore & Sen, 2016). Las biorrefinerías son análogas a las refinerías del petróleo. Tanto la biomasa como el petróleo, están compuestos por diferentes fracciones que se pueden separar y convertir en productos útiles diferenciados (Demirbas & Demirbas, 2010).

Los análisis tecno-económicos sugieren que la co-obtención de productos de mayor valor agregado, dentro del marco de una biorrefinería integral de la biomasa algal, incrementaría en un 33 %, la rentabilidad de producir únicamente biocombustibles (que son productos de bajo valor agregado) (Chisti, 2013; Walsh *et al.*, 2016; Karemore & Sen, 2016; Laurens *et al.*, 2017). Uno de los principales co-productos posibles es la proteína cruda de microalgas ya que suele presentar buenas propiedades para alimentación o suplementos nutricionales para animales. La producción simultánea de biocombustibles y suplementos nutricionales a partir

de las fracciones correspondientes de la biomasa algal, incrementaría la factibilidad técnico-económica en relación a cada uno de los procesos de producto único. La separación exitosa de ambas fracciones, conservando sus propiedades representa un desafío técnico-económico específico (Walsh *et al*, 2016).



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Diseñar una plataforma de producción sustentable de biomasa algal, de circuito semi-cerrado, a expensas del CO₂ y N₂ atmosféricos y del P a partir de recursos naturales renovables, para producir alimentos y biocombustibles de tercera generación (bioetanol / biodiesel) en el marco de una biorrefinería integral de la biomasa.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Escrutinio preliminar de la respuesta al estrés nutricional de las cepas de la colección de microalgas y cianobacterias nativas.
2. Determinación de la composición de la biomasa con énfasis en los niveles de hidratos de carbono totales de las cepas seleccionadas, en respuesta al estrés nutricional.
3. Optimización de las condiciones de hidrólisis de la biomasa de las cepas nativas seleccionadas, para la liberación de azúcares fermentables.
4. Optimización de las condiciones de fermentación y determinación del rendimiento en bioetanol tras la fermentación de la biomasa de las microalgas con levaduras.
5. Determinación de la productividad de las cepas seleccionadas en condiciones de invernadero.
6. Reutilización de la biomasa post-fermentación (vinaza).



MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La Figura 8 muestra un esquema simplificado del flujo de operaciones llevadas a cabo en esta tesis.

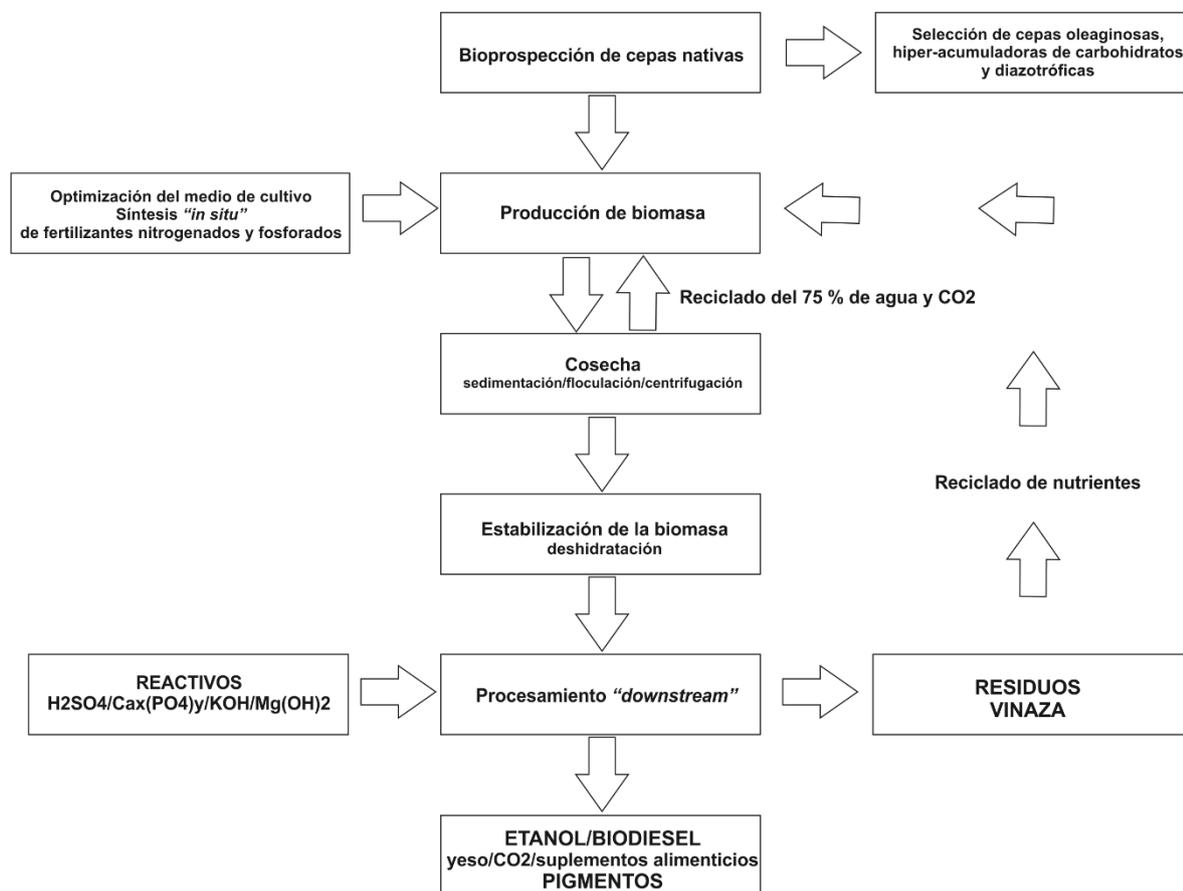


Figura 8. Esquema simplificado del flujo de operaciones llevadas a cabo en esta tesis

3.1. *Aislamiento de cepas de microalgas y cianobacterias*

Las cepas de microalgas y cianobacterias analizadas en este estudio han sido previamente aisladas de diferentes cuerpos de aguas salobres o de agua dulce de reservas ecológicas en los alrededores de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina (38° 0' 0" S 57° 33' 0" O) entre los años 2009 y 2013.

Las muestras medioambientales fueron enriquecidas en cultivos líquidos en medio mineral mínimo. Posteriormente, se realizaron diluciones 1:25 – 1:50 y se cultivaron durante varios meses, en frascos de cultivo tipo “Erlenmeyer” en un volumen de 25

mL, permitiendo el enriquecimiento de las cepas dominantes. Esta técnica de dilución seriada de las muestras medioambientales junto con la técnica de estriado en placa en medio sólido y seguimiento por observación microscópica; así como la confirmación del estado axénico de las muestras mediante cultivos en medio LB, constituyeron el conjunto de técnicas seleccionadas para el aislamiento de cepas nativas con potencial biotecnológico.

Todas las cepas aisladas pertenecen a la División Chlorophyta y se mantienen de forma rutinaria en nuestra colección de laboratorio, tanto en medio líquido como en el mismo medio, solidificado con agar-agar al 1% (p/v) (Do Nascimento *et al.*, 2012).

Las microalgas y la cepa de cianobacterias aisladas y utilizadas en este estudio fueron: *Nostoc* sp. cepa M2, *Chlorella sorokiniana* cepa RP, *Desmodesmus* sp. cepa FG, Chlorophyta cepa SP2-3, *Chlorella* sp. cepa MI, *Scenedesmus obliquus* cepa C1S, *Ankistrodesmus* sp. cepa SP2-15, *Pseudokirchneriella* sp. cepa C1D, *Chlorella* sp. cepa SP2-1, Chlorophyta cepa Chascomús, *Scenedesmus* sp. cepa SP2-9, *Scenedesmus* sp. cepa L2, Chlorophyta cepa C1, Chlorophyta cepa C1C, *Scenedesmus* sp. cepa SP1-20, *Ankistrodesmus* sp. cepa LP1, *Scenedesmus* sp. cepa RD. Las cepas *Chlamydomonas reinhardtii* cepa cc124 y *Nannochloropsis oceanica* fueron provistas por Christoph Benning (Universidad Estatal de Michigan, Estados Unidos).

3.2. Cultivo de microalgas y cianobacterias

3.2.1. Medios de cultivo

Las microalgas, así como la cianobacteria *Nostoc* cepa M2 fueron mantenidas rutinariamente en cámara de cultivo a 28 ± 1 °C e iluminadas con luz blanca constante a $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

La composición del medio de cultivo BG11 es: $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $0,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,075 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,036 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; ácido cítrico. $1\text{H}_2\text{O}$ $0,006 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; citrato de amonio férrico $0,006 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; EDTA (sal disódica) $0,001 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; Na_2CO_3 $0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, y la mezcla de metales traza A5 (H_3BO_3 $2,86 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $1,81 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,222 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,39 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,079 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0,049 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Rippka, 1979), conteniendo NaNO_3 0–12 mM o N_2 atmosférico (BG11₀) como únicas fuentes de N. Se indicará cuándo los cultivos no contengan fuentes de P o S. La deficiencia de estos nutrientes se realizó mediante el

reemplazo de KH_2PO_4 por KCl y de MgSO_4 por MgCl_2 . Los medios de cultivo bajo condiciones experimentales se describen en el texto principal.

C. reinhardtii fue cultivada en medio TAP suplementado con NH_4^+ 3 mM o N-proteico de extractos de *Nostoc*, como única fuente de N. La composición del medio TAP es: NH_4Cl 0,38 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; H_3BO_3 0,01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; KH_2PO_4 0,05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; K_2HPO_4 0,11 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; EDTA 0,05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido acético glacial 1,10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; Tris 2,42 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La cepa marina *N. oceanica* fue cultivada utilizando el medio de cultivo F/2 con KNO_3 3 mM o con el extracto de *Nostoc* como única fuente de N a 20 °C bajo una intensidad de luz de 35 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y en fotoperiodo con ciclos de 14 h de luz/10 h de oscuridad. La composición del medio F/2 es: NaNO_3 0,075 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,03 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Elementos traza Na_2EDTA 0,43 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,31 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,022 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,18 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,006 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Solución de vitaminas: Tiamina-HCl 0,20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; biotina 0,001 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; cianocobalamina 0,001 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975).

Todas las especies de agua dulce, excepto *C. reinhardtii* (que fue cultivada con NH_4^+) fueron suplementados comuna fuente de N 3 mM, proveniente de NaNO_3 , de la urea o de las proteínas del extracto de *Nostoc* (0,26 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de proteínas totales). Los ensayos con caseína se realizaron con la misma concentración de N-proteico del extracto 3 mM, la cual fue estimada en base al factor de conversión proteína-N de 6,25 (González López *et al.*, 2010).

3.2.2. *Sistemas de cultivo*

1) Frascos de cultivo tipo “Erlenmeyer” de 100 mL de capacidad conteniendo 25 mL de medio de cultivo mezclado en agitador orbital a 120 rpm. Los cultivos fueron crecidos en cámaras de cultivo con luz blanca a $200 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y temperatura a $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, constantes. Este sistema se usó para crecer los inóculos utilizados para escalar las muestras.

2) Botellas de 500 mL conteniendo 250 mL de medio burbujeado desde el fondo, con aire filtrado a $0,3\text{-}0,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. Los cultivos se llevaron a cabo en cámara de cultivo con luz blanca a $200 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y temperatura a $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, constantes (Figura 9). Este sistema de cultivo se llevó a cabo tanto para el análisis del crecimiento como para la caracterización de la biomasa de las cepas de microalgas.

3) Fotobiorreactores (PBRs) de tipo air-lift de 5 L de capacidad (Figura 10) (Do Nascimento *et al.*, 2014) conteniendo 4,5 L de medio burbujeado con aire esterilizado desde el centro del tubo a $0,6 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (circulación por flujo ascendente) y CO_2 puro desde el fondo de la circulación de flujo descendente a $0,2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. Los cultivos fueron incubados en cámaras de cultivo con luz blanca a $200 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y temperatura a $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, constantes. Este sistema de cultivo se utilizó con fines preparativos (fermentación de la biomasa y producción del extracto proteico).

4) Fotobiorreactores ambientales (ePBRs). Son sistemas de última generación a escala laboratorio que proporcionan un entorno de crecimiento diseñado para replicar las condiciones ambientales en estanques de producción de biomasa algal y sistemas naturales (Figura 11) (Lucker *et al.*, 2014). Las condiciones del ePBR utilizadas en este estudio, simulan las condiciones promedio del mes de noviembre en la ciudad de Mar del Plata y fueron las siguientes: la intensidad de luz del mediodía de $1500 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 14 h de luz por día en un ciclo sinusoidal y las temperaturas máxima y mínima fueron de $26 \text{ }^\circ\text{C}$ y $16 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente, también en un modo de ciclo sinusoidal. El burbujeo con aire filtrado se realizó a un flujo de $0,25 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$.

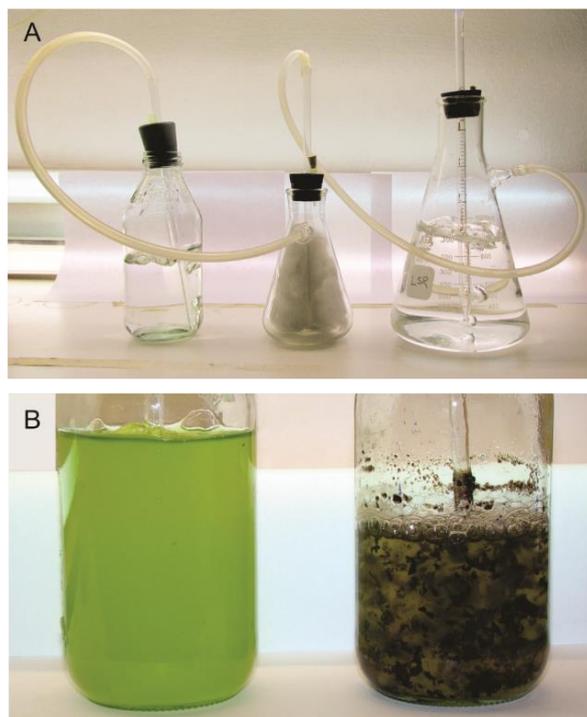


Figura 9. Sistema de cultivo en botellas de 500 mL. (A) Fotografía del sistema de cultivo: el flujo de aire y de CO₂ fue filtrado y humectado antes de pasar al medio de cultivo, desde el fondo de la botella. (B) Fotografía de cultivos líquidos de *Chlorella sorokiniana* cepa RP y *Nostoc* sp. cepa M2.

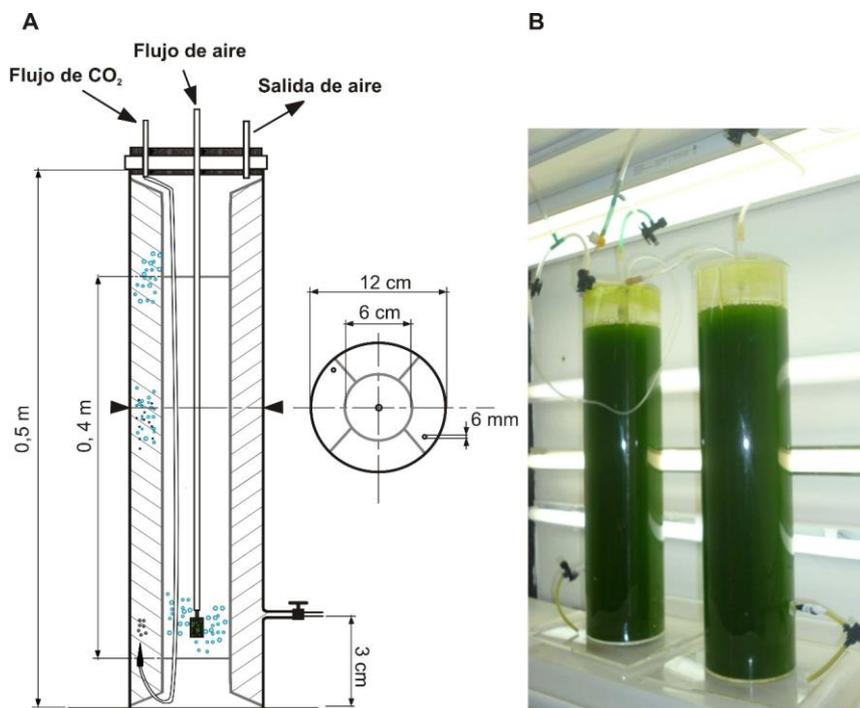


Figura 10. Fotobiorreactor de tipo “air-lift”. (A) Esquema, (B) fotografía. El flujo de aire, CO₂ y el medio de cultivo se establecieron de modo que se permita maximizar la mezcla de los gases. El aire filtrado se burbujeó desde el fondo del cilindro interno, mientras que el CO₂ se burbujeó desde el fondo del cilindro externo (Do Nascimento *et al.*, 2014).

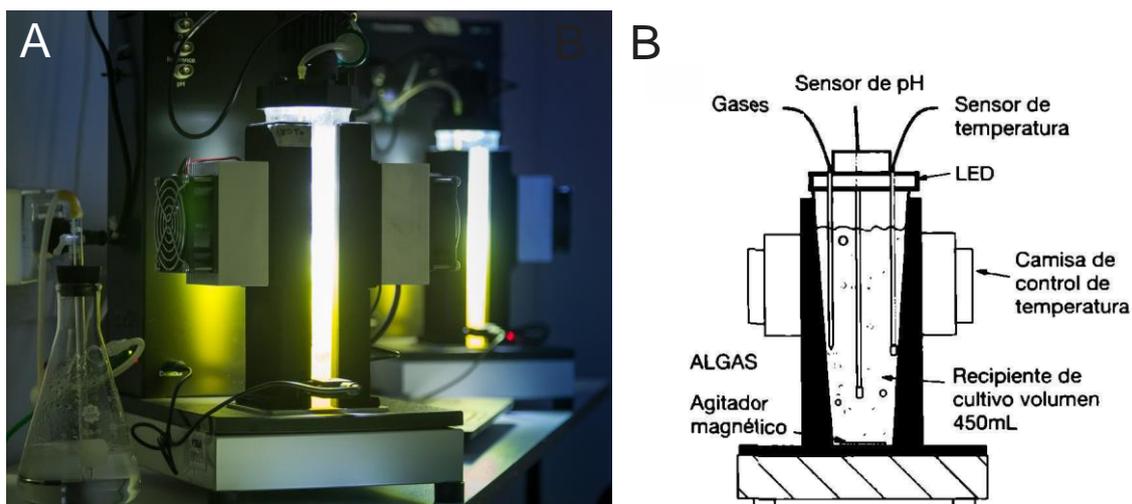


Figura 11. Sistemas de cultivo de microalgas: Fotobiorreactor ambiental (ePBR) “Phenometrics^{MR}”. (A) Fotografía; (B) esquema. Tanto la intensidad de luz como la temperatura son controladas mediante una lámpara LED de luz blanca como con una camisa de intercambio térmico, respectivamente. El sistema permite el control de pH, el suplemento de gases y de la turbidez por medio de un procesador.

3.3. *Colecta de la biomasa*

Para colectar las células de microalgas en suspensión se procedió a concentrarlas en centrífugas Sorvall RC5C o ThermoScientific MR23i (dependiendo del volumen de la muestra de los cultivos) a c.a. 6.000 x g o 4.000 x g, respectivamente y 4 °C durante 10 min, hasta obtener una pastilla de células húmeda.

La biomasa de *Nostoc* se concentró inicialmente, mediante una etapa de sedimentación rápida de aproximadamente 30 min, seguida de una centrifugación a c.a. 1.000-6.000 x g durante 5-10 min en centrífuga Sovall RC5C, para completar la cosecha.

3.4. *Estabilización de la biomasa*

Una vez colectada la biomasa, se procedió a pasarla por una jeringa de 2 mm de diámetro de salida y 60 mL de capacidad y se dispuso la biomasa en tiras finas sobre una malla plástica para su secado bajo una corriente de aire frío (11 ± 1 °C) durante toda una noche. La biomasa seca fue molida en un mortero con arena al 15 % (p/p).

3.5. *Identificación de la cepa Nostoc sp. M2*

La cepa en estudio fue clasificada mediante taxonomía clásica y molecular (acceso al [GenBank # KM272975](#)). Se llevó a cabo la determinación molecular de la cepa mediante el método descrito previamente por Genuário *et al.* (2010). Se obtuvo el DNA genómico de la cepa por una adaptación al método convencional de extracción con fenol/cloroformo y se amplificó por PCR el gen codificante del RNA ribosomal 16S utilizando los cebadores universales 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTMTACGACTT-3'). La secuencia amplificada fue secuenciada por Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur. Las unidades taxonómicas operativas (OTUs) filogenéticamente más cercanas se determinaron utilizando la herramienta de alineamiento múltiple de secuencias computado con el algoritmo ClustalW, seguido de la construcción de árboles filogenéticos según el algoritmo del vecino más cercano ("Neighbor joining").

3.6. *Extracción y purificación de proteínas*

3.6.1. *Preparación de extractos de cianobacterias como fuente de nutrientes*

Para la preparación de los extractos, se utilizaron dos métodos: i) mediante dos ciclos de congelado (a -20 °C durante 2 h) y descongelado a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) de la biomasa de *Nostoc* fresca, o ii) mediante la adición de 30 volúmenes de agua (p/v) a la biomasa seca molida, a temperatura ambiente y agitando vigorosamente en un vórtex junto con algunas perlas de vidrio de 2 y 5 mm de diámetro. Posteriormente se clarificó el homogenato por centrifugación a c.a. 6.000 x g a 4 °C durante 10 min en centrífuga Sovall RC5C.

El extracto fue filtrado a través de membranas estériles de 0,22 µm de diámetro. Cuando se indica, los extractos de *Nostoc* sp. cepa M2 libres de células fueron proteolizados con bromelina parcialmente purificada de *Ananas comosus* en una proporción sustrato:enzima de 20:1, a 45 °C durante una hora. La hidrólisis fue confirmada mediante geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Para el cultivo mixotrófico de microalgas, el medio BG11 que contiene NaNO₃, fue sustituido por el sobrenadante libre de células de *Nostoc* a las diluciones indicadas.

3.6.2. *Purificación de R-ficoeritrina (R-FE)*

Se estimó la abundancia de las ficobiliproteínas o de las preparaciones con diferentes grados de pureza de la R-FE de *Nostoc* sp. cepa M2, mediante sus correspondientes espectros de absorción de 200 a 900 nm de acuerdo a lo reportado por Bennet &

Bogorad (2011). Los espectros fueron registrados utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu modelo UV-1800). Los extractos de *Nostoc* sp. cepa M2 libres de células fueron preparados mediante congelado y descongelado de la biomasa húmeda como se describió previamente, o mediante molienda de la biomasa en un mortero con N₂ líquido. Los extractos fueron clarificados por centrifugación a c.a. 12.000 x g durante 30 min en centrífuga Sovall RC5C. Para una purificación típica de la R-FE, se adicionaron alrededor de 50 mg de proteínas totales de los extractos libres de células en tampón fosfato de sodio 5 mM pH 7,0. La purificación por cromatografía de intercambio iónico se realizó en columnas de DEAE (di-etil-amino-etil) Sephacel (3 cm de largo y 1 cm de diámetro). Las columnas se equilibraron y fueron lavadas con 5 volúmenes de columna con el mismo tampón; y luego vueltas a lavar con 5 volúmenes de columna con tampón fosfato de sodio 12,5 mM pH 7,0. La R-FE fue eluida de la columna con tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0. La fracción eluida fue sujeta a fraccionamiento por precipitación con sulfato de amonio entre 20 y 50 % de saturación (v/v). El precipitado salino obtenido fue solubilizado en tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 7,0, conteniendo glicerol al 3 % (v/v) y fue clarificada mediante centrifugación a c.a. 12.000 x g durante 30 min. Para la cromatografía de filtración en gel, se sembró la fracción de interés de la columna de DEAE-Sephacel en columnas de Sepharose 6 B (50 cm de largo y 2 cm de diámetro) equilibrada en tampón fosfato de sodio 100 mM pH 7,0, que fue eluida con el mismo tampón. Las fracciones que contuvieron R-FE, las cuales fueron fácilmente reconocibles por su color rosado, fueron combinadas y concentradas mediante precipitación con sulfato de amonio al 50 % de saturación (v/v). Los procedimientos y rendimientos de la purificación de la R-FE fueron analizados mediante el espectro de absorción de luz UV-visible y por SDS-PAGE usando geles desnaturizantes de poliacrilamida al 15 %. El espectro de fluorescencia de la R-FE purificada fue llevado a cabo en un espectrofluorómetro (Shimadzu, modelo RF-540).

3.6.3. *Purificación de bromelina*

Para la purificación parcial de bromelina de *Ananas comosus* se resuspendieron cubos de alrededor de 1 cm de diámetro de ananá fresco en tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7,5. La mezcla se filtró y se clarificó por centrifugación a c.a. 12.000 x g por 30 min en centrífuga Sovall RC5C. Las preparaciones de bromelina se obtuvieron por precipitación de las proteínas mediante la adición de etanol entre 30-70 % (v/v) a 4 °C. Luego fueron solubilizadas en tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,5, conteniendo L-

cisteína 2,5 mM y glicerol al 20 % (v/v). Posteriormente, las preparaciones fueron conservadas a -20 °C (Soares *et al.*, 2011).

3.6.4. Purificación de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH)

Para la preparación de fracciones proteicas enriquecidas en la actividad ADH (Racker, 1950) se cultivaron células de *Saccharomyces cerevisiae* durante una noche en medio de cultivo YPD siguiendo el protocolo previamente descrito por Racker (1950), con modificaciones. Se lisaron las células por sonicación en tampón Tris/HCl 20 mM, pH 6,5, conteniendo MgCl₂ 5 mM, ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) 0,40 mM, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 0,5mM y β-mercaptoetanol 5 mM. El extracto fue clarificado por centrifugación a c.a. 12.000 x g durante 15 min en centrífuga Sovall RC5C. El extracto libre de células se incubó a 55 °C, en un baño térmico durante 15 min para favorecer la precipitación de proteínas, que fueron posteriormente separadas por centrifugación a c.a. 12.000 x g durante 15 min. Posteriormente, se enfrió la fracción de proteínas solubles a 0 °C en un baño de agua con hielo y se mezcló lentamente con acetona a 0 °C. La fracción de ADH parcialmente purificada correspondió a las proteínas que precipitaron en el rango 40–50% (v/v) de acetona.

3.7. Determinación de microcistina total (MC)

La determinación de MC se llevó a cabo de acuerdo a recomendaciones del fabricante (Zeu-Immunotec, S. L., Zaragoza, España), a partir del medio de cultivo agotado por células de *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardii* y *Nostoc* sp. cepa M2, así como también a partir del extracto proteico libre de células de *Nostoc* sp. cepa M2. Debido a que el método de detección utiliza el compuesto diana biológico sobre el que actúa esta toxina (en este caso la inhibición de la fosfatasa PP2A), un resultado de mayor actividad de PP2A es indicativo de menor concentración de la toxina. Se cosecharon las células de cultivos de 50 mL de las cepas en fase estacionaria de crecimiento, por centrifugación a 4.000 c.a. x g por 10 min a temperatura ambiente. La determinación de MC-LR se realizó con el sistema Microcytube (Zeu-Inmunotec^{MR}) para lo cual a 350 µL de las muestras se les adicionaron 100 µL de la enzima fosfatasa de proteína tipo PP2A, previamente disuelta en el tampón provisto por el fabricante y 350 µL del sustrato cromogénico (p-nitrofenil-fosfato). La mezcla fue incubada durante 30 min a 37° C. La reacción fue detenida con un reactivo apropiado (de composición no especificada) y se determinó la absorbancia a 405 nm. La curva de calibración se obtuvo utilizando 250

μL de cada uno de los patrones provistos por el kit ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MC). A partir de la curva estándar se calculó la concentración de equivalentes de MC (An & Carmichael, 1994).

3.8. *Sacarificación de biomasa de algas y producción de etanol*

Para la hidrólisis con ácido diluido, se incubaron distintas proporciones de biomasa de microalgas 2,5 %, 5 % o 10 % (p/v), con distintas concentraciones de ácido diluido (H_2SO_4 0 %, 0,5 %, 1 %, 2 % o 4 % (v/v)), a varias temperaturas (60 °C, 90 °C o 120 °C, en autoclave Arcano modelo LS-B75L, o en baño térmico Fisher Scientific Isotemp bath), y por diferentes tiempos (0, 15, 30 o 60 min). Posteriormente, el hidrolizado fue clarificado por centrifugación a 12.000 c.a. x g a 4 °C durante 15 min.

Las preparaciones hidrolizadas, tanto las analíticas (1 mL) como las preparativas (20 mL), llevadas a pH 4,5 con cristales de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ y una solución de KOH 3,6 N, fueron inoculadas con la levadura *S. cerevisiae* (Levex®, Argentina) para la fermentación.

Cuando se indica, la biomasa de microalgas hidrolizada, se concentró por liofilización utilizando un liofilizador marca Thermo, modelo ModulyoD.

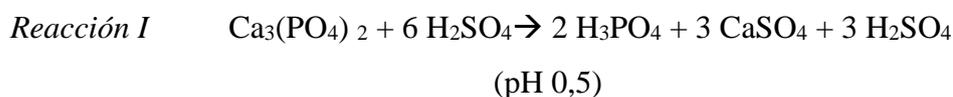
Las fermentaciones (de volúmenes de 1 y 20 mL) se realizaron inoculando las células de levadura a una DO_{600} inicial de 0,25 y se procedió a la incubación en viales de 3 o 25 mL sellados con Parafilm® perforados 5 veces, con agujas 25 G. Cada fermentación de los hidrolizados fue acompañada rutinariamente por una fermentación de medio YPD (Yeast extract (2,5 %), Peptone (5 %), Dextrose), siendo la concentración de dextrosa dentro del rango del contenido de azúcares de las muestras. Para la optimización de la fermentación se analizaron las siguientes variables: concentración de dextrosa (2 %, 10 %, 15 % y 20 % (p/v)), pH (4,5; 5,5; 6,0 y 7,0), y concentración del inóculo de levadura (a DO_{600} de levadura de 0,125; 0,25; 0,50 y 1,00). La agitación (120 rpm en un agitador orbital) y la temperatura (28 ± 1 °C), se mantuvieron constantes.

3.9. *Aprovechamiento de la vinaza de fermentación alcohólica*

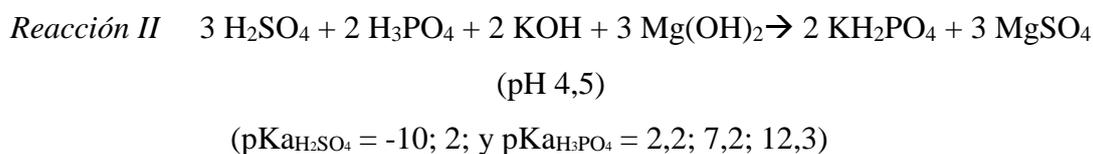
Para la preparación de una “vinaza sintética” según la *Reacción I*, se trataron 60 mmoles de P de distintas fuentes con 360 mmoles de H_2SO_4 (que corresponde al 2 % (v/v) según se optimizó para la sacarificación de biomasa de microalgas) por litro de reacción. Las fuentes de P económicas e insolubles utilizadas en este estudio fueron $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

(fosfato tricálcico proveniente de roca fosfórica), $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ (hidroxiapatita), o de harina de huesos.

Se confirmó la formación de 120 mmoles H_3PO_4 (Shapiro y Stadtman, 1970) quedando un remanente de 180 mmoles de H_2SO_4 en 1 L de reacción.



El yeso se separó, debido a su insolubilidad por centrifugación (durante 5 min a c.a. 4.300 x g) y filtración, y el pH de las preparaciones se elevó de 0,5 a 4,5 con cristales de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ y una solución de KOH 3,6 N (*Reacción II*).



En estas condiciones las sales solubles de K, P, Mg y S se mantuvieron en proporciones relativas similares al medio de cultivo de referencia BG11₀ (Rippka, 1979), a una concentración 250 veces mayor. Para el suplemento con P de la vinaza real se aprovechó la corriente ácida de sacarificación de biomasa de microalgas para solubilizar el P siguiendo el mismo procedimiento (*Reacciones I y II*).

Después de la fermentación con la levadura, las células se separaron por centrifugación a c.a. 4.300 c.a. x g durante 10 min. Se determinó el etanol (*ver Sección Métodos Analíticos – Determinación de etanol*) y luego se evaporó a 80 °C en un baño térmico (Fisher Scientific) durante 2-3 h para eliminar 90-95% del alcohol, simulando las condiciones de destilación para su recuperación. Estas preparaciones se usaron, en una dilución adecuada (1:250 = 0,4 %), como fuente completa de macronutrientes para el cultivo diazotrófico de la cianobacteria *Nostoc* sp. cepa M₂.

3.10. Métodos Analíticos

3.10.1. Análisis del crecimiento

Para realizar las curvas de crecimiento, se determinó el número de células de microalgas mediante el conteo en cámaras de Neubauer. La densidad celular se estimó registrando la DO₇₅₀ para microalgas y cianobacterias y la DO₆₀₀ para la levadura, usando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800). Los datos fueron graficados usando el software GraphPad PRISM (Software intuitivo para Ciencias, San Diego, California) y

los tiempos de duplicación se obtuvieron ajustando los datos experimentales a curvas teóricas de crecimiento exponencial con $R^2 \geq 0.97$.

El peso seco de la biomasa de microalgas se determinó a partir de células resuspendidas en el medio de cultivo. Las muestras (50 mL de cultivo) se centrifugaron a c.a. 4.000 x g a 4 °C durante 10 min (Thermo Scientific MR23i) y la biomasa colectada se secó en un horno a 60-70 °C hasta peso constante (2-3 días).

3.10.2. *Determinación de N y P*

Para la cuantificación de N y P total, las muestras del extracto de *Nostoc*, de la biomasa de *C. sorokiniana* y del medio post cultivo de la microalga, fueron digeridas en H₂SO₄ o una mezcla de HNO₃ y HClO₄, respectivamente, y las determinaciones fueron realizadas por el Laboratorio de Suelos S. A. Fertilab, Mar del Plata, Argentina.

3.10.3. *Actividad proteolítica de los extractos de Nostoc libres de células*

La actividad proteolítica de los extractos fue determinada usando azocaseína como un sustrato artificial (Giménez *et al.*, 2000) luego de concentrar el extracto de *Nostoc* diez veces en un liofilizador. La mezcla de reacción contuvo 0,5 % (p/v) de azocaseína, tampón borato de sodio 0,1 M pH 8,0; NaCl 1,5 M y el extracto proteico de *Nostoc* concentrado. Las incubaciones se realizaron a 30 o 37 °C y fueron detenidas mediante el agregado de un volumen de ácido tricloroacético frío al 10 % (v/v). Los tubos utilizados para el análisis se enfriaron en hielo durante 15 min y fueron centrifugados por 15 min a c.a. 700 x g (centrífuga Thermo Scientific MR23i). Los productos solubles fueron detectados en el sobrenadante mediante absorbancia a 335 nm. Una unidad de actividad (U) fue definida como la cantidad de enzima que produce un incremento de 1 OD.h⁻¹ en las condiciones antes descriptas.

3.10.4. *Cuantificación de proteínas totales*

El método de Lowry *et al.* (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. Se añadió a la muestra el reactivo de Lowry que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a su concentración. La intensidad del color es cuantificada mediante absorbancia a 750 nm.

Para la determinación de proteínas totales de la biomasa, se utilizaron entre 0,1 y 1 mL de cultivo de células concentradas por centrifugación a c.a. 3.500 x g durante 5 min en una centrífuga Thermo Scientific Legend Micro 17R. Las muestras se incubaron a 100 °C en un baño térmico en presencia de NaOH 1 N durante 10 min, para promover la

hidrólisis básica. La determinación de proteínas se realizó sobre las muestras hidrolizadas mediante una adaptación del método de Lowry según el siguiente protocolo: un volumen de 50 μ l del hidrolizado se trató con 1 mL del reactivo A (Na_2CO_3 2% en NaOH 0,1 N, CuSO_4 1 % y tartrato de KNa 2 %, en relación 10:0,1:0,1 (v/v)), luego se agregó 0,1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y finalmente se incubaron durante 15 min en oscuridad. La concentración de las soluciones fue determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm. Como patrón se utilizó una solución de albúmina sérica bovina (0 a 160 μ g) tratada con NaOH 1 N (BSA Fracción V, Sigma, 96 % pureza). Se calculó la concentración de N de las mismas, asumiendo un contenido de N-proteico del 16 % o según un factor de conversión de N-a-proteína de 6,25 (González López *et al.* 2010).

3.10.5. Cuantificación de carbohidratos totales

La determinación de hidratos de carbono se realizó según el método de la antrona para la determinación de hexosas y aldopentosas (Dreywood, 1946). El método de la antrona permite la cuantificación de una amplia gama de carbohidratos. En presencia de ácido sulfúrico concentrado los carbohidratos son deshidratados a furfurales (o hidroxi-metil-furfurales) los cuales se condensan con antrona (10-ceto-9,10-dihidroxiantraceno) producen un complejo azul verdoso. La intensidad del color es cuantificada mediante absorbancia a 620 nm.

Se utilizó un volumen de entre 0,1 y 1,0 mL de la suspensión celular. Las células concentradas por centrifugación utilizando una centrífuga Thermo Scientific Legend Micro 17R (3.500 x g durante 5 min) fueron resuspendidas en medio BG110. Para promover la hidrólisis ácida, un volumen de 200 μ L de la muestra resuspendida (concentrada o en diluciones apropiadas) fue tratado con 1 mL del reactivo de antrona (H_2SO_4 72 % (v/v), antrona 0,5 % (p/v) y tiourea 1 % (p/v)) a 100 °C durante 15 min y se enfriaron en baño de agua fría durante 20 min. La concentración de azúcares en las muestras se determinó por espectrofotometría a 620 nm. La curva estándar se realizó con una solución de glucosa (de 0-400 nmoles) (Sigma-Aldrich, 99% pureza).

3.10.6. Métodos de cuantificación de lípidos

3.10.6.1. Tinción de vesículas de lípidos neutros con Rojo de Nilo

Las células de microalgas fueron inducidas para la acumulación de lípidos neutros mediante privación de N. Se utilizó rojo de Nilo para monitorear la acumulación de lípidos neutros mediante el microscopio de fluorescencia (Nikon-Eclipse E600) (Chen

et al., 2009). Las células fueron incubadas en di-metil-sulfóxido (DMSO) al 20 % (v/v) y Rojo de Nilo 5 μ M, durante 30 min en oscuridad. Para las determinaciones cuantitativas, las muestras fueron excitadas con luz polarizada a 486 nm usando un espectrofluorómetro (Shimadzu, modelo RF-540) registrándose el pico de emisión a 556 nm. Los espectros de emisión de 500 a 700 nm fueron rutinariamente analizados como indicativo de lípidos neutros.

3.10.6.2. *Determinación gravimétrica de lípidos totales*

Los lípidos fueron extraídos de acuerdo al método descrito por Bligh & Dyer (1959) con modificaciones (Do Nascimento, *et al.* 2012).

El método de Bligh & Dyer es un método simple y rápido de extracción y recuperación de lípidos basado en la extracción líquida en un sistema de dos fases, por medio de la homogenización de la muestra con cloroformo, metanol y agua. Al añadir alícuotas de cloroformo y agua se logra la separación de fases. El material lipídico se encuentra en la fase orgánica, mientras que el material no lipídico se encuentra en la fase acuosa.

Las células fueron centrifugadas a c.a. 4.300 x g en centrífuga Sorvall RC5C. La pastilla de células obtenida (0,5-1,0 g peso fresco) fue resuspendida en 1,5 mL NaCl 1 M y, para contribuir a la ruptura celular, las muestras fueron sonicadas a 40 % de potencia en un sonicador (Vibra-Cell, model VCX-130, Sonics Inc.) durante 12 ciclos de 10 s cada uno con descansos de 1 s. Las muestras se homogeneizaron con 4 mL de metanol y 2 mL de cloroformo agitándolas en “vortex” durante 10 min con el agregado de perlas de vidrio de diferentes tamaños (2 y 5 mm de ϕ). A continuación, se agregaron 2 mL de cloroformo y 1,5 mL de NaCl 1 M, y se homogeneizaron las muestras durante 2 min. La separación de fases se llevó a cabo mediante centrifugación a c.a. 5.900 x g durante 10 min. Luego se recuperó la fase orgánica y la fase acuosa se sometió a extracción dos veces más, con el agregado de 2 mL de cloroformo cada vez. Finalmente, la fase orgánica total recolectada se evaporó a temperatura ambiente y fue pesada para determinar su porcentaje en relación al peso seco total de la biomasa. Esta fase fue resuspendida en cloroformo para posteriores determinaciones.

3.10.6.3. *Determinación de metil-ésteres de ácidos grasos (FAME)*

Para la determinación de la metilación de los ácidos grasos presentes en los lípidos de algas, se llevó a cabo la técnica propuesta por Sukhija & Palmquist (1988). Se incubaron las muestras de lípidos en cloroformo con un volumen de ácido metanólico al

5% (v/v) (cloruro de acetilo:metanol, 1:10, (v/v)) durante 1 h a 70 °C. Luego de la adición de cuatro volúmenes de carbonato de potasio al 6 % (p/v), la preparación fue incubada hasta la separación de fases. La fase orgánica fue suplementada con dos volúmenes de cloroformo. La composición de los ácidos grasos fue determinada por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Shimadzu GC-2014 (Kyoto, Japón). Las temperaturas del inyector y detector fueron de 250 y 275 °C, respectivamente, mientras que la temperatura de la columna fue de 210 °C. Un volumen de muestra de 1 µL fue inyectado dentro de la columna (Omega wax 250, Supelco). El gas de arrastre (N₂) fue mantenido a una presión constante de 100 kPa, y los datos del cromatograma fueron adquiridos y procesados usando el software Shimadzu GC-solution. El contenido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) fue expresado como un porcentaje del total de los FAMES identificados en el aceite.

3.10.7. *Análisis de la composición química de la biomasa*

El análisis de la biomasa se realizó en el Laboratorio de Nutrición y Evaluación de Calidad de Forrajes del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Balcarce (<https://inta.gob.ar/servicios/analisis-de-todo-tipo-de-alimentos-para-rumiantes>)

(Guaita, 2014). La composición química (materia orgánica, ceniza, proteínas brutas, grasas brutas y carbohidratos solubles) se determinó a partir de la biomasa de microalgas completa o de fracciones de la misma (biomasa residual posterior a la sacarificación). Para la determinación del contenido orgánico y de las cenizas, la biomasa algal fue calcinada en un horno a 600 °C por 2 h. La materia orgánica se calculó como la diferencia entre el peso de la materia seca y el contenido de cenizas. Las proteínas brutas se calcularon después de la combustión de las muestras en una atmósfera de O₂ ultrapuro y helio a 850 °C. La determinación del N total se llevó a cabo en el sistema LECO FP 528 utilizando EDTA como estándar de calibración y aplicando el factor de conversión de proteína a N de 6,25. Para las determinaciones de lípidos brutos, se realizó una extracción con éter de petróleo de las muestras secas y molidas en un equipamiento Ankom XT10. Los carbohidratos solubles fueron extraídos mediante ebullición en una solución acuosa, filtrados y determinados mediante el método de la antrona.

3.10.8. *Cuantificación de Pi*

El P solubilizado, mediante la reacción de las distintas fuentes de P insoluble con H_2SO_4 , se determinó mediante una modificación del protocolo descrito por Shapiro & Stadtman (1970). En las condiciones de la reacción, el Pi forma un complejo con el hierro y molibdeno y la intensidad del color es cuantificada mediante absorbancia a 660 nm. Se agregaron a muestras de 200 μl de P solubilizado (concentrado o a diluciones apropiadas, en general de 1:100), 1,80 mL de una solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,80% en H_2SO_4 0,015 N y 0,15 mL de revelador ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6,6 % en H_2SO_4 7,5 N). La concentración de P inorgánico en las muestras se determinó por espectrofotometría a 660 nm. La curva estándar se realizó con una solución de H_3PO_4 (0 a 0,4 μmoles).

3.10.9. *Determinación de etanol*

El etanol se determinó como la reducción de NAD^+ , mediante un ensayo enzimático con la enzima ADH (Bonnichsen & Theorell, 1951), con modificaciones, a partir del medio agotado de la fermentación de *S. cerevisiae*. Los ensayos de etanol estándar se llevaron a cabo con tampón Tris/HCl 50 mM pH 8,4; NAD^+ 2,5 mM (como sustrato), 3 μg de proteína de las preparaciones de la enzima ADH y las muestras conteniendo bioetanol, en un volumen final de 100 μL . Se incubaron a temperatura ambiente durante 25 min. El etanol en las muestras se cuantificó en un espectrofotómetro a 340 nm y se comparó con una curva estándar realizada con etanol de grado analítico (0 a 5,88% (v/v)).



CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

BIOMASA DE MICROALGAS COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

4.1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el combustible renovable más común es el etanol. El mismo se obtiene a partir de cultivos agrícolas, los cuales contienen sacarosa o almidón, como la caña de azúcar y el maíz, respectivamente (Gray *et al.*, 2006; Baeyens *et al.*, 2015). Sin embargo, el uso de cultivos agrícolas o residuos agrícolas como materia prima para la producción de bioetanol todavía presenta inconvenientes tales como la creciente demanda de tierras cultivables, el suministro de agua y los altos costos asociados con la conversión de los materiales lignocelulósicos en etanol (Nigam *et al.*, 2011; Baeyens *et al.*, 2015).

La biomasa de microalgas es considerada una de las materias primas alternativas para la producción de bioetanol de tercera generación (Nigam *et al.*, 2011; Baeyens *et al.*, 2015). Algunas especies de microalgas presentan alto contenido de hidratos de carbono (Sumathi *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011; Baeyens *et al.*, 2015). Varias cepas de microalgas (*Chlorella* spp., *Chlamydomonas* spp., *Dunaliella* spp., *Scenedesmus* spp., y *Tetraselmis* spp., entre otras) acumulan hidratos de carbono con valores superiores al 40 % de la biomasa seca (Huber, 2006; Nguyen *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2013). El género *Chlorella* tiene característicamente un alto contenido de carbohidratos, y en especial, la especie *C. vulgaris*, con un contenido del 37 al 55 % de su peso seco (Xu *et al.*, 2011; Wijffels *et al.*, 2013). Los hidratos de carbono se acumulan principalmente como almidón en los cloroplastos y como celulosa/polisacáridos en las paredes celulares (John *et al.*, 2011). Aunque la mayor parte de la biomasa de microalgas no es directamente accesible a los microorganismos fermentativos, se presume que la misma sería más fácil de convertir en monosacáridos en comparación con la materia vegetal lignocelulósica, sobre todo debido a la carencia de lignina (Markou *et al.*, 2012). Antes de la fermentación alcohólica, la biomasa de microalgas debe ser hidrolizada por medios químicos (ácido o álcali) o enzimáticos (Dragone *et al.*, 2011).

La selección de nuevas cepas de microalgas se ha identificado como un aspecto clave para reducir los costos de producción mediante el incremento de la biomasa y/o del contenido de vectores de energía (lípidos o carbohidratos), así como también otros

rasgos que facilitarían el procesamiento posterior de la biomasa (Ho *et al.*, 2013; Chaudhary *et al.*, 2014). Por lo tanto, la bioprospección de microalgas nativas es generalmente el punto de partida en la hoja de ruta hacia la obtención de biocombustibles a partir de biomasa algal. Se asume que las cepas nativas de crecimiento robusto podrían ser más adecuadas para cultivos al aire libre ya que estarían naturalmente aclimatadas a las condiciones ambientales imperantes, incluyendo también el desplazamiento de potenciales competidores, menos productivos. Además, el cultivo masivo de cepas nativas podría prevenir el potencial riesgo ecológico asociado con la introducción

de cepas de especies exóticas (o genéticamente modificadas) y también podría verse favorecida por la percepción pública (Brennan & Owende, 2010).

En la República Argentina, la exploración del potencial de las microalgas como materia prima para biocombustibles y otros bioproductos es aún limitada.

Este Capítulo muestra los resultados de la prospección de microalgas nativas del sudeste de Buenos Aires, con respecto a la producción de hidratos de carbono, y sus propiedades como materia prima alternativa para la producción de bioetanol de tercera generación.

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1. Biosprospección y selección de cepas nativas biotecnológicamente relevantes

En estudios de biosprospección previos en nuestro laboratorio se establecieron 34 cultivos monoalgales, cuyas cepas fueron aisladas de diferentes cuerpos de agua tanto salobres como de agua dulce, en los alrededores de la ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina (38° 0' 0" S 57° 33' 0" O), entre los años 2009 a 2013. Con el objetivo de seleccionar cepas oleaginosas se identificaron más de 15 cepas con potencial biotecnológico, algunas de las cuales podrían tener algún valor como fuente de carbohidratos fermentables (Do Nascimento *et al.* 2012). En este trabajo, se tomaron esos datos como punto de partida y se profundizó el análisis del cepario de microalgas de nuestro laboratorio, con el objetivo de seleccionar cepas hiper-acumuladoras de hidratos de carbono e investigar sus propiedades como materia prima alternativa para la producción de etanol.

Todas las cepas de microalgas de esta colección pertenecen a la División Chlorophyta (Do Nascimento *et al.* 2012) y son mantenidas de forma rutinaria en nuestro laboratorio.

4.2.1.1. Escrutinio de la capacidad de acumulación de azúcares fermentables de un banco de cepas de microalgas de la provincia de Buenos Aires

Para determinar el potencial de las cepas de microalgas de nuestra colección como materia prima para la producción de etanol, se evaluó la capacidad de acumular carbohidratos ante una situación de estrés nutricional, como es la privación de N (NaNO₃).

Se determinó la productividad de biomasa de las distintas cepas durante 10 días, mediante el registro de datos de peso seco y concentración de carbohidratos (Tabla 2). A partir de este análisis identificamos 17 cepas candidatas, las cuales fueron caracterizadas en mayor detalle. Se seleccionaron tres cepas para continuar los estudios: Chlorophyta cepa SP2-3, *Chlorella* sp. cepa MI y *Desmodesmus* sp. cepa FG, que acumularon carbohidratos hasta el 70,3 ± 8,2 % (p/p), 57,8 ± 16,6 % (p/p) y 53,5 ± 14,2 % (p/p), respectivamente.

Las cepas seleccionadas, no acumularon lípidos, mientras que, bajo condiciones de crecimiento idénticas la cepa oleaginosas de referencia *Scenedesmus* sp. cepa C1S (Do Nascimento *et al.*, 2012) muestra la tendencia opuesta alcanzando hasta un 50 % de lípidos totales y bajos niveles de carbohidratos (30 %) (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de biomasa de cepas de microalgas nativas.

| CEPA | Carbohidratos (% PS) | Proteínas (% PS) | Lípidos (% PS) | Peso seco (g.L ⁻¹) |
|---|-------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------------|
| <i>Pseudokirchneriella</i> sp. cepa C ₁ D n=2 | 40,5 ± 0,7 | 31,8 ± 1,3 | nd | 0,8 ± 0,0 |
| <i>Ankistrodesmus</i> sp. cepa SP ₂ -15 n=2 | 47,2 ± 9,5 | 31,6 ± 2,3 | nd | 0,4 ± 0,0 |
| <i>Chlorella</i> sp. cepa SP ₂ -1 n=2 | 44,4 ± 2,2 | 30,8 ± 5,4 | nd | 0,7 ± 0,5 |
| <i>Chlorophyta</i> cepa Chascomús n=2 | 51,2 ± 8,0 | 23,9 ± 3,2 | nd | 0,5 ± 0,1 |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> cepa C ₁ S n=2 | 29,9 ± 8,3 | 15,5 ± 1,2 | 49,9 ± 3,0 | 1,4 ± 0,9 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. cepa SP ₂ -9 n=2 | 52,9 ± 4,1 | 13,8 ± 1,9 | 14,2 ± 0,5 | 0,9 ± 0,0 |
| <i>Chlorella sorokiniana</i> cepa RP n=2 | 49,8 ± 2,4 | 14,7 ± 1,7 | nd | 0,7 ± 0,2 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. cepa L ₂ n=2 | 38,1 ± 5,8 | 19,3 ± 2,4 | nd | 0,6 ± 0,0 |
| <i>Chlorophytacepa</i> C ₁ n=2 | 51,4 ± 4,4 | 17,5 ± 2,1 | nd | 1,4 ± 0,7 |
| <i>Chlorophyta</i> cepa C ₁ C n=4 | 52,8 ± 6,0 | 19,4 ± 3,3 | nd | 1,0 ± 0,3 |
| <i>Desmodesmus</i> sp. cepa FG n=4 | 53,5 ± 14,2 | 16,2 ± 6,9 | 18,7 ± 2,4 | 0,7 ± 0,0 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. cepa SP ₁ -20 n=4 | 46,1 ± 6,4 | 24,9 ± 4,8 | nd | 0,7 ± 0,3 |
| <i>Ankistrodesmus</i> sp. cepa LP ₁ n=4 | 51,2 ± 9,0 | 28,9 ± 3,6 | nd | 0,4 ± 0,1 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. cepa RD n=4 | 41,9 ± 13,1 | 11,9 ± 4,2 | nd | 0,7 ± 0,0 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. cepa PL n=4 | 45,6 ± 10,0 | 18,0 ± 7,5 | nd | 0,9 ± 0,2 |
| <i>Chlorophyta</i> cepa SP ₂ -3 n=4 | 70,3 ± 8,2 | 17,6 ± 8,6 | 10,3 ± 2,6 | 0,6 ± 0,2 |
| <i>Chlorella</i> sp. cepa MI n=4 | 57,8 ± 16,6 | 17,4 ± 8,2 | 11,0 ± 2,2 | 0,6 ± 0,2 |

nd, no determinado

4.2.2. Optimización de la acumulación de azúcares fermentables de las cepas selectas

Se realizó un análisis más detallado de la acumulación de hidratos de carbono de las tres cepas promisorias (Figura 12) en deficiencia de NaNO₃.

Se determinó que, en condiciones de cultivo idénticas, la cepa FG presentó mayor densidad óptica (DO₇₅₀ 2,4 ± 0,0) (Figura 12 A). El registro de la densidad óptica de los restantes cultivos fue muy similar, dando valores de DO₇₅₀ de 1,4 ± 0,0 para la cepa MI y 1,4 ± 0,0 para la cepa SP₂-3 (Figura 12 A).

El mayor rendimiento de carbohidratos totales ($0,3 \pm 0,0 \text{ g.L}^{-1}$) (Figura 12 D) se determinó en cultivos de la cepa FG, en comparación con las concentraciones máximas de carbohidratos acumulados en células de las cepas MI y SP2-3 que fueron de $0,2 \pm 0,0$ y $0,3 \pm 0,0 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 12 C), respectivamente.

En cuanto a la acumulación de proteínas como otro parámetro de crecimiento, la misma se vio severamente reducida en las tres cepas por la deficiencia de N. Las concentraciones de proteínas a los 12 días fueron de $0,1 \pm 0,0$; $0,1 \pm 0,0$; $0,16 \pm 0,0 \text{ g.L}^{-1}$, para las cepas MI, SP2-3 y FG, respectivamente (Figura 12 B-D).

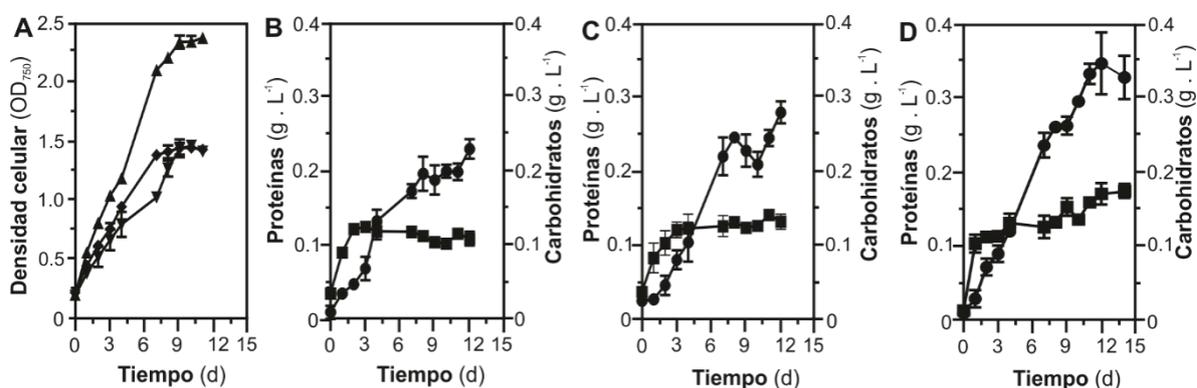


Figura 12. Curvas de crecimiento y contenido de proteínas y azúcares de las cepas de microalgas seleccionadas. (A) Crecimiento de microalgas. DO_{750} , densidad óptica a 750 nm; (▲) *Desmodesmus* sp. cepa FG; (▼) cepa SP2-3; (◆) *Chlorella* cepa MI. (B-D) Composición bioquímica de las microalgas; (B) *Chlorella* cepa MI; (C) cepa SP2-3; (D) *Desmodesmus* sp. cepa FG. (■) Proteínas; (●) carbohidratos. Los datos representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes.

Este análisis nos llevó a seleccionar a la cepa *Desmodesmus* sp. cepa FG debido a que fue la que presentó el mayor crecimiento, siendo el mismo el más robusto y consistente de este estudio con respecto a las otras cepas seleccionadas (Figura 12 A), a la vez de acumular elevados niveles de carbohidratos (Figura 12 D). La productividad de carbohidratos de la cepa SP2-3 resultó menor a consecuencia de una tasa de proliferación menor.

4.2.2.1. Efecto de la deficiencia de otros nutrientes sobre la acumulación de hidratos de carbono en la cepa *Desmodesmus* sp. FG

Con el objetivo de optimizar las condiciones de inducción de la acumulación de carbohidratos se comparó el efecto de la deficiencia de nutrientes distintos del N (P y S), sobre el crecimiento y la acumulación de carbohidratos de la cepa *Desmodesmus* sp. FG, en condiciones autotróficas (Figura 13 A).

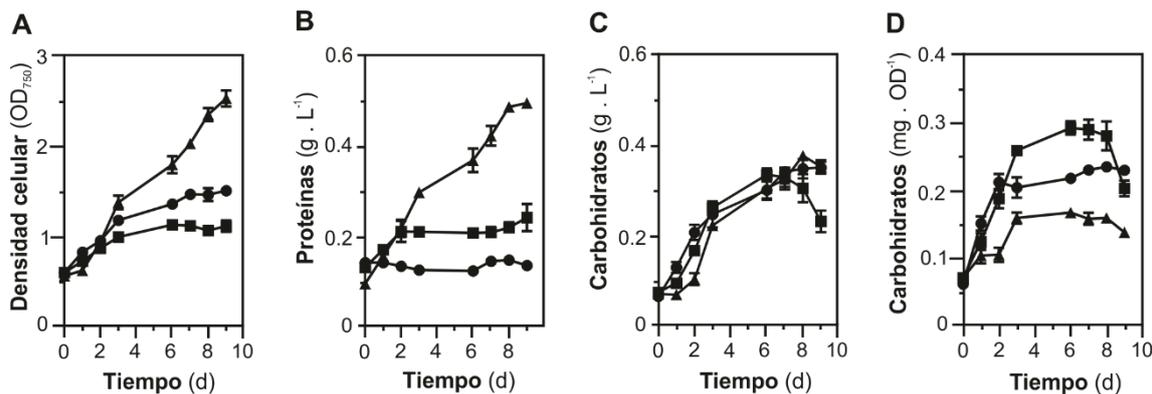


Figura 13. Efecto de la deficiencia de N, P o S en el crecimiento y acumulación de carbohidratos y proteínas de *Desmodesmus* sp. cepa FG. (A) Curvas de crecimiento (OD_{750}); (B) acumulación de proteínas; (C) acumulación de carbohidratos; (D) mg carbohidratos. OD_{750}^{-1} . (●) Privación de N; (▲) privación de P o (■) privación de S. Los datos representan la media y desvío estándar de tres experimentos independientes.

En la Figura 13 A se muestran las curvas de crecimiento de *Desmodesmus* sp. cepa FG, en medio mineral mínimo en ausencia de N, S (reemplazo del $MgSO_4$ por $MgCl_2$ en suficiencia de $NaNO_3$ 6 mM) y P (reemplazo del KH_2PO_4 por KCl en suficiencia de $NaNO_3$ 6 mM) durante 9 días. La deficiencia de S afectó severamente al crecimiento (DO_{750} $1,1 \pm 0,1$), más aún que la privación de N (DO_{750} $1,5 \pm 0,1$), mostrando una tendencia opuesta en cuanto a la acumulación de proteínas ($0,2 \pm 0,0$ y $0,1 \pm 0,0$ $g.L^{-1}$, respectivamente) (Figura 13 B). Como puede observarse, en los cultivos con limitación de P, la cepa continuó acumulando biomasa (DO_{750} $2,5 \pm 0,1$) y proteínas ($0,5 \pm 0,0$ $g.L^{-1}$) hasta altos niveles (Figura 13 A-B).

Se determinó una acumulación de hidratos de carbono en 9 días del 56,3; 49,5 o 38,2% (p/p) según proliferan las células, en un medio de cultivo deficiente en N, S, o P, respectivamente (Figura 13 C).

La privación de S indujo la acumulación de hidratos de carbono a tiempos más cortos, incluso en mayor medida con respecto al N. Sin embargo, de manera inversa a la privación de N, las células en deficiencia de S, tienden a declinar el contenido de carbohidratos a tiempos más largos. Por otro lado, en cultivos con insuficiencia de P, la acumulación de carbohidratos fue moderada (Figura 13 C).

Las células con mayor contenido de carbohidratos fueron aquéllas cultivadas en medio privado de S, con respecto a la deficiencia de N y P (Figura 13D). Sin embargo, debido a que esta deficiencia afecta en mayor medida al crecimiento (Figura 13 A), el déficit de N fue el desencadenante elegido en este estudio, para promover la acumulación de

carbohidratos de reserva. A su vez, el manejo de su dosificación podría ser beneficioso en la economía de los cultivos masivos de microalgas para la producción de productos de bajo valor agregado.

4.2.2.2. Evaluación del efecto de distintos niveles de deficiencia de N sobre el cultivo de *Desmodesmus* sp. cepa FG

Para maximizar la productividad de carbohidratos se profundizó en el análisis del déficit de N (NaNO_3), a tiempos más largos (22 días), sobre la acumulación de carbohidratos en la biomasa de la microalga *Desmodesmus* sp. cepa FG cultivada en condiciones autotróficas (Figura 14).

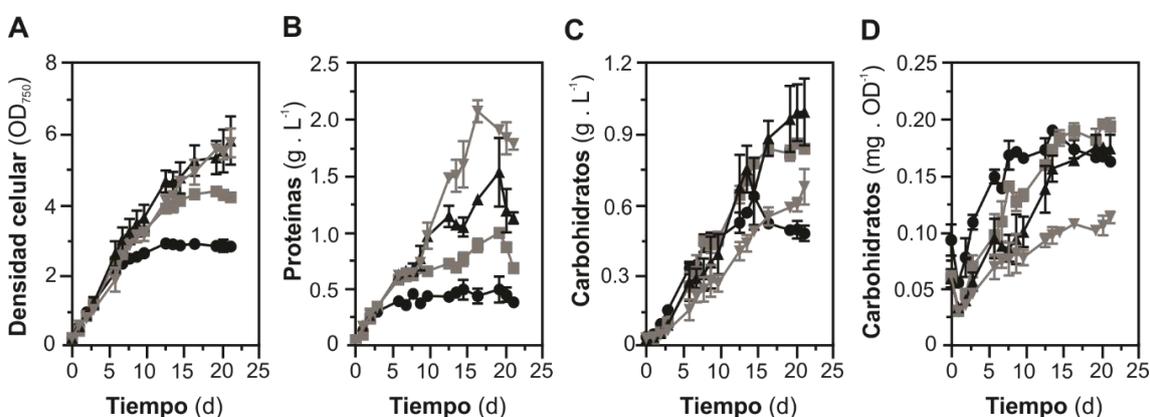


Figura 14. Efecto de diferentes niveles de deficiencia de N, en el crecimiento y acumulación de carbohidratos en *Desmodesmus* sp. cepa FG. (A) Curva de crecimiento (OD_{750}); (B) acumulación de proteínas; (C) acumulación de carbohidratos ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); (D) mg carbohidratos. OD_{750}^{-1} . (●) NaNO_3 1,5 mM; (■) NaNO_3 3 mM; (▲) NaNO_3 6 mM y (▼) NaNO_3 12 mM. Los datos representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes.

Como puede observarse en la Figura 14, los rendimientos finales de biomasa fueron afectados por el nivel de N inicial. La máxima acumulación de biomasa fue en cultivos a expensas de N 6 y 12 mM, dando valores de $2,2 \pm 0,3$ y $2,1 \pm 0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Para células cultivadas en presencia de N 1,5 y 3 mM, los rendimientos de biomasa alcanzaron valores de $1,0 \pm 0,0$; $1,5 \pm 0,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente (Figura 14 A).

Al igual que para la biomasa, las proteínas se acumularon de manera proporcional a la disponibilidad de N, hasta el máximo nivel analizado (Figura 14 B). En condiciones de privación severa (en presencia de N 1,5 mM), la acumulación de las mismas no superó los $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0,4 \pm 0,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) representando un $34,4 \pm 0,6 \%$ (p/p) en la biomasa de *Desmodesmus* sp. cepa FG. En la inducción con N 3 mM los niveles de proteínas

alcanzaron valores de $0,8 \pm 0,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ que corresponde a un $43,5 \pm 0,8 \%$ (p/p). En suficiencia de N, para cultivos con N 6 y 12 mM, los rendimientos de proteínas alcanzaron valores de $1,3 \pm 0,1$ y $1,9 \pm 0,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente (Figura 14 B).

De manera inversa a la acumulación de proteínas, y a pesar de que las productividades volumétricas de carbohidratos fueron similares para cultivos a expensas de N 6 mM ($1,0 \pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y N 3 mM ($0,8 \pm 0,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Figura 14 B), se determinó que la máxima acumulación de carbohidratos ($55,5 \pm 0,0 \%$ p/p), en la biomasa de *Desmodesmus* sp. cepa FG, correspondió a cultivos en presencia de N 3 mM, mientras que la menor acumulación correspondió a cultivos en presencia de N 12 mM ($31,0 \pm 0,0 \%$ (p/p)). El porcentaje de acumulación de carbohidratos de los cultivos con N 1,5 y 6 mM se mantuvo en torno al 46 % (p/p).

Mediante este sistema de cultivo en lote pudo incrementarse la cantidad de carbohidratos (valores cercanos al 60 %) a expensas de una reducción de la productividad de la biomasa (30-60 %) cuyos valores se encontraron dentro del rango de otros estudios previos (de Farías Silva *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que una concentración de N 3 mM es apropiada tanto para la acumulación de biomasa como para la inducción de carbohidratos de reserva en *Desmodesmus* sp. cepa FG.

4.2.3. Sacarificación de la biomasa algal

Con el objetivo de optimizar las condiciones de liberación de azúcares de la biomasa de microalgas mediante hidrólisis ácida diluida, se procedió a la sacarificación de la biomasa utilizando células de *Desmodesmus* sp. cepa FG según las siguientes variables: carga de biomasa, temperatura, concentración de ácido y tiempo de incubación. Para estos ensayos las células se cultivaron en fotobiorreactores de tipo "air-lift" (PBRs) de 5 L de capacidad en presencia de NaNO_3 3 mM durante 15 días, de acuerdo con las condiciones optimizadas de crecimiento e inducción para la productividad de biomasa y el contenido de carbohidratos. Luego de coleccionar las células mediante centrifugación se procedió al secado de la biomasa a temperatura ambiente durante 24 h.

En la Figura 15 puede observarse que mediante la incubación de la biomasa a una carga de sólidos de 2,5 % (p/v) con H_2SO_4 al 2% (a 120°C), se obtuvo una liberación de azúcares solubles del 80 % en 30 min, observándose una disminución de los mismos a mayores concentraciones de H_2SO_4 (4 % v/v) (Figura 15 A). A los 60 min de incubación se obtuvo un porcentaje de liberación de carbohidratos solubles del 50 % a 90°C , detectándose una disminución de los mismos a 120°C (Figura 15 B). La

liberación de carbohidratos solubles cuando se incubó biomasa algal con una carga de sólidos del 5 % (p/v) con H_2SO_4 al 2% (a $120^\circ C$), durante 30 (Figura 15 C) o 60 min (Figura 15 D) fue del 95 y 100 % respectivamente. A mayores concentraciones de ácido, en ambos casos, puede observarse una disminución de la recuperación de azúcares solubles.

Se determinó que las condiciones optimizadas más suaves para la liberación de hasta un 95% de azúcares de la biomasa fueron a una carga de biomasa seca de 10 % (p/v), H_2SO_4 al 2% (v/v), y $120^\circ C$ durante 30 min (Figura 15 E y Tabla 3), observándose una disminución de los azúcares recuperables a tiempos mayores (60 min) (Figura 15 F).

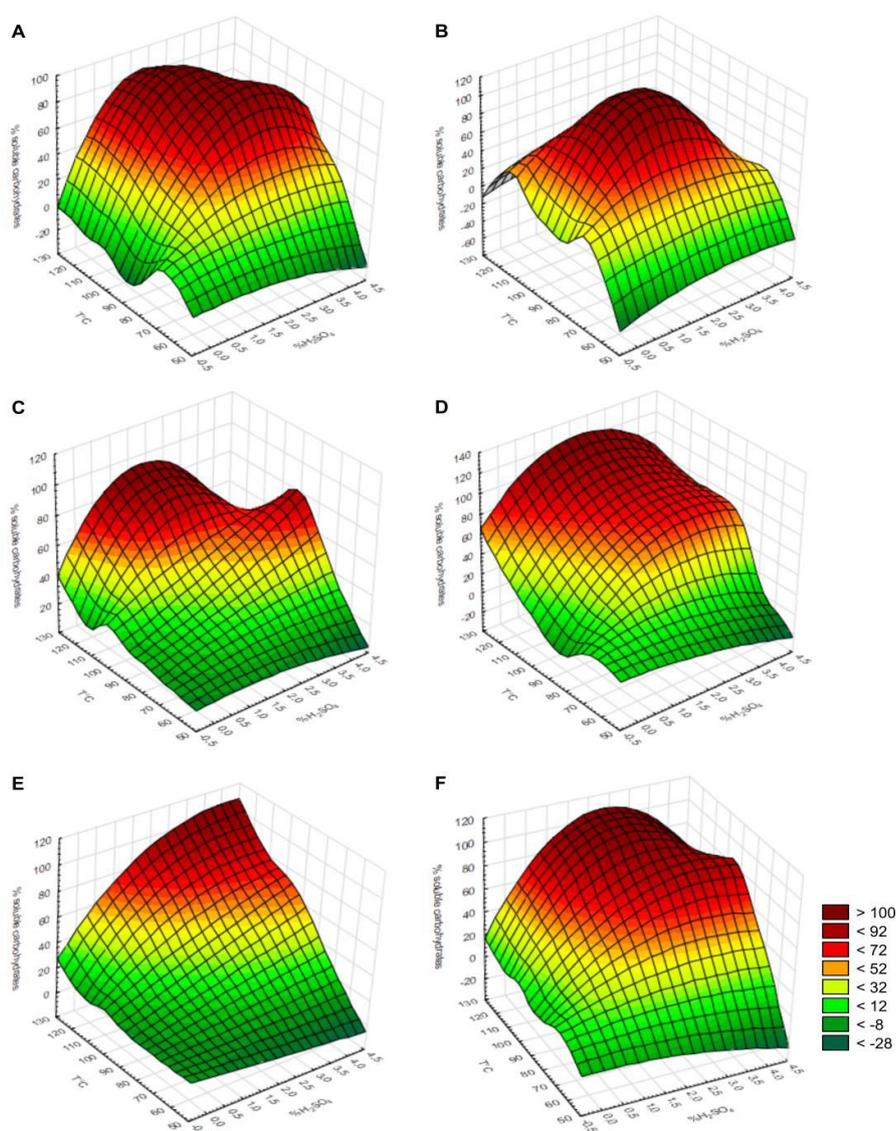


Figura 15. Análisis de superficie de respuesta de la liberación de azúcares de la biomasa algal. Se muestran los gráficos representativos para el tratamiento de biomasa de *Desmodemus* sp. cepa FG con cargas de sólidos de (A-B) 2,5 % (p/v); (C-D) 5 % (p/v); y (E-F) 10 % (p/v), tratadas a diferentes temperaturas y concentraciones de H_2SO_4 durante 30 min (A-C-E) o 60 min (B-D-F). Cada set de datos representa la media de duplicados técnicos.

4.2.3.1. Efecto de la carga de sólidos algales

Con el objetivo de obtener preparaciones de biomasa sacarificada con la mayor concentración de azúcares posible, se evaluó el límite máximo y práctico para la carga de sólidos en la reacción de hidrólisis ácida, incrementando la carga de sólidos algales a hidrolizar hasta valores de 40 %.

La Tabla 3 muestra una comparación de la liberación de azúcares a partir de la sacarificación de distintas cargas de biomasa de *Desmodesmus* así como también, la hidrólisis de 10 % de sólidos de SP2-3.

La hidrólisis con ácido diluido resultó en una concentración de carbohidratos solubles de 5,5; 9,8; 15,0 y 21,6 % (p/v) a partir de cargas de sólidos de 10, 20, 30 y 40 % (p/p), respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de la liberación de azúcares de la biomasa algal posterior a la sacarificación.

| Cepa | Tratamiento de hidrólisis | Carga de biomasa (%) | Azúcares (%) | Volumen recuperado (% del total) |
|---|--------------------------------|----------------------|--------------|----------------------------------|
| <i>Desmodesmus</i> sp. cepa FG ^a | H ₂ SO ₄ | 10 | 5,5 | ND |
| <i>Desmodesmus</i> sp. cepa FG ^a | H ₂ SO ₄ | 20 | 9,8 | 40 |
| <i>Desmodesmus</i> sp. cepa FG ^a | H ₂ SO ₄ | 30 | 15,0 | 20 |
| <i>Desmodesmus</i> sp. cepa FG ^a | H ₂ SO ₄ | 40 | 21,6 | 10 |
| Chlorophyta sp. cepa SP2-3 ^a | H ₂ SO ₄ | 10 | 7,3 | ND |
| Chlorophyta sp. cepa SP2-3 ^{c.a} | H ₂ SO ₄ | 10 | 13,7 | ND |

^aHFS: Hidrólisis y fermentación separadas, ^chidrolizado concentrado por liofilización. ND No determinado

Debido a que la biomasa seca, al hidratarse, retiene líquido, a mayores concentraciones de biomasa a hidrolizar, menores resultaron los volúmenes recuperados de las soluciones de azúcares. En la Tabla 3 se pueden observar los porcentajes de recuperación de volumen de la corriente líquida (posterior a la hidrólisis con H₂SO₄ al 2 %) a partir de un 20, 30 y 40 % de sólidos algales, demostrando una recuperación del 40, 20 y 10 % del volumen total del hidrolizado, respectivamente, con concentraciones crecientes de carbohidratos solubles. Este resultado fue muy satisfactorio para aumentar la concentración de azúcares, que como se discutirá, es de suma importancia para la utilización de los azúcares como sustrato en fermentaciones con pretensiones productivas.

En el procesamiento posterior de la biomasa, tanto el contenido de carbohidratos de microalgas (cantidad y calidad) como el pretratamiento, se encuentran entre las variables más críticas para la producción competitiva de bioetanol. Se estima que el pretratamiento representaría hasta el 33 % del costo total en la producción de bioetanol

de algas. Se ha sugerido que realizar el tratamiento con ácido sulfúrico diluido, luego de la selección de cepas y optimización de la sacarificación de la biomasa, sería la estrategia más efectiva para aplicaciones industriales y que, para disminuir el costo del pretratamiento sería esencial aumentar al máximo la concentración de sólidos y minimizar las pérdidas de azúcares (Li *et. al.*, 2014). Además, para la producción de etanol económicamente rentable, se necesitaría un mínimo de 40 g de etanol · L⁻¹ (4 %) en el caldo de fermentación, para reducir los costos de destilación (Möllers *et. al.* 2014).

Es importante destacar que en este estudio se demostró la posibilidad de incrementar la carga de sólidos durante la hidrólisis hasta un 20 % (p/p), lo cual representó un desafío tecnológico, teniendo en cuenta que la biomasa fresca de *Desmodesmus* contiene un 15 % de sólidos (p/v). Este resultado permitió aumentar la concentración de azúcares hasta niveles sin precedente en la literatura (Figura 15 y Tabla 3).

Tabla 4. Comparación del rendimiento de etanol posterior a la sacarificación y fermentación de biomasa de microalgas

| Cepa | Tratamiento de hidrólisis | Carga de biomasa (g · L ⁻¹) | Concentración de azúcares (g · L ⁻¹) | Organismo fermentador | Etanol (g · L ⁻¹) | Etanol (g · g ⁻¹) | endimiento (%) | Referencia |
|--------------------------------------|---|---|--|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|----------------------------------|
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | H ₂ SO ₄ | 50 | 28,5 | <i>S. cerevisiae</i> | 14,6 | 0,29 | 100,0 | Nguyen, <i>et al.</i> 2009 |
| <i>Spirogyra</i> sp. | Enzimático | 50 | 12,5 | <i>S. cerevisiae</i> | ND | 0,08 | 78,4 | Eshaq, <i>et al.</i> 2010 |
| <i>Chlorococum</i> sp. ^b | CO ₂ supercrítico | 10 | ND ^d | <i>S. bayanus</i> | 3,8 | 0,38 | ND | Harun, <i>et al.</i> 2010 |
| <i>C. reinhardtii</i> | Enzimático | 50 | ND | <i>S. cerevisiae</i> | 11,7 | 0,24 | ND | Choi, <i>et al.</i> 2010 |
| <i>Chlorococum infusionum</i> | NaOH | 50 | ND | <i>S. cerevisiae</i> | ND | 0,26 | ND | Harun, <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | H ₂ SO ₄ /Enzimático | 5 | 5,5 | <i>Escherichia coli</i> | 1,7 | 0,40 | 61,0 | Miranda, <i>et al.</i> 2012 |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | H ₂ SO ₄ | 500 | 63,2 | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 11,7 | 0,02 | 36,3 | Guo, <i>et al.</i> 2013 |
| <i>C. vulgaris</i> | Enzimático (HFS) ^a | 20 | 7,8 | <i>Zymomonas mobilis</i> | 3,6 | 0,18 | 87,6 | Ho, <i>et al.</i> 2013 |
| <i>C. vulgaris</i> | Enzimático (SFS) ^a | 20 | ND | <i>Z. mobilis</i> | 4,3 | 0,21 | 87,1 | Ho, <i>et al.</i> 2013 |
| <i>C. vulgaris</i> | H ₂ SO ₄ | 50 | 23,6 | <i>Z. mobilis</i> | 11,7 | 0,23 | 96,7 | Ho, <i>et al.</i> 2013 |
| <i>S. abundans</i> | H ₂ SO ₄ / Enzimático | 50 | 10,8 | <i>S. cerevisiae</i> | 4,7 | 0,10 | 85,5 | Scholz, <i>et al.</i> 2013 |
| <i>Mychonastes afer</i> | H ₂ SO ₄ /Enzimático | 50 | 6,0 | <i>S. cerevisiae</i> | 2,8 | 0,06 | 92,0 | Scholz, <i>et al.</i> 2013 |
| <i>C. reinhardtii</i> | H ₂ SO ₄ | ND | ND | <i>S. cerevisiae</i> | 8,7 | 0,15 | 86,0 | Kim, <i>et al.</i> 2014 |
| <i>C. vulgaris</i> | Enzimático | 10 | 1,2 | <i>S. cerevisiae</i> | 0,6 | 0,07 | 89,0 | El-Dalatony <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Chlamydomonas mexicana</i> | Enzimático (HFS) ^a | 38 | 22,5 | <i>S. cerevisiae</i> | 8,5 | 0,41 | 72,0 | Mussatto, <i>et al.</i> 2009 |
| <i>C. mexicana</i> | Enzimático (SFS) ^a | 38,10 | 22,5 | <i>S. cerevisiae</i> | 10,5 | 0,50 | 88,2 | Mussatto, <i>et al.</i> 2009 |
| <i>Desmodesmus</i> sp. | H₂SO₄ | 100/200 | 55,3/98,2 | <i>S. cerevisiae</i> | 23,0/49,0 | 0,23/0,25 | 81,4/98,0 | Este estudio |
| Chlorophyta SP2-3 | H₂SO₄ | 100 | 72,9 | <i>S. cerevisiae</i> | 23,6 | 0,24 | 63,7 | Este estudio |
| Chlorophyta SP2-3^c | H₂SO₄ | 100 | 137,2 | <i>S. cerevisiae</i> | 61,2 | 0,31 | 87,4 | Este estudio |

^a HFS Hidrólisis y fermentación separadas; SFS, sacarificación y fermentación simultáneas.

^b Biomasa de microalgas posterior a la extracción de lípidos.

^c Hidrolizado concentrado.

^d No disponible.

4.2.4. Optimización de las condiciones de fermentación

Con el objetivo de reducir al máximo la cantidad de equivalentes de neutralización necesarios para elevar el pH del hidrolizado con cristales de $Mg(OH)_2$ y KOH , para proceder a la fermentación del mismo, se realizaron estudios de optimización de las condiciones de fermentación con *S. cerevisiae*. Las condiciones de referencia fueron: DO_{600} inicial de 0,2 a $28 \pm 2^\circ C$ y agitación a 120 rpm. Se evaluó el rendimiento de la fermentación de concentraciones crecientes de dextrosa comercial (Figura 16). A su vez, se evaluó el rendimiento del proceso de fermentación a distintos pH con 10 % de dextrosa (Figura 17).

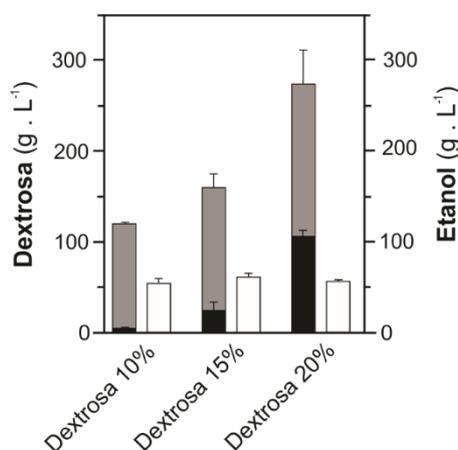


Figura 16. Optimización de las condiciones de fermentación con *S. cerevisiae*. Evolución temporal del consumo de azúcares y de la acumulación de etanol durante la fermentación de concentraciones crecientes de dextrosa comercial (100, 150 y 200 g.L⁻¹) en 24 h. En gris, azúcares totales previos a la fermentación. En negro, azúcares remanentes en el medio de cultivo, posterior a la fermentación. En blanco, acumulación de etanol. Los datos representan la media y desvío estándar de tres experimentos independientes.

Como se indica en la Figura 16, con una concentración de dextrosa cercana a 10 % p/v ($11,7 \pm 0,2$ %) la eficiencia de consumo de dextrosa comercial, en 24 h de cultivo, fue del 99,3 %, quedando un remanente de $0,0 \pm 0,0$ % de dextrosa en el caldo de fermentación. Cuando la concentración de dextrosa fue aumentada a $15,9 \pm 1,0$ %, la eficiencia de consumo fue del 85,4 %, quedando un remanente de $2,3 \pm 0,6$ % de dextrosa. Al elevar aún más la concentración de dextrosa hasta valores de $27,0 \pm 3,0$ %, la eficiencia de consumo disminuyó a un 61,9 %, quedando un remanente en solución de $10,3 \pm 0,6$ %.

En todas las concentraciones de dextrosa utilizadas al tiempo analizado (24 h), la producción de etanol fue similar, dando valores de $5,4 \pm 0,4$; $6,3 \pm 0,4$ y $5,6 \pm 0,2$ % de etanol (p/v) (Figura 16).

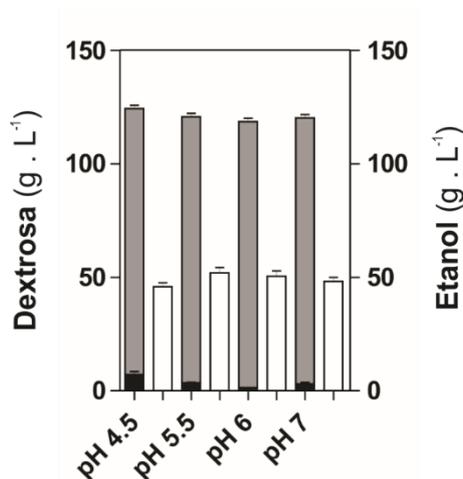


Figura 17. Efecto del pH sobre la fermentación con *S. cerevisiae*. Evolución temporal del consumo de azúcares y de la acumulación de etanol durante la fermentación de dextrosa comercial a $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 24 h a diferentes pHs. En gris, azúcares totales previos a la fermentación. En negro, azúcares remanentes en el medio de cultivo, posterior a la fermentación. En blanco, acumulación de etanol. Los datos representan la media y desvío estándar de tres experimentos independientes.

En la Figura 17 puede observarse que el rendimiento de la fermentación no se vio afectado por el pH dentro del rango estudiado. El etanol acumulado en el medio de cultivo a pH 4,5; 5,5; 6,0 y 7,0 fue de $4,58 \pm 0,18$; $5,19 \pm 0,24$; $5,04 \pm 0,24$ y $4,82 \pm 0,18$ % etanol (p/v), con eficiencias de fermentación de $79,99 \pm 3,14$; $90,65 \pm 4,19$; $88,03 \pm 4,19$ y $84,16 \pm 3,16$ %, respectivamente.

Por último, se analizó la eficiencia de fermentación en cultivos a expensas de $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (3 %) de dextrosa comercial con distintas densidades celulares de *S. cerevisiae*, a una DO_{600} inicial de 0,125; 0,25; 0,5 y 1,0 (Figura 18). Para todas las densidades iniciales de levadura, los rendimientos de etanol fueron similares, dando valores de $1,3 \pm 0,0$; $1,4 \pm 0,1$; $1,4 \pm 0,1$ y $1,5 \pm 0,1$ % (p/v).

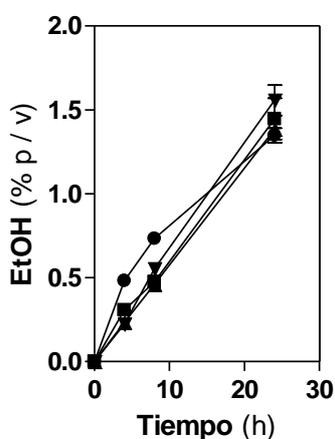


Figura 18. Efecto de la densidad inicial de *S. cerevisiae* sobre la fermentación. Evolución temporal de la acumulación de etanol durante la fermentación de $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de dextrosa comercial en 24 h con distintas densidades de levadura. (●) DO_{600} 0,125, (■) DO_{600} 0,25, (▲) DO_{600} 0,5 y (▼) DO_{600} 1,0. Los datos representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes.

Las condiciones de fermentación optimizadas son a una carga máxima de carbohidratos solubles de un 10 %, con una densidad inicial de levaduras a una DO_{600} de 0,25 y a pH 4,5 durante 24 h (Figuras 16,17 y 18).

4.2.4.1. Producción de etanol y CO_2 a partir de la biomasa de algas sacarificadas

Para evaluar y comparar la calidad de la biomasa de las tres cepas seleccionadas, como materia prima alternativa para la producción de bioetanol, se llevaron a cabo ensayos de fermentación. Las tres cepas fueron inoculadas a la misma densidad celular DO_{750} (0,2) en 250 mL de medio mineral con deficiencia de N, durante 10 días (tiempo suficiente para que cada cepa alcance la máxima acumulación de carbohidratos (Figura 12 B – D)) y luego la biomasa fue colectada, hidrolizada a una carga de sólidos del 5 % en ácido diluido y fermentada con células de *S. cerevisiae*. Los rendimientos de etanol para *Desmodesmus* sp. cepa FG, para la cepa SP2-3 y para *Chlorella* sp. cepa MI fueron de 98 ± 30 ; 61 ± 37 ; o 37 ± 20 mg · L⁻¹ de cultivo o de 134; 91; o 64 mg · g biomasa⁻¹ (Tabla 5). Esta evaluación nos llevó a seleccionar a *Desmodesmus* sp. cepa FG como la más productiva de las microalgas analizadas y a la cepa SP2-3 como la cepa que acumula el máximo nivel de carbohidratos.

Tabla 5. Producción de etanol por *S. cerevisiae* mediante fermentación de biomasa de microalgas.

| Cepa | Consumo de azúcares ^a | | Rendimiento de etanol ^b | | Azúcares a etanol (% del máximo teórico) ^a |
|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---|
| | t = 0 h (g · L ⁻¹) | t = 30 h (g · L ⁻¹) | (mg · L cultivo ⁻¹) | (mg · g biomasa ⁻¹) | |
| <i>Desmodesmus</i> sp. FG | 1,9 ± 0,2 | 0,1 ± 0,0 | 98 ± 30 | 134 ± 47 | 75 ± 15 |
| Cepa SP2 - 3 | 1,1 ± 0,2 | 0,1 ± 0,0 | 37 ± 20 | 64 ± 28 | 84 ± 38 |
| <i>Chlorella</i> sp. MI | 2,2 ± 0,5 | 0,1 ± 0,0 | 61 ± 37 | 91 ± 55 | 60 ± 47 |

Los datos muestran la media y desvío estándar de 3 (a) o 7 (b) experimentos independientes.

Para un análisis más detallado de la producción de etanol a partir de las cepas FG y SP2-3 cultivadas bajo el modo de vida autotrófico, se procedió a hidrolizar biomasa a un 10 % (p/v), según las condiciones optimizadas (Figura 15 E), para producir preparaciones de carbohidratos solubles a un 5,5 o 7,3 % (p/v), respectivamente (Tabla 3). Se ajustó el pH de los hidrolizados a 5,5 o 6,0 con cristales de $Mg(OH)_2$ y estas preparaciones se inocularon con células de *S. cerevisiae*.

Se determinó una acumulación máxima de etanol en el medio de $2,3 \pm 0,2$ o de $2,3 \pm 0,0$ % (p/v) para la cepa FG o SP2-3, respectivamente (Figura 19 A-B). La conversión total de carbohidratos a etanol observada fue cercana al rendimiento de conversión máximo teórico de 0,51 g de etanol por g de glucosa (los valores calculados de eficiencia fueron de 81,4 % o 63,7 %) y una eficiencia de conversión de biomasa a etanol de 0,23 y 0,24 g de etanol.g de biomasa⁻¹ en 24 o 12 h, respectivamente.

La fermentación de carbohidratos solubles concentrados mediante liofilización, de la cepa SP2-3 a 13,7 % (p/v) dio como resultado la acumulación de hasta 6,1 % (p/v) de etanol o 0,31 g.g biomasa⁻¹ (87,4 % de teórico valor) en 24 h. (Figura 19 C).

Se confirmó una cantidad correspondiente de CO₂ liberado, mediante diferencia de peso de los cultivos, con valores cercanos a 0,5 g de CO₂.g de eq. glucosa⁻¹ (rendimiento cercano a los valores teóricos máximos). También se determinó la producción de bajas cantidades de biomasa de levadura, de $3,5 \pm 0,2$ g.L⁻¹ cuando la cepa se cultivó en presencia de $4,5 \pm 0,6$ % de carbohidratos solubles derivados de la cepa FG.

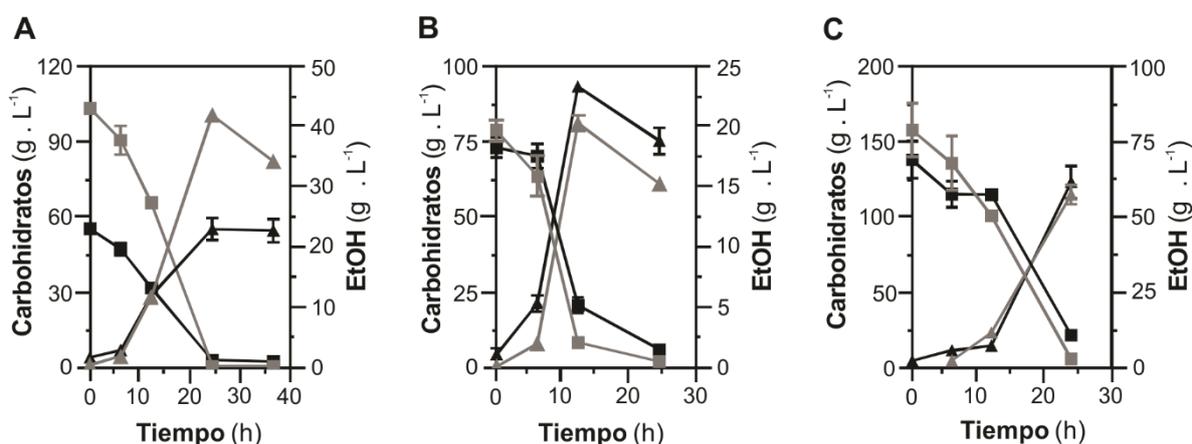


Figura 19. Fermentación de biomasa algal. Evolución temporal de la acumulación de etanol y consumo de azúcares durante la fermentación de la biomasa de microalgas hidrolizada, mediante *S. cerevisiae*. (A) Biomasa hidrolizada de *Desmodesmus* sp. cepa FG; (B) biomasa hidrolizada de la cepa SP2-3; (C) biomasa hidrolizada y concentrada de la cepa SP2-3. (■) Depleción de azúcares del medio YPD; (▲) producción de etanol a partir del medio YPD; (■) depleción de azúcares de biomasa de microalgas hidrolizada; (▲) producción de etanol a partir de biomasa de microalgas hidrolizada. Los datos representan la media y desvío estándar de dos (A-C) o cuatro (B) experimentos independientes.

Los resultados aquí descritos indicaron que la biomasa de microalgas podría convertirse en etanol mediante fermentación con la levadura *S. cerevisiae* tan eficientemente como con la dextrosa de calidad comercial (Figura 19) y que, otros nutrientes generalmente utilizados para mejorar la fermentación, como la fuente de N,

ya estaban presentes en la biomasa de microalgas hidrolizada, dado que el hidrolizado no fue suplementado con ninguna fuente de N, tal como en el medio de referencia YPD. Ambos, el agotamiento casi completo de los carbohidratos del caldo de fermentación y la alta eficiencia de conversión de los carbohidratos en etanol, indicaron un enriquecimiento muy alto de azúcares, presumiblemente glucosa, en la biomasa de las cepas seleccionadas en este estudio y en sus correspondientes hidrolizados. También indicó que la pérdida de azúcares y/o la generación de inhibidores de la fermentación, si están presentes, se mantuvieron en niveles insignificantes después del tratamiento optimizado de sacarificación (Figura 19).

Años atrás se hicieron estimaciones muy optimistas para las productividades de bioetanol derivadas de microalgas de 46.760-140.290 L·ha·año⁻¹, que serían varios órdenes de magnitud mayor que los rendimientos obtenidos a partir de otras materias primas (Mussatto, 2009). Sin embargo, a pesar de los avances logrados en los últimos años, la comercialización de bioetanol a base de algas sigue siendo un desafío debido a las limitaciones tecno-económicas (Li *et al.*, 2014). En 2016, Ruiz y colaboradores reportaron sobre productividades reales de biomasa de microalgas de alrededor de 27 y hasta 61 Tn·ha⁻¹·año⁻¹ para estanques abiertos o sistemas de cultivo cerrados, respectivamente, en el sur de España (Ruiz *et al.*, 2016). Con los rendimientos de etanol alcanzados en este estudio, de 0,23-0.25 g · g biomasa⁻¹ (Tabla 4), se podrían obtener de 8.500–19.500 L·ha·año⁻¹, para una productividad similar a la de los cultivos de caña de azúcar y superior a maíz, que se utilizan actualmente como materia prima de bioetanol (Mussatto, 2009).

Está ampliamente aceptado que la economía de los biocombustibles a base de microalgas mejoraría en gran medida, si se obtuvieran en el marco de una biorrefinería de la biomasa, para la obtención de múltiples productos, incluyendo algunos de mayor valor agregado (Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013). Las fermentaciones realizadas en este estudio arrojaron como co-productos 0,06 kg de levadura comestible seca *S. cerevisiae* por 1 kg de biomasa seca de *Desmodesmus* sp. cepa FG, como suplemento de alimentación animal y el caldo de fermentación agotado, que una vez destilado el etanol se lo denomina vinaza (Kwiatkowski *et al.*, 2006; Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013). Aunque no fue confirmado en esta tesis, se presume que el CO₂ producido como un producto de fermentación (al menos 0,22 kg.kg de biomasa seca de *Desmodesmus*) podría reciclarse en cultivo de microalgas como han demostrado otros autores

anteriormente (Stewart & Hessami, 2005), para aumentar la productividad y reducir la huella de C en el proceso de producción de bioetanol.

4.3. CONCLUSIONES

En este trabajo identificamos dos nuevas cepas de microalgas *Desmodesmus* sp. y la microalga verde cepa SP2-3 (aún no clasificada taxonómicamente), que producen cantidades copiosas de carbohidratos entre 55-70 % en base al peso seco, en condiciones de privación de N en cultivos en laboratorio.

Luego de la selección de cepas y de la optimización de las condiciones de cultivo, de sacarificación y de fermentación, se pudo demostrar tanto una alta eficiencia de conversión de biomasa a etanol de $0.25 \text{ g} \cdot \text{g biomasa}^{-1}$ como una alta concentración de etanol en el caldo de fermentación de $24 \text{ g etanol} \cdot \text{L hidrolizado}^{-1}$. Los rendimientos observados fueron superiores al 87,4 % del valor teórico; así como también se ha obtenido CO_2 como una fuente puntual reutilizable a rendimientos cercanos al máximo teórico. Estos resultados representan una mejora sustancial en relación a trabajos previos en la literatura internacional y se espera que contribuyan a mantener el interés en el desarrollo de esta tecnología.



CAPÍTULO II

CAPÍTULO II**APROVECHAMIENTO DEL NITRÓGENO DEL AIRE PARA EL CULTIVO
DE MICROALGAS****5.1. INTRODUCCIÓN***5.1.1. Producción de biomasa de microalgas y fertilización nitrogenada*

Las microalgas y/o cianobacterias representan una alternativa prometedora como materia prima para la producción sostenible de biocombustibles, pudiendo aliviar la presión sobre la agricultura para el suministro de alimentos y bioenergía.

Uno de los inconvenientes de implementar el cultivo masivo de microalgas es la gran demanda de fertilizantes sintéticos, especialmente nitrógeno (N).

Aunque el 78% de la atmósfera está compuesta por N₂, el N biológicamente disponible es una limitación común para la productividad de los cultivos en la agricultura y en los ambientes naturales. La razón de esto es que la mayoría de los organismos, incluidos los eucariotas, sólo pueden asimilar N reactivo, como especies de N oxidadas (por ejemplo, NO_x, NO₃⁻, HNO₃) o reducidas (por ejemplo, NH₃, NH₄⁺ y aminas) (Burén & Rubio, 2017).

5.1.2. Síntesis química de fertilizante nitrogenado: el proceso de Haber & Bosch

Industrialmente, el amoníaco (NH₃) se produce a partir de H₂ y N₂ que reaccionan sobre un catalizador a alta temperatura y presión (Erisman *et al.*, 2008; Sutton *et al.*, 2011). Desarrollado por Fritz Haber y llevado a escala industrial/comercial por Carl Bosch durante 1908-1913, el proceso de Haber-Bosch permitió que la población humana supere los 3.000 millones de personas. La mayor parte del N fabricado por el proceso de Haber-Bosch es para la producción de fertilizantes (Burén & Rubio, 2017).

Las microalgas tienen una composición promedio de C₁₀₆H₁₈₁O₄₅N₁₆P, donde el N representa el 4-8% en base a la biomasa seca, haciendo que estos cultivos sean considerablemente más intensivos en N que la agricultura tradicional. Por ejemplo, para producir 1 litro de aceite de algas o biodiesel se necesitarían unos 4,6 kg de CO₂; 0,36 kg de N y 0,06 kg de P, respectivamente (National Research Council of the National Academies (2013); Peccia *et al.*, 2013).

Esta situación puede no sólo tener un impacto negativo en los costos de producción, sino que también representa una parte importante del balance energético mundial ya que más del 10 % del gas natural se dedica a la síntesis de fertilizantes nitrogenados mediante el citado proceso de Haber-Bosch (Schrock, 2006).

En muchas regiones del mundo en vías de desarrollo, como en África Subsahariana, la productividad agrícola se ve principalmente disminuida por el acceso restringido a los fertilizantes debido a la industria no desarrollada, la dependencia de la importación y los precios internacionales, así como también los medios de transporte limitados en las zonas rurales, entre otros factores (Miller *et al.*, 2010; Curatti & Rubio, 2014). Por otro lado, en regiones del mundo con mayor desarrollo, donde el fertilizante nitrogenado económico está disponible, la mayor parte del mismo se pierde en el ambiente, principalmente debido a una incorrecta forma de dosificación (Chen *et al.*, 2011), lo que representa un desperdicio inútil de energía. Además, esto conduce a la fertilización involuntaria, provocando cambios en la biodiversidad de suelos y cuerpos de agua, reduciendo la calidad del agua tanto potable como recreativa, promoviendo el calentamiento global y contaminando el aire a través de diferentes vías químicas (Tilman *et al.*, 2002; Crutzen *et al.*, 2008; Sutton *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Lelieveld *et al.*, 2015). Por lo tanto, la producción sostenible *in situ* de fertilizantes nitrogenados a bajo costo, podría promover cierto alivio hacia la seguridad alimentaria y energética, especialmente en las regiones menos desarrolladas del mundo.

5.1.2.1. *Alternativas al proceso de Haber & Bosch*

5.1.2.1.1. *Uso de aguas residuales*

Alternativamente, las algas pueden ser cultivadas cerca de corrientes de aguas residuales (industriales, municipales, domiciliarias, de la acuicultura, de desechos de animales de granja, de mataderos), con un alto contenido orgánico que sirven como fuente de agua y nutrientes. Si bien las aguas residuales pueden ser explotadas a nivel regional y/o estacional no siempre coinciden en estar disponibles junto con tierras útiles, clima u otros recursos (Pittman *et al.*, 2011; Georgianna & Mayfield, 2012). Sin embargo, las aguas residuales con frecuencia pueden ejercer efectos tóxicos sobre las algas y/o la biomasa resultante, impidiendo su uso como fertilizante (especialmente si esta biomasa fuera a utilizarse para alimentación).

5.1.2.1.2. *Reciclado de nutrientes a partir del procesamiento de la biomasa*

La posibilidad de recuperar los nutrientes de la biomasa procesada es de enorme importancia cuando se desea escalar los cultivos de microalgas para la producción de biocombustibles a escala industrial. De hecho, los medios de cultivo estándar son recetas que proporcionan una mezcla optimizada de nutrientes que soportan el crecimiento de las algas y son actualmente de alto costo.

Se ha demostrado un reciclado directo del N luego de la gasificación catalítica de la biomasa algal a bajas temperaturas, junto con la producción de biogás rico en metano (Minowa & Sawayama, 1999). También se ha propuesto, a partir de un análisis de ciclo de vida, la captura de amonio luego de la gasificación de la biomasa de una cianobacteria fijadora de N₂ (Razon *et al.*, 2012 y 2014). Otra opción es reciclar los nutrientes que permanecen en el residuo del alga después de la extracción de lípidos, sacrificando su posible uso como co-producto para la alimentación animal (Georgianna & Mayfield, 2012). También se propuso el reciclado de N a partir de la biomasa residual posterior a la extracción de lípidos y de carbohidratos por fermentación, el cual fue utilizado como única fuente de N para el cultivo de *Scenedesmus acutus*, posterior a la remoción de algunos inhibidores a partir del caldo de fermentación (Gu *et al.*, 2015). La mayoría de estos métodos aseguran un reciclado eficiente de nutrientes, los cuales reducen ampliamente el uso de fertilizantes para la producción de biomasa algal (Canter *et al.*, 2015).

5.1.2.1.3. *Fijación biológica del N₂*

Al igual que en la agricultura, hay un creciente interés en tomar ventaja de la fijación biológica del N₂ (FBN) para la producción de biomasa de microalgas. La FBN es la conversión del N₂ del aire en N biológicamente activo (NH₃) y sólo lo llevan a cabo un grupo de procariontas (bacterias y arqueas) colectivamente denominadas diazotóxicas. La FBN es catalizada por nitrogenasas sensibles al O₂ en una reacción que demanda una cantidad importante de energía metabólica, requiriendo 8 electrones y al menos 16 equivalentes de ATP para fijar una molécula de N₂. Algunas cianobacterias despliegan un conjunto de adaptaciones para armonizar la evolución fotosintética de O₂ y la fijación de N₂ en un proceso que está totalmente energizado por la luz (Bothe *et al.*, 2010). Aunque se ha previsto la ingeniería genética mediante la inserción de la ruta de fijación biológica del N₂ en microalgas oleaginosas o la hiper-acumulación de aceites en cianobacterias fijadoras de N₂, no se pudo realizar hasta ahora, probablemente

debido a complejidades celulares, genéticas y/o bioquímicas (Curatti & Rubio, 2014; Miller, 2010; Ortiz Márquez *et al.*, 2013).

A diferencia de las cianobacterias, las microalgas eucariotas no pueden utilizar el N₂ del aire, por lo que la producción sostenible *in situ* de fertilizantes-N basada completamente en la FBN sería económica y ambientalmente favorable para el cultivo masivo de microalgas.

En este capítulo proveemos una prueba de concepto para un proceso integrado que produce fertilizante nitrogenado *in situ* basado en la FBN. La biomasa de la cianobacteria rica en N puede ser eficientemente utilizada, sin la necesidad de adicionar nutrientes, para producir biomasa de una microalga oleaginosa o de una microalga hiper-acumuladora de carbohidratos, como materia prima para la producción de biodiesel o bioetanol, respectivamente. El acceso a fertilizantes nitrogenados de alta calidad, sintetizados *in situ*, podría aliviar la necesidad de reciclar el N a partir de biomasa de microalgas.

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1. Aislamiento, propiedades y caracterización de la biomasa de *Nostoc* sp. cepa M2

Con el objetivo de aislar microorganismos idóneos para la producción *in situ* de fertilizantes N para el cultivo mixotrófico de microalgas nativas, se realizó una prospección de cianobacterias nativas fijadoras de N₂, aisladas de los alrededores de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina (38° 0' 0" S 57° 33' 0" O) durante el año 2009. Se seleccionó una cepa diazotrófica (denominada cepa M2) que presentó un rápido crecimiento, la cual fue clasificada morfológicamente mediante inspección microscópica, como perteneciente a la sección IV del sistema de clasificación de Rippka (Rippka *et al.*, 1979). Este grupo incluye a cianobacterias filamentosas heterocísticas que se dividen en un solo plano y su reproducción se da por la ruptura de tricomas al azar, de las cuales algunas germinan a partir de acinetos. Esta cepa se encuentra dentro del orden Nostocales. Por lo tanto, se clasificó en forma preliminar a la cepa M2 como *Nostoc* sp., presumiblemente del género *Nostoc*.

Con el objetivo de refinar la identificación taxonómica de la cepa *Nostoc* sp. cepa M2, se obtuvo el DNA genómico de la misma por una adaptación al método convencional de extracción con fenol/cloroformo y se amplificó por PCR el gen codificante del RNA ribosomal 16S. Se determinó que el fragmento secuenciado se corresponde con el gen 16S de la cepa *Nostoc* sp. CENA88 (aislada de un reservorio de agua dulce en Piracicaba, San Pablo, Brasil en 2009) (Figura 20) (Altschul *et al.*, 1997; NCBI Handbook). La identificación también se confirmó por medio del análisis múltiple de secuencias, utilizando el programa Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) con secuencias representativas de cianobacterias (Figura 20). Los alineamientos de parejas fueron computados con el método de “todos contra todos” y las similitudes fueron guardadas en una matriz. Esta fue luego convertida en una matriz de distancias, donde la longitud de la distancia reflejó la distancia evolutiva entre cada par de secuencias. A partir de esta matriz de distancias se creó un árbol filogenético, utilizando un algoritmo de agrupamiento del “vecino más cercano” (“*Neighbor-joining*”). Se determinó el orden en que los pares de secuencias fueron alineadas progresivamente en cada punto de la ramificación, empezando por los pares de secuencias más cercanas. Estos resultados confirmaron la determinación taxonómica anterior y finalmente, la secuencia del RNA 16S fue depositada en la base de datos del GenBank (número de acceso al GenBank# KM272975).

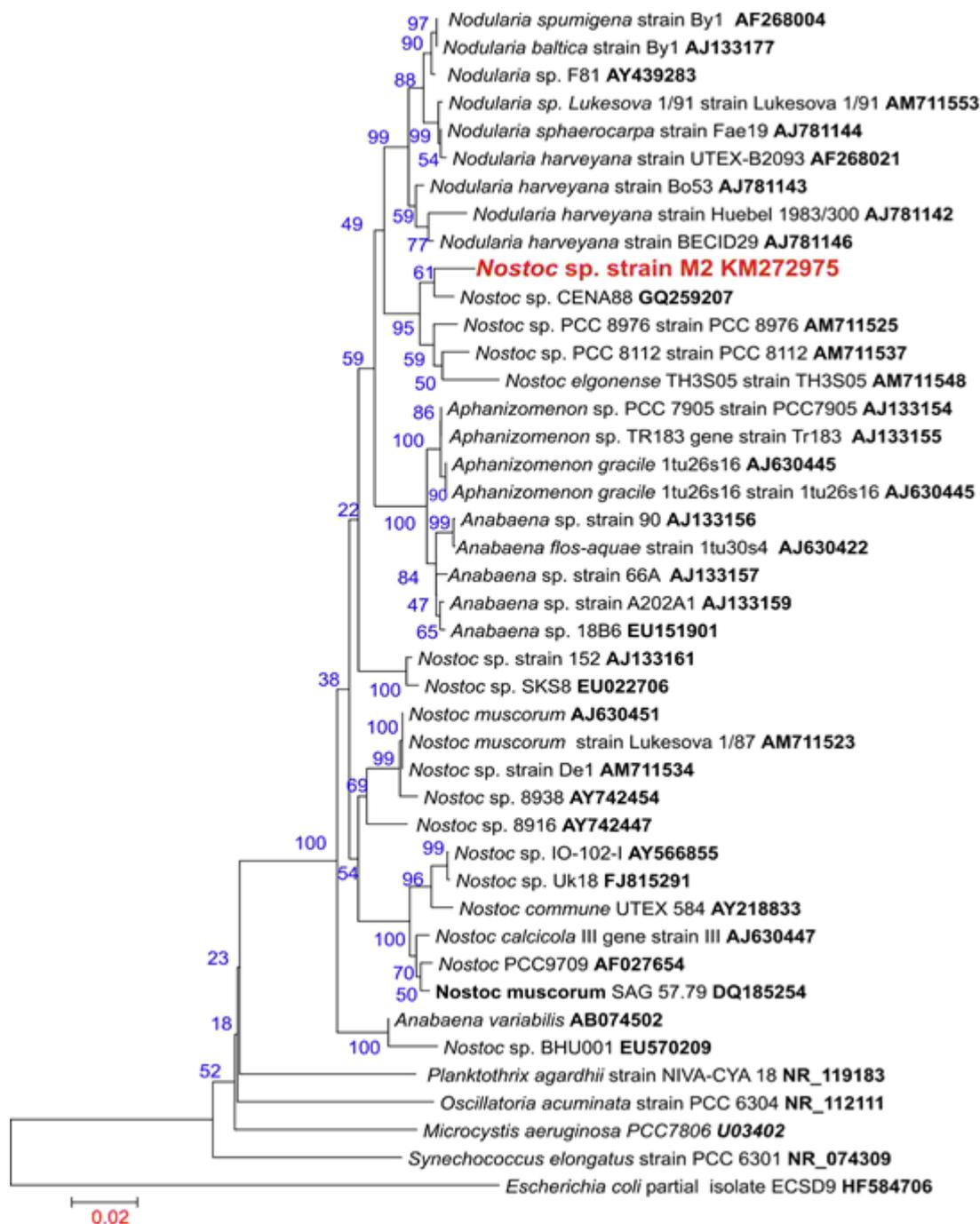


Figura 20. Análisis filogenético de la región del gen ribosomal 16 S de *Nostoc* sp. cepa M2. Los números de acceso a las secuencias fueron indicados a la derecha de cada nombre de las cepas. Los alineamientos de múltiples secuencias fueron generados utilizando el algoritmo Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) a partir del software MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis v5) (Tamura *et al.*, 2011). Los árboles filogenéticos fueron creados utilizando el algoritmo del “vecino más cercano” (“*Neighbor Joining*”) (Saitou & Nei, 1987) del software MEGA5 luego de 500 rondas de remuestreo (“*bootstrap*”).

Nostoc sp. cepa M2 presentó un tiempo de duplicación de su biomasa seca de $1,9 \pm 0,7$ días con un rendimiento final de biomasa de hasta 2 g de biomasa seca $\cdot L^{-1}$, en 10-12 días cuando la cepa fue cultivada bajo condiciones diazotróficas, en botellas de 500 mL conteniendo medio BG11₀ en cultivos en laboratorio (Figura 21).

Para comparar los rendimientos con cultivos al aire libre, se cultivó durante el verano a la cepa por 15-20 días en botellas de 3 L de capacidad con burbujeo de aire. Se determinó que los rendimientos de biomasa obtenidos, 1,8 g de biomasa seca $\cdot L^{-1}$, fueron similares a los obtenidos en cultivos de laboratorio.

Se realizaron cálculos utilizando un factor de conversión de proteína a N para la biomasa de la cianobacteria (asumiendo una composición del 16 % de N en las proteínas) (Gonzalez López *et al.*, 2010) indicando que *Nostoc* sp. cepa M2 fijaría y asimilaría dentro de su biomasa entre 13 o 20 mg $N \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ bajo condiciones controladas de laboratorio o en cultivos al aire libre, respectivamente.

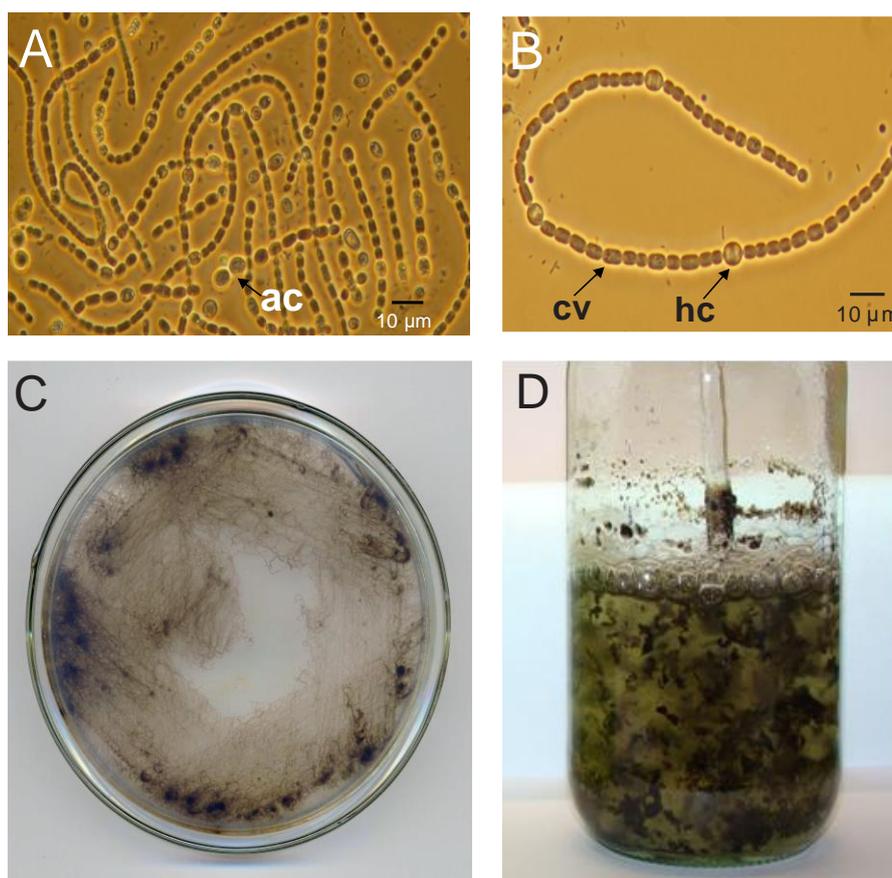


Figura 21. Modo de cultivo diazotrófico de *Nostoc* sp. cepa M2. (A-B) Fotomicrografía: (ac) acinetos, (cv) célula vegetativa y (hc) heterocisto. (C) Cultivo en medio mineral sólido y (D), cultivo en medio mineral líquido.

En la Tabla 6 se detalla la composición macromolecular de la biomasa de *Nostoc* sp. cepa M2, cuya característica principal, es la acumulación de 45-60 % de proteínas.

Tabla 6. Composición de biomasa de *Nostoc* sp. cepa M2

| Composición de biomasa | Proteínas (% p/p) | Carbohidratos (% p/p) | Lípidos (% p/p) |
|---------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|
| <i>Nostoc</i> sp. cepa M2 | 45-60 | 25-35 | 10 |

En las condiciones de cultivo utilizadas, la cepa *Nostoc* sp. M2 presentó la capacidad de formar agregados macroscópicos dada su naturaleza filamentosa, lo cual permitió inicialmente concentrar la biomasa mediante una etapa de sedimentación de 30 min (Figura 22), seguida de una centrifugación a baja velocidad, entre 1.000-6.000 c.a. x g durante 5-10 min, para completar la cosecha.

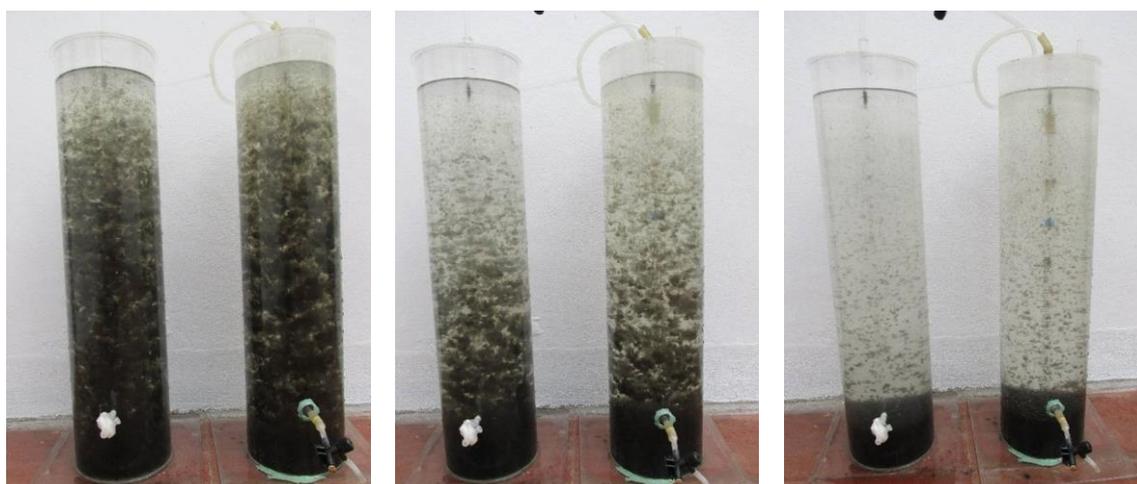


Figura 22. Modo de cultivo diazotrófico de *Nostoc* sp. cepa M2 en fotobiorreactores de 5 L. (A-C) Fotografías de cultivo en medio mineral líquido. Se observa en pasos secuenciales la etapa de sedimentación rápida (duración total 30 min).

La sedimentación de la biomasa de *Nostoc* sp. M2 (Figura 22) es muy interesante dado que la cosecha de cianobacterias o microalgas, a partir de cultivos diluidos, es una de las principales limitaciones para la producción rentable de biomasa a partir de estos microorganismos, principalmente debido al pequeño tamaño de las células individuales (Molina Grima *et al.*, 2003).

5.2.2. Producción de fertilizante orgánico a partir del N₂ del aire

Dado que el 75-85% del N celular se encuentra en forma de proteínas, se optimizaron dos métodos alternativos para la recuperación de proteínas solubles a partir de la biomasa de *Nostoc* sp. cepa M2 (Figura 24).

Uno de los métodos se basó en el secado al aire de la biomasa de *Nostoc*, molienda en mortero con 15 % (p/p) de arena (produciéndose de esta manera la ruptura mecánica de las células), rehidratación y extracción acuosa durante 1 h (Figura 24). Este método de extracción permitió una liberación de entre un 30-50 % de las proteínas que componen la biomasa de la cianobacteria.

El otro método de extracción fue mediante congelado y descongelado de la biomasa fresca de *Nostoc*, que resultó en una liberación más eficiente de su contenido celular. En este caso, se obtuvo una extracción de 60-90% de las proteínas totales (10-40% de la proteína total se mantuvo en la pasta celular). Por lo tanto, estos dos métodos alternativos difieren en su demanda energética a expensas de una reducción del rendimiento.

Se realizaron cálculos utilizando factores de conversión de proteína a N para la biomasa de cianobacterias (González López *et al.*, 2010) y se determinó que una preparación típica contenía 5-20 g.L⁻¹ de proteínas con una concentración de N de 0,9 - 3,6 g .L⁻¹ (50-200 mM) (asumiendo un contenido del 16 % de N en las proteínas). Además las preparaciones contenían P 0,1 g.L⁻¹ y carbohidratos solubles 2,5 g.L⁻¹.



Figura 24. Fotografía del extracto proteico de *Nostoc* sp. M2 libre de células. El extracto se obtuvo a partir de la rehidratación de 0,1 g de polvo de *Nostoc* sp. M2 cultivada bajo condiciones diazotróficas.

El tener acceso a una fuente de N renovable aumentaría significativamente la sostenibilidad de la propuesta, a la vez de disminuir su impacto ambiental. Razón *et al.* (2012) ha sugerido, mediante análisis de ciclos de vida, que la gasificación de la

biomasa de *Anabaena* sp. ATCC 33047 convierte el amonio del biogás residual, en sulfato de amonio. Al secar el sulfato de amonio a cristales y convertirlo a amonio líquido y ácido sulfúrico concentrado, se ahorrarían aproximadamente 1.10^5 MJ de energía no renovable y 3.100 kg de CO₂ para producir 1 tonelada de amonio líquido, en comparación con el proceso industrial de Haber & Bosh, para obtener la misma cantidad de fertilizante nitrogenado (Razon, 2012).

La alternativa aquí propuesta, para la producción *in situ* de fertilizantes nitrogenados (Figura 24) es algo más sencilla debido a las propiedades especiales de la biomasa de *Nostoc* a partir de la cual se liberan cantidades copiosas de proteínas.

5.2.3. *Uso del extracto de Nostoc libre de células, como fertilizante orgánico para el cultivo de microalgas*

C. sorokiniana cepa RP fue capaz de utilizar eficientemente tripteína (hidrolizado ácido de caseína) como única fuente de N y este hecho alentó el estudio del uso de extractos proteicos de *Nostoc* sp cepa M2 como fuente económica y ambientalmente conveniente de N (Figura 24). Se siguió el razonamiento de que los aminoácidos y péptidos cortos (como los presentes en la tripteína) podrían ser un sustrato más inmediatamente disponible para las microalgas, y se evaluaron fuentes económicas de proteasas para la preparación de soluciones concentradas de aminoácidos a partir de la biomasa de *Nostoc* sp cepa M2.

Para evaluar la calidad del extracto proteico de *Nostoc*, se analizó la capacidad de la microalga oleaginosa *C. sorokiniana* cepa RP de utilizarlo como fertilizante nitrogenado (Figura 24), planteando como alternativa, la hidrólisis enzimática del extracto proteico con preparaciones crudas de *Ananas comosus* (conteniendo la proteasa bromelina). La efectividad de la proteólisis fue determinada mediante electroforesis de los polipéptidos en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) (Tesis de Licenciatura).

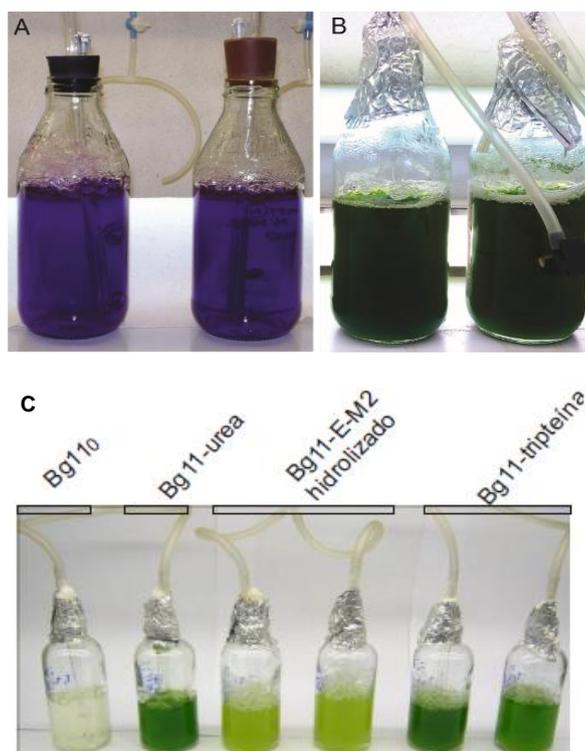


Figura 24. Biofertilización de cultivos de *C. sorokiniana* cepa RP, utilizando distintas fuentes de N orgánico. (A) Fotografía de los cultivos en medio BG11₀ con N 3mM del extracto de *Nostoc* sp. cepa M2 libre de células a tiempo inicial y (B) a los 5 días de cultivo mixotrófico. (C) Fotografía de los cultivos en BG11₀, BG11₀ N 3mM de urea, BG11₀ N 3mM de tripteína (hidrolizado trípico de caseína) y BG11₀ con N 3mM a partir de preparaciones hidrolizadas con extracto crudo de ananá (bromelina) del extracto de *Nostoc* sp. cepa M2.

La Figura 25 muestra que *C. sorokiniana* usa eficientemente esta fuente de N, con tiempos de duplicación de $12,6 \pm 4,3$ h. En el control positivo, en medio mineral mínimo con urea como fuente de N, el tiempo de duplicación observado fue de $9,2 \pm 0,6$ h. El otro control positivo, correspondió a cultivos de *C. sorokiniana* en presencia de hidrolizados de caseína, para los cuales se demostró un tiempo de duplicación de $12,1 \pm 0,8$ h, confirmando que la cepa de microalgas es capaz de utilizar péptidos cortos como fuente de N y como era de esperarse *C. sorokiniana* no pudo duplicar su biomasa en ausencia de una fuente de N agregada (Figura 25 A).

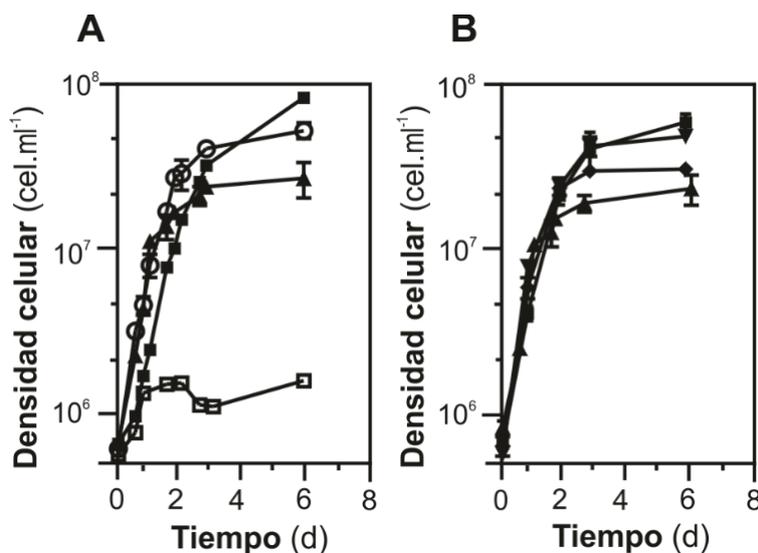


Figura 25. Curvas de crecimiento de *C. sorokiniana* usando el extracto de *Nostoc* como fuente de N. (A) (□) Medio de cultivo BG11₀ (sólo con trazas de N biodisponible para microalgas); (■) BG11₀ suplementado con N 3 mM de urea; (○) BG11₀ suplementado con N 3mM de peptona de caseína; (▲) BG11₀ suplementado con N 3mM de proteínas del extracto de *Nostoc* proteolizado con bromelina. (B) Efecto de la proteólisis de los extractos libres de células de *Nostoc*, sobre el crecimiento de *C. sorokiniana*. (■) BG11₀ suplementado con N 3mM de urea; (▲) BG11₀ suplementado con N 3 mM de proteínas del extracto de cianobacterias tratado con bromelina; (▼) BG11₀ suplementado con N 3mM de proteínas del extracto de *Nostoc* no tratado con bromelina; (◆) N 3 mM de proteínas del extracto de *Nostoc* no tratado en agua destilada. Los cultivos se llevaron a cabo en botellas de 500 mL burbujeadas con aire filtrado. Los datos representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes.

Si bien se confirmó la hipótesis inicial de que los hidrolizados proteicos podrían proporcionar una fuente de N más fácilmente disponible para las microalgas, la conveniencia del tratamiento enzimático (con bromelina) no resultó tan clara ya que extractos sin tratar permitieron un crecimiento considerable de las microalgas (Figura 25 B), pero fueron incapaces de utilizar caseína (Figura 26 A). De esta manera se investigó si los extractos libres de células presentaban un nivel de actividad proteolítica que pudiera dar cuenta de los resultados observados. Tal como muestra la Figura 26 B, el extracto de *Nostoc* presentó tal actividad proteolítica que generaría péptidos más cortos los cuales serían aprovechados por la microalga como fuente de N.

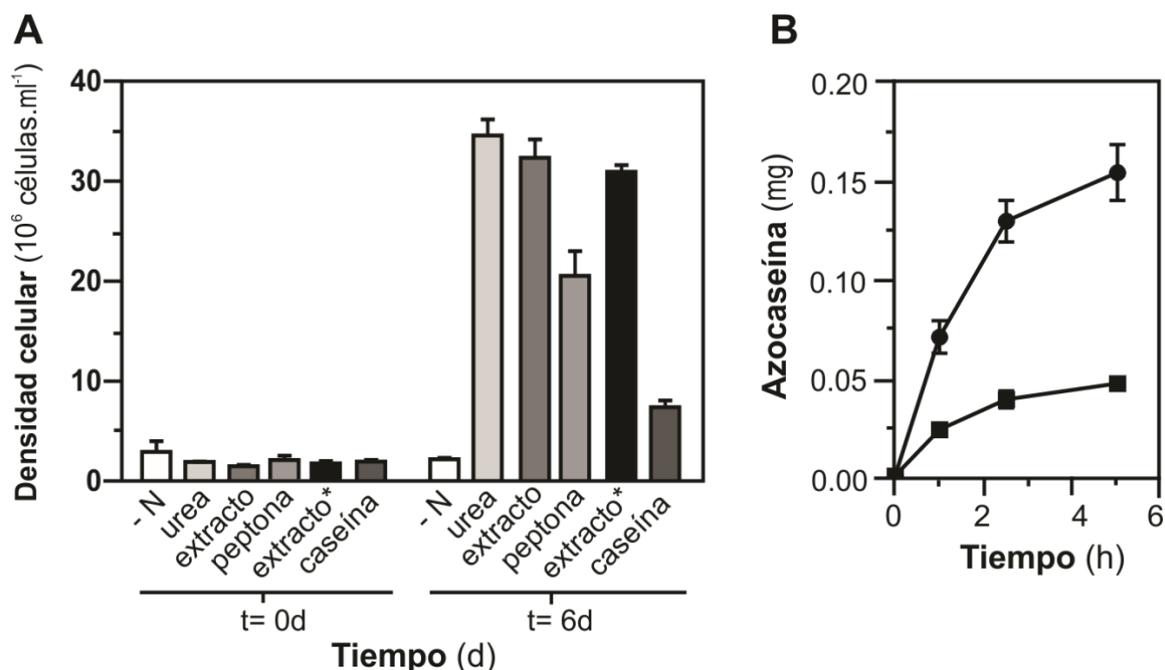


Figura 26. (A) Crecimiento de *C. sorokiniana* utilizando diferentes fuentes de N. Los cultivos fueron llevados a cabo en erlenmeyers estáticos agitados manualmente dos veces al día. * Se suplementó el extracto de *Nostoc*, libre de células con ampicilina $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ para prevenir la contaminación bacteriana. Las fuentes de N3 mM utilizadas fueron urea, peptona de caseína, proteínas de caseína no hidrolizada y proteínas del extracto de *Nostoc* libre de células. Los datos representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes. (B) Actividad proteolítica de los extractos libres de células de *Nostoc* sp. cepa M2 sobre el sustrato artificial azocaseína a (■) 30°C o (●) 37°C . Los datos corresponden a la media y desvío estándar de dos determinaciones independientes a partir de las preparaciones representativas.

La proteólisis se debió principalmente a proteasas de *Nostoc* sp. cepa M2 (en contraste con una posible contaminación bacteriana) debido a que el extracto libre de células fue filtrado con filtros de $0,22 \mu\text{m}$ y a que el crecimiento de *C. sorokiniana* fue llevado a cabo en presencia de ampicilina para prevenir el desarrollo de bacterias (Figura 26 A).

Con el objetivo de evaluar el flujo de N y P desde los extractos a la biomasa de la microalga se determinó la incorporación total de los mismos, desde los extractos a la biomasa de *C. sorokiniana* y los resultados indican que la incorporación en siete días fue del 80 y 84 %, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Asimilación de N y P en la biomasa de *C. sorokiniana* a partir del extracto de *Nostoc* libre de células.

| | N (mg.L ⁻¹) | P (mg.L ⁻¹) |
|--|-------------------------|-------------------------|
| Medio BG-110 ^a | 0,15 | 4,50 |
| BG-110 + extracto <i>Nostoc</i> ^a | 32,07 | 9,31 |
| Biomasa <i>C. sorokiniana</i> ^b | 24,07 ± 1,56 | 7,36 ± 0,46 |
| “Spent medium” ^b | 7,58 ± 1,57 | ND ^c |

^aDeterminaciones simples. ^bLos datos representan la media y desvío estándar de dos cultivos independientes al séptimo día de cultivo. ^cNo detectado. Estas determinaciones se realizaron mediante servicios certificados (Fertilab).

Además del reciclado del 80 % del N, se demostró el reciclado de un 84 % del P de los extractos de *Nostoc* para el cultivo de microalgas (Tabla 7). Esto es de primordial interés especialmente considerando que, a diferencia de los fertilizantes N que pueden ser producidos mediante síntesis química o biológica a partir del N atmosférico, los fertilizantes fosforados son producidos a través de la minería a partir de recursos no renovables, los cuales se estima que serán agotados en 50-100 años (Canter *et al.*, 2015).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración del extracto de *Nostoc* sobre células de *C. sorokiniana*, se realizaron cultivos en presencia de N 3 o 9 mM del extracto. El rendimiento final de las microalgas fue de $24,7 \cdot 10^6 \pm 1,1$ y $58,9 \cdot 10^6 \pm 12,2$ células.mL⁻¹, respectivamente (Figura 27).

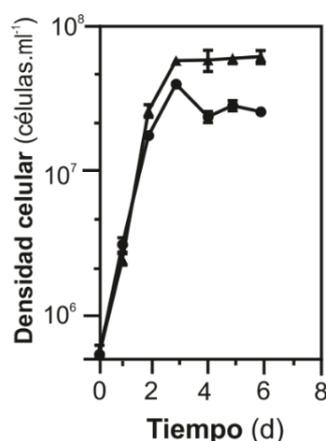


Figura 27. Efecto de la concentración del extracto de *Nostoc* libre de células sobre el crecimiento de *C. sorokiniana*. Los cultivos fueron suplementados con el extracto de *Nostoc* libre de células diluido en agua destilada a una concentración de N de las proteínas de (■) 3 mM o (▲) 9 mM. Los cultivos se llevaron a cabo en botellas con burbujeo de aire. Los datos representan la media y desvío estándar de cuatro experimentos independientes.

La Figura 28 muestra que la depleción de proteínas de *Nostoc* del medio de cultivo se correspondió con un incremento proporcional de proteínas en la biomasa de *C. sorokiniana* en seis días de cultivo, indicando que la asimilación de N de los extractos libres de células de *Nostoc* en biomasa de *C. sorokiniana* ocurre a una eficiencia cercana al 100 %.

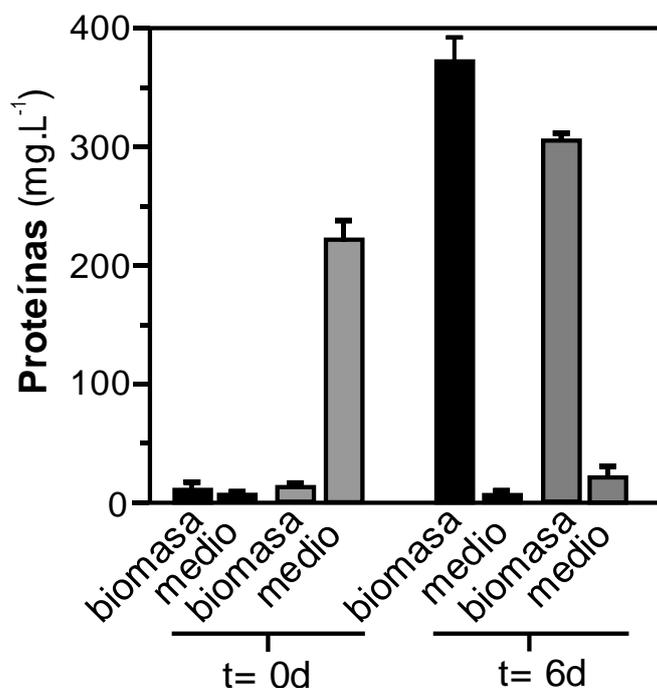


Figura 28. Partición de proteínas totales en cultivos de *C. sorokiniana* a expensas del extracto de *Nostoc* libre de células. Los niveles de proteínas totales fueron determinados tanto a partir del medio de cultivo o de biomasa de *C. sorokiniana* a los 0 y 6 días de cultivo. Los medios de cultivo utilizados son BG11₀ suplementado con N 3 mM de urea (barras negras) o extracto libre de células de *Nostoc* sp. cepa M2 no hidrolizado y diluido en agua destilada (barras grises). Nota: mientras que al día 0 de cultivo las proteínas se refieren a aquéllas presentes en la biomasa de *C. sorokiniana* utilizada como inóculo, a los 6 días de cultivo se hace referencia a las proteínas acumuladas durante este tiempo. Los datos representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes.

Cuando se incrementó la dosis del extracto como fuente total de nutrientes, no se observaron diferencias en la tasa específica de crecimiento en las células de *C. sorokiniana*, sugiriendo que, a la concentración de referencia equivalente a un contenido en N de 3 mM, los transportadores de los nutrientes implicados, podrían estar operando a niveles saturantes. Además se deduce que los nutrientes se mantienen biodisponibles y no limitan el crecimiento de las distintas cepas de microalgas. Por otro lado, el hecho de que el rendimiento máximo de células fuera proporcional a la dosis

suministrada, sugirió una importante eficiencia de conversión de los nutrientes del extracto en biomasa algal (Figura 26, Figura 28).

Se ha demostrado hasta aquí, una alternativa para el reciclado del N y P de la biomasa de la cianobacteria. Gu *et al.* (2015) han aplicado con éxito, un enfoque de biorrefinería en el que pretrataron la biomasa de *Scenedesmus acutus* cepa SCE 0401 con H₂SO₄ al 2 % (p/v) a 150 ° C para lisar las células y luego separar los lípidos de la suspensión. El líquido sacarificado fue utilizado como fuente de azúcares para la producción de bioetanol por fermentación con levaduras. Además, demostraron que el medio de fermentación agotado sustituyó el fertilizante nitrogenado para el cultivo de *S. acutus* cepa SCE 0401, lo que proporciona una prueba de concepto de una biorrefinería que produce aceites y etanol como principales productos, minimizando la entrada de fertilizantes N mediante el reciclado de N en un ciclo interno. Según los autores esta propiedad aparentemente podría ser específica de *S. acutus* cepa 0401, pero podría transferirse a otras cepas prometedoras (Gu *et al.*, 2015).

Con el objetivo de testear la capacidad de usar el extracto en otras cepas de microalgas de diferentes familias, remotamente relacionadas, se estudió el crecimiento de las cepas *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ankistrodesmus* sp. y *Nannochloropsis oceanica*.

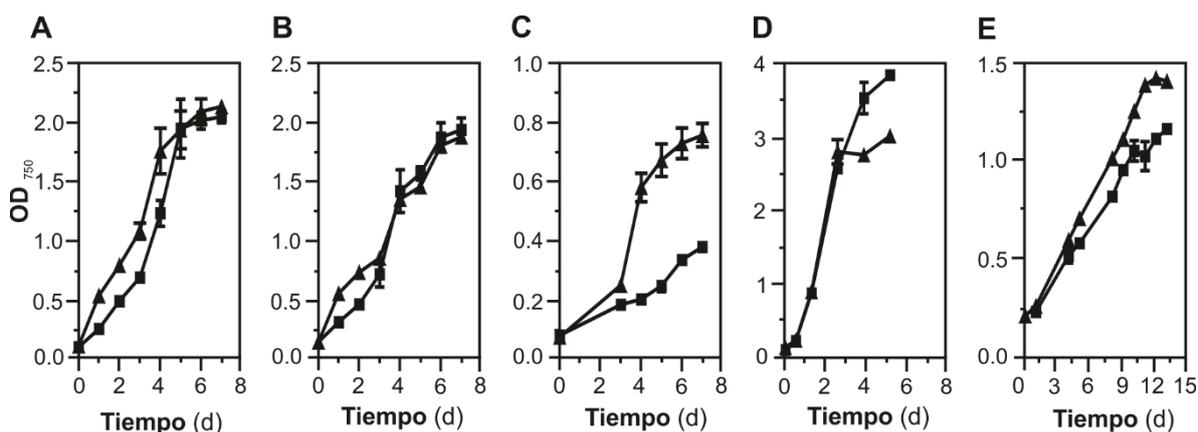
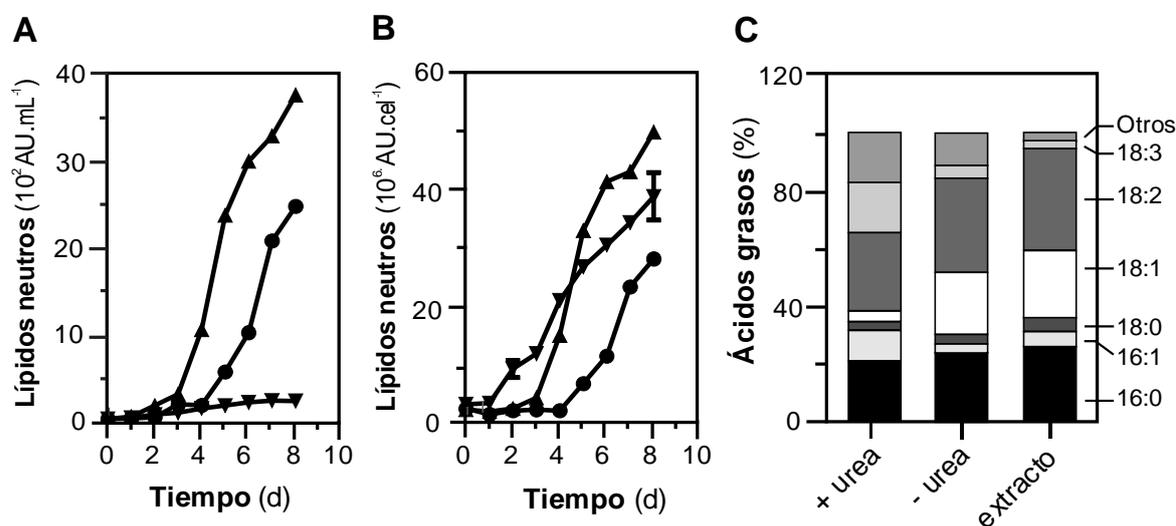


Figura 29. Curvas de crecimiento de las diferentes microalgas a expensas del extracto de *Nostoc* libre de células como única fuente de N. (A) *C. sorokiniana*; (B) *S. obliquus*; (C) *Ankistrodesmus* sp.; (D) *C. reinhardtii*; (E) *N. oceanica*. (■) BG110 suplementado con N 3 mM proveniente de la urea (a excepción de *C. reinhardtii* cuyo control positivo fue en medio TAP con amonio 10 mM); (▲) BG110 suplementado con N 3 mM de proteínas de extractos de *Nostoc* libres de células no proteolizados con bromelina (a excepción de *C. reinhardtii* donde se reemplazó el amonio del medio TAP por el extracto). Los cultivos fueron llevados a cabo en erlenmeyers estáticos agitados manualmente dos veces por día. Los datos representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes.

Como se muestra en la Figura 29, *S. obliquus* (Figura 29 B) y *N. oceánica* (Figura 29 E) presentaron respuestas similares a la cepa *C. sorokiniana* (Figura 29 A) en cuanto a sus rendimientos máximos alcanzados tanto para el medio BG11 suplementado con urea como en BG11 suplementado con el extracto de *Nostoc* como fuente de N. En cultivos en medio TAP con el extracto de *Nostoc* libre de células, la cepa *C. reinhartii* presentó la mayor densidad celular (Figura 29 D). En el caso de *Ankistrodesmus*, el fertilizante nitrogenado de *Nostoc* superó ampliamente a la urea (Figura 29 C) o al nitrato (datos no mostrados) como fuente de N alternativa. Estos datos demuestran que microalgas de diferentes familias son capaces de utilizar el extracto tan eficientemente como *C. sorokiniana*.

5.2.3.1. Producción de aceites de microalgas a expensas del fertilizante de *Nostoc* sp. cepa M2

Con el objetivo de inducir la acumulación de lípidos en *C. sorokiniana*, se cultivaron a las células en un medio privado de N, y como resultado se demostró una acumulación de lípidos neutros tal como había sido reportado en trabajos previos en nuestro laboratorio (Do Nascimento *et al.*, 2012) (Figura 30 A y B).



La acumulación de lípidos en el cultivo fue compensada por una producción extremadamente baja de biomasa (Do Nascimento *et al.*, 2012). Un suplemento de N3 mM al medio de cultivo, proveniente de urea o N 2,2 mM proveniente de proteínas de *Nostoc* a partir del extracto libre de células (como fuente completa de nutrientes) incrementó la acumulación total de lípidos de 10 a 15 veces, aunque con un retraso de 3 a 4 días, respectivamente.

La acumulación de lípidos neutros fue más rápida en cultivos de *C. sorokiniana* a expensas del extracto libre de células (como fuente completa de nutrientes), con una diferencia máxima a los 5 días de iniciado el cultivo. A ese tiempo, se realizó la extracción de los lípidos con solventes orgánicos y se determinaron gravimétricamente, dando como resultado un contenido total de lípidos de $32,3 \pm 1,0$ % (p/p) en base al peso seco. Posteriormente, a los 8 días de cultivo, las células continuaron acumulando lípidos, aunque a una tasa muy lenta, hasta valores superiores a $33,4 \pm 0,7$ % (p/p). Por otro lado, las células cultivadas con urea, acumularon lípidos totales hasta el $12,1 \pm 1,1$ % (p/p).

Se observó una mayor acumulación de lípidos neutros para células cultivadas en presencia del extracto que en ausencia total de la fuente de N, lo que sugiere que otros componentes en el extracto contribuyen a mejorar la acumulación de lípidos, además de la deficiencia de N. El extracto de *Nostoc* libre de células, además de una fuente de N, parece proveer sustratos orgánicos que contienen C (azúcares y otros hidratos de carbono), los cuales promocionan el crecimiento mixotrófico (Cheirsilp & Torpee, 2012), y probablemente todos los nutrientes y otras sustancias estimulantes del crecimiento, para algunas microalgas con requerimientos nutricionales especiales (Leão *et al.*, 2012). Esta forma de cultivo incrementó el rendimiento del proceso y no se produjeron cambios en la composición de ácidos grasos de la biomasa algal, tendiendo a conservar la calidad específica de los aceites según la cepa de origen (Figura 30).

Con el objetivo de determinar el potencial máximo de producción de aceites de microalgas, se realizó el escalado de los cultivos de *C. sorokiniana*, en fotobiorreactores de tipo “air-lift” (PBRs) de 5 litros de capacidad, utilizando N 3 mM del extracto de *Nostoc* como fuente completa de nutrientes. Las condiciones se mantuvieron constantes y fueron optimizadas según las siguientes variables, suplemento de CO₂, luz y temperatura (ver Sección *Materiales y Métodos*). La

productividad de lípidos al quinto día de cultivo fue de $89,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ con un contenido de lípidos totales de 37 % (p/p). Esta productividad se aproxima a valores umbrales, de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, que representan una muy alta productividad de lípidos de acuerdo a la literatura (Griffiths & Harrison, 2009). Al octavo día las células acumularon hasta un 42 % (p/p) de lípidos totales, aunque la productividad mostró tendencia a disminuir en ausencia de crecimiento de las microalgas. La composición de los ácidos grasos de los lípidos extraídos, acumulados durante 8 días de cultivo en presencia del extracto de *Nostoc* fueron más similares a los acumulados en medio de cultivo BG11₀ en comparación con los acumulados cuando las células utilizan urea como fuente de N (Figura 30 C). Se observó un enriquecimiento en ácido oleico (18:1) en los triacilglicerolos, en células cultivadas con el extracto, siendo ésta una característica observable en cultivos control, que han agotado la fuente de N.

5.2.3.1.1. Rendimiento potencial en cultivos al aire libre de *C. sorokiniana*, creciendo a expensas del extracto de *Nostoc*

Con el objetivo de estimar el rendimiento potencial de los cultivos al aire libre, se simuló en fotobiorreactores ambientales (ePBRs) el cultivo de *C. sorokiniana* a expensas del extracto de cianobacterias como única fuente de nutrientes (sin suplemento de CO₂), en piletas a cielo abierto de 20 cm de profundidad.

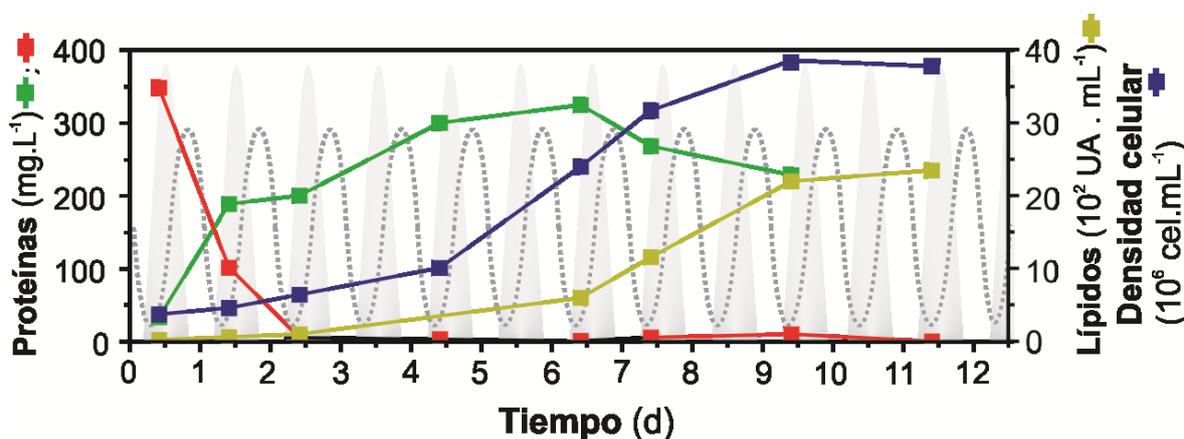


Figura 31. Simulación en fotobiorreactores ambientales de la productividad de aceites de *C. sorokiniana* cultivada al exterior a expensas del extracto de *Nostoc* como única fuente de nutrientes. Las condiciones del ePBR usadas en este estudio simulan el promedio de las condiciones climáticas de la temporada de primavera, en el mes de noviembre en la ciudad de Mar del Plata. (Rojo) proteínas en el medio/ "spentmedium"; (verde) proteínas en la biomasa de *C. sorokiniana*; (azul) células de *C. sorokiniana*; y (amarillo) lípidos neutros (Rojo de Nilo reactivo en unidades arbitrarias de fluorescencia). El período de luz fue sombreado en el fondo del gráfico, y el ciclo de temperaturas fue indicado mediante líneas punteadas. Las amplitudes se indicaron en la sección *Materiales y Métodos*.

En la Figura 31 se muestra el promedio de una corrida, simulada para las condiciones meteorológicas que prevalecen en la temporada de primavera de la ciudad de Mar del Plata. Bajo estas condiciones, en 2 días, las células de *Chlorella* agotaron las proteínas de *Nostoc* suplementadas al medio de cultivo. En 6 días, las proteínas recuperadas en la biomasa de *C. sorokiniana* fueron equivalentes a la cantidad inicial de proteínas de *Nostoc* suplementadas al medio de cultivo. Tras una ligera disminución en el contenido de proteínas, las células de la cepa de microalga comenzaron a acumular lípidos, hasta un 33 % (p/p) después de 9 días de cultivo con un rendimiento final de biomasa seca de $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y una productividad de aceite de $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. La productividad de los cultivos al aire libre fue una cuarta parte de su aparente potencial máximo estimado para cultivos en los fotobiorreactores de tipo “air-lift”, mencionados anteriormente y probablemente se debió a un crecimiento más lento.

Según Pérsico *et al.* (2011), dentro de la biorrefinería de microalgas oleaginosas, podrían obtenerse $13.216 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$ de aceite de *Nannochloropsis oceanica*, suponiendo una productividad de biomasa promedio durante el año, del 75 %, con respecto a la estimación para la primavera observada en cultivos al aire libre de esta microalga en esta ciudad (Pérsico *et al.*, 2011). La superficie requerida para producir *Nostoc* y poder acoplar la producción *in situ* del fertilizante nitrogenado con la producción de aceites a partir de microalgas oleaginosas, reduciría el rendimiento de aceites en base al área utilizada para cultivar esta bacteria. En este estudio no pudimos realizar las estimaciones de la productividad potencial de las células de *Nostoc* creciendo en piletas a cielo abierto en los fotobiorreactores ambientales (ePBRs) porque los largos filamentos tuvieron la tendencia de adherirse a los sensores del sistema. Sin embargo, asumiendo una productividad en piletas a cielo abierto, como la que se observó en estudios previos para una cianobacteria relacionada (*Anabaena* sp. ATCC 33047), de $56,60 \text{ toneladas de peso seco}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$ (Razon, 2012), se debería destinar alrededor de un 33 % del área de tierra a la producción *in situ* del fertilizante nitrogenado. Este cálculo se basa en la eficiencia observada de conversión de biomasa de *Nostoc* a biomasa de *C. sorokiniana* y la composición bioquímica de ambos organismos, reduciendo la productividad de aceites en estos sistemas acoplados, a $9.937 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$. De manera alternativa, podrían alcanzarse productividades de biomasa de *Nostoc*, como las alcanzadas en cultivos al aire libre en botellas de 3 L de cultivo, si la cepa es cultivada en tubos de polietileno de gran calibre encerrados en

jaulas cilíndricas de 30 cm de diámetro y 200 cm de altura, o cualquier otro sistema similar a los comúnmente utilizados en acuicultura (Creswell, 2010). Utilizando estos sistemas de cultivo, el uso de superficie terrestre podría reducirse a un 5 % para la producción *in situ* de este fertilizante nitrogenado, alcanzando productividades de aceite de microalgas de 12.770 L.ha⁻¹.año⁻¹. Este rendimiento esperado de 10.000-13.000 L.ha⁻¹.año⁻¹ de aceites de microalgas es alrededor de 20 veces mayor que el reportado para la soja como materia prima predominante para la producción de biodiesel (500 L.ha⁻¹.año⁻¹ de aceites) y se mantiene dentro del rango para la producción de aceites de microalgas producidas en piletas a cielo abierto a expensas de fertilizante nitrogenado sintético con suplemento de CO₂ (Griffiths & Harrison, 2009; Chisti, 2013).

Además del aceite, el proceso antes descrito produciría a partir de 2 kg de biomasa de *Nostoc*, aproximadamente 1 kg de biomasa residual de *Nostoc* (principalmente carbohidratos), y 1 kg de carbohidratos y 1 kg de proteínas a partir de biomasa de *C. sorokiniana* (esta estimación se realiza sobre la base de la conversión determinada de biomasa de cianobacteria a biomasa de microalga, y a partir de la composición macromolecular de ambas biomásas). Estos resultados representan una cantidad muy alta de biomasa fotosintética para reclamar créditos en bonos de C (Marenya *et al.*, 2012) y una oportunidad para desarrollar una biorrefinería para la coproducción de alimentos y suplementos alimenticios para animales, ricos en N entre otras alternativas, según las tecnologías y mercados disponibles (Ogbonna *et al.*, 2013; Lum *et al.*, 2013), que en gran medida aumentarían la rentabilidad del proceso.

5.2.3.2. Producción de carbohidratos de microalgas a expensas del fertilizante de *Nostoc sp. cepa M2*

Para aprovechar la FBN, mediante la producción sostenible *in situ* del fertilizante nitrogenado, se utilizó la corriente líquida libre de células de *Nostoc sp. cepa M2*, para la acumulación de biomasa de microalgas hiper-acumuladoras de carbohidratos.

A partir del escrutinio de las cepas hiper-acumuladoras de carbohidratos (Tabla 2) se seleccionó a *Desmodesmus* cepa FG (Do Nascimento, *et al.* 2012) que se cultivó en botellas de 500 mL, bajo el modo de vida mixotrófico en condiciones de CO₂ (2 %), luz (100 μmol fotones m⁻². s⁻¹) y temperatura (28 ± 1 °C) constantes. Los cultivos fueron operados bajo el modo semi-continuo con un 75 % de agua reciclada y con una colecta de células a los días 10 y 20.

En la Tabla 8 se indican los parámetros analizados en el cultivo mixotrófico semicontinuo de *Desmodesmus* sp. cepa FG (Figura 32). Como puede observarse, en comparación con el modo de cultivo autotrófico, se alcanzó una concentración final de biomasa muy alta, en un ciclo de 10 días, de $8,1 \pm 0,1$ g (peso seco) $\cdot L^{-1}$, obteniéndose una productividad máxima de $0,6 \pm 0,0$ g $\cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$, correspondiendo la mayor parte a carbohidratos fermentables ($67,7 \pm 1,7$ % p/p) (Figura 32 y Tabla 8).

Tabla 8. Análisis del crecimiento, acumulación de carbohidratos fermentables y proteínas a partir de células de *Desmodesmus* sp. cepa FG a expensas del fertilizante nitrogenado orgánico en cultivos semicontinuos.

| Parámetros analizados | 1° CICLO (10 días) | |
|---|---------------------|---------------------|
| | Cultivo mixotrófico | Cultivo autotrófico |
| Concentración inicial N (mM) | 7,1± 0,1 | 8 |
| Biomasa seca inicial (g. L ⁻¹) | 1,5± 0,0 | 1,4 ± 0,0 |
| Biomasa seca final (g. L ⁻¹) | 8,1± 0,1 | 6,8± 0,3 |
| Productividad máxima de biomasa (g. L ⁻¹ . d ⁻¹) | 0,6± 0,0 | 0,5± 0,0 |
| Proteínas (% p/p) | 31,6 ± 0,1 | 37,1 ± 2,1 |
| Carbohidratos (% p/p) | 67,7 ± 1,7 | 60,0 ± 2,2 |
| pH final (3° ciclo) | 9,0 | 9,5 |

Mediante esta forma de cultivo, se recicló tanto el N, obtenido mediante FBN, como también otros nutrientes, los cuales fueron suficientes para una productividad máxima de biomasa ligeramente superior ($0,6 \pm 0,0$ g $\cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$), comparada con la del medio de cultivo de referencia (Tabla 8).

En estos cultivos semicontinuos, un reciclado de agua de hasta el 75% (v/v) por ciclo, permitió sostener una productividad máxima de biomasa equivalente ($0,5 \pm 0,0$ g $\cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$) y un rendimiento de carbohidratos ligeramente inferior ($38,9 \pm 0,7$ % p/p) (Figura 32). El reciclado de agua minimizaría los costos de producción de biomasa algal, siendo un paso esencial para hacer que el proceso de producción de biocombustibles sea económica y ambientalmente sustentable. Se puede reducir el requerimiento de agua del sistema mediante el reciclado del medio de cultivo, obtenido posterior a la cosecha. Se reportó una reducción de 1.500-3.700 L a 500-800 L de agua reciclada para producir 1

L de biodiesel a base de *Chlorella vulgaris* (Farooq *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2011; de Farías Silva *et al.*, 2019). El reciclaje adicional de agua resultó en productividades más bajas y una mayor tendencia a la auto-floculación (datos no mostrados). Esta característica también podría contribuir a mejorar la rentabilidad del proceso debido a que para que sea posible la comercialización de biocombustibles basados en microalgas deberán ser desarrolladas tecnologías de cosecha más económicas. Estos resultados se corresponden por lo reportado por de Farías Silva *et al.* (2019) donde se informa que la biomasa de microalgas rica en carbohidratos (estrés por deficiencia de N) incrementa su velocidad de sedimentación unas diez veces con respecto a las condiciones control (suficiencia de N).

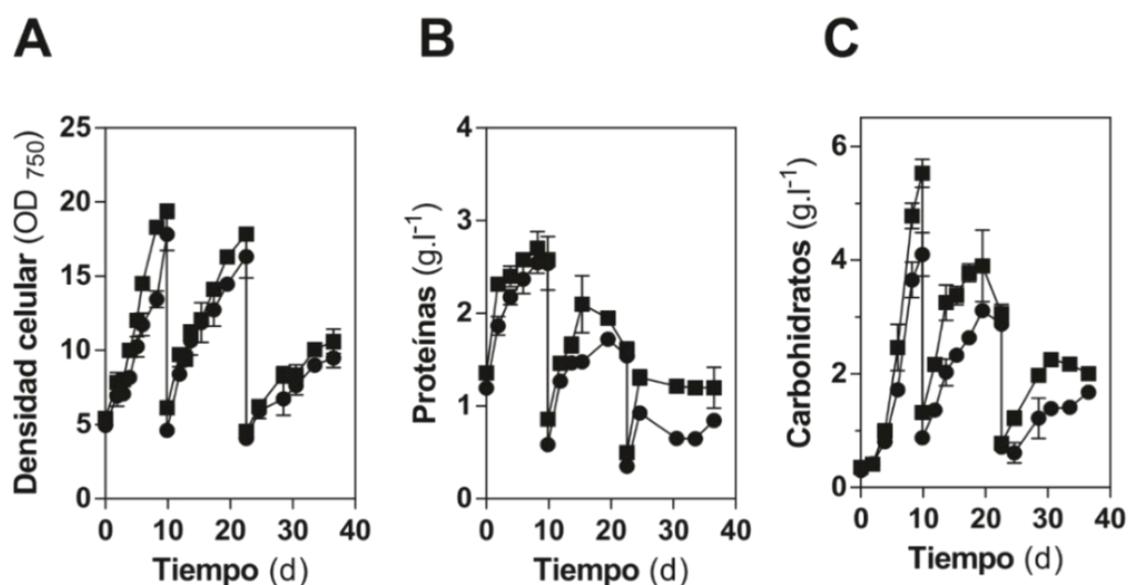


Figura 32. Cultivos semicontinuos de *Desmodesmus* sp. cepa FG bajo el modo de vida mixotrófico a expensas del extracto de *Nostoc* libre de células. (A-C) Evolución temporal de la densidad celular (OD₇₅₀) (A), acumulación de proteínas o (B) carbohidratos (C). (●) Medio BG11₀ conteniendo NaNO₃ 8 mM (control positivo); o (■) N 8 mM de extracto proteico de *Nostoc* como única fuente de nutrientes. Cada set de datos representa la media y error de dos experimentos independientes.

Se simuló la productividad de la microalga a expensas del fertilizante orgánico a base de *Nostoc* en fotobiorreactores ambientales, que imitan las condiciones de estanques abiertos. De acuerdo con esa productividad y la eficiencia de conversión de biomasa a etanol demostrada y optimizada en el capítulo I (0,25 g de etanol . g de biomasa⁻¹), este sistema de cultivo podría producir, bajo las condiciones ambientales del sudeste de la provincia de Buenos Aires, entre 7.600 y 10.800 L de etanol. ha⁻¹. año⁻¹, dependiendo de si *Nostoc* se cultiva en estanques al aire libre o en fotobiorreactores tubulares,

respectivamente. Estos cálculos preliminares sugerirían que este tipo de plataformas de producción podrían representar una materia prima alternativa interesante frente a las de grano o rastrojo de maíz para la producción de bioetanol de primera o segunda generación, respectivamente, con productividades típicas de 3.680 o 1.594 L de etanol. ha⁻¹. año⁻¹, respectivamente (Pimentel & Patzek, 2005; Karlen *et al.*, 2011).

5.2.4. Análisis de toxicidad de *Nostoc sp. cepa M2*

Dado que algunas cepas de cianobacterias producen toxinas (Carmichael, 1992 y 1997), se investigó esta característica en *Nostoc sp. cepa M2*. Se analizó la posible producción de microcistinas a partir del medio de cultivo de la cepa M2 y se utilizaron como control positivo los medios de cultivo libres de células de las cepas toxígenas *Microcystis aeruginosa* y *Planktothrix agardii*. Los valores determinados de microcistinas totales fueron menores a 0,5 µg.L⁻¹ en comparación con los valores observados de 1,0-2,5 y 0,5-1,0 µg.L⁻¹ para las cepas productoras *Microcystis aeruginosa* y *Planktothrix agardii*, respectivamente (Tabla 9). También fueron negativos los ensayos de estas toxinas en extractos concentrados, libres de células, de la cepa M2.

Adicionalmente, se analizó por PCR la presencia del gen *mycA* (integrante del operón involucrado en la síntesis de microcistinas), como marcador de la capacidad de sintetizar toxinas (Figura 33). Esos resultados también fueron negativos y contribuyen a la presunción de inocuidad de esta cepa, al menos para una de las toxinas más comunes entre las cianobacterias.

Tabla 9. Test semicuantitativo para microcistinas

| Cepa | Equivalentes de microcistina total (µg.L ⁻¹) |
|---|--|
| <i>Microcystis aeruginosa</i> (“spent-medium”) | 1,0-2,5 |
| <i>Planktothrix agardii</i> (“spent-medium”) | 0,5-1,0 |
| <i>Nostoc sp. cepa M2</i> (“spent-medium”) | < 0,5 |
| <i>Nostoc sp. cepa M2</i> (extracto libre de células) | < 0,5 |

Los ensayos se realizaron de acuerdo a recomendaciones del fabricante (Zeu-Inmunotec, S. L. (Zaragoza, España)). *Microcystis aeruginosa* y *Planktothrix agardii* fueron obtenidas a partir de la colección de cianobacterias de la Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA).

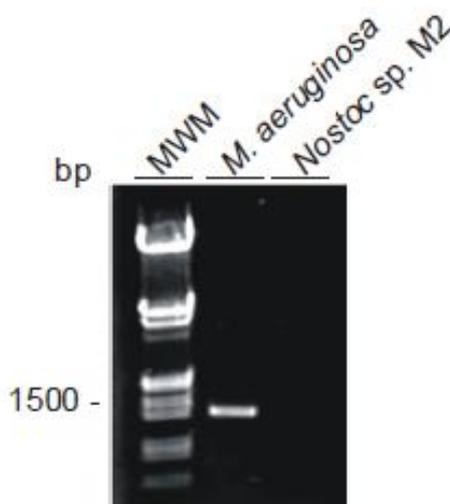


Figura 33. Análisis por PCR del gen *mycA* involucrado en la biosíntesis de microcistinas en *Nostoc* sp. cepa M2. El análisis fue llevado a cabo usando cebadores para *mycA*, MSF-MSF, para un amplicón esperado de 1.300 pares de bases.

Debido a que el método de detección utiliza el compuesto diana biológico sobre el que actúa esta toxina (en este caso la fosfatasa PP2A), los resultados son un indicador del potencial toxígeno de la molécula, es decir, que su detección es proporcional a su toxicidad y no a sus propiedades estructurales (Smienk *et al.*, 2007). El análisis de toxicidad de la cepa nativa aislada, *Nostoc* sp. cepa M2, indicó que no sería productora de microcistina, como lo es la cianobacteria *Nostoc* sp. CENA88, filogenéticamente muy relacionada (Tabla 9 y Figura 33). La producción de microcistina parecería ser polifilética en cianobacterias, ya que las cepas productoras y no productoras normalmente están agrupadas en filogenias de RNA (Genuário *et al.*, 2010).

5.2.5. Aislamiento de productos de alto valor agregado

La economía de los biocombustibles a base de microalgas mejoraría en gran medida si se obtuvieran múltiples productos y productos de mayor valor agregado (Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013), incrementando significativamente la rentabilidad del proceso. Exploramos esta opción tomando ventaja del particular alto contenido de ficobiliproteínas (FBPs), especialmente R-ficoeritrina (R-FE), en la biomasa de *Nostoc* sp. cepa M2 y mostramos protocolos de purificación simples, a diferentes grados de pureza (Figuras 35 y 36). Las FBPs, FE, FC y alo-ficocianina (AFC) de la biomasa de cianobacterias son un ejemplo principal de productos de alto valor agregado. Las FBPs

son las principales cromoproteínas cosechadoras de luz en cianobacterias y permiten la absorción de luz de un amplio rango de longitudes de onda. Estas proteínas son usualmente abundantes en cianobacterias y sirven a su vez como fuente de N (Watanabe & Masahiko, 2013). Las FBPs son usadas como colorantes, naturales y biodegradables, en alimentos, maquillajes, productos para la salud, farmacéuticos, textiles, detergentes y fuentes decorativas. Las FBPs altamente purificadas son usadas como sondas fluorescentes de muy alto valor para investigación y diagnóstico, a precios que ascienden a 30.000 U\$\$.g⁻¹ (Sekar & Chandramohan, 2008). Además, los efectos antioxidantes, anti-tumorales, anti-virales, anti-inflamatorios, neuro y hepato-protectores de las FBPs (entre otros), amplían el espectro de otros posibles usos alternativos (Watanabe & Masahiko, 2013).

5.2.5.1. Purificación de R-FE de *Nostoc* sp. cepa M2

La R-FE tiene un máximo de absorción a 565 nm y picos adicionales de absorción a 280, 310, 375 y 545 nm. Las preparaciones altamente purificadas de R-FE de cianobacterias tienen una relación $A_{565}:A_{280} \geq 4,25$. Los extractos libres de células de *Nostoc* sp. cepa M2 presentan una relación $A_{565}:A_{280} = 0,5-1,3$; la cual tiende a incrementar cuando las células fueron cultivadas en bajas intensidades lumínicas y especialmente bajo luz verde. Con las condiciones citadas anteriormente el incremento en R-FE fue acompañado con un decrecimiento en la absorción de luz a 620 nm que caracteriza a la ficocianina (FC) (Figura 34). Este fenómeno de adaptación fotocromática en cianobacterias es conocido hace décadas (Bennett & Bogorad, 2011).

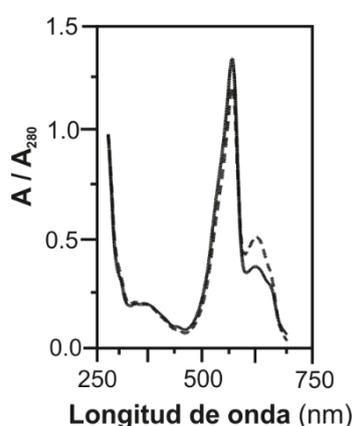


Figura 34. Efecto del espectro lumínico sobre la composición de los ficobilisomas de *Nostoc* sp. cepa M2. Espectro UV-visible normalizado (A/A_{280}) a partir de extractos libres de células. Las células fueron cultivadas bajo luz blanca (---) o verde (—).

Se purificó la R-FE a partir de extractos libres de células de *Nostoc* sp. cepa M2 hasta obtener una relación $A_{565}:A_{280}$ de 5,3 (Figuras 36 A-B) sugiriendo que su abundancia en los extractos libres de células de *Nostoc* cepa M2 estaría en el rango de 10-25 % de las proteínas totales solubles. La débil unión de la R-FE a columnas de DEAE-Sephacel a pH 7,0 permitió una purificación muy rápida y simple para obtener preparaciones de R-FE con un 75 % de pureza (proporción $A_{565}:A_{280}$ de 3,8). Una segunda etapa de purificación utilizando cromatografía en columnas de Sepharose 6B permitió obtener preparaciones de R-FE electroforéticamente homogéneas, aparentemente de un alto grado de pureza (Figura 36). La R-FE de *Nostoc* sp. cepa M2 está compuesta de polipéptidos con pesos moleculares de alrededor de 15 kDa. Como se muestra en la Figura 35 C, la R-FE purificada de *Nostoc* presentó un máximo de emisión de fluorescencia a 575 nm cuando fue excitada a 488 nm. Ésta es una característica de la R-FE purificada a partir de una amplia variedad de fuentes (Bryant, 1982).

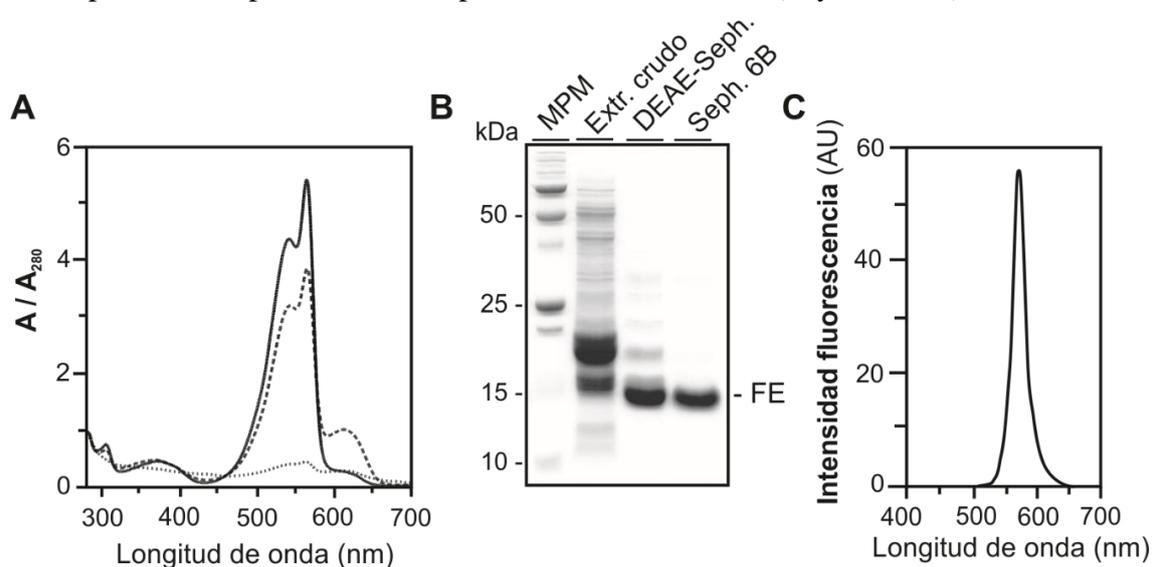


Figura 35. Purificación de R-FE a partir de extractos de *Nostoc* sp. cepa M2. (A) Espectros de absorción de luz UV-visible normalizados (A/A_{280}) de diferentes grados de purificación de la R-FE de *Nostoc* sp. cepa M2: (•••••) extractos crudos; (- - -) conjunto de fracciones de la columna DEAE-Sephacel; (—) fracciones de la columna Sepharose 6B. (B) Análisis de la purificación de la R-FE de *Nostoc* sp. cepa M2 mediante SDS-PAGE. El marcador de peso molecular fue la proteína dual color Precision Plus Protein™ y las muestras fueron 10 μ g de extracto crudo; o 2,5 μ g de las fracciones de las columnas DEAE-Sephacel o Sepharose 6B. (C) Espectros de emisión de fluorescencia de la R-FE purificada de *Nostoc* sp. cepa M2 excitada a 488 nm.



Figura 36. Purificación de FBPs a partir de extractos de *Nostoc* sp. cepa M2. (A) Imagen de FE (izquierda) y FC (derecha) purificadas por columnas de Sepharose 6 B y concentradas por precipitación con sulfato de amonio.

Se propone un protocolo simplificado para la extracción y preparación de diferentes grados (de acuerdo al nivel de purificación) de proteínas de alto valor agregado tales como las FBPs, minimizando la necesidad de infraestructura y equipamientos costosos para una fracción relativamente pequeña de biomasa de *Nostoc*, que de lo contrario se utilizaría únicamente como fertilizante nitrogenado de alta calidad (Figuras 35 y 36).

5.3. CONCLUSIONES

La cepa *Nostoc* sp. M2 posee propiedades potencialmente útiles para aplicar en biotecnología algal. Presenta un rápido crecimiento diazotrófico, con tiempos de duplicación de alrededor de 2 días y alcanza una alta densidad celular, aproximadamente 2 g PS.L⁻¹, tanto en condiciones de laboratorio como a la intemperie. Presenta propiedades que favorecen la cosecha en poco tiempo y a bajo costo. Posee un alto contenido proteico, 45-60 % de la biomasa y permite la preparación de extractos ricos en proteínas con un alto contenido de N (50-200 mM) sin gran demanda metodológica ni energética. Los extractos de *Nostoc* libre de células poseen una buena calidad nutricional como fuente completa de nutrientes. La forma de cultivo que se propone en este trabajo permitió una canalización eficiente del N₂ desde el aire hacia la biomasa de microalgas, mediante el proceso natural de FBN, así como también el reciclado de otros nutrientes, ya asimilados en la biomasa de la cianobacteria. Se utilizó la FBN como una entrada constante de N, y no fueron necesarios productos químicos ni pretratamientos del extracto proteico libre de células de *Nostoc* debido a que las

microalgas lo utilizaron eficientemente, aún como fuente completa de nutrientes. Por lo tanto, el fertilizante nitrogenado sintético pudo ser reemplazado por el N_2 del aire. Adicionalmente, se demuestra la posibilidad de obtención de FBPs de alto valor agregado y la inocuidad aparente de los extractos.



CAPÍTULO III

CAPÍTULO III**PLATAFORMA SEMI-CERRADA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y
BIORREFINERÍA: VALORIZACIÓN DE LA VINAZA Y RECICLADO DE
REACTIVOS EN NUTRIENTES****6.1. INTRODUCCIÓN**

La vinaza es la fracción líquida remanente después de la fermentación y destilación del etanol y normalmente se produce a volúmenes 20 veces superiores con respecto al etanol acumulado en el caldo de fermentación (5 % (v/v) de etanol). Generalmente posee un color marrón oscuro con un alto contenido orgánico y es de carácter ácido (pH 3,5-5,0). Por lo tanto, el tratamiento de la vinaza de fermentación, previo a la disposición final, y/o su eventual aprovechamiento para otras aplicaciones, es parte integral de la producción industrial del etanol (Christofolletti *et al.*, 2013).

Las vinazas de caña de azúcar o de la remolacha azucarera se han utilizado principalmente como fertilizantes líquidos para cultivos, reduciendo la necesidad de agua de riego para el crecimiento de las plantas (ferti-irrigación) o como aditivo para alimentación animal (Moraes *et al.*, 2017; de Farias Silva *et al.*, 2019). Sin embargo, la ferti-irrigación a largo plazo a menudo produce efectos negativos en el suelo y en las aguas subterráneas. La vinaza de caña de azúcar puede proporcionar la mayoría de los requerimientos de K, P y otros minerales (Moran Salazar *et al.*, 2016), pero es generalmente deficiente en N, conteniendo formas de N insolubles en ácido, que tienden a promover la acumulación de minerales, conteniendo K^+ y Ca^{+2} principalmente, hasta niveles perjudiciales para el medio ambiente (Rodrigues Reis & Hu, 2017). Además, el bajo pH, el alto contenido orgánico, y algunas sustancias presentes en la vinaza pueden producir efectos adversos a largo plazo en suelos agrícolas, ríos, lagos y la biota en general.

Se han propuesto algunas alternativas, además de la ferti-irrigación, para reciclar y valorizar la vinaza, tal como el reciclado de la misma en la fermentación, la concentración por evaporación, la producción de energía (biogás) o levaduras (Christofolletti *et al.*, 2013). También se ha demostrado, por ejemplo, que se pueden cultivar algunas microalgas a expensas de los nutrientes de la vinaza (Santana *et al.*, 2017), especialmente en cultivos en medio líquido, que a diferencia de la agricultura tradicional, conservan y reciclan tanto el agua como los nutrientes (National Research

Council of the National Academies, 2013), lo que podría generar altos rendimientos de productos químicos de valor agregado.

Los nutrientes, especialmente C, N y P, se deben suministrar a tasas apropiadas para alcanzar máxima productividad de biomasa algal. Un suplemento de CO₂ concentrado, mejora la eficiencia de uso de N y P, aumentando la productividad de la biomasa (National Research Council of the National Academies, 2013).

La principal fuente de CO₂ para el cultivo masivo de microalgas es el gas de combustión de diferentes industrias. El fertilizante nitrogenado puede ser sintético y/o provenir de aguas residuales, del reciclado de nutrientes y/o de la FBN del aire. Este último aspecto ha sido específicamente tratado en el capítulo anterior y representa una de las principales contribuciones científico/tecnológicas de esta Tesis Doctoral.

Luego del C y el N, el siguiente macronutriente más requerido es el P, con una demanda 5-10 veces menor que la del N. Sin embargo, con la tasa actual de extracción de P, para el cultivo en suelos agrícolas, sus reservas podrían ser agotadas en los próximos 50-100 años. La producción a gran escala de biocombustibles podría reducir este período de tiempo (Cordell *et al.*, 2009; Peccia *et al.*, 2013; Canter *et al.*, 2015).

Los fertilizantes de fosforados se producen industrialmente a partir de rocas o sedimentos (mediante la acción de distintos ácidos), cuyas reservas se distribuyen de manera desigual entre las regiones, siendo de esta manera, altamente susceptibles al agotamiento (Cordell *et al.*, 2009; Simons *et al.*, 2013). El 80 % del P se obtiene, a nivel mundial, de la explotación de rocas fosfóricas, cuyo principal componente es la apatita, un fosfato de calcio (por lo que también es fuente de calcio). Los yacimientos más productivos se encuentran en el norte de África, Australia, Brasil, Estados Unidos, Canadá, China, Kazajistán y Nueva Zelanda. En Argentina, los yacimientos de estas rocas (alrededor de una docena) poseen bajo contenido de P y debido al pequeño tamaño de los mismos, no es posible una explotación económica viable (Herrman, 2018).

La roca fosfórica también suele utilizarse en forma directa, como una fuente de P de bajo rendimiento, principalmente por la baja solubilidad de las sales cálcicas del fósforo. Otra alternativa, consiste en el uso de harina de hueso o de carne y hueso, que presenta la ventaja de ser un recurso renovable, pero comparte la desventaja de su baja solubilidad, para su uso directo (Heuer *et al.*, 2017).

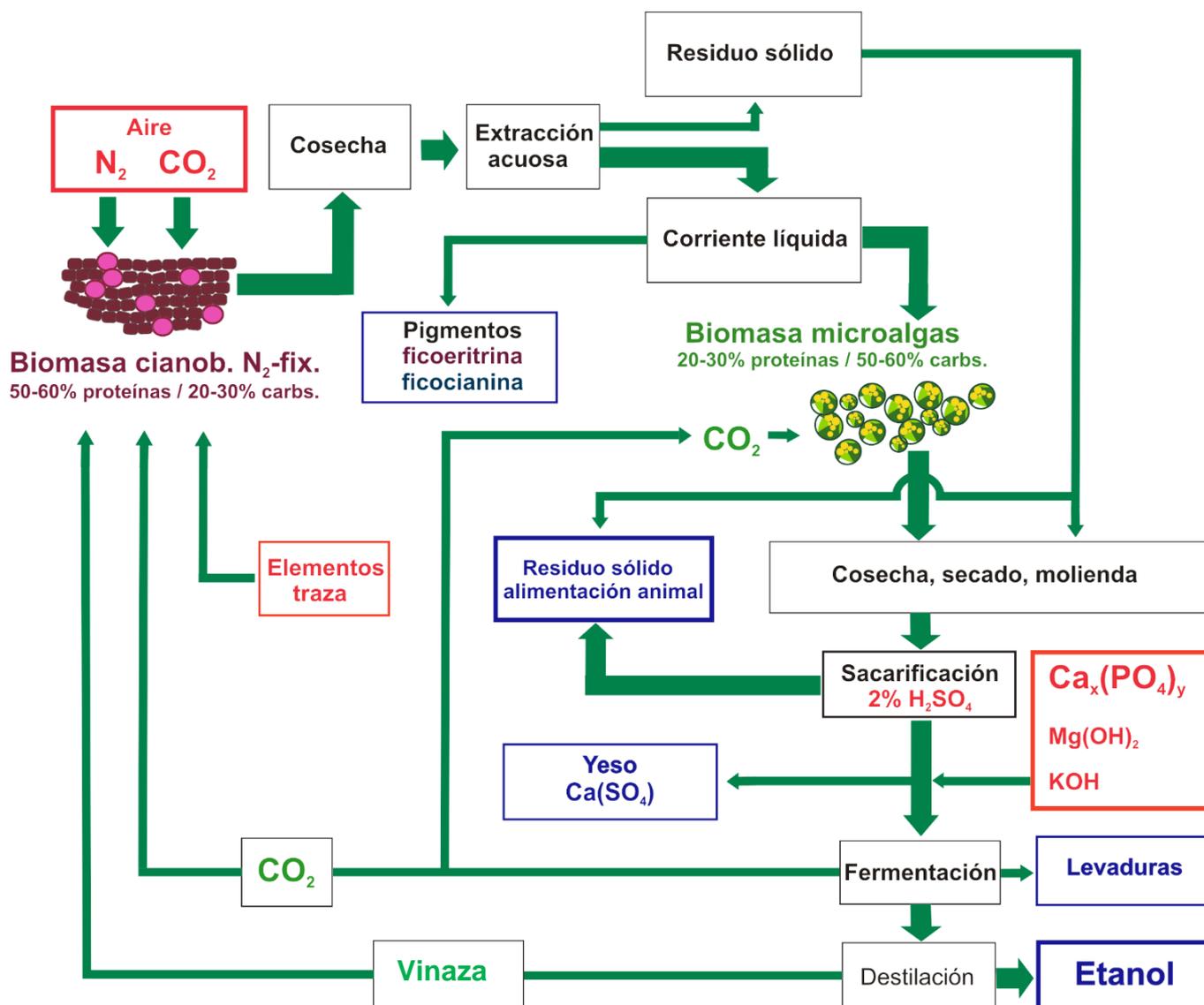
De esta manera, sería conveniente la recuperación del P de la harina de huesos que es un producto renovable (o desperdicio) de la industria alimentaria cuya producción está acompañada de la demanda de alimentos a nivel mundial.

El objetivo de este capítulo fue el tratamiento y valorización de la vinaza y demás reactivos utilizados en la conversión de la biomasa de microalgas en alcohol. Se optimizaron alternativas para el tratamiento del residuo del H_2SO_4 utilizado para la sacarificación de la biomasa y su aprovechamiento y co-valorización para la obtención de H_3PO_4 como fertilizante fosforado de óptima calidad a partir de harina de hueso.

6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1. *Diseño de una plataforma semi-cerrada de producción de biomasa algal para la obtención de etanol y suplementos nutricionales*

El Esquema 1 muestra el diseño conceptual de un proceso consolidado para la producción de biomasa de una cianobacteria que utiliza el N_2 de aire como única fuente de N y la preparación de un fertilizante orgánico nitrogenado para el cultivo de microalgas oleaginosas o hiper-acumuladoras de azúcares fermentables (Capítulo II) y la sacarificación y conversión de esta biomasa en etanol por fermentación con levaduras (Capítulo I). Aquí, se planteó la posibilidad del aprovechamiento secundario del H_2SO_4 utilizado en la sacarificación de la biomasa para la valorización de la vinaza de fermentación por medio de la solubilización del P a partir de harina de huesos y la producción de yeso. Finalmente, la vinaza de fermentación, convenientemente valorizada podría ser utilizada como fuente de nutrientes para el cultivo de la cianobacteria fijadora de N_2 , para el primer paso del proceso. En este Capítulo se validaron experimentalmente y se optimizaron las condiciones para cada operación unitaria del proceso.



Esquema 1. Diseño simplificado de una plataforma de producción de biomasa de ciclo semi-cerrado y biorrefinería de la biomasa, para la producción de etanol y suplementos para alimentación animal, a partir del CO_2 y N_2 del aire y del P de recursos renovables. Las principales corrientes hacia el etanol y alimentos se indican con flechas más gruesas. Las entradas principales están marcadas con rojo, las salidas principales en azul y las operaciones en negro. Las flechas estrechas generalmente indican el reciclado de reactivos en nutrientes o la producción de productos secundarios. El H_2SO_4 integra la sacarificación de la biomasa de microalgas y la recuperación del P de recursos renovables y se demuestra la recuperación de pigmentos proteicos (R-ficoeritrina).

6.2.2. Aprovechamiento de la corriente sólida de la sacarificación de biomasa algal para su uso como suplemento para alimentación animal

Con el objetivo de evaluar si la fracción remanente de la biomasa algal, que permanece insoluble luego del proceso de sacarificación, posee algún potencial biotecnológico, se realizó un análisis de su composición bioquímica.

La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos de las determinaciones de la composición porcentual de materia orgánica, ceniza, proteínas, lípidos y carbohidratos totales de la fracción sólida de la sacarificación, en comparación con la biomasa completa de *Desmodesmus* sp. cepa FG. Tal como se esperaba, esta fracción insoluble prácticamente no contiene hidratos de carbono. En cambio se enriqueció en proteínas y lípidos. Mientras que en el insoluble permanecieron el 50 % de las proteínas totales, pueden observarse valores cercanos al 100 % con respecto a los lípidos (Tabla 10).

La composición de esta fracción sugiere un buen suplemento para forrajes (Guaita, 2014), para incrementar el contenido proteico y lipídico de las dietas para animales de cría. Se requieren estudios adicionales tal como refiere Gong *et al.* (2018), para evaluar el valor nutricional real, la digestibilidad, la palatabilidad y la toxicidad potencial para confirmar el potencial de esta fracción en producción animal.

Tabla 10. Análisis comparativo de la composición de la fracción sólida de la sacarificación en relación a la biomasa completa.

| Determinaciones | Fracción sólida de la sacarificación ^a | Biomasa completa ^b |
|-------------------------------------|---|-------------------------------|
| Materia orgánica (% p/p) | 86,4 ± 3,1 | 81,4 |
| Ceniza (% p/p) | 15,6 ± 0,6 | 18,6 |
| Proteínas brutas (% p/p) | 10,4 ± 2,1 | 10,8 |
| Lípidos brutos (% p/p) ^c | 43,4 ± 3,4 | 4,5 |
| Carbohidratos (% p/p) ^d | 0,4 ± 0,4 | 11,3 |

^aMedia y error de dos preparaciones independientes. ^bDeterminaciones únicas. ^cExtracto etéreo. ^dCarbohidratos solubles en agua.

6.2.3. *Uso de la vinaza de fermentación como fuente de nutrientes*6.2.3.1. *Preparación de la vinaza*

Con el objetivo de obtener la vinaza algal se procedió a evaporar la mayor parte del etanol (Figura 37) acumulado en el medio de cultivo, posterior a la sacarificación y fermentación de la biomasa de microalgas (*Desmodesmus* sp. cepa FG). Cuando la sacarificación se llevó a cabo con un 10 % (p/v) de sólidos algales, la vinaza obtenida representó un volumen de 40 veces mayor que el contenido de etanol. En cambio, cuando la sacarificación se realizó sobre un 20 % (p/v) de sólidos, la vinaza representó un volumen 20 veces mayor que el etanol acumulado.

Para optimizar las condiciones de evaporación del etanol se simularon las condiciones de destilación para la recuperación del mismo, a una temperatura de 78-80°C. Se incubaron distintas concentraciones de etanol de grado analítico (1, 2 y 4 % (v/v)) (Figura 37 A) y se tomaron alícuotas a las 2 h para proceder a su cuantificación y estos resultados fueron comparados con los obtenidos en la evaporación del etanol acumulado (aproximadamente 2,5 % (p/v)) por fermentación de un 5 % de carbohidratos algales (Figura 37 B).

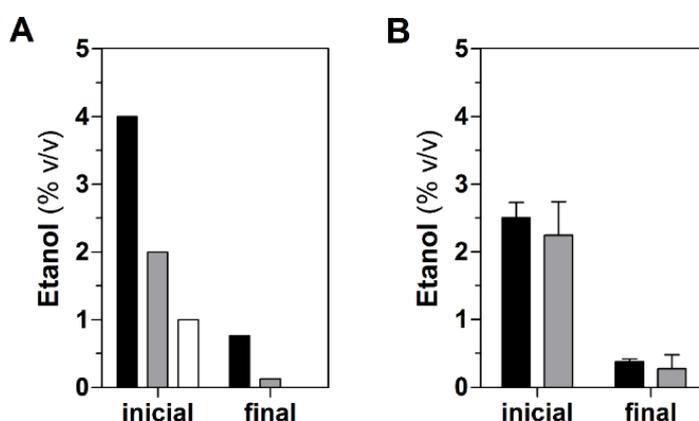


Figura 37. Condiciones de evaporación del etanol luego de la fermentación a 78-80 °C. (A) Evaporación de 4 % (barras negras), 2 % (barras grises) o 1 % (barras blancas) de etanol de grado analítico. (B) Evaporación del etanol acumulado mediante fermentación de biomasa de microalgas sacarificadas (barras negras) o de un medio de cultivo control (YPD) (barras grises). Los datos representan la media y error estándar de dos experimentos independientes.

En la Figura 37 puede observarse que 2 h de tratamiento a 80 °C, fueron suficientes para una remoción cercana al 100 % (99,7 y 93,7%) del contenido de etanol, a una concentración inicial de 1 y 2 %, respectivamente, mientras que para concentraciones mayores (4 %) la remoción fue del 81,0 %, quedando aproximadamente un 1 % de

etanol remanente (Figura 37 A). La evaporación de etanol al $2,5 \pm 0,2$ o $2,2 \pm 0,5\%$, proveniente de la fermentación de 10 % de sólidos de biomasa algal sacarificada (conteniendo 5 % (p/v) de carbohidratos) o del medio de cultivo YPD, fue del $84,4 \pm 3,1$ y $84,8 \pm 12,6$ %, respectivamente (Figura 37 B).

6.2.3.2. *Calidad nutricional de la vinaza como fuente de N y P para el cultivo de microalgas*

Se cuantificó el contenido de carbohidratos y proteínas de la vinaza y los resultados indicaron que contiene cantidades mínimas de carbohidratos (ya que fueron consumidos en la fermentación quedando un remanente de 0,16 % de carbohidratos totales. Además, contiene cantidades muy bajas de proteína.

Para analizar la calidad nutricional de la vinaza se ensayó el crecimiento de *Desmodesmus* sp. cepa FG en experimentos cualitativos con distintos tratamientos, conteniendo diferentes diluciones de la vinaza. Se cultivó la cepa FG con una dilución 1:10 de la vinaza observándose proliferación celular cuando el medio de cultivo fue suplementado con una fuente de N combinada y con una fuente de N combinada más la adición de una fuente de P. A los 10 días se observó un ΔOD_{750nm} , de 4,55 y 5,35; respectivamente. Esta proliferación es comparable con la obtenida en el medio de cultivo de referencia.

Debido a que se observó crecimiento de la microalga en ausencia de una fuente de P agregada, y para poder discernir de donde proviene esta fuente, se realizó el mismo experimento, pero utilizando como inóculo a la misma microalga que fuera cultivada durante 10 días con vinaza, en ausencia de P (cultivo en el cual ya se habrían agotado sus reservas internas). Cuando fue inoculada en cultivos en ausencia de fuente de P, pero en presencia de N, se observó crecimiento, indicando que el mismo estuvo sostenido por el contenido de P de la vinaza y no por reservas de P internas.

Por otro lado, a mayores concentraciones (1:3), la vinaza afectó el desarrollo de la microalga, presentando síntomas de inhibición del crecimiento, aún en presencia de las fuentes de N y P agregadas al medio de cultivo.

De estos resultados se concluyó que la vinaza de fermentación de biomasa de *Desmodesmus* sp. cepa FG, contiene un complemento de macronutrientes completo, para el cultivo de la misma microalga, con excepción de una fuente biodisponible de N, y en menor medida de P.

6.2.4. Análisis de la deficiencia de P en cultivos diazotróficos de *Nostoc* sp. cepa M2

Los resultados anteriores sugirieron que la vinaza de fermentación de biomasa de *Desmodesmus* sp. cepa FG podría reciclarse para cultivar *Nostoc* que fija N₂ del aire. Para evaluar esta posibilidad, se estudiaron los requerimientos de P de esta cepa (Figura 38).

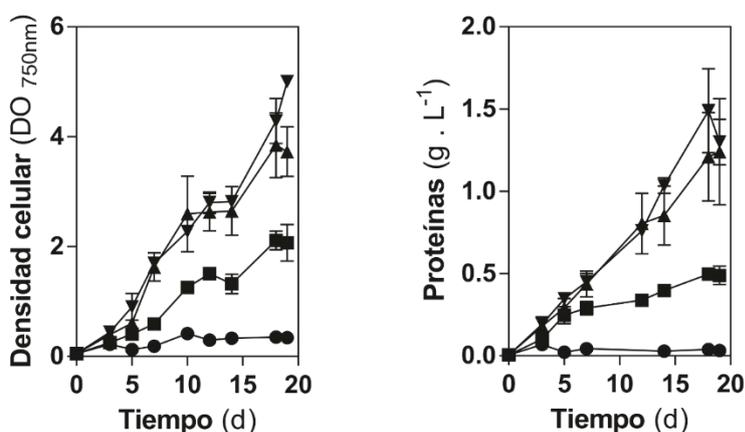


Figura 38. Efecto de la deficiencia de P en el crecimiento y acumulación de proteínas de *Nostoc* sp. cepa M2. (●) Deficiencia total de P, (■) deficiencia del 90 % de P, (▲) BG11₀ completo y (▼) suplemento del doble de P. Los datos representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes.

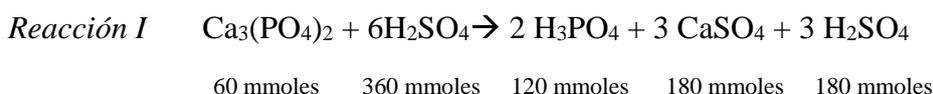
La Figura 38 muestra el análisis del crecimiento en condiciones diazotróficas (medio de cultivo BG11₀) y de la acumulación de proteínas de *Nostoc* sp. cepa M2 con distintos niveles de deficiencia de P en 20 días de crecimiento. Como puede observarse, *Nostoc* no crece en ausencia total de P (DO_{750} $0,3 \pm 0,0$), y con una deficiencia del 90 % de P (en relación al medio de cultivo de referencia BG11₀) presentó rendimientos de biomasa cercanos al 50% (DO_{750} $2,0 \pm 0,3$) con respecto a los valores de referencia del medio de cultivo (DO_{750} $3,7 \pm 0,4$). Cuando la cepa se cultivó con el doble de P del utilizado como referencia, no hubo cambios en la acumulación de la biomasa (DO_{750} $5,0 \pm 3,0$) (Figura 38 A).

6.2.5. Aprovechamiento de la corriente líquida de la sacarificación de biomasa algal para la solubilización de P proveniente de recursos naturales renovables

Con el doble propósito de reciclar la vinaza y enriquecerla en P proveniente de fuentes de bajo costo, aplicamos conceptos de ecología industrial para reciclar y aprovechar el ácido sulfúrico utilizado durante la sacarificación de la biomasa de microalgas. Se hizo reaccionar 360 mmoles de H₂SO₄ (2 % H₂SO₄ en la sacarificación de la biomasa) con

60 mmoles de P en forma de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ o harina de huesos para producir 120 mmoles de H_3PO_4 y 180 mmoles de CaSO_4 en 1 L de reacción (*Reacción I*). El yeso (CaSO_4), muy insoluble en agua, se separó por sedimentación/centrifugación.

Según la estequiometría de la reacción, al reaccionar 60 mmoles de la fuente de P con 360 mmoles de H_2SO_4 , se producirían 120 mmoles de H_3PO_4 quedando un remanente de 180 mmoles de H_2SO_4 , en un volumen de 1L. Ambos ácidos contribuyen a mantener el pH del medio en 0,5.



Para poder establecer un protocolo optimizado de las condiciones de solubilización del P de la roca fosfórica, se hizo reaccionar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en distintas proporciones, con H_2O , H_2SO_4 y HCl.

Tabla 11. Análisis del tratamiento de solubilización del P de la roca fosfórica.

| Tratamiento a 80°C | | H_3PO_4 (mmoles.L ⁻¹) | |
|-----------------------------|---------------------------------------|---|-------|
| | | ½ h | 4 h |
| H_2SO_4 2 % | 1:2 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 285,8 | ND |
| | 1:1 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 151,0 | 163,3 |
| | 1:0,5 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 78,6 | 81,4 |
| HCl 4 % | HCl 4%:1 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 160,6 | ND |
| H_2O | 1:2 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 0,1 | ND |
| | 1:1 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 0,1 | ND |
| | 1:0,5 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 0,08 | ND |

El $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ fue tratado con 2% de ácido sulfúrico, 4 % de ácido clorhídrico y agua, a distintos tiempos, y a una temperatura de incubación de 80 °C.

Los resultados indican que la solubilización de P con H_2SO_4 al 2 % (v/v) es proporcional a la concentración de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, observándose una solubilización total en todas sus concentraciones (1:0,5; 1:1 y 2:1), determinando que la fuente de P es el reactivo limitante de la reacción. El tratamiento a 80 °C durante 30 min fue suficiente para solubilizar el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Se evidenció la solubilización total del $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en HCl al 4% (v/v) y no hubo indicios de solubilización en agua (Tabla 11).

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de solubilización del P proveniente de distintas fuentes, se llevó a cabo la *reacción I* a distintos tiempos y temperaturas (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis del tratamiento de solubilización de P de distintas fuentes de bajo costo, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ y harina de huesos.

| Tratamiento | T amb (1 h) | 100 °C (10 min) |
|---------------------------------------|--|------------------|
| Fuente de P | H_3PO_4 formado (mmoles.L^{-1}) | |
| $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | $117,6 \pm 0,3$ | $124,5 \pm 0,3$ |
| $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ | $248,7 \pm 19,2$ | $274,0 \pm 17,0$ |
| Harina de huesos | $59,8 \pm 0,3$ | $87,0 \pm 4,8$ |

Las distintas fuentes de P fueron tratadas con H_2SO_4 al 2 % a distintos tiempos y temperaturas de incubación.

La Tabla 12 muestra los resultados de la solubilización de P de las distintas fuentes, determinada mediante la cuantificación del H_3PO_4 formado a partir del H_2SO_4 ($360 \text{ mmoles.L}^{-1}$) y el P (60 mmoles.L^{-1}) de las distintas sales cálcicas. Según la estequiometría de la *reacción I*, el valor teórico esperado de H_3PO_4 es de $120 \text{ mmoles.L}^{-1}$ y, cómo puede observarse, el rendimiento fue óptimo en presencia de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, tanto con un tratamiento de 1 h a temperatura ambiente (H_3PO_4 $117,6 \pm 0,3 \text{ mmoles.L}^{-1}$) como con 10 min a 100°C (H_3PO_4 $124,5 \pm 0,34 \text{ mmoles.L}^{-1}$). La solubilización del P de la harina de huesos, varió según la temperatura del tratamiento, los valores a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) fueron de aproximadamente el 50 % del valor teórico (H_3PO_4 $59,8 \pm 0,3 \text{ mmoles.L}^{-1}$). La incubación a 100°C durante 2 h permitió una recuperación de $87,0 \pm 4,8 \text{ mmoles.L}^{-1}$ de H_3PO_4 , cercana al 75 % del valor máximo solubilizado en presencia de H_2SO_4 al 60 % (v/v) a 100°C ($110,0 \pm 10,0 \text{ mmoles.L}^{-1}$) (Tabla 11 y13).

Tabla 13. Análisis del tratamiento de solubilización de P proveniente de la harina de huesos.

| Tratamiento | 2 % H ₂ SO ₄ | 60 % H ₂ SO ₄ |
|-----------------------|--|-------------------------------------|
| Tiempo a 100 °C (min) | H ₃ PO ₄ formado (mmoles.L ⁻¹) | |
| 5 | ND | 115,0 ± 1,0 |
| 15 | ND | 116,7 ± 5,7 |
| 30 | ND | 110,6 ± 0,1 |
| 60 | ND | 105,6 ± 4,4 |
| 120 | 84,1 ± 1,8 | 110,0 ± 10,0 |

La harina de huesos fue tratada con ácido sulfúrico a distintas concentraciones y tiempos de incubación a 100 °C. ND: No determinado.

6.2.5.1. Alcalinización de los productos de reacción entre el H₂SO₄ y las sales cálcicas de P

El producto de la *reacción I* previamente optimizada presenta un pH de 0,5. Previo a los ensayos de fermentación, se alcalinizaron los productos de reacción con una solución de Mg(OH)₂ y KOH, hasta pH 4,5 (*reacción II*) para acondicionar estas preparaciones a las condiciones optimizadas de fermentación (Capítulo I, Figuras 16, 17 y 18).

En la Figura 39 se muestra la curva de titulación completa de la mezcla de ácidos (*reacción I*) con la mezcla de hidróxidos (*reacción II*).



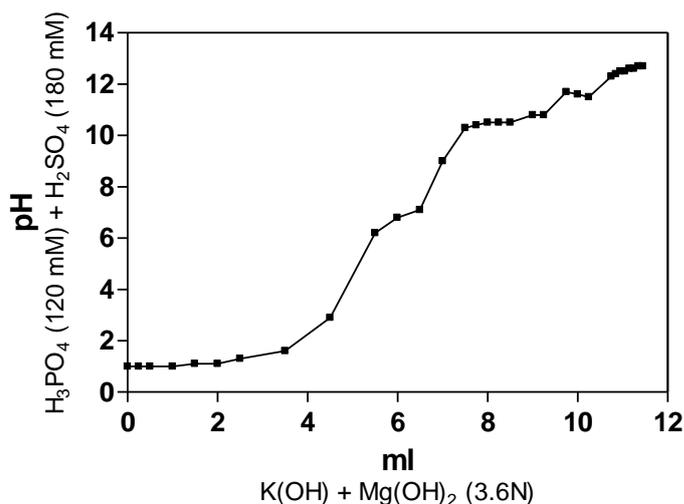


Figura 39. Curva de titulación completa de la mezcla de ácidos con la mezcla de hidróxidos. La especie química predominante al pH del primer punto de equivalencia (pH 4,5) es KH_2PO_4 , mientras que, en el segundo punto de equivalencia (pH 9,46) la especie dominante es K_2HPO_4 .

El KH_2PO_4 es la especie predominante en el primer punto de equivalencia a pH 4,5. Es una sal muy soluble en agua que se utiliza a menudo como fertilizante.

El MgSO_4 se produce por la neutralización del H_2SO_4 con $\text{Mg}(\text{OH})_2$ y podría representar una fuente de nutrientes, tal como se demostrará en la sección 6.2.5.2.

La estequiometría de las *reacciones I y II* fue calculada de tal manera que en el producto de la *reacción II*, las cantidades relativas fueran similares al medio de cultivo de referencia BG11₀, utilizado para el cultivo de cianobacterias y microalgas (Tabla 14).



Tabla 14. Concentración de S, P, K, y Mg en medio BG11₀ y el producto de la *Reacción II*

| Composición | Concentración BG11 ₀ (mg.L ⁻¹) | Concentración de productos de <i>reacción II</i> (mg.L ⁻¹) |
|-------------|---|--|
| S | 9,73 | 2.880,00 (295 X) ^a |
| P | 5,42 | 1.855,00 (342 X) |
| K | 13,68 | 4.041,80 (295 X) |
| Mg | 7,39 | 1.652,40 (223,5 X) |

^a295 X indica una concentración 295 veces mayor que en el medio BG11₀

En la Tabla 14 pueden observarse las concentraciones finales de los macronutrientes S, P, K y Mg de las sales solubles (KH₂PO₄ y MgSO₄) producidas en la *reacción II* con respecto a las sales del medio de cultivo de referencia BG11₀, tal y como se utilizan para el cultivo de microalgas.

Una vez optimizadas las *reacciones I y II* con reactivos puros, se procedió a preparar la vinaza de fermentación de biomasa de *Desmodesmus* sp. FG (Sección 6.2.5.2.), para obtener una vinaza enriquecida en P y conteniendo concentraciones balanceadas de P, S, K y Mg, según el medio de cultivo de referencia BG11₀.

La producción *in situ* de fertilizante fosforado sería económicamente ventajosa si pudiese sintetizarse a partir de recursos naturales que contienen Ca₃(PO₄)₂ o Ca₅(PO₄)₃(OH) como la roca fosfato o harina de hueso, respectivamente. El uso de roca de fosfato es factible en algunas regiones y / o contextos específicos. Sin embargo, ya que es un recurso natural finito y se encuentra distribuida de forma desigual por regiones geográficas, es más atractivo desde un punto de vista de economía circular y de sostenibilidad, la recuperación de P de la harina de hueso, subproducto renovable (o desecho) de la industria alimentaria y cuya producción está acompañada de la demanda de alimentos en todo el mundo. Por ejemplo, Etiopía ha producido aproximadamente 192.000 a 330.000 toneladas de desperdicios de huesos anualmente, que tendrían un rendimiento de alrededor de 28-58% del fertilizante fosforado anual del país y un ahorro de US\$ 50 a 104 millones de la importación de una cantidad equivalente de

fertilizante fosforado; sin embargo, esta estrategia aún no se ha explorado suficientemente (Simons *et al.*, 2013).

6.2.5.2. Análisis de la calidad nutricional de la vinaza algal suplementada con P para el cultivo diazotrófico de *Nostoc sp.* cepa M2

Se analizaron las propiedades fertilizantes de la vinaza suplementada con P, “vinaza-P”, tanto la que fuera preparada a partir de reactivos puros (vinaza sintética) como aquella obtenida por fermentación, y se analizó el crecimiento de *Nostoc sp.* cepa M2 con diferentes diluciones de la vinaza.

En experimentos cualitativos, la vinaza (sin suplemento de P durante la sacarificación), a una dilución 1:10, resultó tóxica para el cultivo diazotrófico de la cianobacteria *Nostoc sp.* cepa M2 observándose despigmentación de las células, aún con el agregado de la fuente de P al medio de cultivo (datos no mostrados).

Se evaluó el crecimiento de *Nostoc sp.* cepa M2 tanto con una dilución al 0,4 % (v/v) de la vinaza sintética (Figura 40) como con la vinaza real, obtenida después de la sacarificación de biomasa y suplementación con P de harina de huesos (Figura 41).

En la Figura 40 se observa el crecimiento de *Nostoc sp.* cepa M2 a expensas de una vinaza sintética, como única fuente de P, S, Mg y K. La vinaza se sintetizó según las reacciones I y II, a partir de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figura 40 A) o harina de huesos (Figura 40 B-C).

Se observó que la vinaza sintética sostuvo el crecimiento de la cepa a rendimientos equivalentes a los del medio de cultivo de referencia. Las densidades ópticas a 750 nm fueron de 1,7 y $1,6 \pm 0,1$; respectivamente (Figura 40 A). Como se esperaba, el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ no resultó una fuente de P metabolizable para la cianobacteria (DO_{750} $0,3 \pm 0,0$) (Figura 40 A). De la misma manera, *Nostoc* no aumentó su biomasa en ausencia simple de P (DO_{750} $0,3 \pm 0,0$) o S (DO_{750} $0,1 \pm 0,0$) o ausencia combinada de P y S (DO_{750} $0,1 \pm 0,0$) (Figura 40 A).

Por otra parte, al igual que la acumulación de biomasa, la acumulación de proteínas de los cultivos a expensas de la vinaza sintética fue similar con respecto al medio de cultivo de referencia. Los valores de concentración de las mismas fueron de 0,6 y $0,6 \pm 0,0$ g.L^{-1} , respectivamente. Las restantes condiciones de cultivo, en deficiencia de

fuentes de P y S afectaron severamente la acumulación de proteínas en la biomasa de *Nostoc*, demostrando valores de entre 0,02 y 0,06 g.L⁻¹ (datos no mostrados).

Resultados similares se obtuvieron con la vinaza sintética suplementada con P a partir de harina de huesos (Figura 40 B-C). Los rendimientos de proteínas obtenidos con vinaza sintética con harina de huesos solubilizada fueron cercanos a 1,0 g.L⁻¹ en 9 días (Figura 40 C). Ambas vinazas representan un medio de cultivo mejorado para la cianobacteria, en comparación con el medio de referencia BG11₀.

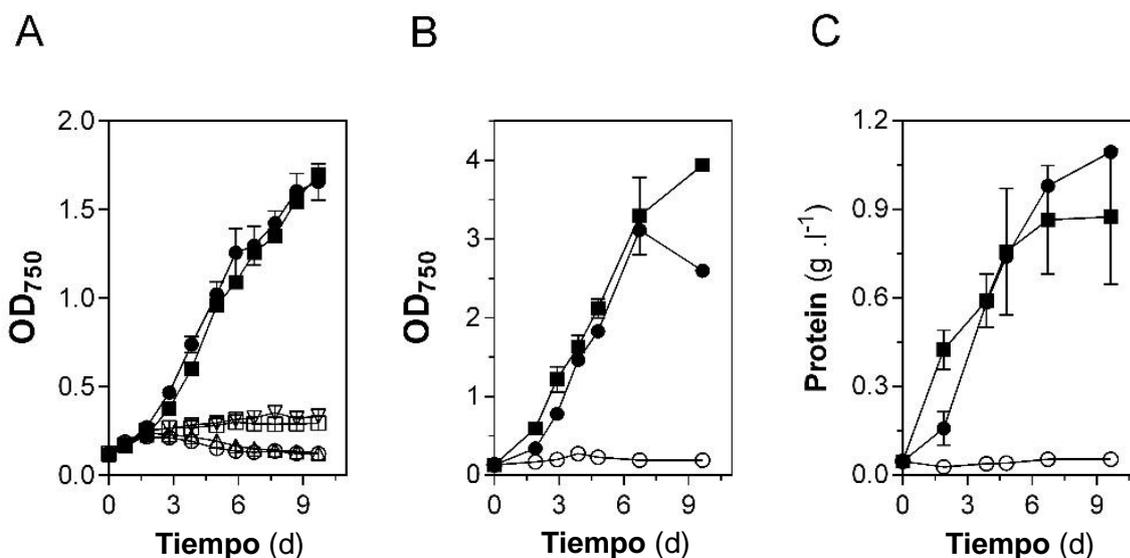


Figura 40. Valorización de la vinaza suplementada con fuentes económicas de P como nutrientes para la producción de biomasa de la cianobacteria fijadora de N₂. (A) Curvas de crecimiento de *Nostoc* sp. cepa M2 a expensas de preparaciones de vinaza sintética mediante la reacción de H₂SO₄ con Ca₃(PO₄)₂ y Mg(OH)₂ y KOH, como fuentes únicas de P, S, Mg y K. (●) Medio de cultivo BG11₀ (control positivo); (■) Medio similar vinaza; (□) BG11₀ con suplemento de Ca₃(PO₄)₂ (control negativo); (▽) medio BG11₀ sin P (control negativo); (Δ) medio BG11₀ sin S (control negativo); (○) medio BG11₀ sin P y S (control negativo). B y C) Curvas de crecimiento de *Nostoc* sp. cepa M2 a expensas de preparaciones de vinaza sintética mediante la reacción de H₂SO₄ con harina de huesos y Mg(OH)₂ y KOH como única fuente de P, S, Mg y K. (A y B) Densidad celular; (C) acumulación de proteínas. (●) Medio de cultivo BG11₀ (control positivo); (■) medio similar-vinaza; (○) medio BG11₀ sin P y S (control negativo). Cada set de datos representa la media y error de dos experimentos independientes.

días. El crecimiento y acumulación de proteínas con la vinaza algal (Figura 41 A) fue similar al control positivo (Figura 41 A) alcanzando densidades celulares a 750 nm de $2,7 \pm 0,2$ y $2,3 \pm 0,0$, respectivamente. La acumulación de proteínas en células cultivadas con vinaza algal, alcanzó niveles de $1,1 \pm 0,0$ y $0,8 \pm 0,0$ a los 10 días (Figura 41 B).

Cuando se utilizó esta vinaza para cultivar la cianobacteria bajo el modo de cultivo diazotrófico, de manera semi-continua y con un reciclaje del 75 % (v/v) de agua por ciclo (hasta 3 ciclos), se produjo biomasa seca hasta aproximadamente 2 g.L^{-1} con una productividad máxima de $0,3 \text{ g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ (Figura 41 C y Tabla 15) usando N_2 atmosférico como única fuente de N. Los valores de proteínas por ciclo fueron cercanos al 60 % (p/p) con valores de $1,2 \pm 0,1$ y $1,1 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$ a los 5 y 10 días, respectivamente (Figura 41 D). Para simplificar, los microelementos se reabastecieron en cada ciclo en esta etapa. Los parámetros analizados para el cultivo semi-continuo se encuentran resumidos en la Tabla 15.

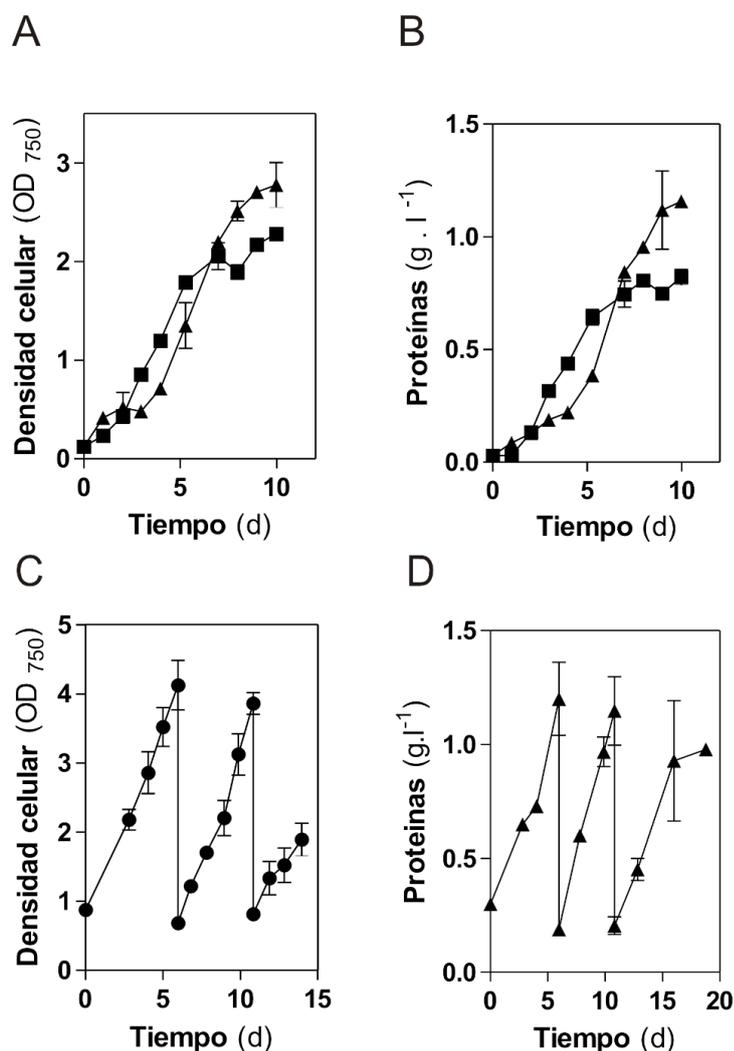


Figura 41. Reciclado de la vinaza de fermentación y valorización de fuentes económicas de P. (A-B) Curvas de crecimiento de *Nostoc* sp. cepa M₂ a expensas de la vinaza de fermentación de la biomasa de microalgas sacarificada con H_2SO_4 y suplementada con harina de huesos. (■) Medio BG11₀ (control positivo); o (▲) vinaza de fermentación como única fuente de P, S, K y Mg. (C-D) Cultivos semi-continuos de *Nostoc* sp. cepa M₂ a alta densidad a expensas de la vinaza real como fuente de macronutrientes, con una cosecha de células cada 5 días y un 75 % de agua reciclada por ciclo. Cada set de datos representa la media y desvío estándar de dos experimentos independientes.

Tabla 15. Análisis del crecimiento y acumulación de proteínas de *Nostoc* sp. cepa M2 a expensas de la vinaza como fuente de macronutrientes.

| Parámetros analizados | Vinaza 0,4 % | |
|---|-------------------|-------------------|
| | 1° CICLO (5 días) | 2° CICLO (5 días) |
| Biomasa seca final (g.L ⁻¹) | 1,8 ± 0,2 | 1,8 ± 0,0 |
| Productividad máxima de biomasa (g.L ⁻¹ .día ⁻¹) | 0,3 ± 0,0 | 0,4 ± 0,0 |
| Tiempo duplicación (días) | 3,0 ± 0,6 | 2,3 ± 0,3 |
| Proteínas (% p/p) | 65,1 ± 2,7 | 61,1 ± 7,9 |

El análisis se llevó a cabo a partir de cultivos diazotróficos semicontinuos de *Nostoc* sp. cepa M2 a expensas de la vinaza algal suplementada con P de harina de huesos como fuente de macronutrientes (P, K, S y Mg).

En ciclos sucesivos (tercero en adelante) se obtuvieron productividades más bajas y un incremento en la acumulación de hidratos de carbono extracelulares en el medio de cultivo ($0,2 \pm 0,0$ g.L⁻¹ a los 16 días). Podría ser interesante analizar en mayor detalle este aspecto para potenciales productos adicionales (por ejemplo, exopolisacáridos) a partir de este tipo de biorrefinerías multitróficas.

La plataforma que se presenta en esta tesis se basó en el H₂SO₄ como un componente clave que integró la sacarificación eficiente de la biomasa de algas y la recuperación del P a partir de residuos animales/alimenticios (simbiosis industrial).

El H₂SO₄ es actualmente el reactivo más utilizado en la industria química/petroquímica y se produce principalmente en refinerías de petróleo, plantas de procesamiento de gas natural y plantas de coque, en un proceso principalmente destinado a reducir los niveles de S de los gases combustión. Debido a consideraciones ambientales, es que en las últimas dos décadas, se ha ejercido una creciente presión hacia la reducción de S en los combustibles, que de lo contrario promovería la lluvia ácida con graves resultados perjudiciales para la salud humana, la biodiversidad y también contra la integridad de edificios y materiales de maquinaria y construcción (Burns *et al.*, 2012). Se prevé que, impulsada por la seguridad energética y medioambiental, la explotación de reservas de combustibles fósiles de menor calidad (con mayor contenido de S) y el refuerzo de políticas ambientales, sostendrán la producción de H₂SO₄ a bajo costo. En esta plataforma no se producen residuos de H₂SO₄ ya que el mismo se convierte íntegramente en yeso y biomasa.

3.2.6. *Plataforma semi-cerrada de producción de biomasa algal*

Finalmente, la biomasa de la cianobacteria cultivada a partir de la vinaza de fermentación de microalgas suplementada con P se convirtió en materia prima para el siguiente ciclo de producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos fermentables (Figura 32 y Esquema 1). La Figura 42 muestra las principales transformaciones de la materia en la plataforma de biorrefinería propuesta, tal como han podido ser confirmadas en las secciones de este capítulo y los anteriores.

La plataforma de producción de biomasa algal semi-cerrada que se propone en esta Tesis Doctoral hace uso de una fábrica de células microbianas multi-específica basada en el acoplamiento tecnológico de la actividad de diferentes organismos que se destacan en tareas únicas (Ortiz-Márquez *et al.*, 2013). En esta plataforma i) la FBN; ii) la biosíntesis y acumulación de carbohidratos fermentables y iii) la producción de etanol se lograron mediante el uso secuencial de tres microorganismos diferentes. Las fábricas de células microbianas multiespecie ejecutan de forma óptima múltiples tareas que, normalmente superan a cualquier especie individual. Esto se debe principalmente a las incompatibilidades intrínsecas de rutas metabólicas complejas como son la fijación del N₂, la fermentación y la fotosíntesis oxigénica e hiperacumulación de hidratos de carbono y proteínas, desalentando de alguna manera, la ingeniería metabólica de un solo microorganismo para alcanzar niveles óptimos de producción (Ortiz-Márquez *et al.*, 2013).

del proceso. Si el fertilizante orgánico N se produjera mediante molienda en seco y extracción acuosa de la biomasa de cianobacterias (30-50% de recuperación de proteínas) sería necesario alrededor del doble del volumen del cultivo de cianobacterias, con una productividad de $0,3 \text{ g. L}^{-1} \text{ día}^{-1}$, para cerrar el balance de masa de la plataforma, integrando la producción de biomasa de microalgas, a una productividad de $0,6 \text{ g. L}^{-1} \text{ día}^{-1}$. La extracción de proteínas por congelado-descongelado de la biomasa (60-90% de recuperación de proteína) tiende a minimizar el volumen de cultivo de la cianobacteria requerido para alimentar el cultivo de microalgas. La extracción parcial de proteínas, mediante molienda en seco y extracción acuosa, genera un residuo con una cantidad sustancial de proteínas que podría ser considerado como suplemento para alimentación animal.

Otra característica única de esta propuesta es la sustitución completa de fertilizantes sintéticos (industriales) de N y P, por fertilizantes naturales producidos *in situ*, a partir de recursos renovables. La FBN sustituyó por completo al controvertido proceso de Haber & Bosch para la síntesis del fertilizante nitrogenado requerido para el cultivo de microalgas.

De manera contraria al N que se retuvo principalmente en la biomasa residual de la sacarificación de algas y biomasa de levadura, una cantidad sustancial de P permaneció en la vinaza de fermentación en forma biodisponible, permitiendo un reciclaje interno eficiente de este nutriente vital. La recuperación adicional del P de la harina de huesos, produjo una vinaza suplementada con un exceso de P, que después de varios ciclos de cultivo de *Nostoc* y reciclado de agua, podría servir para fertirrigar cultivos, en lugar de utilizar la vinaza concentrada directamente (Rodrigues Reis & Hu, 2017).

De acuerdo con las condiciones de sacarificación optimizadas a una carga de sólidos del 20 % (p/v), se produjo un exceso de 20 veces el volumen en vinaza. Un aumento de la carga de biomasa de microalgas a un 30-40% (p/v) redujo proporcionalmente el volumen de vinaza, y se acercó a cerrar un balance de masa sin producción de residuos, pero en estas condiciones, la conversión de azúcares fermentables en etanol comenzó a disminuir, debido a un límite en el proceso de fermentación en el tiempo analizado.

Sin embargo, aunque no se confirmó en este estudio, es probable que la cianobacteria tolere un aumento de hasta el 50 % en la concentración de la vinaza; pasando de 0,4 % (demostrado) a 0,6 % (incremento del 50 %), ya que se observó toxicidad al 10 % (v/v).

Sin embargo, se necesita un análisis más detallado de la composición de nutrientes en las diferentes corrientes de la plataforma, para optimizar aún más su rendimiento en el reciclaje de nutrientes y el equilibrio general de los mismos.

La naturaleza mixotrófica de la plataforma de producción propuesta a expensas de un medio orgánico rico, la haría propensa a la contaminación, por lo tanto, los fotobiorreactores cerrados como los utilizados en este estudio serían más adecuados. En este caso, las productividades esperadas serían significativamente mayores, en el rango de 3 veces (Jorquera *et al.*, 2010) con respecto a las obtenidas en piletas a cielo abierto, pero a expensas de un aumento proporcional en los costos de capital y operativos (Richardson *et al.*, 2012).

Ambos sistemas de cultivo pueden combinarse tal como los mencionados sistemas híbridos, aprovechando las mejores características de los estanques abiertos y de los PBR, para aumentar la productividad de la biomasa y disminuir los costos de producción.

6.3. CONCLUSIONES

Esta plataforma de producción de biomasa de algas de ciclo semi-cerrado brinda conceptos de economía circular en el campo de la biorrefinería de biomasa de microalgas, produciendo biomasa de grado de alimentación y etanol a rendimientos casi teóricos, a expensas del CO₂ y N₂ atmosféricos, y del P del residuo de la industria alimentaria (huesos).

La estrategia siguió un enfoque de fábrica de células multi-trófica que acopló tecnológicamente las actividades de tres microorganismos diferentes que sobresalen en las tareas de fijación biológica del N₂, acumulación de carbohidratos fermentables/lípidos transesterificables y/o producción de etanol.

Esta propuesta se basó en el reciclaje intensivo de agua, vinaza de fermentación y reactivos del procesamiento de la biomasa (H₂SO₄, Mg(OH)₂ y KOH y Ca_x(PO₄)_y) en nutrientes para microalgas (y cianobacterias). También hace uso del H₂SO₄ para integrar estratégicamente la sacarificación de la biomasa, para producir etanol, y para la recuperación y valorización del P de recursos renovables. La recuperación de estos nutrientes permite la reposición del N de la plataforma mediante FBNy fotosíntesis.



CONCLUSIONES FINALES

7. CONCLUSIONES FINALES

En esta Tesis Doctoral, se proporciona una prueba de concepto para la producción *in situ* de N biológicamente reactivo, como sustituto de los fertilizantes N sintéticos utilizados para el cultivo de microalgas. Se demuestra la producción simultánea de aceites o carbohidratos como materia prima para biocombustibles (biodiesel y bioetanol) y biomasa rica en proteínas con potencial uso como alimento, piensos y productos químicos de alto valor agregado en un sistema impulsado por la energía lumínica y el CO₂ y N₂ del aire.

Así, la estrategia propuesta en este trabajo representa una alternativa al controvertido proceso industrial de Haber & Bosch para la síntesis de fertilizantes N en todo el mundo, pudiendo de esta manera avanzar hacia una economía verde sostenible. Se espera que el avance en las biorrefinerías, especialmente aquéllas que maximizan la sustentabilidad mediante la explotación de recursos renovables de libre acceso (por ejemplo, como son el N₂ y el CO₂ atmosféricos, según se muestra en este trabajo) aumente gradualmente el interés a nivel mundial.

Por otro lado, aunque existe un incentivo para producir cultivos alternativos para biocombustibles y otros fines en regiones no desarrolladas del mundo, la tarea es difícil de cumplir en parte porque la producción de agroquímicos, la compra y/o el transporte son extremadamente costosos para pequeños agricultores de estos países (Marenya *et al.*, 2012; Ogbonna *et al.*, 2013). Es posible que en algunas de estas regiones donde el clima, la tierra y la disponibilidad de mano de obra son favorables, las biorrefinerías basadas en tecnología simplificada y el libre acceso a recursos renovables, puedan contribuir a producir un impacto económico y social en los pequeños agricultores para el cumplimiento de las necesidades básicas para alimentos y energía y como uno de los puntos de partida para crear valor, mediante la producción de productos de alto valor para los mercados externos.

Asimismo, se muestra un diseño y una prueba de concepto para una plataforma de producción de biomasa de microalgas de ciclo semi-cerrado y la biorrefinería de la biomasa, para producir etanol y suplementos para alimentación animal. A partir del CO₂ y N₂ del aire, y P de desechos de la industria alimenticia. Este enfoque concilia la co-producción de combustibles (etanol y biodiesel) y piensos mediante el reciclado interno de macronutrientes distintos al N y P.

Demostramos una clara mejora en el “estado del arte” de la fermentación de la biomasa de microalgas, mediante la producción de corrientes líquidas sacarificadas que contienen hasta 100 g de azúcares.L⁻¹, que produjeron, después de la fermentación, hasta 50 g de etanol.L⁻¹. El rendimiento potencial de etanol modelado en el campo sería de 2 a 3 veces mayor que el que se obtiene actualmente a partir de materias primas como el maíz (y de 5 a 7 veces mayor

que el obtenido a partir de residuos lignocelulósicos). Asimismo, los rendimientos potenciales obtenidos para el biodiesel, superan ampliamente (20 veces) los obtenidos a partir de la soja. Algunas características únicas de la plataforma son: i) un enfoque multi-específico, que comprende tres microorganismos diferentes que sobresalen en operaciones únicas (fijación biológica del N_2 , acumulación de carbohidratos y fermentación); ii) el uso de H_2SO_4 para integrar la sacarificación de la biomasa y la recuperación del P soluble de la harina de huesos; y iii) el reciclaje interno intensivo del agua y los nutrientes con la vinaza de fermentación; iv) no se producen residuos de H_2SO_4 en la plataforma, ya que todo se convierte en yeso para aplicaciones adicionales, y fertilizante/biomasa.

Cada uno de estos conceptos ha sido sólo superficialmente abordado en el pasado y, hasta donde sabemos, nunca fueron integrados en una única plataforma de producción que aporte alternativas de economía circular a la biotecnología algal. Confiamos en que estos conceptos puedan inspirar futuros desarrollos para una producción más limpia de insumos básicos para el desarrollo de la humanidad.



BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA POR ÓRDEN ALFABÉTICO

A

- Acién *et al.* Economics of microalgae production. Microalgae-based biofuels and bioproducts. From feedstock cultivation to end-products. *Woodhead Publishing Series in energy* 485-503 (2017).
- Altschul *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402 (1997).
- An & Carmichael. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* **32**, 1495-1507 (1994).
- Ax Elicegui. Biocombustibles: una nueva oportunidad para el agro. *Universidad Austral* (2006).

B

- Baeyens, *et al.* Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol, *Progress in Energy and Combustion Science* **47** 60–88 (2015).
- Beligni *et al.*, The diversity of algal phospholipase D homologs revealed by biocomputational analysis. *Journal of Phycology* **51**(5) 943-962 (2015).
- Bennett & Bogorad, Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue green alga. *Journal of Cell Biology* **58** (2) 419–435 (2011).
- Berberoglu, Gomez & Pilon. Radiation characteristics of *Botryococcus braunii*, *Chlorococcum littorale*, and *Chlorella* sp. used for CO₂ fixation and biofuel production. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **110**(17), 1879-1893 (2009).
- Bligh & Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal Biochemistry and Physiology* **37** 911–917 (1959).
- Bonnichsen & Theorell. An enzymatic method for the micro determination of ethanol, *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* **3** 58–62 (1951).
- Börjesson & Tufvesson. Agricultural crop-based biofuels – resource efficiency and environmental performance including direct land use changes. *Journal of Cleaner Production* **19**, 108 – 120 (2011).
- Borowitzka. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* **70** (1), 313-321 (1999).
- Bothe, *et al.* Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria, *Microbiol. Molecular Biology Review* **74** (4) 529–551 (2010).
- Brennan & Owende. Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **14**, 557-577 (2010).
- Bryant. Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: Properties and Occurrence in Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **128**, 835-844 (1982).
- Burén & Rubio. State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. *FEMS Microbiology Letters* **365** (2) (2017).
- Burns, *et al.* National acid precipitation assessment program report to Congress: An integrated assessment, *National Science and Technology Council*. US EPA Clean Air Markets Div., Washington, DC, (2012).
- Burrows, *et al.* Optimization of media nutrient composition for increased photofermentative hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC 6803. *International Journal of Hydrogen Energy* **33** (21), 6092–6099 (2008).

C

- Cai, *et al.* Large-scale preparation of phycobiliproteins from *Porphyra yezoensis* using co-precipitation with ammonium sulfate. *Natural Science*, **4** 536-543 (2012).
- Cámara Argentina de Biocombustibles (CARBIO), (2017).
- Canter *et al.*, Implications of widespread algal biofuels production on macronutrient fertilizer supplies: nutrient demand and evaluation of potential alternate nutrients sources. *Applied Energy* **143**, 71-80 (2015).
- Carmichael. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* **72**, 445-459 (1992).
- Carmichael. The cyanotoxins. *Advances in Botanical Research* **27**, 211-256 (1997).
- Chaudhary, *et al.* Algae as a feedstock for bioethanol production: new entrance in biofuel world, *International Journal Chemical Technology Research* **6** 1381–1389 (2014).
- Cheah *et al.* Biorefineries of carbon dioxide: From carbon capture and storage (CCS) to bioenergies production *Bioresource Technology* **215**, 346-356 (2016).
- Cheirsilp & Torpee. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology* **110** 510–516 (2012).
- Chen *et al.* A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods* **77**(1) 41-47 (2009).
- Chen, *et al.* Integrated soil–crop system management for food security. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **108**, 6399-6404 (2011).
- Chen, *et al.* Microalgae-based carbohydrates for biofuel production *Biochemical Engineering Journal* **78** 1– 10 (2013).
- Chen, *et al.* Population, water, food, energy and dams. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **56**, 18-28 (2016).
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, **25** 3, 294- 306. 30. (2007)
- Chisti. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in biotechnology*, **26** 3, 126-131 (2008).
- Chisti. Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology* **167** (3) 201–214 (2013).
- Choi, Nguyen & Sim. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production, *Bioresource Technology* 101 5330–5336 (2010).
- Christofolleti *et al.* Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management* **33**, 2752-2761 (2013).
- Cordell, Drangert & White. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change* **19**, 292-305 (2009).
- Coronel, Do Nascimento & Curatti. Effect of matching microalgal strains origin and regional weather condition on biomass productivity in environmental photobioreactors. *Bioresource Technology Reports* **5**, 104-112 (2019).
- Creswell L. Phytoplankton culture for aquaculture feed, Southern Regional Aquaculture Center (SRAC). Department of Agriculture, US, (Pub. No. 5004) (2010).
- Crutzen, *et al.* N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmospheric Chemistry and Physics*, **8**, 389-395 (2008).

- Curatti L. & Rubio L.M. Challenges to develop nitrogen-fixing cereals by direct *nif*-gene transfer. *Plant Science* **225** 130–137 (2014).

D

- Dale, *et al.* Take a closer look: biofuels can support environmental, economic and social goals. *Environmental Science & Technology* **48**, 7200- 7203 (2014).
- de Farias Silva, Barbera & Bertucco. Bioethanol Production from Food Crops Sustainable Sources, Interventions, and Challenges. ISBN 978-0-12-813766-6. Chapter 17 - Biorefinery as a promising approach to promote ethanol industry from microalgae and cyanobacteria, 343-359 (2019).
- Demirbas & Demirbas. Biorefineries. *Green Energy and Technology* 159-181 (2010).
- Demirbas. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. *Applied Energy* **86** 151–161 (2009).
- Demirbas. Production economics of high-quality microalgae. *Energy Sources part B: Economics, planning, and policy*, **12**(5), 395-401 (2017).
- Do Nascimento, Ortiz-Marquez, Sánchez Rizza, Echarte & Curatti. Bioprospecting for fast growing and biomass characterization of oleaginous microalgae from south-eastern Buenos Aires, Argentina, *Bioresource Technology* **125** 283–290 (2012).
- Do Nascimento, Sanchez Rizza & Curatti. Desarrollos de biotecnología algal como alternativa sustentable para la producción de biocombustibles y otros productos naturales en Tópicos selectos en biodiversidad y biotecnología. Editado por Berón, Covacevich, Curatti & Salerno. 179 p. (155-166). ISBN: 978-987-544-623-6 (2014).
- Domozych, *et al.* The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity, *Frontiers in Plant Science* **3** 82 (2012)
- Dragone, *et al.* Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy* **88**, 3331-3335 (2011).
- Dreywood. Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* **18**, 499 (1946).
- Durrett, Benning & Ohlrogge. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *The Plant Journal* **54**(4), 593-607 (2008).

E

- El-Dalatony, *et al.* Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* **219** 98–105 (2016).
- Erisman, *et al.* How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience* **1**, 636–639 (2008).
- Eshaq, *et al.* *Spirogyra* biomass a renewable source for biofuel (bioethanol) production. *Engineering Science & Technology* **2** (12), 7045–7054 (2010).

F

- Farooq, *et al.* Water use and its recycling in microalgae cultivation for biofuel application. *Bioresource Technology* **184**, 73–81 (2015).

G

- Genuário, *et al.* Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. *Toxicon* **55** 846–854 (2010).
- Georgianna & Mayfield. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature* **488**, 329–335 (2012)
- Gerbens Leenes, *et al.* The blue water footprint and land use of biofuels from algae *Water Resource Research* **50**, 8549-8563 (2014).

- Gerbens Leenes, Hoekstra & van der Meer. The water footprint of bioenergy. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **106**, 10219-10223 (2009).
- Giménez *et al.* Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. *Extremophiles* **4** (3) 181–188 (2000).
- Gong, *et al.* Digestibility of the defatted microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Desmodesmus* sp. when fed to Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition* **24** 1 56-64 (2018).
- Gonzalez Fernandez & Ballesteros. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnology Advances* **30** (6), 1655-1661 (2012).
- González López, *et al.* Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology* **101** (19) 7587–7591 (2010).
- Graham Rowe. Agriculture: Beyond food versus fuel. *Nature* **474**, S6 (2011)
- Gray, Zhao & Emptage. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology* **10** 141–146 (2006)
- Griffiths & Harrison. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* **21**(5) 493-507 (2009).
- Grubb M., Vrolijk C. & Brack D. The Kyoto protocol: a guide and assessment. [Book]. Royal Institute of International Affairs Energy and Environmental Programme: London (1997).
- Gu *et al.* Nitrogen recycling from fuel-extracted algal biomass: Residuals as the sole nitrogen source for culturing *Scenedesmus acutus*. *Bioresource Technology* (184) 153-160 (2015).
- Guaita. Algunas consideraciones acerca del análisis de alimentos para rumiantes. *Nutrición Animal Aplicada*, 31 (2014).
- Guillard & Ryther. Studies of marine planktonic diatoms: *I. cyclotella nana hustedt*, and *Detonula confervacea (cleve) gran.* *Canadian Journal of Microbiology* **8**, 229-239 (1962).
- Guillard. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*, 29-60 (1975).
- Guldhe, *et al.*; Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. *Fuel*. **128**, 46-52 (2014).
- Guo, *et al.* Biochemical features and bioethanol production of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta, *Bioresource Technology* **127** 422–428 (2013).
- Guo, Song & Buhain. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **42**, 712-25 (2015)

H

- Hanotu, *et al.* Microalgae recovery by microflotation for biofuel production using metallic coagulants. *Biofuels*. **4** (4), 363-369 (2013).
- Harun *et al.* Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production, *Applied Energy* **88** 3464–3467 (2011).
- Harun, Danquah & Forde. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **85** 199–203 (2010).
- Herrman. Rocas y minerales como fertilizantes de los suelos agrícolas. *Ciencia Hoy*. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Asociación Civil Ciencia Hoy. ISSN 0327-1218 **27** 158 (2018).

- Heuer, *et al.* Improving phosphorus use efficiency: a complex trait with emerging opportunities. *The plant Journal* **90**(5) 868-885 (2017).
- Ho, Chen & Chang. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology* 244–252 (2012).
- Ho, *et al.* Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*. **135**, 191–198 (2013).
- Huber, Iborra & Corma. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chemical Reviews* **106**, 4044-4098 (2006).
- Huntley, *et al.* Demonstrated large-scale production of marine microalgae for fuels and feed. *Algal Research* **10**, 249-265 (2015).

I

- INDEC Informes Técnicos, vol. 2, n° 102 ISSN 2545-6636. Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC) ministerio de hacienda, Presidencia de la Nación.

J

- John, *et al.* Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol, *Bioresource Technology* 102 186–193 (2011).
- Jorquera, *et al.* Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, **101** 1406-1413 (2010).

K

- Karemore & Sen. Downstream processing of microalgal feedstock for lipid and 1 carbohydrate in a biorefinery concept: A holistic approach for biofuel applications. *RSC Advances* **35**, 1-34 (2016).
- Karlen, Birell, & Hess. A five-year assessment of corn stover harvest in central Iowa, USA. *Soil and Tillage Research* **115-116** 47-55 (2011).
- Kim, *et al.* Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation, *Bioresource Technology* **153** 47–54 (2014).
- Kwiatkowski, *et al.* Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process, *Industrial Crop Production* **23** 288–296 (2006).

L

- Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227** (5259) 680–685 (1970).
- Larkin, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948 (2007).
- Laurens, *et al.* Development of algae biorefinery concepts for biofuels and bioproducts; a perspective on process-compatible products and their impact on cost-reduction. *Energy & Environmental Science*, **10**, 1716-1738 (2017).
- Leão, *et al.* The chemical ecology of cyanobacteria. *Natural Product Reports* **29** (3) 372–391 (2012).
- Lehninger: Principles of Biochemistry (6th edition), Chapter 20, Albert Lehninger; David L. Nelson; Michael M. Cox. W.H. Freeman, New York 2012. ISBN 978-1-4292-3414-6.
- Lelieveld, *et al.* The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. *Nature*, **525**, 367-371; (2015).
- Li, *et al.* Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress* **24** (4), 815-820 (2008).
- Li, Liu & Liu. An overview of algae bioethanol production. *International Journal of Energy Research* **38**, 965–977 (2014).

- Liandong. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **41** 1376–1384 (2015).
- Liu, *et al.* Enhanced nitrogen deposition over China. *Nature*, **494**, 459-462 (2013)
- Lowry, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275 (1951).
- Lucker, *et al.* The environmental photobioreactor (ePBR): An algal culturing platform for simulating dynamic natural environments. *Algal Research* **6**, 242-249 (2014).
- Lum, Kim & Lei Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed, *Journal of Animal Science and Biotechnology* **4** (1) 53–59 (2013).

M

- Marenya, *et al.* Which policy would work better for improved soil fertility management in sub-Saharan Africa, fertilizer subsidies or carbon credits? *Agricultural Systems* **110** 162–172 (2012).
- Markou, Angelidaki & Georgakakis. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**, 631–645 (2012).
- Mata, Martins, & Caetano. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Review* **14**, 217-32 (2010).
- Milledge & Heaven. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **12** (2), 165-178 (2013).
- Miller. Minimizing land use and nitrogen intensity of bioenergy, *Environmental Science & Technology* **44** (10) 3932–3939 (2010).
- Minowa & Sawayamal. A novel microalgal system for energy production with nitrogen cycling. *Fuel* **78** (10) 1213–1215 (1999).
- Miranda, Passarinho & Gouveia. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production, *Applied Microbiology and Biotechnology* **96** 555–564 (2012).
- Moheimani & Borowitzka. The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. *Journal of Applied Phycology* **18**(6), 703-712 (2006).
- Molina Grima *et al.* Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* **20** 491–515 (2003).
- Mollah, *et al.* Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation. *J. Hazard. Matter.* **114**(1), 199-210 (2004).
- Möllers, *et al.* Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation, *Biotechnology Biofuels* **7** 64 1-11 (2014).
- Moraes *et al.* Reduction in greenhouse gas emissions from vinasse through anaerobic digestion. *Applied Energy* **189** 21-30 (2017).
- Moran Salazar, *et al.* Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. *Springer Plus* **5** 1007 (2016).
- Moreno García *et al.* Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **76** 493-506 (2017).

- Murphy. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in lipid research*, **40**(5), 325-438 (2001).
 - Mussatto. Biotechnological potential of brewing industry by-products, *Biotechnology for Agro-industrial Residues Utilization*, 313–326 (2009).
- N**
- National Research Council of the National Academies (2013). Sustainable development of algal biofuels in the U. S. Nation Academic Press.
 - NCBI Handbook [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowSection&rid=handbook.chapter.610]
 - Nguyen, *et al.* Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Journal Microbiology Biotechnology* **19** (2), 161–166 (2009).
 - Nigam & Singh. Production of liquid biofuels from renewable resources, *Progress in Energy Combustion Science* **37** 52–68 (2011).
 - Nilsson, Griggs & Visbeck. Map the interactions between Sustainable Development Goals. *Nature* **534**, 320-322 (2016)
 - NREL, What is a Biorefinery? U.S. Department of Bioenergy. <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html> (2015).
- O**
- OCDE-FAO. Perspectivas Agrícolas 2017-2026.
 - Ogbonna, Nomura & Aoyagi. Bioenergy production and food security in Africa, *African Journal of Biotechnology* **12** (52) 7147–7157 (2013).
 - Ohlrogge. Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* **7**(7), 957 (1995).
 - Organización Naciones Unidas, Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, División de Población (2017). *Perspectivas de la población mundial: revisión de 2017*. Nueva York: Naciones Unidas.
 - Ortíz-Márquez, *et al.* Genetic engineering of multi-species microbial cell-factories as an alternative for bioenergy production, *Trends in Biotechnology* **31** (9) 521–529 (2013).
- P**
- Parvatker. Biodiesel From microalgae – A sustainability analysis using life cycle assessment. *International Journal Chemical Physics Science* **2**, 159–69 (2013).
 - Peccia, *et al.* Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. *Trends in Biotechnology* **31**, 134-138 (2013).
 - Pérsico, *et al.* Evaluación de un sistema exterior de cultivo masivo de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*, en una zona templada oceánica de Argentina, *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* **2** 30–48 (2011).
 - Pimentel & Patzek. Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. *Natural Resources Research* **14** 1 65-76 (2005).
 - Pittman, Dean & Osundeko. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology* **102**, 17-25 (2011).
- R**
- Racker. Crystalline alcohol dehydrogenase from baker's yeast, *Journal of Biological Chemistry* **184** 313–319 (1950).
 - Radakovits, *et al.* Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell* **9** 486–501 (2010).
 - Razon. Life cycle analysis of an alternative to the Haber–Bosch process: nonrenewable energy usage and global warming potential of liquid ammonia from

- Cyanobacteria. *Environmental Progress & Sustainable Energy* **33** (2) 618–624 (2014).
- Razon. Life cycle energy and greenhouse gas profile of a process for the production of ammonium sulfate from nitrogen-fixing photosynthetic cyanobacteria. *Bioresource Technology* **107** 339–346 (2012).
 - Richardson, Johnson & Outlaw. Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest. *Algal Research* **1**, 93-100 (2012).
 - Rippka, *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *Microbiology*, **111**, 1-61 (1979).
 - Rismani Yazdi *et al.* Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels, *BMC Genomics* **12** 148 (2011).
 - Rockström, *et al.* A safe operating space for humanity. *Nature* **461**, 472-475 (2009).
 - Rockström, *et al.* Sustainable intensification of agriculture for human prosperity and global sustainability. *Ambio* **46**, 4-17 (2017)
 - Rodrigues Reis & Hu. Vinasse from Sugarcane Ethanol Production: Better Treatment or Better Utilization? *Frontiers in Energy Research* **5** 7 (2017).
 - Rosenzweig, *et al.* Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **111**, 3268-3273 (2014)
 - Ruiz, *et al.* Towards industrial products from microalgae, *Energy Environmental Science* **9** 3036–3043 (2016).
 - Rulli, *et al.* The water-land-food nexus of first-generation biofuels. *Scientific Reports* **6**, 22521 (2016)
- S**
- Saitou & Nei. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425 (1987).
 - Salerno & Curatti. Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why?. *Trends in Plant Science* **8**(2), 63-69 (2003).
 - Salmon, *et al.* Global rain-fed, irrigated, and paddy croplands: A new high resolution map derived from remote sensing, crop inventories and climate data. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* **38**, 321-334 (2015)
 - Sánchez Rizza, Lara. “Estudios sobre la utilización de cianobacterias fijadoras de nitrógeno como biofertilizantes para el cultivo de microalgas oleaginosas”. Tesis para optar al título de Lic. Cs. Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata (2012).
 - Santana, *et al.* Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. *Bioresource Technology* **228** 133-140 (2017).
 - Sanz Smachetti, Sánchez Rizza, Coronel, Do Nascimento & Curatti. Microalgal Biomass as an Alternative Source of Sugars for the Production of Bioethanol in *Principles and applications of fermentation technology*. Edited by Arindam Kuila and Vinay Sharma. Editorial, Wiley 484 p. (351-386). ISBN: 978-1-119-46026-8 (2018).
 - Schenk *et al.* Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research* **1** (1), 20-43 (2008).
 - Scholz, Riley & Cuello. Acid hydrolysis and fermentation of microalgal starches to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass Bioenergy* **48**, 59-65 (2013).

- Schrock. Reduction of dinitrogen. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **103** (46) 17087-17087 (2006).
- Sekar & Chandramohan. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied 149 research, patents and commercialization, *Journal of Applied Phycology* **20** (2) 113-136 (2008).
- Shapiro & Stadtman. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*) *Methods of Enzymology*. **17** A. 910-922 (1970).
- Sheehan *et al.* A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel From Algae, Golden, Colorado, 1998.
- Simons, *et al.* Filling the phosphorus fertilizer gap in developing countries, *Nature Geoscience* **7**, 3, (2013).
- Singh, Nigam & Murphy. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels, *Bioresource Technology* **102** 10–16 (2011).
- Smienk, *et al.* Validación de un kit para la detección de microcistinas en agua. Zeu-Immunotec, Dpto. I+D, C/ Maria Luna, 11 Nave 19, 50018 Zaragoza y Universidad de Zaragoza, Facultad Ciencias, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular. 50009 Zaragoza.
- Soares *et al.* Studies on bromelain precipitation by ethanol, poly(ethylene glycol) and ammonium sulphate, *Chemical Engineering Transaction* **24** 979–984 (2011).
- Stewart & Hessami. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration - the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach, *Energy Conversion and Management* **46** 403–420 (2005).
- Sticklen. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics* **9** (6), 433-43 (2008).
- Sukhija & Palmquist. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **36**, 1202–1206 (1988)
- Sumathi, Chai & Mohamed. Utilization of oil palm as a source of renewable energy in Malaysia, *Renew. Sust. Energ. Rev.* **12** 2404–2421 (2008)
- Sutton, *et al.* Too much of a good thing. *Nature*, **472**, 159-161 (2011).

T

- Tamura *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731–2739 (2011).
- Terry & Raymond. System design for the autotrophic production of microalgae. *Enzyme and Microbial Technology* **7** (10), 474-487 (1985).
- Tilman, *et al.* Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* **292**, 281-2842 (2001).
- Tilman, *et al.* Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, **418**, 671-677; (2002).
- Tuantet *et al.* Nutrient removal and microalgal biomass production on urine in a short light-path photobioreactor. *Water Research* **55** 162-174 (2014).

V

- Vanthoor Koopmans, *et al.* Biorefinery of microalgae for food and fuel, *Bioresource Technology* **135** 142–149 (2013).

W

- Walsh *et al.* Algal food and fuel coproduction can mitigate greenhouse gas emissions while improving land and water-use efficiency. *Environmental Research Letters*, **11**(11), 114006 (2016).

- Wang, *et al.* Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic cell*, **8**(12), 1856-1868 (2009).
- Wang, *et al.* CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **79**(5), 707-718 (2008).
- Wang, Lan & Horsman. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances* **30** (4), 904-912 (2012).
- Watanabe & Masahiko. Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex. *Photosynthesis Research* **116** (2-3) 265-276 (2013).
- Wijffels & Barbosa. An outlook on microalgal biofuels. *Science*, **329** (5993), 796-799 (2010)
- Wijffels, Kruse & Hellingwerf. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae, *Current Opinion in Biotechnology* **24** 405–413 (2013).

X

- Xin, *et al.* Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, **101**(14), 5494-5500 (2010).
- Xu, *et al.* Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: Energy balance analysis, *Bioresource Technology* **102**(8) 5113–5122 (2011).

Y

- Yang, *et al.* Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology* **102**, 159–165 (2011).
- Yen, *et al.* Microalgae-based biorefinery –From biofuels to natural products, *Bioresource Technology* **135** 166–174 (2013).
- Yoo, *et al.* Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource technology*, **101**(1), 71-74 (2010).
- Yujie *et al.* Progress in microalgae biofuel's commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **74** 402-411 (2017).

Z

- Zhu. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **41**, 1376-1384 (2015).