

Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez
Martín”



Cultivation of microalgae in a high irradiance zone

Cultivo de microalgas en una zona de alta irradiancia

**Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:**

María Cuaresma Franco

Fecha de lectura: 15 de marzo de 2012

Bajo la dirección de los doctores:

Carlos Vílchez Lobato

René H. Wijffels

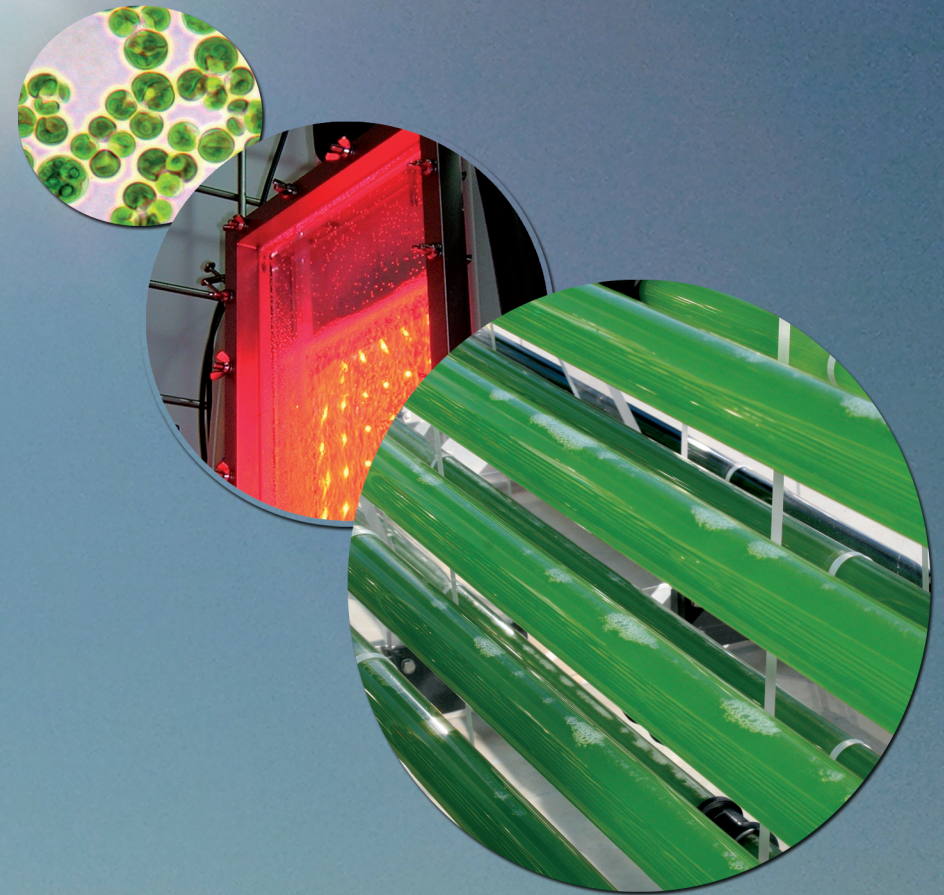
Marcel Janssen

Huelva, 2012



Cultivo de microalgas en una zona de alta irradiancia

Cultivo de microalgas en una zona de alta irradiancia



M. Cuaresma Franco

María Cuaresma Franco



Universidad
de Huelva





Universidad
de Huelva



UNIVERSIDAD DE HUELVA
Departamento de Química y Ciencia de los Materiales
"Prof. J. Carlos Vílchez Martín"

Cultivo de microalgas en una zona de alta irradiancia

Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias Ambientales

María Cuaresma Franco

Para optar al grado de Doctor

Trabajo realizado bajo la dirección de

Dr. Carlos Vílchez Lobato
Profesor Titular de Universidad
Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Huelva

Dr. René H. Wijffels
Catedrático de Universidad
Bioprocess Engineering
Wageningen University

Dr. Marcel Janssen
Profesor Asociado
Bioprocess Engineering
Wageningen University

Cultivation of microalgae in a high irradiance zone

María Cuaresma Franco

Contents

Acknowledgements	1
Resumen de la Tesis Doctoral	9
Summary	39
Chapter 1	
<i>Introduction and thesis outline</i>	47
Chapter 2	
<i>Performance of <i>Chlorella sorokiniana</i> under simulated extreme winter conditions</i>	59
Chapter 3	
<i>Productivity of <i>Chlorella sorokiniana</i> in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance</i>	77
Chapter 4	
<i>Horizontal or Vertical Photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency</i>	97
Chapter 5	
<i>Luminostat operation: a tool to maximize microalgae photosynthetic efficiency in photobioreactors during the daily light cycle?</i>	127
Chapter 6	
<i>Cultivation of microalgae in a high irradiance area: biotechnological potential of <i>Chlorella sorokiniana</i></i>	151
Conclusiones	165
Nomenclature	171
References	179
Curriculum Vitae	201
Publications	205

Acknowledgements





Once I read that to write the acknowledgments was delightful. Yes, it is. But it is also difficult. It is difficult to not forget someone who was also part of this work during this almost 5 years. And it is even more difficult when you have found people always ready to help you, no matter the country where you were neither the language you were speaking.

En primer lugar quisiera nombrar a **Carlos**, la persona que en un momento determinado me ofreció la oportunidad de pertenecer a este mundillo de la investigación, y que tiene mucha culpa de que hoy día sea una de mis pasiones. Su dedicación y honestidad en el trabajo son para mí ejemplo a seguir. Gracias “Charly” por tu apoyo incondicional, por la apuesta que en su momento hiciste en mí y que espero no haber desaprovechado. Secondly, I would like to thank **René**, the second person who offered me the chance to discover the great algae world. It has been a pleasure to learn from someone who really believes in what he is doing and who opened the doors of the Bioprocess Engineering Group for me. Bedankt for all your support, and mainly for keeping the enthusiasm in developing future collaborations with my University in Spain. We will produce algae over there!.

Now I have to mention the person who was really involved in my daily work, even from a 2600 km distance. Hartelijk bedankt, **Marcel**. Although we know that the distance made the work hard (and stressful) sometimes, the result is something to be proud of. I’ve learnt a lot from your experience and from your personal way of working. And despite the differences in the character (maybe too Dutch or too Spanish), I’ve really enjoyed to work with you. Also **Fred** deserves to be mentioned here. Without his technical support the things would never have been done. But what I admire the most from him is the willingness to help when needed, no matter if he is at the office or in a steam train. Thanks for calming down whenever an electrical power failure occurred and for “suffering” when traveling to Huelva to modify my photobioreactor setup...

Along this PhD I have had the pleasure of being part of two different groups. En Huelva he encontrado un grupo en el que desarrollarme como “científica” pero también como persona. Edu fue de las primeras personas que conocí en el laboratorio, junto con Inés, M^a José y Alonso, y esas primeras tardes juntos en el laboratorio hicieron que se despertara mi interés en este mundillo de las algas. Gracias **Edu** por tu buen humor, por estar siempre dispuesto a ayudar desinteresadamente y por ser tan humilde cuando en realidad todos sabemos que aprendemos muchísimo de ti, y contigo. De **Inés** admiro la fidelidad que tiene con el grupo y la voluntad que tiene siempre para colabo-



rar en la medida de lo posible. Para mí eres ejemplo de trabajo honesto y bien hecho. De **Mª José** admiro la fuerza de voluntad que tiene para seguir involucrada con el grupo, con nosotros, aun cuando no le quedan horas en el día. Y gracias a **Alonso**, quien a su vez me presentó a **Fernando** (“el gallego”), Holanda dejó de ser un país extraño para mí. Gracias por ese magnífico viaje en coche; nunca olvidaré la experiencia de comer una barra de salami a mordiscos en el coche, en medio de un atasco en una autopista alemana...

Al poco tiempo aparecieron Marta e Inma. **Marta**, aunque nuestras líneas de investigación iban por caminos distintos siempre ha habido tiempo para un café, una tarde de tiendas o un almuerzo en la playa. Hemos compartido mucho juntas y poco a poco hemos aprendido a valorarnos como personas, más que como compañeras de trabajo. Ante todo gracias por seguir ahí. Y a ti, **Inma**, gracias por tu humor ácido, que tantas veces nos ha hecho reír y nos hace plantearnos las cosas de otra manera. Después llegaron Carlete, Beni, Mayca y algo más tarde Ana Carolina. **Carlete**, el día a día nos ha hecho trabajar codo con codo y eso me ha enseñado a valorar tu precisión a la hora de hacer las cosas. Además, siempre ha sido un placer pasar algún tiempo juntos, ya sea discutiendo sobre el PAM, jugando un partidito de pádel, o cazando gamusinos... **Beni**, tu llegada al grupo aportó una visión más ingenieril de las cosas y nos ha permitido evolucionar mucho. Para mí eres ejemplo de arrojo y superación, aun cuando las cosas no siempre salen bien a la primera. **Mayca**, nos hemos peleado con los cortes eléctricos en el “labo” y con los pedales en la clase de spinning. Siempre tienes una sonrisa que ofrecer y para mí eres ejemplo de dedicación y de trabajo bien hecho. **Ana Carolina**, quizás hayamos aprendido más la una de la otra durante nuestros desayunos juntas que en el labo pero siempre es un placer compartir dudas y experiencias contigo.

Ahora llega el tiempo de la última generación. **Mª Carmen, Isa y Rocío**, vuestra energía y entusiasmo aportan savia nueva al grupo. Los ratitos y desayunos compartidos en Ciecem han sido inmejorables y siempre ha sido un placer trabajar con vosotras. **Encarni y Marta V.**, aunque en el trabajo diario no hayamos compartido mucho siempre habéis estado ahí. Y los ratos pasados juntas, ya sea tapeando, comiendo pizzas o en un concierto, han sido geniales; pero vaya “Marys” que estáis hechas... jeje...

Rosa y Javi, parte de lo que soy hoy os lo debo a vosotros también. Gracias por estar ahí siempre que os he necesitado. Y **Belén**, tú también mereces mención en esta tesis, por haber sido parte del



grupo en las “actividades sociales”, por los paseitos juntas cada mañana a la Facultad y por ser de las primeras en visitarme cuando he estado lejos.

Y por último no he de olvidar a los vecinos, “los inorgánicos”. Siempre dispuestos a ayudar o a prestarme alguna herramienta, especialmente cuando los hombres nos abandonaron en el laboratorio... **Iván**, gracias además por sobrellevar mis problemas informáticos a la perfección y por no desesperar durante el diseño de la portada de la tesis... Mil gracias por estar siempre ahí.

Now it is time for my second group. In 2007 the Bioprocess Engineering Group welcomed me. Here I found people that I’m not going to forget, because they have made Wageningen to become my second home. Hartelijk bedankt **Marieke**. You’ve been the first person who introduced me to the Dutch culture, and along these years you have become one of my best friends. Thanks for being always there when I needed you, and thanks for sharing with me your time, your holidays, your wedding and even your plants.... **Klaske**, you appeared in my life thanks to Marieke and the time spent in Schaeapmanstraat with the three of us was great. I won’t forget the mojito’s evenings, the nice dinners or the time spent gossiping... But what I won’t forget for sure is that you allowed me to be part of your small family in Wag, together with **Rick**. “Miss María” is really happy of having you both as friends here. And you all might already know that you have a house in Huelva.

In 2007 other people arrived at the small town of Wageningen. Carsten and Francisco, together we founded the PRELBIT and at that time we really enjoyed to stay together. Although sometimes cultural differences are present we have learnt to respect each other. **Carsten**, there was always time for spontaneous things: a beer in the Zaaier, a dinner at your or my place. The time spent together made us feel confident and although we don’t see too often lately, I enjoy a lot doing things with you and **Ana**. **Francisco**, it was a honour to be your paranymp, and it’s always a pleasure to spend time with you; talking, singing, playing the guitar... Together with **Lena**, thanks for offering your house, for all the support during the first months, after moving here, and for making us feel at home... And I shouldn’t forget **Taia**, the “chicken girl”, with whom the most boring thing is experienced as amazing, and who has always a big smile to offer. Thanks for all the good moments together!

Now it is time for people from Proceskunde, where the coffee breaks offered me more than regular Dutch conversations. Thanks **Sina** for always being “un caballero”, for offering yourself to pick me



up when needed, for taking me ice-skating at Kinderdijk (even though your skills were not so good) and for enjoying sharing thoughts and feelings. It's always a pleasure to nag you... **Floor, Annette, Sayam, Jan-Willem, Packo, Mathieu, Caterina, Elsbeth, Niels, David, Marian, Gerrit, Pieter, Anne, Bas, Claudia**, we have travelled around Huelva together; we have spent some time at conferences, sharing the nerves before the first oral presentation in Galway; in the lab, enjoying the experience of lipid extractions in the evening; discovering Shibuya or singing in a karaoke in Japan; barbequing at the Rijn or dancing in a PhD party; driving along the Grand Canyon in the USA or sharing a leaking room in California ... It was a pleasure to find people who didn't mind to help you and with whom I've shared experiences that I won't forget. I also would like to thank **Marieke Buffing** for her dedication during her internship in Huelva.

Finally I want to mention my new colleagues, although some of them have been closed to me since the beginning. Gracias **María B.** por darme la oportunidad de participar en este nuevo gran proyecto llamado AlgaePARC, por abrirme las puertas de tu casa y por enseñarme que el entusiasmo puede mover montañas cuando se cree en lo que se hace. **Rouke**, from you I've learnt that there can be tidiness inside the mess, that seriousness can be covered by a big laugh and that the best way to success is always collaboration. **Dorinde**, your positivity is your strength, and to work with you is easy and enjoyable. **Jeroen**, the daily work with you is amusing, but to tease you is even better... Thanks for being always ready to help, no matter if the "Jefa" was complaining too much. **Patrick**, it is a honour to introduce you to the algae world, and your personal sense of humour is making the coffee/lunch breaks always interesting.

Por ultimo me toca agradecer a la gente que siempre ha estado apoyándome, que siempre ha creído en mí y a quien no les ha importado estar a miles de kilómetros de distancia. Entre ellas tengo que destacar a mis amigas, a quienes no les han importado mis ausencias cuando he estado liada y quienes siempre han sabido sacarme tiempo para un cafelito o unas tapas. Y en especial tengo que nombrar a mis padres, **Pepi y Marcelino**, y a mi hermana, **Araceli**. Al principio todo esto parecía una locura, dejar un trabajo por una beca no parecía lo más lógico. Aun así siempre habéis tenido palabras de aliento y habéis aceptado mis decisiones. Y a ti, **Ángel**, he de agradecerte más que a nadie tu paciencia infinita, que sí que la tienes. Soy consciente de que has sido de las personas que más han sufrido con esta tesis, pero aun así has sido siempre el primero en empujarme a dar



Acknowledgements

el paso. Gracias por tu apoyo incondicional, por tu comprensión y sobre todo por seguir ahí.

También quiero recordar a esa gente que hoy día no están cerca, pero que en su día fueron también punto de apoyo importante y que siempre tenían una sonrisa en la cara cuando se hablaba con "la niña que estaba en Holanda". Esta tesis es tan vuestra como mía, es algo que juntos hemos compartido a lo largo de estos casi cinco años y por ello no puedo más que daros las gracias.

Os quiere, María.

Resumen de la Tesis Doctoral



1. Antecedentes

1.1. Microalgas

Las microalgas son organismos eucariotas unicelulares y cuya biodiversidad se estima en unas 200.000 especies, de las cuales sólo 35.000 han sido identificadas. Son organismos acuáticos que pueden encontrarse en una gran variedad de hábitats, desde ambientes de agua dulce hasta ambientes ácidos o alcalinos, como es el caso de las microalgas extremófilas.

El interés comercial en la producción de microalgas está principalmente relacionado con su poder nutricional; por su elevado contenido en proteínas, así como por la presencia de aminoácidos esenciales, carbohidratos, lípidos o precursores de vitaminas. Esto las hace ser consideradas una fuente alimenticia potencial tanto para humanos como para animales, estando muy extendido el uso de las microalgas en acuicultura. Además, otras moléculas de alto valor añadido pueden ser obtenidas de las microalgas, tales como pigmentos (carotenoides), compuestos antioxidantes o ácidos grasos (especialmente poliinsaturados como el DHA o EPA).

Las microalgas son filogenéticamente las plantas más antiguas de la tierra, y debido a su fotoautotrófico carácter han estado siempre expuestas a altos niveles de oxígeno, lo que ha resultado en el desarrollo de numerosos mecanismos eficaces de protección frente al estrés oxidativo y la acumulación de radicales libres. Así, compuestos antioxidantes derivados de las microalgas son de gran interés en cosmética así como en diversas aplicaciones farmacéuticas o en la terapia de enfermedades asociadas a la oxidación (inflamaciones).



Hoy día, las microalgas se consideran también fuente de energía renovable por su posible papel en la obtención de biodiesel, así como también es valorado su papel como sumidero de CO₂ procedente de efluentes gaseosos (biomitigación del efecto invernadero). Sin embargo, la producción de microalgas a escala comercial solo data de los años 50, cuando *Chlorella* y *Arthrospira* empezaron a ser producidas como fuente nutricional alternativa. Y es posteriormente en los años 70 cuando empiezan a considerarse fuente alternativa de energía durante la primera crisis del petróleo.

Existen diferentes sistemas de cultivo, dependiendo de la microalga a producir, del coste del terreno, del clima, de las necesidades energéticas, de nutrientes y de agua, así como de la importancia y valor del producto final. La efectividad de los diferentes sistemas de cultivo depende en último término, de su eficiencia en la captación y distribución de la luz, su capacidad para el control de la temperatura, el estrés hidrodinámico al que se someterán las microalgas, la capacidad para mantener condiciones axénicas y la viabilidad técnica para realizar el escalado. En este sentido, los fotobiorreactores panelares -sistemas de cultivo cerrados, con un estrecho paso óptico y cuya disposición puede ser variable (inclinados, verticales u horizontales)- son considerados uno de los sistemas más eficientes para la producción de microalgas.

Pero aún son varios los aspectos que limitan la explotación de las microalgas a nivel industrial. Principalmente, los costes de producción son aún muy elevados. La construcción de los sistemas de cultivo, la aireación/homogeneización de los mismos, la recolección y separación de la biomasa del medio de cultivo, y el suministro de nutrientes, requieren aún

una gran inversión económica, así como energética, para poder considerar la producción comercial como rentable.

No obstante, y a pesar de estas limitaciones, las microalgas son aún consideradas como una de las fuentes alimenticias, así como de biocombustibles de nueva generación, más atractivas. Esto es debido a su flexibilidad para ser cultivadas en agua de mar, sin limitar las reservas de agua dulce para consumo humano y a que pueden ser localizadas en zonas áridas o no destinadas a la agricultura, presentan un mayor contenido y productividad en aceites y proteínas y presentan tasas de crecimiento mayores a las de cualquier planta.

1.2. Eficiencia fotosintética

Las microalgas son organismos fotoautotróficos, siendo la fotosíntesis el proceso por el cual la biomasa es producida a partir de dióxido de carbono y luz. En este sentido, la luz solar es el principal substrato en la producción de microalgas en sistemas localizados en el exterior y ha de ser utilizada de una forma eficiente para optimizar dicha producción.

El proceso fotosintético se divide en dos etapas (Figura 1): fase luminosa (fotoquímica) y la fase oscura (biosintética).

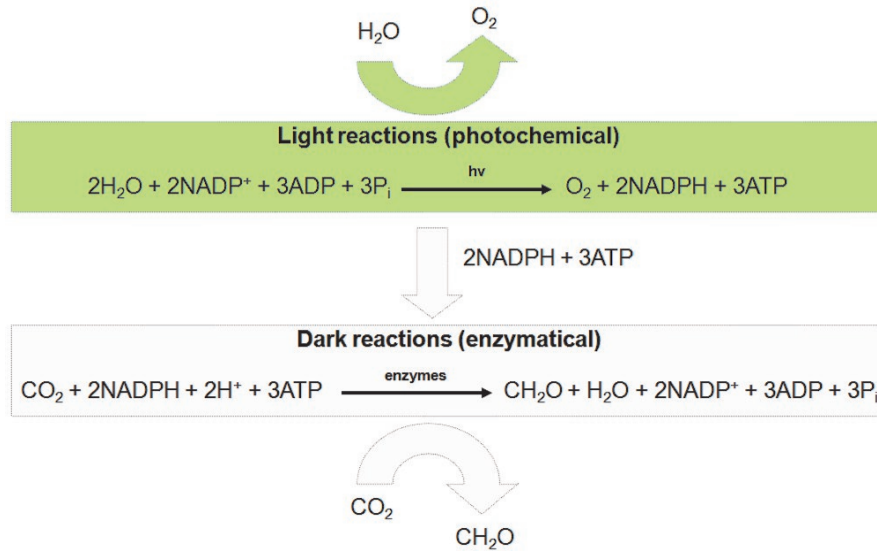


Figura 1: Resumen esquemático del proceso fotosintético.

En la primera etapa la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos, se produce oxígeno y se almacena energía química en forma de NADPH y ATP, la cual será utilizada en la etapa posterior para reducir dióxido de carbono hasta carbohidratos (azúcares). Como mínimo, 8 moles de fotones son necesarios para producir un mol de oxígeno y para incorporar una molécula de dióxido de carbono como carbohidratos. A partir de estos carbohidratos se produce nueva biomasa.

Sin embargo, el proceso fotosintético no es perfecto. La Figura 2 muestra una curva típica que relaciona el proceso fotosintético con la irradiancia mediante la producción de oxígeno (P_{O_2}) y la intensidad lumínica (PFD) recibida dentro del rango PAR (radiación fotosintéticamente activa). Además, dicha figura muestra también el rendimiento cuántico en la producción de oxígeno (QY_{O_2}), que es igual a la cantidad de oxígeno producido (moles) por cantidad de intensidad PAR absorbida (mol de fotones).

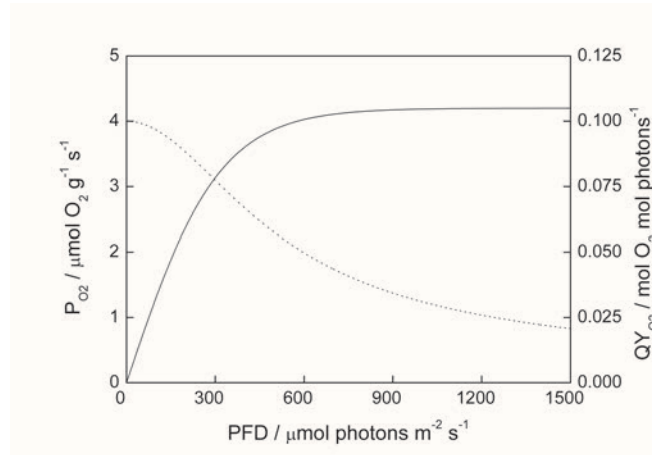


Figura 2: *Típica curva PI que muestra la tasa fotosintética, representada por la evolución de oxígeno (P_{O_2}), como función de la intensidad luminica (PFD) [-]. La eficiencia fotosintética es representada por el rendimiento cuántico en la producción de oxígeno (QY_{O_2}), el cual también se representa en función de la irradiancia. [..]. Los datos están basados en la capacidad fotosintética de la microalga *Chlorella sorokiniana*.*

Como puede observarse en la Figura, cuando el nivel de irradiancia es bajo la maquinaria fotosintética recibe menos fotones de los que puede procesar. A estas intensidades el crecimiento celular está foto-limitado y la eficiencia fotosintética es elevada ya que la mayoría de la energía lumínica absorbida es invertida en la producción de biomasa. La tasa fotosintética, representada por la producción de oxígeno (P_{O_2}), incrementa hasta que el nivel de irradiancia es saturante, donde el crecimiento pasa a estar limitado por las reacciones de la fase oscura de la fotosíntesis. Al mismo tiempo la eficiencia fotosintética, representada por el rendimiento cuántico en la producción de oxígeno (QY_{O_2}), disminuye. Esto es debido a que la tasa de absorción de la energía luminosa incrementa linealmente con la intensidad lumínica mientras que el proceso fotosintético empieza a estar saturado. En este momento, el exceso de energía absorbido tiene que ser disipado en forma de calor mediante diferentes procesos que son normalmente referidos como quenching no fotoquímico (NPQ). Gracias a



estos procesos las microalgas son capaces de aclimatarse a condiciones de alta irradiancia previniendo la fotoinhibición. Pero, consecuentemente, gran parte de la energía absorbida no será utilizada para la producción de biomasa, lo cual hace que se reduzca automáticamente la eficiencia fotosintética.

Además de la luz, también la temperatura afecta a la actividad fotosintética y con ello al crecimiento de las microalgas, especialmente a las reacciones bioquímicas que tienen lugar en el periodo de oscuridad. Las bajas temperaturas desencadenan una tasa metabólica menor, por lo que una menor cantidad de la energía absorbida es convertida en carbohidratos. La ralentización de las reacciones bioquímicas deriva en la acumulación de energía lumínica no utilizada y en la sobre-excitación de la maquinaria fotosintética. En este sentido, temperaturas subóptimas para el crecimiento conllevan un desequilibrio entre la energía lumínica absorbida mediante las reacciones fotoquímicas y la energía utilizada en el metabolismo. Las microalgas utilizan los mismos sistemas de defensa contra la sobre-excitación del aparato fotosintético a bajas temperaturas que a altas irradiancias, el quenching no fotoquímico (NPQ).

1.3. Producción de microalgas en exterior

Según el carácter fotosintético de las microalgas, su cultivo en exterior, con la luz solar como fuente de energía, es necesario para rentabilizar el proceso. Sin embargo, en el exterior las microalgas están expuestas continuamente a un ambiente cambiante en términos de irradiancia y temperatura. En este sentido, las algas experimentan diariamente cambios en la

intensidad lumínica, así como sufren los cambios propios de las diferentes estaciones, los cuales también están asociados a la localización del sistema de cultivo.

Además de la irradiancia, también la temperatura en el exterior es cambiante y afecta a la productividad final, como se ha comentado anteriormente. Aunque en la mayoría de los sistemas de cultivo actuales la temperatura se mantiene constante en su valor óptimo para el crecimiento de la microalga utilizada, esto repercute en los costes de producción. Si el enfriamiento durante el verano o el calentamiento durante el invierno pudieran ser evitados el proceso sería en general más rentable.

Como se ha apuntado anteriormente, el proceso fotosintético no es perfecto y la eficiencia fotosintética alcanzada bajo condiciones de irradiancia solar es mucho menor cuando se compara con la máxima eficiencia que podría alcanzarse bajo condiciones de luz limitante. Pérdidas debidas a la reflexión de la luz en la superficie de los fotobiorreactores, a procesos de foto-respiración, o al mantenimiento celular, disminuyen aún más la eficiencia fotosintética. El efecto de la foto-saturación, sin embargo, es considerado el mayor proceso limitante de la eficiencia en el uso de la luz bajo condiciones reales de irradiancia. Una mayor comprensión de dicho efecto, así como la minimización del mismo ayudaría a desarrollar un proceso de producción de microalgas más eficiente.

Áreas geográficas con condiciones de alta irradiancia a lo largo de todo el año son consideradas óptimas para el cultivo de microalgas. Sin embargo, no existen muchos datos de producción de microalgas en exterior y la evaluación de la eficiencia fotosintética bajo condiciones reales de irradiancia es necesaria para poder desarrollar estrategias de cultivo óptimas.

Esta tesis presenta una visión general sobre la productividad y eficiencia fotosintética de *Chlorella sorokiniana* bajo condiciones de irradiancia reales simuladas en un fotobiorreactor a escala de laboratorio. Se evalúan diferentes estrategias destinadas a minimizar y/o evitar la fotosaturación. Finalmente, se pone de manifiesto el potencial de *C. sorokiniana* para la producción de biomasa y de otras moléculas de valor añadido para una región de alta irradiancia (Huelva, Andalucía, España).

1.4. *Chlorella sorokiniana*

En este estudio, *Chlorella sorokiniana* se ha utilizado como organismo modelo para evaluar la producción de biomasa en un fotobiorreactor panelar. Su elevada tasa específica de crecimiento, su versatilidad para soportar condiciones de elevada temperatura o irradiancia, así como la disponibilidad de estudios comparables, nos hizo elegirla como estirpe de referencia. Además, el género *Chlorella* es de los más usados actualmente para la producción de biomasa dada su elevada tasa de crecimiento. La composición bioquímica de dicho género las hace ser consideradas fuente de carbohidratos, proteínas y vitaminas hoy día. También en la producción de biocombustibles podría jugar un papel importante, dada su composición celular y elevada tasa de crecimiento.

Específicamente, *Chlorella sorokiniana* es una microalga de agua dulce con una tasa específica de crecimiento máxima muy elevada ($\mu_{\max} = 0.27 \text{ h}^{-1}$). Presenta carácter mesofílico, creciendo bien en el margen de temperatura entre 20 y 45 °C, siendo 37 °C la temperatura óptima para su cultivo. Además, *C. sorokiniana* tolera elevados valores de irradiancia. Todo

esto la hace ser considerada una buena candidata para la producción de biomasa en áreas con elevada irradiancia.

2. Objetivos de la Tesis

Como se ha comentado anteriormente, la luz es el principal sustrato para la producción de microalgas. Regiones con alta irradiancia y temperaturas moderadas a lo largo de todo el año son, por lo tanto, consideradas idóneas para la producción de biomasa de microalgas. Sin embargo, la fotosíntesis no es un proceso perfecto, y las bajas eficiencias fotosintéticas alcanzadas en cultivos en el exterior, especialmente bajo condiciones de alta irradiancia, limitan el desarrollo de sistemas de producción de microalgas a escala comercial.

Por tanto, debido a que el exceso de luz reduce la eficiencia fotosintética en el exterior, se requiere un mayor conocimiento sobre el efecto de la foto-saturación en el proceso fotosintético con objeto de mejorar la productividad de los cultivos. En este sentido, experimentos a nivel de laboratorio donde pueden simularse condiciones reales de irradiancia, a la vez que se mantienen el resto de parámetros operacionales en sus valores óptimos, proporcionan una mejor comprensión sobre el cultivo de microalgas.

Con el objeto de evaluar la productividad y eficiencia fotosintética potenciales de *Chlorella sorokiniana* en Huelva (suroeste de España), en esta

Tesis se simulan condiciones de irradiancia propias del periodo estival, así como del invierno, en dicha región. Se evalúan diferentes estrategias para minimizar o evitar los efectos de la foto-saturación y de la fotoinhibición y se discute la producción de biomasa de *C. sorokiniana* en el lugar geográfico del estudio.

La obtención de elevadas productividades anuales está limitada por la baja productividad alcanzada durante el invierno. La baja irradiancia, junto con las bajas temperaturas típicas de este periodo, afecta drásticamente a la eficiencia fotosintética. Es por ello que la mayoría de los datos publicados sobre productividades se restringen a estaciones más cálidas, como la primavera o el verano. No obstante, es necesario comprender el comportamiento de las microalgas bajo condiciones típicas de invierno para poder optimizar la producción a lo largo de todo el año. En el **Capítulo 2** de esta Tesis se evalúa cuantitativamente la productividad y eficiencia fotosintética de *Chlorella sorokiniana* bajo condiciones extremas de invierno típicas de la región de estudio.

Durante el periodo estival, la elevada intensidad lumínica asociada a esta estación da lugar a una menor eficiencia fotosintética debido al efecto de la foto-saturación, y posiblemente de la fotoinhibición, sobre el proceso fotosintético. El **Capítulo 3** evalúa el efecto de la foto-saturación estival en la eficiencia fotosintética y productividad de *C. sorokiniana*. Para ello, se simula la máxima irradiancia solar experimentada sobre un fotobiorreactor horizontal mientras que la temperatura se controla en su valor óptimo para el crecimiento.

Los experimentos descritos en el Capítulo 2 y 3 fueron realizados bajo iluminación continua, la cual obviamente no tiene lugar en un proceso de

producción en exterior. La eficiencia fotosintética y la productividad bajo ciclos reales de día/noche son, por lo tanto, evaluadas y descritas en los siguientes capítulos.

En el **Capítulo 4** se estudia una de las estrategias más populares para minimizar la foto-saturación en cultivos de microalgas en el exterior: la dilución de la luz mediante la disposición vertical de los fotobiorreactores. El efecto de la dilución de la luz en la productividad y eficiencia fotosintética de *C. sorokiniana* se evalúa cuantitativamente bajo condiciones de irradiancia estivales propias de la región de estudio, simulando el ciclo de luz/oscuridad propio de un día de verano en dicha región.

La operación de fotobiorreactores en modo luminostato, el cual adapta continuamente la densidad celular a los valores de irradiancia reales, para prevenir zonas no iluminadas y maximizar la captura de la luz dentro del cultivo, se ha propuesto también como medio para obtener mayores eficiencias fotosintéticas. Por ello, los experimentos mostrados en el **Capítulo 5** se realizaron operando el fotobiorreactor como luminostato, simulando de nuevo las condiciones de irradiancia estivales en un fotobiorreactor vertical ya estudiadas anteriormente. La productividad y eficiencia fotosintética se evalúan y comparan con las obtenidas durante la operación del fotobiorreactor en modo quimiostato (Capítulo 4).

El **Capítulo 6** es una discusión general sobre los principales resultados de esta Tesis. Se discute la producción potencial de biomasa de *Chlorella sorokiniana* en una zona de alta irradiancia en base a los datos obtenidos experimentalmente.

3. Diseño experimental

El fotobiorreactor utilizado en esta Tesis es un fotobiorreactor panelar a escala de laboratorio con un estrecho paso óptico, el cual es iluminado por un panel compuesto de LEDs (diodos emisores de luz) rojos. La intensidad recibida en la superficie del fotobiorreactor puede variarse desde 0 a 3000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en el rango PAR (400-700 nm) mediante control externo. Dicho control permite simular ciclos de irradiancia reales mediante variación del output de dicho panel. La influencia de diferentes orientaciones del fotobiorreactor puede ser entonces estudiada mediante modificación del perfil de irradiancia en base a datos tabulados previamente.

A pesar de que no existe una correlación directa entre el espectro de la luz solar y los LEDs empleados en esta Tesis, ninguna de las lámparas comerciales disponibles hoy día proporcionan un espectro parecido. Además, de acuerdo con el espectro de acción de la fotosíntesis ya definido en los años 40 o 50, cualquier fotón dentro del rango PAR puede ser utilizado en el proceso fotosintético con similar eficiencia. Este hecho, combinado con las ventajas técnicas de usar LEDs (larga duración, bajo consumo energético, elevado y homogéneo flujo de fotones, mínimo aporte de calor y habilidad para rápidamente modificar la intensidad) las hace ser consideradas óptimas para el desarrollo de experimentos a nivel de laboratorio.

La Figura 3 muestra fotografías del fotobiorreactor empleado. Las dimensiones de la cámara de cultivo son: 25 cm de ancho, 60 cm de alto y 1.4 cm de paso óptico. El volumen útil del fotobiorreactor es de 1.7 L, siendo el resto utilizado como cámara para el intercambio gaseoso.

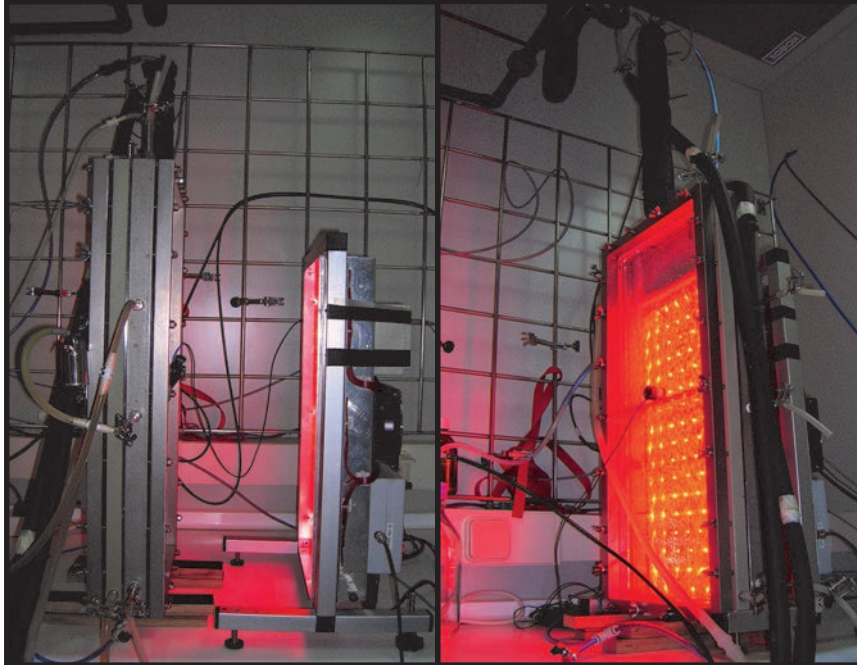


Figura 3: *Fotografías del fotobiorreactor panelar y del panel de lámparas LED usados en esta Tesis.*

El cultivo de microalgas es homogeneizado mediante adición de aire a través de un tubo de silicona con pequeños orificios (cada 0.5 cm) en la base del fotobiorreactor. Este aire permite también eliminar el exceso de oxígeno producido durante la fotosíntesis y la tasa de aireación es continuamente medida y controlada mediante controladores de flujo. Dióxido de carbono es añadido separadamente mediante un micro-difusor en forma de pequeñas burbujas para facilitar la transferencia gaseosa. La cantidad de CO₂ suministrada es también controlada mediante un controlador de flujo, y dependiendo de las necesidades de cada experimento puede utilizarse como medio para controlar el pH o simplemente se mantiene una concentración constante en el cultivo.



La concentración de oxígeno disuelto en el cultivo es además monitorizada, pero no controlada, como indicador de la evolución del proceso de cultivo.

El fotobiorreactor está además equipado con un sensor de espuma conectado a un circuito de adición de antiespumante que responde a un incremento en la conductividad.

La temperatura es medida directamente dentro de la cámara de cultivo y es controlada mediante la regulación de la temperatura en una cámara de agua contigua a la cámara de cultivo. Dicha cámara está conectada a un termostato que responde al valor de temperatura dentro del cultivo. Además, el fotobiorreactor está instalado en una cámara termostaticada donde la temperatura ambiente es mantenida siempre en 20 °C para facilitar el funcionamiento de los diferentes aparatos.

Como se ha comentado anteriormente, la intensidad lumínica del panel de LEDs puede ser continuamente adaptada al perfil de irradiancia deseado. Dicha irradiancia será además verificada en la superficie del fotobiorreactor con un sensor Li-cor que mide la intensidad lumínica en el rango PAR.

El fotobiorreactor está además equipado con un condensador para evitar pérdidas de agua del cultivo mediante evaporación. La adición de aire pre-humidificado también contribuye a minimizar dicha pérdida y previene la aparición de depósitos de sales en los orificios del distribuidor de aire. El condensador está conectado a un segundo termostato en el cual la temperatura es fijada en 4 °C.

Finalmente, el reactor está equipado con diferentes puertos para la adi-

ción de medio de cultivo, de inóculo o de antiespumante. Además, presenta otros puertos para extraer el exceso de cultivo cuando se opera en continuo, así como para la toma de muestra. El tubo empleado para extraer el exceso de cultivo determina el nivel de líquido dentro de la cámara de cultivo. Un último puerto es además necesario en la parte inferior del reactor para facilitar su completo vaciado.

4. Principales resultados de la Tesis Doctoral

Elevadas productividades anuales de biomasa de microalga sólo pueden obtenerse cuando la luz solar se utiliza eficientemente a lo largo de las diferentes estaciones. Durante el invierno, la productividad es baja debido a las condiciones de luz y temperatura asociadas a esta estación. Por ello, la productividad y eficiencia fotosintética de *Chlorella sorokiniana* son evaluadas en el **Capítulo 2** bajo condiciones extremas propias del invierno en la zona de estudio, Huelva, España. La máxima intensidad experimentada sobre un fotobiorreactor horizontal ($800 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) así como la máxima temperatura alcanzada durante el mediodía ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) en el invierno se simularon en un fotobiorreactor panelar con un estrecho paso óptico y a escala de laboratorio. El fotobiorreactor se operó en modo quimiostato y los resultados obtenidos bajo las condiciones ensayadas se compararon con una situación menos extrema, en la que la temperatura de cultivo se mantuvo en el óptimo para el crecimiento de *C. sorokiniana* ($38 \text{ }^\circ\text{C}$).

Como puede verse en la Figura 4, cuando la temperatura se mantuvo en su óptimo, la máxima productividad se alcanzó a una tasa de dilución igual a 0.18 h^{-1} ($P_v = 0.28 \text{ g Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), así como la máxima eficiencia fotosintética, medida por el rendimiento de la biomasa en términos de la luz suministrada ($Y_{x,E} = 1.36 \text{ g mol fotones suministrados}^{-1}$). Sin embargo, cuando la temperatura es subóptima la tasa específica de crecimiento de *C. sorokiniana* resultó sorprendentemente afectada, siendo muy baja y no soportando operación en continuo a una tasa de dilución mayor a 0.02 h^{-1} . La baja actividad metabólica a temperaturas subóptimas da lugar a una reducción en la necesidad de sustrato y, en el caso de las microalgas, de luz.

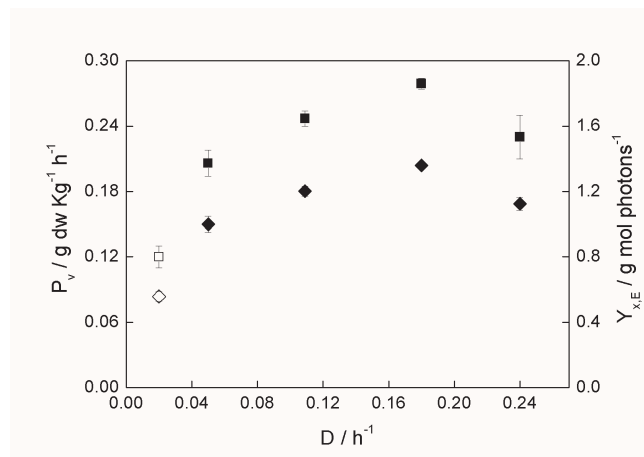


Figura 4: Productividad volumétrica (P_v , ■) y rendimiento de la biomasa en energía lumínica ($Y_{x,E}$, ◆) durante el cultivo como quimostato a $800 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y a la temperatura óptima de cultivo de *C. sorokiniana* ($38 \text{ }^\circ\text{C}$). Los símbolos abiertos corresponden a una temperatura de cultivo subóptima ($20 \text{ }^\circ\text{C}$).

Consecuentemente, la máxima irradiancia típica de invierno es experimentada por las microalgas como excesiva, lo que resulta en fotosaturación y deriva en una baja eficiencia fotosintética y productividad ($Y_{x,E} = 0.6 \text{ g mol fotones suministrados}^{-1}$ $P_v = 0.1 \text{ g Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Además, cuando la temperatura es subóptima la abundancia relativa de los carotenoides respecto a la clorofila es mayor, indicando posiblemente la activación de procesos de disipación del exceso de energía absorbida.

El control de temperatura, así como la dilución de la irradiancia recibida en los fotobiorreactores durante el invierno podrían mejorar notablemente la productividad. Sin embargo, la menor disponibilidad de luz durante esta época aún deriva en una menor productividad volumétrica cuando se compara con condiciones de irradiancia estivales, lo que sugiere que el fotobiorreactor estaría operando en condiciones de foto-limitación durante el invierno.

Durante el verano es esperable una mayor productividad debido a la disponibilidad de una mayor irradiancia. No obstante, durante este periodo la luz también puede derivar en foto-saturación, limitando con ello la eficiencia fotosintética. Para intentar demostrarlo, en el **Capítulo 3** se evalúa la productividad y eficiencia fotosintética de *Chlorella sorokiniana* bajo condiciones de irradiancia extremas propias de la zona de estudio, Huelva, España. Con tal objetivo, se simuló en un fotobiorreactor horizontal la máxima intensidad experimentada en la zona durante el verano ($2100 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Dicha intensidad es similar a la máxima irradiancia localizada en superficies horizontales a latitudes inferiores a 37° . En este caso la temperatura de cultivo se mantuvo en el óptimo para el crecimiento de *C. sorokiniana* (38°C). La operación del fotobiorreactor se realizó en modo quimiostato y se estudió el efecto de la tasa de dilución, comprendiendo el rango de dilución empleado desde 0.06 h^{-1} hasta 0.26 h^{-1} .

La productividad máxima se obtuvo a una tasa de dilución igual a 0.24 h^{-1} , con un valor de $7.7 \text{ g of biomasa seca m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (por m^2 de área del fotobiorreactor iluminada), siendo la productividad volumétrica de $0.5 \text{ g de biomasa seca L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A esta tasa de dilución, la concentración dentro del reactor es de 2.1 g L^{-1} y la eficiencia fotosintética de $1.0 \text{ g de biomasa producida por mol de fotones}$. La Figura 5 muestra la productividad volumétrica y eficiencia fotosintética obtenidas para cada tasa de dilución ensayada.

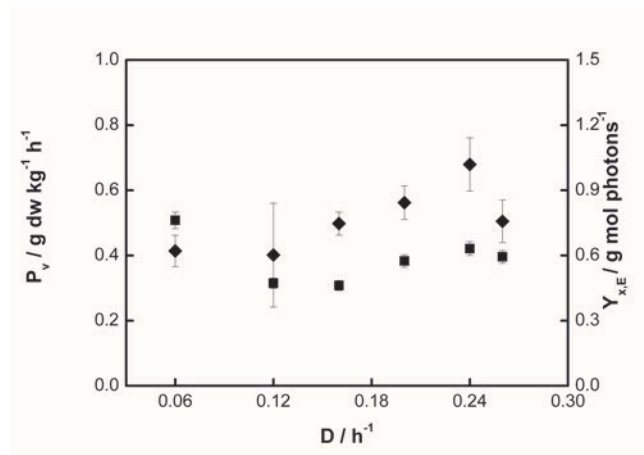


Figura 5: Productividad volumétrica (P_v , ■) y rendimiento de la biomasa en energía lumínica ($Y_{x,E}$, ◆) durante el cultivo como quimioestado a $2100 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y a la temperatura óptima de cultivo de *C. sorokiniana* ($38 \text{ }^\circ\text{C}$).

La máxima eficiencia fotosintética alcanzada es elevada, aunque inferior al máximo teórico para esta microalga ($1.8 \text{ g biomasa por mol de fotones}^{-1}$), lo cual debe estar relacionado con la foto-saturación experimentada por el cultivo a este nivel de irradiancia y la consecuente disipación de energía lumínica absorbida en forma de calor (quenching no fotoquímico). En este sentido, los resultados muestran que un fotobiorreactor panelar con un estrecho paso óptico y dispuesto en posición horizontal podría utilizarse para cultivar *C. sorokiniana* eficientemente incluso bajo condicio-

nes de luz sobresaturantes.

A una baja concentración celular y a una tasa de dilución próxima a la máxima tasa específica de crecimiento de esta microalga, se obtienen elevadas productividades y eficiencia fotosintética. En base a ello, se concluye que los efectos de la fotoinhibición bajo las condiciones operacionales probadas son mínimos. Sin embargo, debe remarcarse que los resultados están fundamentados en el diseño del fotobiorreactor en sí, así como en la microalga utilizada, la cual presenta una tasa específica de crecimiento muy elevada. El estrecho paso óptico y la tasa de aireación/mezclado del fotobiorreactor hacen que se mejore la distribución de la luz en el interior del cultivo y permiten a las células moverse desde zonas donde perciben la luz como saturante hasta zonas donde experimentan una total oscuridad.

Una vez evaluada la eficiencia fotosintética de *Chlorella sorokiniana* bajo condiciones de luz sobre-saturantes propias del invierno y del periodo estival en la zona de estudio, el **Capítulo 4** evalúa una de las técnicas más simples propuestas para minimizar la foto-saturación y/o foto-inhibición de los cultivos: la dilución de la intensidad luminosa mediante disposición vertical del fotobiorreactor. En este sentido, se simularon condiciones de irradiancia reales propias de un fotobiorreactor dispuesto en posición horizontal y vertical, con el objetivo de evaluar la productividad y la eficiencia fotosintética de *C. sorokiniana*. El ciclo diario de irradiancia propio del periodo estival en la región de estudio se simuló y aplicó al fotobiorreactor mediante el panel de LEDs.

La máxima irradiancia experimentada en ambas disposiciones difiere notablemente, siendo $400 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el máximo recibido en un fotobiorreactor vertical y $1800 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en un fotobiorreactor horizontal. La simple disposición vertical del fotobiorreactor hace que la intensidad lumínica recibida sea dispersada sobre una mayor superficie y, con ello, la intensidad promedio recibida es mucho menor. En la Figura 6 se muestran los dos perfiles de irradiancia simulados.

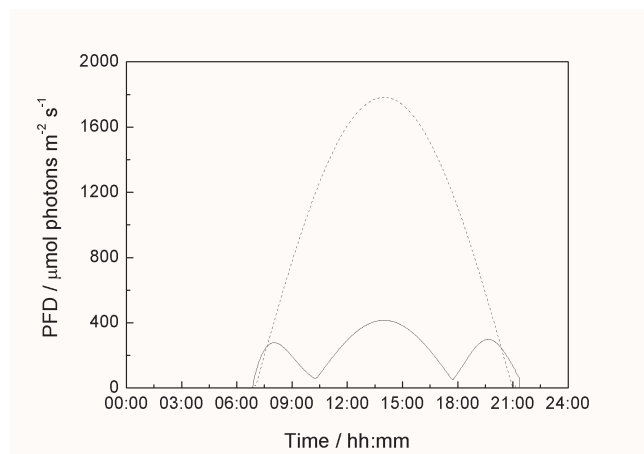


Figura 6: Perfiles de irradiancia simulados, expresados como densidad de flujo de fotones en el rango PAR (PFDF). La línea continua representa el perfil de irradiancia experimentado en una superficie vertical y la línea discontinua en una superficie horizontal.

La mayor productividad volumétrica se alcanza cuando el fotobiorreactor está colocado en posición horizontal, siendo igual a 4 g de biomasa producidos por kilogramo de cultivo por día. Sin embargo, la máxima eficiencia fotosintética se alcanza cuando el fotobiorreactor es colocado en posición vertical (1.3 g de biomasa producida por mol de fotones suministrados en el rango PAR). Dicho valor es notablemente superior al obtenido en el fotobiorreactor horizontal (0.85 g de biomasa por mol de fotones $^{-1}$). No obstante, la eficiencia obtenida es aún inferior al máximo teórico para

Chlorella sorokiniana comentado anteriormente (1.8 g mol^{-1}). Bajo el perfil de irradiancia vertical solo el 30% de la luz recibida por el cultivo es disipada en forma de calor cuando el fotobiorreactor se coloca en posición vertical, mientras que en sistemas horizontales la disipación alcanza el 60%. Además, cuando el fotobiorreactor se coloca en posición horizontal el proceso fotosintético se satura a media mañana, permaneciendo así hasta media tarde (Figura 7). Esto hace que la eficiencia fotosintética sea mayor en los sistemas verticales.

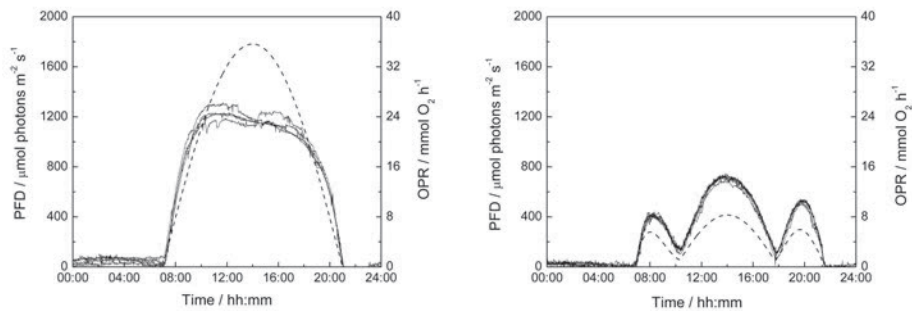


Figura 7: Tasa de producción de oxígeno (OPR) bajo las dos disposiciones ensayadas. La figura de la izquierda muestra la producción en el sistema horizontal y la figura de la derecha en el sistema vertical. Los perfiles de irradiancia correspondientes están también incluidos en las gráficas, en línea discontinua.

La eficiencia fotosintética alcanzada en este trabajo es, además, muy elevada, considerando que las pérdidas de biomasa durante la noche y los requerimientos propios del mantenimiento celular se han incluido en los cálculos. A pesar de obtenerse una menor productividad por unidad de volumen en los fotobiorreactores verticales, la posibilidad de colocar varias unidades en la misma superficie hace que la productividad final por unidad de área sea mayor.

R

En este Capítulo se presenta, además, una estimación aproximada de la producción anual de biomasa de *C. sorokiniana* en el suroeste de España. Dicha estimación se ha realizado en base a la irradiancia solar anual promedio en el sitio geográfico de estudio y en la extrapolación, a todo el año, de la eficiencia fotosintética obtenida en el fotobiorreactor vertical. Sin embargo, en un sistema real de reactores panelares verticales la disposición de los fotobiorreactores ha de ser optimizada para poder maximizar la captura de la luz y minimizar el efecto de sombreado entre las diferentes unidades.

La operación de fotobiorreactores en modo luminostato, la cual adapta continuamente la densidad celular a los valores de irradiancia reales, para prevenir zonas no iluminadas y maximizar la captura de la luz dentro del cultivo, se ha propuesto como medio para obtener mayores eficiencias fotosintéticas. Sin embargo, dicho control de biomasa no ha sido aún probado bajo ciclos reales de irradiancia. En el **Capítulo 5** el fotobiorreactor es operado como luminostato, aplicando el mismo perfil de irradiancia simulado en el Capítulo 4 para la disposición del fotobiorreactor vertical. Para evaluar la productividad y eficiencia fotosintética de *Chlorella sorokiniana* se usaron diferentes parámetros de transmitancia, comprendiendo desde 4 a 20 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La Figura 8 representa un ejemplo del control de la transmitancia aplicado al sistema, así como la transmitancia real conseguida bajo el perfil de irradiancia aplicado.

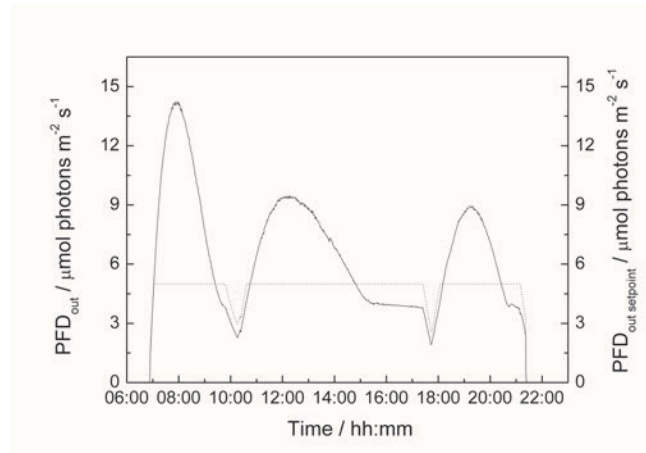


Figura 8: Transmitancia deseada (línea discontinua) y transmitancia real (línea continua) obtenida bajo una de las condiciones ensayadas.

Como puede verse en dicha Figura, la operación del fotobiorreactor como luminostato no pudo ser mantenida bajo condiciones de irradiancia variables (ciclo real día/noche) debido a la diferencia en la cinética de la irradiancia y del metabolismo de las microalgas. Se hace necesaria una futura modificación de dicho control, basado en un valor variable del punto de compensación de la fotosíntesis, para que este pueda ser aplicado eficientemente en condiciones de cultivo en exterior.

La máxima productividad volumétrica ($1.22 \text{ g Kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y eficiencia fotosintética ($1.27 \text{ g de biomasa por mol fotones aplicados}^{-1}$) se obtuvieron cuando la transmitancia se situaba entre 4 y $6 \text{ } \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La eficiencia fotosintética resultante es comparable a la obtenida bajo la operación como quimiostato (Capítulo 4).

Las eficiencias fotosintéticas obtenidas durante la operación como luminostato y quimiostato fueron similares (Capítulos 4 y 5), sugiriendo proximidad a la máxima eficiencia que podría esperarse en la práctica. Apa-

R

rentemente, la continua adaptación de la densidad celular a la irradiancia no conduce a una mejora significativa de la productividad, como se había sugerido. Sin embargo, un control más avanzado de la densidad celular basado en un luminostato dinámico (con un punto de compensación de la fotosíntesis variable a lo largo del día) podría conducir a una futura mejora. No obstante, las eficiencias fotosintéticas obtenidas en los Capítulos 4 y 5 deben estar cercanas a la máxima eficiencia esperable cuando se cultiva *C. sorokiniana* en el exterior bajo condiciones de irradiancia estivales en un fotobiorreactor vertical.

Como se ha comentado anteriormente, en la producción de microalgas en el exterior la conversión eficiente de la luz solar a través de la fotosíntesis está aún limitada por la foto-saturación experimentada por las células. La maximización de la eficiencia fotosintética en áreas con alta irradiancia, mediante la minimización/ausencia de la foto-saturación ha de conducir a mayores productividades. El **Capítulo 6** abunda en dicha cuestión mediante la discusión de los principales resultados de esta tesis. El análisis de la composición de la biomasa producida bajo condiciones de irradiancia máxima de invierno y verano permite, además, discutir el potencial de *Chlorella sorokiniana* como productora de luteína.

La habilidad de *Chlorella sorokiniana* para soportar condiciones de alta irradiancia, junto con la configuración del fotobiorreactor, hace que *C. sorokiniana* sea considerada una candidata ideal para la producción de biomasa en el suroeste de España así como en localizaciones similares.

Chlorella sorokiniana es normalmente producida como fuente de proteínas y carbohidratos, pero sin embargo también pueden obtenerse de dicha microalga algunos ácidos grasos y compuestos antioxidantes de valor. Además, su potencial como fijadora de dióxido de carbono procedente de efluentes gaseosos ha sido ya ampliamente demostrado, al igual que su potencial para el tratamiento de aguas residuales y en fitorremediación. Nuestro estudio, sin embargo, revela que también puede ser considerada como productora de luteína y neoxantina dado su elevado contenido celular.

La luteína es una xantofila -carotenoide que presenta uno o más átomos de oxígeno en su estructura- con demostrada influencia en la prevención o disminución de los efectos de ciertas enfermedades degenerativas humanas. Entre ellos, destaca su efecto benéfico en la prevención de la degeneración macular. La neoxantina, por otro lado, induce la apoptosis en células prostáticas cancerosas. La presencia de otros productos con valor añadido en las microalgas redundan positivamente en su aplicación desde un punto de vista comercial.

Hoy día la luteína se obtiene de la caléndula, donde el contenido en luteína es solo del 0.03% en peso. En este sentido, la producción de luteína requiere un intensivo proceso de labranza así como grandes extensiones de terreno agrícola. Por otro lado, la síntesis química es posible pero aún muy costosa. Por todo ello, las microalgas son consideradas una fuente alternativa de luteína dado su elevado contenido celular (de 0.5 a 1.2% en peso seco), su mayor productividad y por presentar además otros componentes celulares beneficiosos para la salud, como proteínas o lípidos.

R

En esta Tesis se han obtenido altas productividades de luteína, similares o mayores a las ya publicadas para otros procesos a escala comercial con otras microalgas.

Summary



Microalgal biomass production seems to be most attractive in regions with high irradiance and moderate temperatures along the year because light is usually the limiting substrate. However, photosynthesis is not a perfect process and the low photosynthetic efficiency reached in outdoor production systems, especially under high irradiance, restricts the development of commercially feasible microalgal production processes.

More knowledge on the light saturation effect, the main factor limiting microalgae photosynthetic efficiency outdoors, is needed. In laboratory experiments where real irradiance conditions can be simulated, while maintaining all other process conditions at the optimal levels, a better insight in microalgae cultivation can be obtained.

In this thesis, the simulation of real summer and winter irradiation conditions in Huelva, southern Spain, is realized in order to assess the potential productivity and photosynthetic efficiency of *Chlorella sorokiniana* in that region. Different strategies to minimize or avoid effects of photosaturation and photoinhibition are described and the potential production of *C. sorokiniana* in the study site is presented.

High annual productivities are limited by the lower microalgae productivity associated to winter time. The lower irradiance and temperature conditions are mainly affecting the photosynthetic efficiency of microalgae during that season. While reported algal productivity data are usually based on spring or summer time, also insight into microalgae performance under winter conditions is needed to optimize microalgae production over the whole year. In **Chapter 2** the quantitative assessment of productivity and photosynthetic efficiency of *Chlorella sorokiniana* is described under extreme winter conditions at the study site. As it is proven in this chapter, the combination of maximal winter irradiance in a horizontal photobioreactor and suboptimal growth temperature resulted in the microalgae cells experiencing over-saturating light conditions. The slow algae metabolism found at suboptimal growth temperature resulted in a decline in substrate requirements,





among others the requirement for light. The maximal winter irradiance therefore was experienced as over-saturating and photodamage occurred. Dissipation of excessive absorbed light through non-photochemical quenching (NPQ) was needed, resulting in a low photosynthetic efficiency. When temperature was controlled at its optimal value for growth of *C. sorokiniana*, a higher photosynthetic efficiency was found, which resulted in a higher winter productivity. However, the lower light availability during winter time still leads to a lower volumetric productivity when compared with summer irradiance, showing that the photobioreactor is operated in the photolimited regime during that season.

When moving to summer conditions, the high light intensity associated to that season will directly result in a reduced photosynthetic efficiency because of light saturation and possibly also because of photoinhibition. **Chapter 3** deals with the effect of light saturation during summer time on photosynthetic efficiency and productivity of *C. sorokiniana*. Maximal irradiance over a horizontal photobioreactor was applied while controlling temperature at its optimal value for growth. It is shown that a short light path panel photobioreactor placed horizontally can be used to grow *C. sorokiniana* efficiently even under over-saturating light conditions. A high productivity and photosynthetic efficiency were found at a low biomass concentration and a dilution rate close to the maximal specific growth rate. Based on these findings we concluded that photoinhibition effects were minimal. However, it must be addressed that these results are based on the narrow light path and good mixing rate of the photobioreactor used, which improves light distribution and allows cells to quickly move from saturating light zones to dark zones. Moreover, the microalgae used has a high specific growth rate. The experiments described in Chapter 2 and 3 were based on continuous illumination, which should not be considered in a real outdoor production process. The assessment of photosynthetic efficiency and productivity under daily light cycles is therefore described in the following chapters.

In **Chapter 4** one of the most popular strategies to minimize photosaturation in outdoors microalgae cultivation is evaluated: light dilution by vertical reactor orientation. The light dilution effect on productivity and photosynthetic efficiency of *Chlorella sorokiniana* was quantitatively assessed during simulated summer irradiance conditions at the study site. Under the same daily light cycle, only 30% of the supplied light was dissipated as heat by placing the photobioreactor units vertically, while it accounted for 60% in horizontal systems. Saturation of photosynthesis was already found halfway in the morning for the horizontal system, and it remained saturated until halfway the afternoon. Photosynthetic efficiency therefore was higher in the vertical system, and the value reached in this work was very high considering that also night biomass loss and maintenance requirements were included in the calculation. Moreover, productivity per ground area can be enhanced by placing more vertical photobioreactor-units in the same ground area despite the lower volumetric productivity obtained in the vertical systems. A rough estimation of the annual areal productivity in southern Spain is also presented in this chapter. It is based on the extrapolation to the whole year of the photosynthetic efficiency obtained in the vertical system and the yearly averaged solar irradiance at the study site. However, in a real system of vertical panel reactors the photobioreactor layout needs to be further optimized to maximize sunlight collection and minimize panel shading.

Luminostat operation, which continuously adapts the corresponding biomass density to the irradiance, in order to prevent dark zones and maximize light capture, has been proposed to lead to higher photosynthetic efficiencies. In **Chapter 5** the photobioreactor is operated as a luminostat while simulating a vertical position during summer time. Productivity and photosynthetic efficiency were evaluated and compared to traditional chemostat operation (Chapter 4). The photosynthetic efficiencies found during luminostat and chemostat operation were equal, indicating that we were already operating very close to the maximal efficiency to be expected. Apparently, adaptation of the biomass concentration to the irradiance does not lead to any further improvement in productivity as it is suggested. A





more advanced biomass control strategy based on a luminostat with a varying set-point could lead to a further improvement. But the photosynthetic efficiencies found in Chapters 4 and 5 must be very close to the maximal efficiency when growing *C. sorokiniana* outdoors under summer irradiance conditions in a vertical photobioreactor and it shows what we might maximally expect for large-scale microalgae production a high irradiance area.

Chapter 6 is a general discussion about the main findings of this thesis. The potential biomass production of *Chlorella sorokiniana* in a high irradiance area is presented based on the experimental data obtained. The ability of *Chlorella sorokiniana* to handle high irradiance, together with the photobioreactor configuration, makes *C. sorokiniana* an ideal candidate for biomass production in Southern Spain as well as many other locations. Moreover, it has been shown that *C. sorokiniana* contains high levels of lutein. Similar or higher lutein productivities to those already reported for commercial scale processes with other microalgae have been calculated. The potential role of *Chlorella sorokiniana* as a lutein producer is therefore discussed in this chapter.

Chapter 1

*Introduction and
thesis outline*



Microalgae

Microalgae are unicellular eukaryotic microorganisms (between 1 and 50 μm) (Figure 1.1), which can form colonies or live as individual cells. They are photoautotrophic organisms capable of using light to metabolize carbon dioxide inside energy-rich organic compounds.

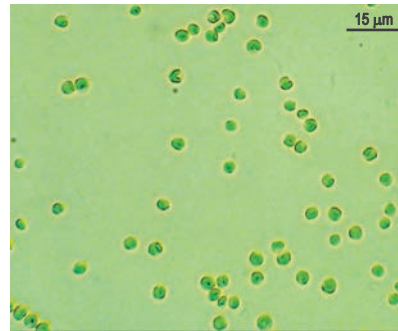


Figure 1.1: Example of a Chlorophyceae: the fresh water microalgae *Chlorella sorokiniana*.

The biodiversity of microalgae is enormous, two hundred thousand species has been estimated to exist but only about thirty five thousand species have been described (Norton et al., 1996). They can be found in different habitats, ranging from fresh to hyper-saline environments. Even acidic and alkaline environments can be optimal for extremophile microalgae.

Commercial interest in microalgae so far is related to their use as aquaculture feedstock and their potential as producers of specific compounds which can be used as nutraceuticals. Value-added molecules can be obtained from these phototrophic microorganisms, such as carotenoids and other vitamins and antioxidants, fatty acids, and specifically poly-unsaturated fatty acids.

However, large scale commercial production processes only date back to the 1950s, when *Chlorella* and *Arthrospira* started to be produced as an alternative nutritious source (Belasco, W., 1997; Grobbelaar, 2010; Schmidt et al., 2010; Spolaore et al., 2006).

Nowadays, microalgae are also considered a promising source of renewable energy and suitable for the fixation of carbon dioxide, although the interest in using microalgae for renewable energy already started in 1970s during the first oil crisis (Spolaore et al., 2006).

I

Several aspects are hindering the industrial exploitation of microalgae. Basically cost of production is too high. Construction of cultivations systems, gassing and mixing the microalgae cultures, harvesting the microalgae and supplying nutrients are still too expensive and require too much energy to make commercial production feasible. Despite these limitations, microalgae are considered one of the most attractive sources of feed, food and next-generation biofuels since they can grow in seawater, on non-arable land, and they have a higher oil and protein yield and a higher growth rate in comparison to traditional crops (Tredici, 2010).

Photosynthetic efficiency

Light energy is usually limiting the productivity of microalgae cultivations systems. For this reason it is important to use the light energy as efficiently as possible. Photosynthesis is the process by which biomass is produced from carbon dioxide and this process is driven by sunlight energy. The photosynthetic process is divided into light and dark reactions. In the light reactions, light energy is absorbed by the photosynthetic machinery, O_2 is released and chemical energy (NADPH and ATP) is produced, which is used in the dark reactions to reduce carbon dioxide to the level of carbohydrates (sugars). Minimally 8 moles of photons are needed to produce one mole of O_2 and incorporate one mole of CO_2 into carbohydrates (biomass). New microalgae biomass is built up from these carbohydrates.

In Figure 1.2, a typical photosynthesis-irradiance (PI) curve is shown. This curve shows the gross specific oxygen production rate (P_{O_2}) of microalgae as a function of light intensity (PAR photon flux density, PFD). In the same curve the quantum yield of oxygen evolution (QY_{O_2}) is shown, which is the amount (mol) of oxygen which can be produced per amount (mol) of PAR photons absorbed. When the level of irradiance is low there is photolimitation; the photosynthetic machinery receives less photons than it can process. At these light intensities the algal growth is light-limited and the efficiency of photosynthesis is high since the larger

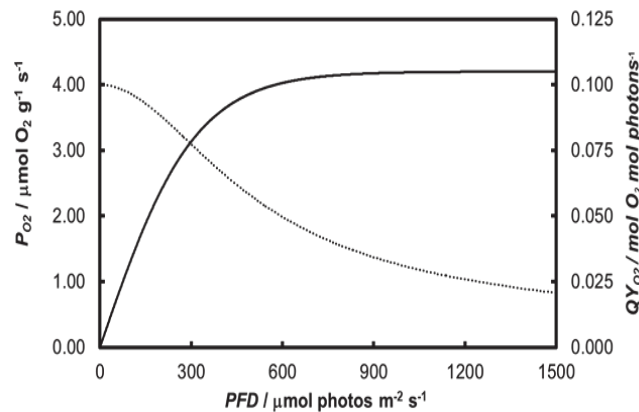


Figure 1.2: Typical PI-curve which shows the gross rate of photosynthesis (i.e. oxygen evolution, P_{O_2}) as a function of light intensity (PFD) [-]. Photosynthetic efficiency is represented as the oxygen quantum yield (QY_{O_2}) and also plotted versus PFD [-]. Numbers are based on the photosynthetic capacity of the green microalgae *Chlorella sorokiniana*.

part of the light energy absorbed by the algae can be allocated to biomass growth. The rate of photosynthesis (i.e. the oxygen production rate, P_{O_2}) increases until the level of irradiance is saturating, where growth becomes limited by the dark reactions of photosynthesis (MacIntyre et al., 2002). At the same time the photosynthetic efficiency (i.e. the quantum yield of oxygen evolution, QY_{O_2}) decreases because the rate of light absorption increases linearly with the light intensity while the rate of photosynthesis saturates. The excess of light energy absorbed will be dissipated as heat via a number of dedicated processes which are usually referred to as non-photochemical quenching (NPQ) (Huner et al., 1998; Maxwell and Johnson, 2000). Thanks to these processes microalgae are able to acclimate to high (sun)light levels preventing photoinhibition. But, consequently, not all the incoming light is used for growth at high light intensities and part is 'wasted' as heat (Huisman et al., 2002). This automatically leads to a drop in photosynthetic efficiency.

Except for light also temperature affects the photosynthetic activity and the growth of microalgae (Coles and Jones, 2000). Although the photochemical 'light' reactions are highly affected by irradiance and not sensitive to temperature, the biochemical 'dark' processes are temperature sensitive. At low temperatures the



metabolic rate is reduced and consequently less absorbed light energy can be converted into carbohydrates (Coles and Jones, 2000; Dauta et al., 1990; Huner et al., 1998). The slow biochemical reactions then can cause accumulation of light energy and over-excitation of the photosynthetic machinery. In this sense, suboptimal temperatures lead to an imbalance between the light absorbed through photochemistry versus the energy utilized through metabolism and algae use the same defense mechanism to over-excitation of the photosynthetic machinery (NPQ) at low temperatures as at high irradiances (Huner et al., 1998; Maxwell et al., 1994).

Outdoor production

Outdoors the algae are continuously exposed to changing irradiation and temperature conditions. In this sense, microalgae are not only exposed to the daily irradiance cycles, but also experience different irradiance levels due to seasonal changes, which are depending on the location of cultivation.

Next to irradiance, also the outdoor temperature affects productivity, as already explained. Though in most algae cultivation systems the temperature is remained at its optimal value for microalgae growth, it is also forming a major burden on production costs. When cooling in summer or heating in winter can be avoided, this will be of great benefit for the overall feasibility of the production process.

As explained above, photosynthesis is not a perfect process and the photosynthetic efficiency achieved under sunlight is much lower when compared with the maximal levels which can be achieved under limiting light levels. Losses due to reflection on the photobioreactor surface, photorespiration, cellular maintenance, will further diminish the photosynthetic efficiency. The effect of photosaturation though is the most dominant process limiting light use efficiently under high light intensities. Understanding and minimization of photosaturation is the only way to

achieve an efficient microalgae production.

Geographical areas with high irradiance conditions along the year are considered optimal for microalgae cultivation. However, evaluation of photosynthetic efficiency under real irradiance conditions is needed in order to develop an optimal production process. This thesis presents an overview on productivity and photosynthetic efficiency of *Chlorella sorokiniana* under simulated irradiance conditions. Different strategies leading to a higher photosynthetic efficiency by avoiding or reducing photosaturation were evaluated. Finally a production process for biomass and other added-value molecules with *Chlorella sorokiniana* is proposed for Huelva, south Spain, the selected study site.



Chlorella sorokiniana

In this thesis *Chlorella sorokiniana* was used as a model organism to evaluate the photobioreactor performance because of its high growth rate, robustness and the availability of comparable studies which could be used as reference. In this sense, *Chlorella* species are the most widely used microalgal strains for biomass production due to their high growth rate. The great variety of chemical components in different *Chlorella* strains makes them a good source of carbohydrates, proteins and vitamins (Matsukawa et al., 2000). Also in biofuel production they may play a role, because of their beneficial cellular composition and high growth rates (Qiao and Wang, 2009; Wahlen et al., 2011).

Specifically, *Chlorella sorokiniana* is a freshwater microalga with a high maximal specific growth rate ($\mu_{\max} = 0.27 \text{ h}^{-1}$) and a mesophilic character ($T_{\text{opt}} = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$). In fact it is the fastest growing eukaryotic microalgae known at the moment. Moreover, *C. sorokiniana* is tolerant to high irradiation levels (Matsukawa et al., 2000; Sorokin, 1959). Altogether this makes *C. sorokiniana* a suitable strain for cultivation in a high irradiance area.

Thesis outline

The potential for algal biomass production in a high irradiance area (Huelva, southern Spain) is studied in this thesis. The productivity and photosynthetic efficiency of *Chlorella sorokiniana* were studied under simulated outdoor irradiance conditions in a lab-scale panel photobioreactor (Figure 1.3).

I

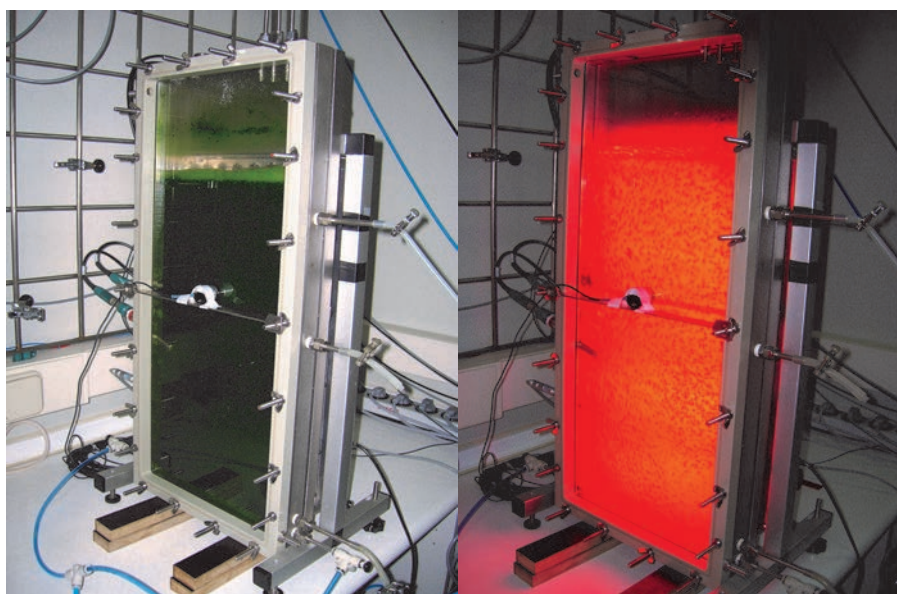


Figure 1.3: Panelar lab-scale photobioreactor used in the experiments.

The effect of extreme winter conditions is discussed in **Chapter 2**, where the strong influence of temperature on algal productivity during winter cultivation was shown. Due to the actual winter irradiance conditions, temperature control might be necessary in order to minimize photosaturation and/or photoinhibition. **Chapter 3** deals with the influence of extreme summer conditions on productivity and photosynthetic efficiency. Around noon the cells are exposed to over-saturating irradiance conditions, as high as $2100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *Chlorella sorokiniana*, due to its mesophilic character and resistance to high irradiance, showed a high growth rate under the conditions assayed. The photosynthetic efficiency and

productivity, even under continuous illumination, were high considering the over-saturating irradiance applied. Photoinhibition was not observed, and *C. sorokiniana* could become a good alternative for biomass production in a high irradiance area in short light path photobioreactors fully exposed to sunlight (i.e. placed horizontally).

The aim of the work described in **Chapter 4** and **Chapter 5** was to maximize the photosynthetic efficiency of *C. sorokiniana* under summer irradiance conditions. It was tested whether the photosynthetic efficiency could be increased by minimizing photosaturation by reducing the incoming light intensity on the surface of panel photobioreactors. This can be achieved by placing the light exposed panel surface of photobioreactors in a vertical orientation, for example a system of panels as shown in Figure 1.4. It was demonstrated in **Chapter 4** that this light dilution greatly enhances the photosynthetic efficiency and productivity per unit of ground area.

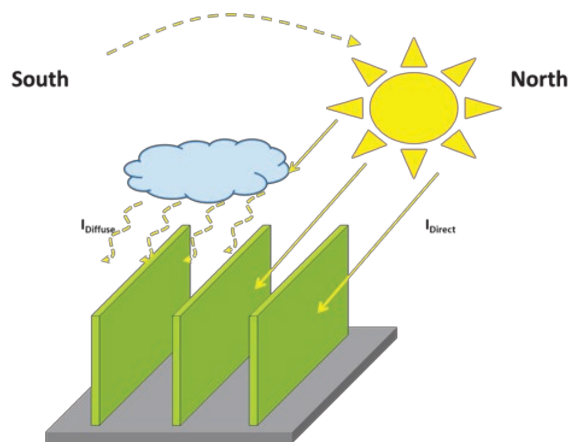


Figure 1.4: Scheme of the light dilution effect.

Vertical photobioreactors therefore might be considered as optimal production systems to produce *C. sorokiniana* in Huelva when maximal areal productivity is the aim.



In **Chapter 5** the influence of luminostat operation on photosynthetic efficiency is evaluated. The biomass concentration inside the photobioreactor was continuously adapted to the irradiance conditions in order to maximize light absorption and prevent dark zones within the algae culture. Despite the initial hypothesis, luminostat operation did not lead to any improvement in productivity and photosynthetic efficiency when compared with a traditional chemostat operation. However, both operational conditions, chemostat and luminostat operation, avoided photoinhibition in a vertical photobioreactor, even under saturating irradiance conditions, yielding a high photosynthetic efficiency: 1.2 – 1.3 grams of biomass per mol of photons supplied.

Chapter 6 is a general discussion about the potential to grow microalgae in a high irradiance area. The biotechnological potential of *Chlorella sorokiniana* for commercial production of lutein in Huelva is also discussed.

Los artículos que forman parte de los apartados “Chapter 1 a Chapter 5”, han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a derechos de autor. En sustitución de los artículos ofrecemos la siguiente información: referencia bibliográfica, enlace al artículo, y resumen.

- Cuaresma Franco, M., Buffing, M.F., Janssen, M., Vílchez Lobato, C., Wijffels, R.H. (2012). Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions. *Journal of Applied Phycology*. Vol. 24, n. 4, págs.. 693-699. DOI: 10.1007/s10811-011-9687-y

Enlace al texto completo del artículo: <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9687-y>

RESUMEN:

High annual microalgae productivities can only be achieved if solar light is efficiently used through the different seasons. During winter the productivity is low because of the light and temperature conditions. The productivity and photosynthetic efficiency of *Chlorella sorokiniana* were assessed under the worst-case scenario found during winter time in Huelva, south of Spain. The maximum light intensity (800 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and temperature (20°C) during winter were simulated in a lab-scale photobioreactor with a short light-path of 14 mm. Chemostat conditions were applied and the results were compared with a temperature-controlled situation at 38°C (optimal growth temperature for *C. sorokiniana*). When temperature was optimal the highest productivity was found at a dilution rate of 0.18 h^{-1} ($P_v = 0.28 \text{ g Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), and the biomass yield on light energy was high ($Y_{x,E} = 1.2 \text{ g mol}^{-1} \text{ photons supplied}$). However, at suboptimal temperature, the specific growth rate of *C. sorokiniana* was surprisingly low, not being able to support continuous operation at a dilution rate higher than 0.02 h^{-1} . The slow metabolism under suboptimal temperature resulted in a decline of the light energy requirements of the cells. Consequently, the maximum winter irradiance was experienced as excessive, leading to a low photosynthetic efficiency and productivity ($Y_{x,E} = 0.5 \text{ g mol}^{-1} \text{ photons supplied}$, $P_v = 0.1 \text{ g Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). At suboptimal temperature a higher carotenoid-to-chlorophyll ratio was observed indicating the activation of light-dissipating processes. We conclude that temperature control and/or light dilution during winter time will enhance the productivity.

- Cuaresma Franco, M., Janssen, M., Vílchez Lobato, C., Wijffels, R.H. (2009). Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) photobioreactor under high irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 104, n. 2, págs. 352-359. DOI: 10.1002/bit.22394

Enlace al texto completo del artículo: <https://doi.org/10.1002/bit.22394>

RESUMEN:

Maximal productivity of a 14 mm light-path panel photobioreactor under high irradiance was determined. Under continuous illumination of 2,100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with red light emitting diodes (LEDs) the effect of dilution rate on photobioreactor productivity was studied. The light intensity used in this work is similar to the maximal irradiance on a horizontal surface at latitudes lower than 37°. *Chlorella sorokiniana*, a fast-growing green microalga, was used as a reference strain in this study. The dilution rate was varied from 0.06 to 0.26 h^{-1} . The maximal productivity was reached at a dilution rate of 0.24 h^{-1} , with a value of 7.7 $\text{g dw m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (m^2 of illuminated photobioreactor surface) and a volumetric productivity of 0.5 $\text{g dw L}^{-1} \text{h}^{-1}$. At this dilution rate the biomass concentration inside the reactor was 2.1 g L^{-1} and the photosynthetic efficiency was 1.0 $\text{g dw mol photons}^{-1}$. This biomass yield on light energy is high but still lower than the theoretical maximal yield of 1.8 $\text{g mol photons}^{-1}$ which must be related to photosaturation and thermal dissipation of absorbed light energy.

- Cuaresma Franco, M., Janssen, M., Vílchez Lobato, C., Wijffels, R.H. (2011). Horizontal or Vertical photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency. *Bioresource Technology*. Vol. 102, n. 8, págs. 5129-5137. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.01.078

Enlace al texto completo del artículo: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.078>

RESUMEN:

The productivity of a vertical outdoor photobioreactor was quantitatively assessed and compared to a horizontal reactor. Daily light cycles in southern Spain were simulated and applied to grow the microalgae *Chlorella sorokiniana* in a flat panel photobioreactor.

The maximal irradiance around noon differs from 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the vertical position to 1800 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the horizontal position. The highest volumetric productivity was achieved in the simulated horizontal position, 4 $\text{g kg culture}^{-1} \text{d}^{-1}$. The highest photosynthetic efficiency was found for the vertical

simulation, 1.3 g of biomass produced per mol of PAR photons supplied, which compares favorably to the horizontal position (0.85 g mol⁻¹) and to the theoretical maximal yield (1.8 g mol⁻¹). These results prove that productivity per unit of ground area could be greatly enhanced by placing the photobioreactors vertically.

- Cuaresma, M., Janssen, M., van den End, E.J., Vílchez Lobato, C., Wijffels, R.H. (2011). Luminostat operation: a tool to maximize microalgae photosynthetic efficiency in photobioreactors during the daily light cycle?. *Bioresource Technology*. Vol. 102, n. 17, págs. 7871-7878. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.05.076

Enlace al texto completo del artículo: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.076>

RESUMEN:

The luminostat regime has been proposed as a way to maximize light absorption and thus to increase the microalgae photosynthetic efficiency within photobioreactors. In this study, simulated outdoor light conditions were applied to a lab-scale photobioreactor in order to evaluate the luminostat control under varying light conditions. The photon flux density leaving the reactor (PFD_{out}) was varied from 4 to 20 μmol photons m⁻² s⁻¹ and the productivity and photosynthetic efficiency of *Chlorella sorokiniana* were assessed.

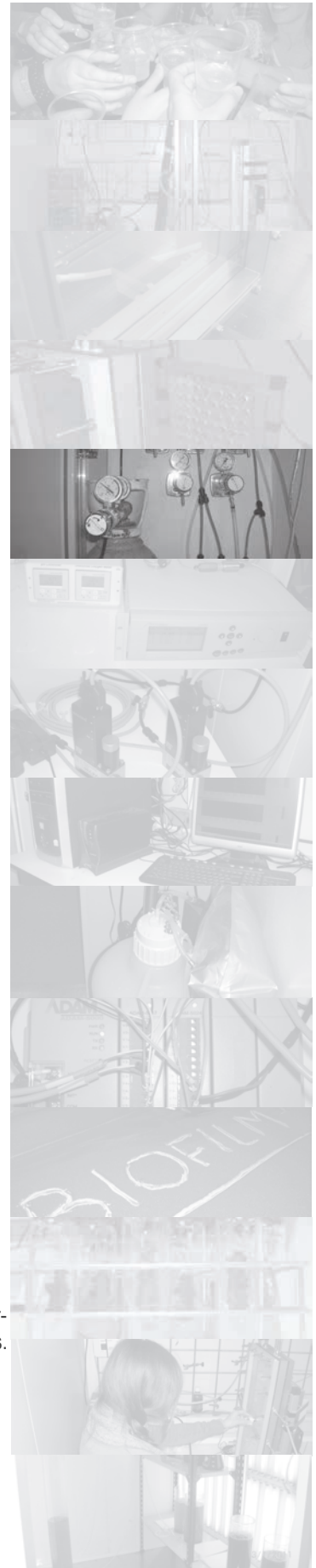
Maximal volumetric productivity (1.22 g kg⁻¹ d⁻¹) and biomass yield on PAR photons (400–700 nm) absorbed (1.27 g mol⁻¹) were found when PFD_{out} was maintained between 4 and 6 μmol photons m⁻² s⁻¹. The resultant photosynthetic efficiency was comparable to that already reported in a chemostat-controlled reactor. A strict luminostat regime could not be maintained under varying light conditions. Further modifications to the luminostat control are required before application under outdoor conditions.

Chapter 2

*Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions*

This chapter has been published as:

Cuaresma, M., Buffing, M.F., Janssen, M., Vilchez, C., Wijffels, R.H. Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions. Journal of Applied Phycology. DOI: 10.1007/s10811-011-9687-y



Chapter 3

*Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance*

This chapter has been published as:

Cuaresma, M., Janssen, M., Vilchez, C., Wijffels, R.H., 2009. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) photobioreactor under high irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 104 (2): 352-359

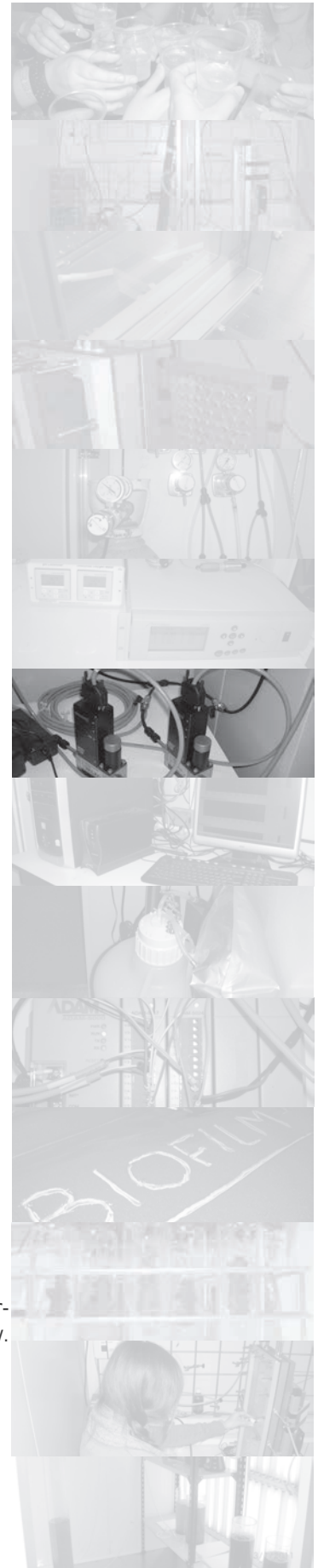


Chapter 4

Horizontal or Vertical photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency

This chapter has been published as:

Cuaresma, M., Janssen, M., Vilchez, C., Wijffels, R.H., 2011. Horizontal or Vertical photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency. *Bioresource Technology*, 102: 5129-5137



Chapter 5

Luminostat operation: a tool to maximize microalgae photosynthetic efficiency in photobioreactors during the daily light cycle?

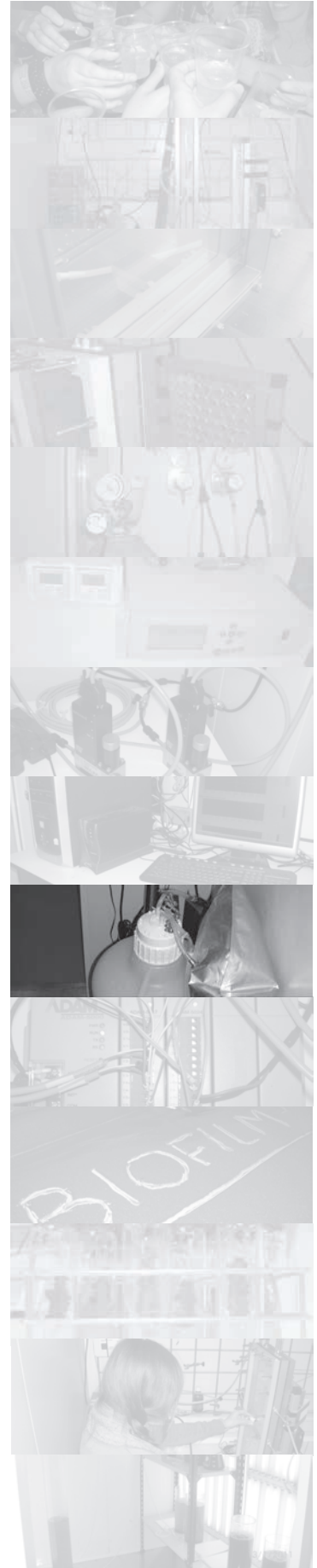
This chapter has been accepted for publication as:

Cuaresma, M., Janssen, M., van den End, E.J., Vilchez, C., Wijffels, R.H., Luminostat operation: a tool to maximize microalgae photosynthetic efficiency in photobioreactors during the daily light cycle?. *Bioresource Technology*.



Chapter 6

*Cultivation of microalgae in a
high irradiance area:
biotechnological potential
of *Chlorella sorokiniana**



Abstract

Microalgae are considered nowadays a promising source of high-value products as well as a source of feedstock for biofuels. Microalgae are photosynthetic organisms, the efficient use of light is one of the main prerequisites for successful industrial production processes.

6

During outdoor microalgae production the major factor limiting solar conversion efficiency in photosynthesis is the so-called light saturation effect. Maximization of photosynthetic efficiency in high irradiance areas, by avoiding or minimizing the photosaturation effect, will lead to higher productivities.

The potential biomass production of *Chlorella sorokiniana* in Huelva, southern Spain, is discussed based on experimental data. Summer irradiance conditions, as well as extreme winter conditions, were simulated in a lab scale photobioreactor to assess the effect on photosynthetic efficiency and productivity. The analysis of biomass composition under the different conditions applied revealed the potential of *Chlorella sorokiniana* as lutein producer.

Introduction

Added value molecules such as carotenoids, fatty acids, polysaccharides, vitamins and proteins can be obtained from microalgae. Algae are capable of accumulating heavy metals, fixing carbon dioxide, and are also considered a promising source of renewable energy. Algae-derived hydrogen, methane, triacylglycerols, and ethanol are potential materials for biofuels (Chisti, 2007; Hu et al., 2008; Rupprecht, 2009; Schenk et al., 2008; Wijffels et al., 2010). So far commercial production has only been developed in niche markets for high-value products. The world microalgal production is about 10 million kg of dry biomass per year and the biomass is mainly produced in China, Japan, Taiwan, USA, Australia and India (Benneman, 2008).

Potentially the productivity of culturing photoautotrophic microorganisms in high irradiance areas is higher because the availability of light. However, the efficiency of photosynthesis can be low due to the exposure to saturating or over-saturating light intensities. For most algal groups the saturation light intensity of photosynthesis (I_s) varies between 50 and 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Goldman, 1979). Since during the central daylight hours the solar irradiance can exceed 2000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ the light saturation effect imposes a serious limitation on the efficiency with which solar energy can be utilized in outdoor algal cultures. In addition to that, it is difficult to control temperatures inside photobioreactors. In this sense, thermal-tolerant species with a higher optimal growth temperature should be considered a good alternative for outdoor production (Ono and Cuello, 2007; Sorokin and Myers, 1953).

Chlorella sorokiniana has potential as biomass producer in a high irradiance area as Huelva, southern Spain, because of its high growth rate, 0.27 h^{-1} and its tolerance to high irradiance, high temperature and high CO_2 concentrations (Matsukawa et al., 2000; Sorokin, 1959). Real outdoor irradiance conditions were simulated in a lab-scale panelar photobioreactor in order to assess the productivi-

ty and photosynthetic efficiency while controlling the rest of the operational parameters. Mainly over-saturating irradiance conditions were applied in order to find out the best strategy to minimize or avoid effects of photosaturation and photoinhibition. But according to the mesophilic character of *C. sorokiniana*, the influence of winter irradiance and temperature was also evaluated. The potential production of *C. sorokiniana* in Huelva, the study site, is discussed.

In parallel, the biomass composition under the different conditions applied was analyzed, which revealed the potential of *Chlorella sorokiniana* as lutein producer. The potential of commercial production of lutein with *C. sorokiniana* in Andalucía, southern Spain, will be discussed.

Photobioreactor design and microalgae strain

Laboratory experiments where all cultivation parameters can be defined and controlled have been used to study the main factor limiting the photosynthetic efficiency and productivity of microalgae; i.e. the varying light conditions over the day and over the year. In our studies a lab-scale panel photobioreactor (1.7 L of working volume) with a light path of only 14 mm was used. It allowed us to directly correlate the effect of the irradiance conditions on the photosynthetic efficiency and productivity of *Chlorella sorokiniana*, while keeping the rest of the operational parameters controlled (see Cuaresma et al., 2009, 2011b, Chapter 1 and Chapter 5 for more details). Red light emitting diodes (LEDs) were used to simulate the different irradiance conditions. Although LEDs could not be considered representative of the solar spectrum, none of the commercial lamps used to grow microalgae nowadays are. Moreover, according to the action spectra of photosynthesis any photon within the PAR range will be used in photosynthesis at roughly the same efficiency (Emerson and Lewis, 1943). This fact, in combination with the technical advantages of using LEDs (long lifetime, low power consumption, high

and homogeneous PFD, no heat radiation and ability to quickly modify the PFD), make LEDs a versatile and reliable light source.

Chlorella sorokiniana plays a role in a wide range of biotechnological applications. It is known as an interesting source for proteins (González et al., 2010) and carbohydrates (Watanabe et al., 2008), and more recently it has been used in wastewater treatment (Godos et al., 2009, 2010; González et al., 2008; de-Bashan et al., 2008), CO₂ mitigation (Morita et al., 2000; Ho et al., 2010), metal removal (Akhtar, et al., 2003, 2004; Chong, et al., 2000; Yoshida et al., 2006) and biofuel production (Amaro et al., 2010; Chen et al., 2011; Wahlen et al., 2011). We selected *Chlorella sorokiniana* as model microorganism because it allows us to perform experiments in a short time. Moreover, because of its tolerance to high irradiance and temperature conditions *C. sorokiniana* is a promising organism for commercial biomass production in the south of Spain.

Algal biomass production in a high irradiance area

Geographical areas with high irradiances along the year and moderate temperatures are optimal for microalgae cultivation. Because of the amount of sunlight hours per day, and the mean solar irradiance, Southern Spain is considered one of the best location for outdoor cultivation of microalgae in Europe (García-González et al., 2003).

Photosynthesis, the process where sunlight energy drives the fixation of inorganic carbon dioxide and its conversion into sugars and biomass unfortunately is not a perfect process. The photosynthetic efficiency (PE) achieved under sunlight is much lower when compared with the theoretical maximum due to losses related to photosaturation, photorespiration, respiration and photoinhibition.

The light saturation effect is considered the main factor limiting photosynthetic efficiency when growing microalgae outdoors. High annual microalgae productivi-

ties can only be achieved if solar light is efficiently used through the different seasons.

During winter time, microalgae productivity can be low due to the irradiance conditions. But also temperature has a strong effect on photosynthetic efficiency, and therefore on productivity. The maximal irradiance during winter time, combined with maximal winter temperature clearly lead to photoinhibition when producing microalgae in a high irradiance area (Chapter 2). Temperature mainly affects the algae metabolism, resulting in a decline in substrate requirements. In this sense, the winter irradiance is already experienced as over-saturating. However, when temperature is controlled at its optimal value for algae growth, a higher photosynthetic efficiency is found. At optimal temperature 1.2 g of biomass are produced per mol of photons supplied, while only 0.5 g of biomass mol photons⁻¹ are produced when temperature is suboptimal. Therefore, when producing microalgae in a high irradiance area, temperature control has to be considered in the photobioreactor design in order to maximize photosynthetic efficiency.

During summer time, the effect of light saturation is more pronounced; cells can be exposed to irradiances as high as 2100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nevertheless, *Chlorella sorokiniana* is able to grow under such irradiance conditions, and it shows a high photosynthetic efficiency (1.02 g of biomass produced per mol of photons supplied) (Cuaresma et al., 2009). Surprisingly also under these conditions we found a high volumetric productivity, which suggests that photoinhibition effects were minimal. Apparently the combination of the photobioreactor configuration and the microalgae used allowed a high productivity ($P_v = 0.5 \text{ g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) under summer conditions. A narrow light path and a good mixing rate improves light distribution and allows cells to move from saturating light zones to dark zones. The robustness of *C. sorokiniana*, which tolerates high irradiance and has a high specific growth rate, also contributes to the high productivity.

Once the production of *Chlorella sorokiniana* in a panelar photobioreactor is demonstrated to be feasible in a high irradiance area, we looked at strategies to

maximize PE. Optimizing photobioreactor orientation to avoid or reduce photosaturation has been proposed (Qiang et al., 1998a). By placing the photobioreactors vertically, 30% of the daily supplied light is dissipated as heat, while heat dissipation accounts for 60% in horizontal systems (Cuaresma et al., 2011b). As a result the photosynthetic efficiency of *C. sorokiniana* in a vertical photobioreactor is very high, 1.3 g mol^{-1} versus the maximal 1.8 g mol^{-1} . This value includes night biomass loss and maintenance requirements. Despite the lower volumetric productivity associated, the productivity per ground area can be enhanced by placing more vertical photobioreactor-units in the same ground area (Figure 6.1). In this sense, only the photobioreactor layout should be improved in terms of shading and sunlight collection (Slegers et al., 2011). A rough estimation based on the PE obtained in the vertical photobioreactor, and the yearly averaged solar irradiance at the study site, proposes that 160 tons of dry matter could be produced per ha per year in southern-Spain (see Cuaresma et al., 2011b for more details).

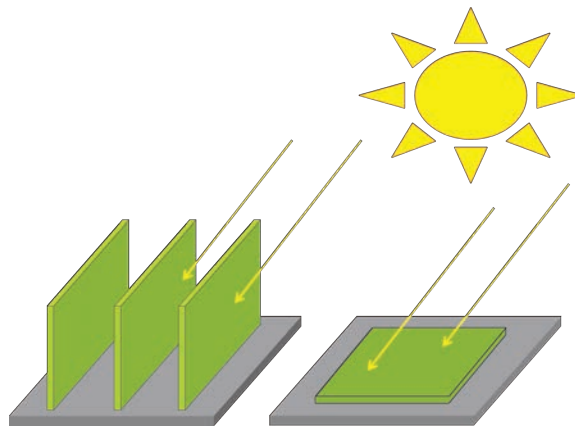


Figure 6.1: Improving microalgae areal productivity: the light dilution effect.

Luminostat operation, which continuously controls the light transmission in order to prevent the development of a dark zone and, at the same time, maximizing light capture, has been proposed to improve photosynthetic efficiency (Pruvost et al., 2011; Takache et al., 2010). However, the biomass yield obtained is comparable, but not higher, with the yield obtained under traditional chemostat operation

(Cuaresma et al., 2011b; Chapter 5).

According to the main findings discussed above, a biomass production process based on vertical panelar photobioreactors with a narrow light path, a good mixing rate, temperature control, chemostat operation and *Chlorella sorokiniana* as microalgae strain could be efficiently used in south Spain.

Cost estimation for a flat panel photobioreactor production plant can be found in Norsker et al. (2011). In this work, the flat panel photobioreactors are considered the best option to produce microalgae in a 100 ha plant. Considering a 5% of photosynthetic efficiency, and a productivity of 64 tons of dry matter per ha per year (according to the irradiance conditions in the Netherlands), a biomass production cost of 5.96 € per kilogram is expected. However, a sensitivity analysis on the final cost is also presented in the paper of Norsker and coworkers. A final price of 0.68 € kg⁻¹ could be achieved optimizing the biomass production in terms of irradiation, mixing, photosynthetic efficiency, and medium and carbon dioxide supply. Considering the irradiance conditions of Huelva, the study site, a maximal productivity of 160 tons per ha per year could be expected, considering an average photosynthetic efficiency of 6% (Cuaresma et al., 2011b). The higher productivity and PE expected in that area will have a positive influence on the biomass production costs, which should be lower than the reported 5.96 € kg⁻¹.

The costs allowed for biomass production depends on the value of the final product produced. For biofuel production the product value is low and so production costs should be really low as well (< 0.50 €/kg). For the production of valuable products the biomass production costs can be higher.

Biotechnological potential of *Chlorella sorokiniana*

Chlorella sorokiniana is normally produced for proteins and carbohydrates, but also fatty acids and antioxidants can be produced with this strain. Its ability to fix carbon dioxide from flue gas has been proved (Miller et al., 1971; Matsukawa et al., 2000) and more recently *C. sorokiniana* has been considered for biofuel production because of its lipid content (around 20%) and high growth rate (Qiao and Wang, 2009; Wahlen et al., 2011). Also its potential for waste water treatment and phytoremediation has been demonstrated (Akhtar, et al., 2003, 2004; Godos et al., 2009, 2010; Yoshida et al., 2006). Apart from the environmental benefit of heavy metal removal, *C. sorokiniana* is able to incorporate metals as Selenium, which has antioxidant properties. Selenium plays an important role in prevention of a number of degenerative pathologies including cancer and inflammatory, cardiovascular and neurological diseases (Brown and Arthur, 2001; Patrick, 2004; Thomson, 2004; Rayman, 2005). *C. sorokiniana* incorporates inorganic selenite into intracellular macromolecules, including carbohydrates, proteins, lipids and selenoaminoacids. Organic forms of selenium are much more bioavailable than inorganic forms, which reveals the high potential of *C. sorokiniana* as nutraceutical.

Our studies (Cuaresma et al., 2009, 2011b, Chapter 1, Chapter 5) revealed the great potential of *C. sorokiniana* as lutein producer. *C. sorokiniana* has a high content of carotenoids, with lutein, neoxanthin and β -carotene as the most abundant ones. The potential of lutein production for the Huelva region will be presented.

Lutein production

Lutein ((3R,3'R,6'R)- β,ϵ -carotene-3,3'-diol) (Figure 6.2) is a xanthophyll (carotenoids which contain hydroxyl or carbonyl groups) that helps to prevent or diminish the effects of degenerative human diseases, such as age-related macular degeneration (AMD) (Carpentier et al., 2009; Chiu and Taylor, 2007; Granado et al., 2003) or cataracts (Arnal et al., 2009). It is largely consumed as food colorant in the United States and as feed additive in Europe and the market volume in 2010 accounted for about 190 million dollars (Vilchez et al., 2011).

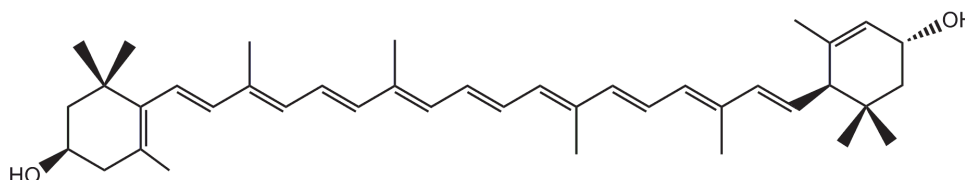


Figure 6.2: Lutein structure.

Currently lutein is obtained from marigold, where the lutein content is as low as 0.03% w/w (Piccaglia et al., 1998). The production is therefore a labor-intensive land-demanding process. Although it has also been produced synthetically, the prices of chemical synthesis (10,000 \$ kg⁻¹) are not competitive in comparison to production in marigold nowadays.

6

Microalgae are considered an alternative source of lutein because of their high cellular content (0.5 – 1.2% dry weight), the higher biomass productivity, the potential to process the whole biomass, the ease to develop a continuous process, and the presence of valuable by-products (as proteins, other pigments and lipids) (Fernández-Sevilla, et al., 2010). *Muriellopsis* and *Scenedesmus* are among several microalgae with a reported large scale production system outdoors and their lutein content ranges from 4 to 6 mg g⁻¹ (0.4 - 0.6% w/w). (Fernández-Sevilla, et al., 2010). Other algae as *Chlorococcum citrifforme*, *Neosporangiococcus gelatinosum* or *Chlamydomonas acidophila* have also been proposed as lutein producers

with a cellular content ranging from 4.6 to 10 mg g⁻¹ (0.46 - 1.0 % w/w) (Cuaresma et al., 2011a; Del Campo et al., 2000). However, only batch experiments under continuous illumination have been carried out with that strains making it difficult to extrapolate their potential under real outdoor cultivation conditions.

Based on the biomass analysis realized during our studies (Cuaresma et al., 2009, 2011b, Chapter 1, Chapter 5), the lutein content of *C. sorokiniana* ranges from 2.4 to 6.0 mg g⁻¹ (0.24 – 0.6% w/w) (Table 6.1). That concentration is similar to the cellular content of *Muriellopsis* and *Scenedesmus*. However, the higher biomass productivities yielded by *C. sorokiniana* under simulated summer conditions might lead to a more profitable production system, with daily productivities ranging from 4 to 10 mg L⁻¹ d⁻¹ (Table 6.1). According to Fernández-Sevilla et al. (2010), a maximal productivity of 7.2 mg L⁻¹ d⁻¹ has been found when growing *Muriellopsis* outdoors in a horizontal tubular system (2.4 cm inner diameter). The production process of *Muriellopsis* is considered as a profitable process.

C. sorokiniana also showed a high neoxanthin content, ranging from 0.6 to 2.0 mg g⁻¹ (Table 6.1). Neoxanthin (Figure 6.3) has been shown to induce apoptosis in prostate cancer cells (Kotake-Nara et al., 2005). As commented before, the presence of valuable by-products rebounds positively from a commercial point of view.

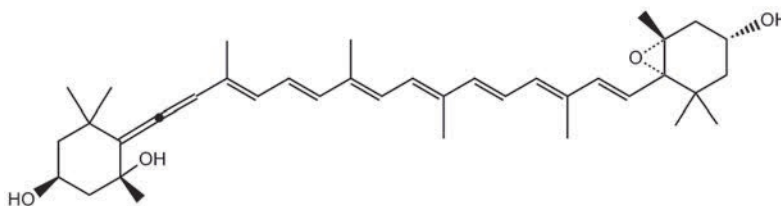


Figure 6.3: Neoxanthin structure.

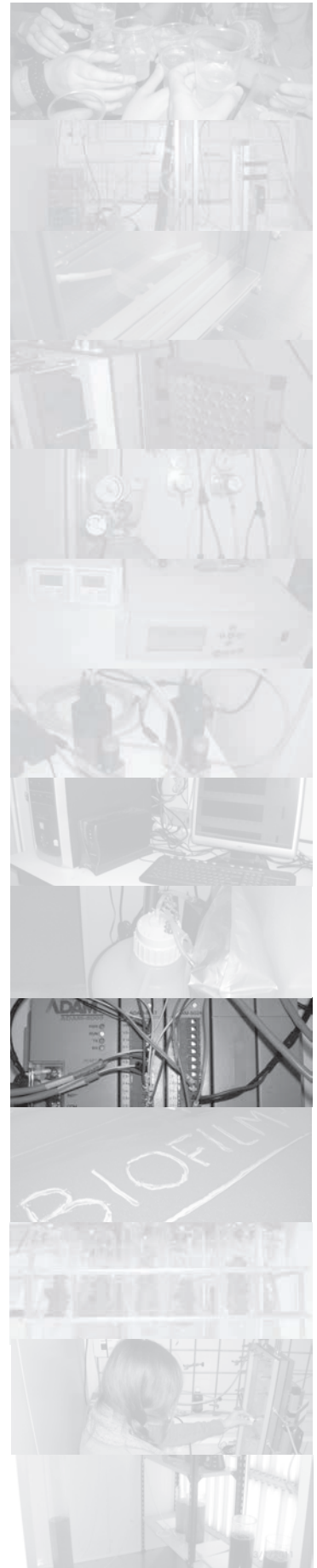
Culture conditions	Lutein		Neoxanthin		β-carotene		References
	mg g ⁻¹ dw	mg L ⁻¹ d ⁻¹	mg g ⁻¹ dw	mg L ⁻¹ d ⁻¹	mg g ⁻¹ dw	mg L ⁻¹ d ⁻¹	
Batch cultivation, Roux flasks 0.8 L, 25 °C, continuous illumination: 165 μmol photons m ⁻² s ⁻¹	5.1	-	2.0	-	1.2	-	This chapter
Chemostat operation, SLP photobioreactor, 1.8 L, 38 °C, continuous illumination: 800 μmol photons m ⁻² s ⁻¹	2.4-5.1	0.6-1.2*	0.6-1.8	0.1-0.4*	0.5-1.5	0.1-0.4*	Chapter 2
Chemostat operation, SLP photobioreactor, 1.8 L, 20 °C, continuous illumination: 800 μmol photons m ⁻² s ⁻¹	5.0	0.6*	1.1	0.1*	0.85	0.1*	Chapter 2
Chemostat operation, SLP photobioreactor, 1.8 L, 38 °C, Simulated summer irradi- ance in a horizontal pho- tobioreactor in Huelva	6.0	10.1-13.1	1.7	4.0-4.5	1.6	3.5-4.0	Cuaresma et al. 2011b
Chemostat operation, SLP photobioreactor, 1.8 L, 38 °C, Simulated summer irradi- ance in a vertical photo- bioreactor in Huelva	4.8	3.7-5.8	1.9	1.7-2.5	1.7	1.5-2.2	Cuaresma et al. 2011b
Luminostat operation, SLP photobioreactor, 1.8 L, 38 °C, Simulated summer irradi- ance in a vertical photo- bioreactor in Huelva	6.0	4.2-7.3	1.9	1.7-2.4	1.7	1.3-2.1	Chapter 5

Table 6.1: Resume of the main carotenoids content of *C. sorokiniana*, per gram of dry matter, under different conditions. Productivity is expressed per liter of culture broth per day. When continuous illumination was applied the productivity is expressed per liter of culture broth per hour (data marked with *).

Potential production of lutein in Huelva, Spain

In Cuaresma et al. (2011b) a rough estimation of maximal productivity in Huelva, south Spain, can be found. According to it, 160 tons of biomass per ha per year could be reached in vertical photobioreactors considering the yearly average irradiance conditions of the study site. Assuming an average cellular lutein content in *C. sorokiniana* of 5 mg g^{-1} , a productivity of 219 mg of lutein per square meter per day could be reached. It will lead to a maximal yearly productivity of $800 \text{ kg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$. Considering an average cellular content of neoxanthin of 2 mg g^{-1} , the maximal productivity reached could be $88 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ($320 \text{ kg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$). Comparing the data estimated in this paper with the productivities reported in Fernández-Sevilla et al., (2010), ranging from 100 to $290 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, also a profitable production process might be expected in Huelva.

Conclusiones



1. Existe una gran dependencia entre la productividad en el cultivo de microalgas y la temperatura durante el invierno. Temperaturas subóptimas para el crecimiento conducen a una tasa específica de crecimiento menor y a un rendimiento de la biomasa en energía lumínica bajo. Un ralentizado metabolismo y una mayor necesidad de activación de mecanismos disipadores del exceso de luz absorbido (quenching no fotoquímico, NPQ) resultaron en una menor eficiencia fotosintética en *C. sorokiniana* a temperaturas subóptimas.
2. La carotenogénesis resulta estimulada a temperaturas subóptimas, situación en que las células experimentan las condiciones de irradiancia como sobresaturantes. Esto podría estar relacionado con una mayor activación de los mecanismos disipadores de energía en forma de calor (NPQ).
3. El control de la temperatura durante el invierno podría, claramente, mejorar la productividad y eficiencia fotosintética de *Chlorella sorokiniana*. La menor irradiancia experimentada durante la simulación de la irradiancia máxima invernal resultó en una conversión más eficiente de la luz cuando la temperatura se controló en su valor óptimo para el cultivo. Sin embargo, la disponibilidad de un menor número de fotones lumínicos durante el invierno condujo a una menor productividad volumétrica cuando se compara con las condiciones de irradiancia estivales, sugiriendo que el fotobiorreactor operó en condiciones de fotolimitación.
4. Durante el invierno, el cultivo de *Chlorella sorokiniana* a temperaturas subóptimas para el crecimiento, y bajo condiciones de irradiancia relativamente altas (irradiancia típica del mediodía), deriva en una drástica reducción de la tasa metabólica de las células y, consecuentemente, de su eficiencia fotosintética. Temperaturas superiores a 20 °C conducirían a una mayor productividad, siendo por lo tanto el control de la temperatura un factor a tener en cuenta durante el cultivo de microalgas en el invierno. Por otro lado, la reducción de la irradiancia recibida en la superficie del fotobiorreactor podría ser una atractiva alternativa durante el cultivo en el exterior.

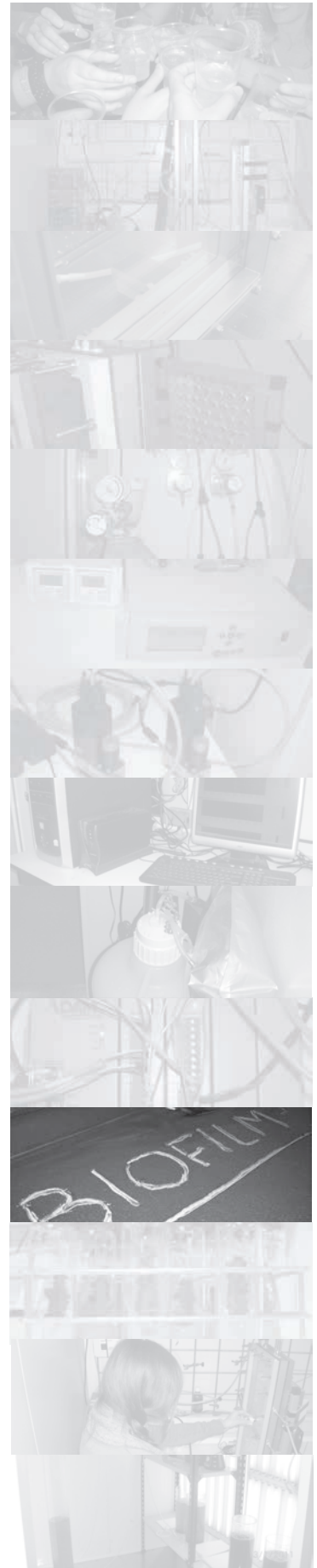


5. La alta productividad ($7.7 \text{ g de biomasa seca m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) alcanzada por *C. sorokiniana* en un fotobiorreactor panelar bajo condiciones de alta irradiancia propias del periodo estival ($2100 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) puede ser explicada según la propia configuración del fotobiorreactor (estrecho paso óptico y buena tasa de aireación/mezclado), la cual mejora la distribución de la luz dentro del cultivo y permite el movimiento de las células entre zonas donde la luz se experimenta como saturante y la obscuridad. Un segundo factor determinante de la elevada productividad es la microalga utilizada (*C. sorokiniana*), la cual tiene una elevada tasa específica de crecimiento y además tolera condiciones de alta irradiancia y temperatura.
6. El elevado rendimiento de la biomasa en energía lumínica ($1.0 \text{ g de biomasa por mol de fotones}$) observado bajo condiciones de luz sobresaturantes ($2100 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), y a una tasa de dilución cercana a la máxima tasa específica de crecimiento, sugiere que la fotoinhibición no fue un proceso dominante durante el estudio. La diferencia entre el rendimiento observado y el máximo teórico para ($1.8 \text{ g mol fotones}^{-1}$) podría deberse a la activación de mecanismos disipadores del exceso de energía lumínica absorbida.
7. Se ha demostrado que la eficiencia fotosintética de las microalgas puede ser claramente mejorada mediante la colocación de los fotobiorreactores en posición vertical y la optimización de la tasa de dilución. Sin embargo un estudio en profundidad sobre la disposición óptima de los fotobiorreactores verticales es necesario con objeto de maximizar la productividad por área.
8. La operación del fotobiorreactor en régimen de luminostato bajo condiciones de irradiancia estivales (simulación del ciclo de luz día/noche) permite evitar la fotoinhibición y la excesiva fotosaturación. Sin embargo, el rendimiento de la biomasa en energía lumínica resultante fue similar, pero no mayor, al rendimiento obtenido durante la operación del fotobiorreactor como quimiostato (Capítulo 4).

9. El régimen de luminostato no pudo ser estrictamente mantenido bajo condiciones de luz cambiantes (simulación del ciclo día/noche). Por esta razón, no es posible determinar si dicho régimen conduciría o no a una mayor productividad, siendo necesario modificar la estrategia de control en futuros estudios.
10. *Chlorella sorokiniana* presenta un contenido celular en luteína entre 2.4 y 6.0 mg g⁻¹ (0.24 – 0.6% p/p) (Tabla 6.1). Dicha concentración es similar al contenido celular de *Muriellopsis* y *Scenedesmus*, microalgas productoras de luteína. Sin embargo, la mayor productividad obtenida con *C. sorokiniana* bajo condiciones simuladas de verano podría derivar en un proceso de producción más rentable, con productividades diarias alrededor de los 4 - 10 mg L⁻¹ d⁻¹. *C. sorokiniana* presenta, además, un contenido en neoxantina relativamente alto, entre los 0.6 y 2.0 mg g⁻¹. La presencia de productos secundarios de alto valor añadido repercute positivamente en el proceso desde un punto de vista comercial.
11. Asumiendo un contenido celular de luteína en *C. sorokiniana* de 5 mg g⁻¹, y teniendo en cuenta la productividad anual calculada en el Capítulo 4, una productividad de 219 mg de luteína por metro cuadrado por día podría ser alcanzada en la región de estudio. Esto conduciría a una productividad máxima anual de 800 kg ha⁻¹ year⁻¹. Considerando además un contenido celular de neoxantina de 2 mg g⁻¹, la máxima productividad estimada para este antioxidante sería de 88 mg m⁻² d⁻¹ (320 kg ha⁻¹ year⁻¹). Basado en estos cálculos, un proceso de producción de microalgas en Huelva podría ser considerado rentable.



Nomenclature



A_{470}	measured absorbance at 470 nm
A_{652}	measured absorbance at 652 nm
A_{665}	measured absorbance at 665 nm
A_r	reactor illuminated surface, m^2
AMD	age-related macular degeneration
ATP	adenosine-5'-triphosphate
CCAP	Culture Collection of Algae and Protozoa, UK
Car_{tot}	cellular total carotenoids content, $mg L^{-1}$, $mg g^{-1}$
Chl_a	cellular chlorophyll a content, $mg L^{-1}$, $mg g^{-1}$
Chl_b	cellular chlorophyll b content, $mg L^{-1}$, $mg g^{-1}$
Chl_{tot}	cellular total chlorophyll content, $mg L^{-1}$, $mg g^{-1}$
C_x	biomass concentration, $g Kg^{-1}$
D	dilution rate, h^{-1}
DAQ	data acquisition module
DO	dissolved oxygen, %
dw	dry weight, $mg g^{-1}$, $g Kg^{-1}$
F	flow rate, $Kg h^{-1}$
F_0	zero fluorescence level
$F_{g,in}$	gas flow entering the reactor, $mmol h^{-1}$



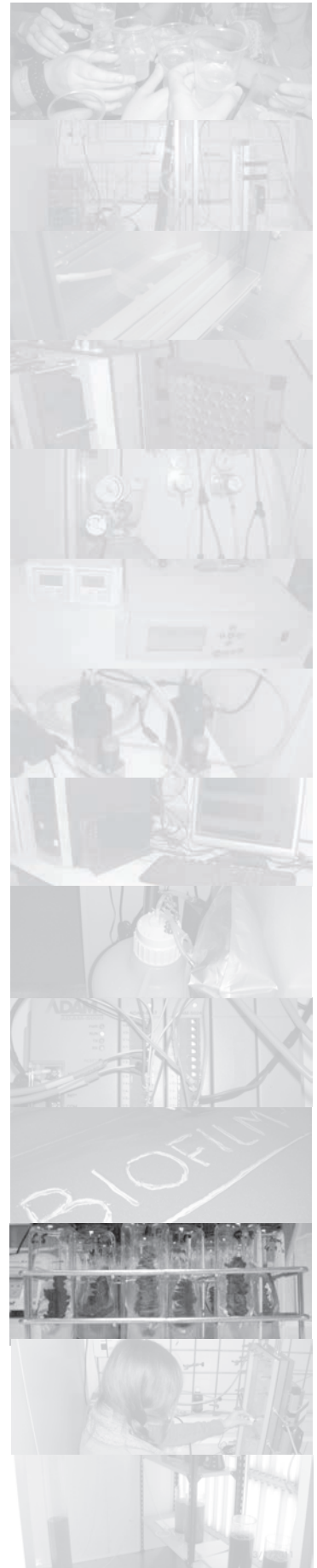
$F_{g,out}^*$	corrected gas flow leaving the reactor, mmol h^{-1}
F_m	maximal fluorescence level
F_v/F_m	maximum PSII quantum yield
GMO	genetically modified organism
I_s	saturation light intensity
(L:D)	duration of the light:dark cycle, (h:h)
LED	light emitting diodes
M_{harvest}	culture broth harvested daily, Kg
M_{reactor}	culture broth weight inside the photobioreactor, Kg
MFC	mass flow controller
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NPQ	non photochemical quenching
OD_{680}	optical density at 680 nm
OD_{750}	optical density at 750 nm
OPR	oxygen production rate, mmol h^{-1}
P_{area}	areal productivity, $\text{g dw m}^{-2} \text{ day}^{-1}$, $\text{g dw m}^{-2} \text{ h}^{-1}$
P_{O_2}	gross specific oxygen production rate, $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$
P_v	volumetric productivity, $\text{g dw Kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $\text{g dw Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$
PAM	pulse amplitude modulation



PAR	photosynthetically active radiation (400 – 700 nm)
PE	photosynthetic efficiency, %
PFD	photon flux density, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
PFD _{abs}	light absorbed by the culture broth, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
PFD _d	daily light input, $\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$
PFD _{in}	light input on reactor surface, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
PFD _{out}	light output leaving the photobioreactor (not absorbed), $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
PFD _{out setpoint}	desired light output leaving the photobioreactor, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
PFD _{profile}	simulated irradiance profile, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
PI-curve	photosynthesis-irradiance curve
PSII	photosystem II
QY	quantum yield
QY _{O₂}	quantum yield of oxygen evolution, $\text{mol O}_2 \text{ mol photons}^{-1}$
SLP	short light path
T	temperature
t _d	time, day
T _{opt}	optimal growth temperature, 38 °C
T _{sub}	suboptimal growth temperature, 20 °C
μ	specific growth rate, h^{-1}

μ_{\max}	maximal specific growth rate, h^{-1}
V	liquid volume reactor, L
V_r	reactor illuminated volume, dm^3
X_{O_2}	molar fraction of oxygen in the outflow gas, %
$X_{\text{O}_2,\text{db}}$	molar fraction of oxygen in the dry baseline, %
$X_{\text{O}_2,\text{wb}}$	molar fraction of oxygen in the wet baseline, %
$Y_{x,E}$	biomass yield on light energy, grams of biomass produced per mol of PAR photons supplied or absorbed

References





Akhtar, N., Iqbal, J., Iqbal, M., 2004. Removal and recovery of nickel (II) from aqueous solution by *loofa* sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. *Journal of Hazardous Materials* 108(1-2): 85-94

Akhtar, N., Saeed, A., Iqbal, M., 2003. *Chlorella sorokiniana* immobilized on the biomatrix of vegetable sponge of *Luffa cylindrical*: a new system to remove cadmium from contaminated aqueous medium. *Biore-source Technology* 88(2): 163-165

Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X., 2010. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.014

Arnal, E., Miranda, M., Almansa, I., Muriach, M., Barcia, J.M., Romero, F.J., Diaz-Llopis, M., Bosch-Morell, F., 2009. Lutein prevents cataract development and progression in diabetic rats. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 247(1): 115–120



Belasco, W., 1997. Algae burgers for a hungry world? The rise and fall of *Chlorella* cuisine. *Technology and Culture* 38(3): 608-634


Benneman, J.R., 2008. Opportunities and challenges in algae biofuels production. Presented in *Algae World 2008*, Nov. 17-18, Singapore. http://www.futureenergyevents.com/algae/whitepaper/algae_positionpaper.pdf.



Blanco, A.M., Moreno, J., Del Campo, J.A., Rivas, J., Guerrero, M.G., 2007. Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis sp.* in open ponds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73: 1259-1266

Bosma, R., van Zessen, E., Reith, J.H., Tramper, J., Wijffels, R.H., 2007. Prediction of volumetric productivity of an outdoor photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 97(5): 1108-1120

Brown, K.M., Arthur, J.R., 2001. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutrition* 4: 593-599

 arpentier, S., Knaus, M., Suh, M., 2009. Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49(4): 313-326

Chen, C-Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D-J., Chang, J.S., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 102(1): 71-81. Special issue: Biofuels – II: Algal biofuels and Microbial Fuel Cells

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306

Chiu, C.J., Taylor, A., 2007. Nutritional antioxidants and age-related cataract and macular degeneration. *Experimental Eye Research* 84: 229-245



Chong, A.M., Wong, Y.S., Tam, N.F., 2000. Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater. *Chemosphere* 41(1-2): 251-257

- Chow, W.S., Lee, H.Y., Park, Y.I., Park, Y.M., Hong, Y.M., Anderson, J.M., 2002. The role of inactive photosystem II-mediated quenching in a last-ditch community defence against high light stress in vivo. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 357: 1441-1449
- Coles, J.F., Jones, R.C., 2000. Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from tidal freshwater river. *Journal of Phycology* 36: 7-16
- Cuaresma, M., Casal, C., Forján, E., Vilchez, C., 2011a. Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38: 167-177
- Cuaresma, M., Janssen, M., Vilchez, C., Wijffels, R., 2009. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. *Biotechnology and Bioengineering* 104(2), 352-359
- Cuaresma, M., Janssen, M., Vilchez, C., Wijffels, R.H., 2011b. Horizontal or Vertical Photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency. *Bioresource Technology* 102: 5129-5137

Dauta, A., Devaux, J., Piquemal, F., Boum nich, L., 1990. Growth rate of four freshwater algae in relation to light and temperature. *Hydrobiologica* 207: 221-226



- de-Bashan, L.E., Trejo, A., Huss, V.A., Hernandez, J.P., Bashan, Y., 2008. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, high-light tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology* 99(11): 4980-4989
- Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J., Guerrero, M.G., 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology* 76: 51-59
- Del Campo, J.A., Rodríguez, H., Moreno, J., Vargas, M.A., Rivas, J., Guerrero, M.G., 2001. Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 85: 289-295
- Doucha, J., Lívanský, K., 2006. Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a middle and southern European climate. *Journal of Applied Phycology* 18: 811-826
- Dubinsky, Z., Stambler, N., 2009. Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications. *Aquatic Microbial Ecology* 56: 163-176
- Duboc, P., Marison, I., von Stockar, U., 1999. Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. In: Kemp RB, editor. Elsevier. pp. 267-365



merson, R., Lewis, C.M., 1943. The dependence of the quantum yield of *Chlorella* on wavelength of light. *American Journal of Botany* 30(3): 165-178

Eriksen, N.T., 2008. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters* 30: 1525-1536

Fernández-Sevilla, J.M., Ación Fernández, F.G., Molina Grima, E., 2010. Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 27-40

García-González, M., Moreno, J., Cañavate, J.P., Anguis, V., Prieto, A., Manzano, C., Florencio, F.J., Guerrero, M.G., 2003. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Applied Phycology* 15: 177-184

García-Malea, M.C., Ación, F.G., Fernández, J.M., Cerón, M.C., Molina, E., 2006. Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: modeling of the irradiance effect. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 981-989

Godos, I., González, C., Becares, E., García-Encina, P.A., Muñoz R., 2009. Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(1): 187-194



- Godos, I., Vargas, V.A., Blanco, S., González M.C., García-Encina, P.A., Becares, E., Muñoz R., 2010. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresource Technology* 101(14): 5150-5158
- Goldman, J.C., 1979. Outdoor algal mass cultures – II. Photosynthetic yield limitations. *Water Research* 13: 119-136
- González, C., Marciniak, J., Villaverde, S., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2008. Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (5): 891-898
- González Lopez, C.V., Cerón García, M.C., Ación Fernández, F.G., Segovia Bustos, C., Chisti, Y., Fernández Sevilla, J.M., 2010. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology* 101(19): 7587-7591
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I., 2003. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition* 90: 487–502
- Grobbelaar, J.U., 2007. Photosynthetic characteristics of *Spirulina platensis* grown in commercial-scale open outdoor raceway ponds: what do the organisms tell us?. *Journal of Applied Phycology* 19: 591-598
- Grobbelaar, J.U., 2010. Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynthesis Research* 106: 135-144



H

an, B-P., Virtanen, M., Koponen, J., Straskraba, M., 2000. Effect of photoinhibition on algal photosynthesis: a dynamic model. *Journal of Plankton Research* 22(5): 865-885

- Ho, S-H., Chen, C-Y., Lee, D-J., Chang, J-S., 2011. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – A review. *Biotechnology Advances* 29(2): 189-198
- Hu, Q., Guterman, H., Richmond, A., 1996. A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. *Biotechnology and Bioengineering* 51: 51-60
- Hu, Q., Kurano, N., Kawachi, M., Iwasaki, I., Miyachi, S., 1998a. Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49(6): 655-662
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal* 54: 621–639
- Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M., Balke, H., Sigon, C.A.M., Passarge, J., Weissing, F.J., Mur L.R., 2002. Principles of the light-limited chemostat: theory and ecological applications. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 117-133
- Huner, N.P.A., Öquist, G., Sarhan, F., 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science Reviews* 3(6): 224-230

Jacob-Lopes, E., Gimenes Scoparo, C.H., Ferreira Lacerda, L.M.C., Teixeira Franco, T., 2009. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing* 48: 306-310

R

Janssen, M., Tramper, J., Mur, L.R., Wijffels, R.H., 2003. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering* 81 (2): 193-210

Jensen, S., Knutsen, G., 1993. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology* 5: 495-504

Kliphuis, A.M.J., de Winter, L., Vejrazka, C., Martens, D.E., Janssen, M., Wijffels, R.H., 2010. Photosynthetic efficiency of *Chlorella sorokiniana* in a turbulently mixed short light-path photobioreactor. *Biotechnology Progress* 26(3): 687-696

Kliphuis, A.M., Janssen, M., van den End, E.J., Martens, D.E., Wijffels, R.H., 2010. Light respiration in *Chlorella sorokiniana*. *J. Appl. Phycol.* DOI: 10.1007/s10811-010-9614-7

Kotake-Nara, E., Asai, A., Nagao, A., 2005. Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-e human prostate cancer cells. *Cancer Letters* 220: 75-84

Kromkamp, J.C., Beardall, J., Sukenik, A., Kopecký, J., Masojidek, J., van Bergeijk, S., Gabai, S., Shaham, E., Yamshon, A., 2009. Short-term variations in photosynthetic parameters of *Nannochloropsis* cultures grown in two types of outdoor mass cultivation systems. *Aquatic Microbial Ecology* 56: 309-322



R

Lee, C-G., Palsson, B.O., 1995. Light emitting diode-based algal photobioreactor with external gas exchange. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79 (3): 257-263

Lee, C-G., Palsson, B.O., 1996. Photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to red light from light-emitting diodes leads to autospore release following each cellular division. *Biotechnology Progress* 12: 249-256

Leu, K.L., Hsu, B.D., 2005. A programmed cell disintegration of *Chlorella* after heat stress. *Plant Science* 168: 145-152

Li, Z., Wakao, S., Fischer, B.B., Niyogi, K.K., 2009. Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology* 60: 239-260

Liechtenthaler, H., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods on Enzymology* 148: 350-382

MacIntyre, H.I., Kana, T.M., Anning, T., Geider, R.J., 2002. Review: Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *Journal of Phycology* 38: 17-38

Mandalam, R.K., Palsson, B., 1998. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 59 (5): 605-611

R

- Masojídek, J., Torzillo, G., Koblížek, M., Kopecký, J., Bernardini, P., Sacchi, A., Komenda, J., 1999. Photoadaptation of two members of the Chlorophyta (*Scenedesmus* and *Chlorella*) in laboratory and outdoor cultures: changes in chlorophyll fluorescence quenching and the xanthophylls cycle. *Planta* 209: 126-135
- Masojídek, J., Papacek, S., Sergejevova, M., Jirka, V., Cerveny, J., Kunc, J., Korcecko, J., Vervobikova, O., Kopecky, J., Stys, D., Torzillo, G., 2003. A closed solar photobioreactor for cultivation of microalgae under supra-high irradiance: basic design and performance. *Journal of Applied Phycology* 15: 239-248
- Matsukawa R., Hotta M., Masuda Y., Chihara M., Karube I. 2000. Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology* 12: 263-267
- Matthijs, H.C.P., Balke, H., van Hes, U.M., Kroon, B.M.A., Mur, L.R., Binot, R.A., 1996. Application of light-emitting diodes in bioreactors: flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). *Biotechnology and Bioengineering* 50: 98-107
- Maxwell, D.P., Falk, S., Trick, C.G., Huner, N.P.A., 1994. Growth at low temperature mimics high-light acclimation in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology* 105: 535-543
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence - A practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659-668
- Meiser, A., Schmid-Staiger, U., Trösch, W., 2004. Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor. *Journal of Applied Phycology* 16: 215-225

-
- Melis, A., 2009. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science* 177: 272–280
- Miller, R.L., Wickline, H.E., Richardson, B., 1971. Effects of heterotrophic and autotrophic growth conditions on the composition of *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Food Science* 36: 774-777
- Molina Grima, E., Fernández Sevilla, J.M., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., 1996. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology* 45: 59-69
- Morita, M., Watanabe, Y., Saiki, H., 2000. High photosynthetic productivity of green microalga *Chlorella sorokiniana*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 87(3): 203-218
- Morweiser, M., Kruse, O., Hankamer, B., Posten, C., 2010. Mini-review: Developments and perspectives of photobioreactors for biofuels production. *Applied Microbial Biotechnology* 87 (4): 1291-1301
- Muller, P., Li, X-P., Niyogi, KK., 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125: 1558-1566
- Myers, J., Graham, J.R., 1961. On the mass culture of algae. III. Light diffusers; High vs low temperature *Chlorellas*. *Plant Physiology* 36(3): 342-346

Neidhardt, J., Benemann, J.R., Zhang, L.P., Melis, A., 1998. Photo-system-II repair and chloroplast recovery from irradiance stress: relationship between chronic photoinhibition, light-harvesting chlorophyll antenna size and photosynthetic productivity in *Dunaliella salina* (green algae). *Photosynthesis Research* 56: 175-184

Niyogi K.K., Björkman, O., Grossman, A.R., 1997. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 14162-14167

Norsker, N-H., Barbosa, M.J., Vermue, M.H., Wijffels, R.H., 2011. Microalgal production – a close look at the economics. *Biotechnology Advances* 29 (1): 24-27


Norton, T.A., Melkonian, M., Andersen, R.A., 1996. Algal biodiversity. *Phycologia* 35(4): 308-326

Ono, E., Cuello, J.L., 2007. Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria. *Biosystems Engineering* 96(1): 129–134



Patrick, L., 2004. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Alternative Medicine Review* 9: 239–258

-
- Piccaglia, R., Marotti, M., Grandi, S., 1998. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Industrial Crops and Products* 8: 45–51
- Posten, C., 2009. Review: Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences* 9 (3): 165-177
- Pulz, O., Scheibenbogen, K., 1998. In: Scheper T, editor. *Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg; 123-152
- Pruvost, J., Cornet, J.F., Goetz, V., Legrand, J., 2011. Modelling dynamic functioning of rectangular photobioreactors in solar conditions. *AIChE Journal*, n/a. doi: 10.1002/aic.12389
- PVGIS: Photovoltaic Geographical Information System. European Commission. Joint Research Centre. Institute for energy, Renewable Energy Unit, via Fermi 2749, TP 450, I-21027 Ispra (VA), Italy. <http://re.jrc.ec.europa.eu/pvgis/>

 iang, H., Richmond, A., 1994. Optimizing the population density in *Isochrysis galbana* grown outdoors in a glass column photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 6: 391-396

- Qiang, H., Richmond, A., 1996. Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 8 (2): 139-145



- Qiang, H., Faima, D., Richmond, A., 1998a. Optimal tilt angles of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85 (2): 230-236
- Qiang, H., Zarmi, Y., Richmond, A., 1998b. Combined effect of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina patensis* (cyanobacteria). *European Journal of Phycology* 33(2): 165-171
- Qiao, H., Wang, G., 2009. Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana GXNN01*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 27(4): 762-768




aven, J.A., Geider, R.J., 1988. Temperature and algal growth. *New Phytologist* 110: 441-461

- Rayman, M.P., 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society* 64: 527-542
- Reboloso Fuentes, M.M., García Sánchez, J.L., Fernández Sevilla, J.M., Ación Fernández, F.G., Sánchez Pérez, J.A., Molina Grima, E., 1999. Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. *Journal of Biotechnology* 70: 271-288
- Richmond, A., 1997. Efficient utilization of high irradiance for production of photoautotrophic cell mass: a survey. *Journal of Applied Phycology* 8: 381-387



Richmond, A., 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *Journal of Applied Phycology* 12: 441-451

Rupprecht, J., 2009. From systems biology to fuel – *Chlamydomonas reinhardtii* as a model for a systems biology approach to improve biohydrogen production. *Journal of Biotechnology* 142: 10–20

 chen, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., 2008. Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research* 1: 20–43

Schmidt, B.J., Lin-Schmidt, X., Chamberlin, A., Salehi-Ashtiani, K., Papin, J.A., 2010. Review: Metabolic systems analysis to advance algal biotechnology. *Biotechnology Journal* 5: 660–670

Slegers, P.M., Wijffels, R.H., van Straten, G., van Boxtel, A.J.B., 2011. Design scenarios for flat panel photobioreactors. *Applied Energy*. Doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.037

Sorokin, C., 1959. Tabular comparative data from the low-temperature and high-temperature strains of *Chlorella*. *Nature* 184: 613-614

Sorokin, C., 1960. Kinetic studies of temperature effects on the cellular level. *Biochimica et Biophysica Acta* 38: 197-204

Sorokin, C., Krauss, R.W., 1962. Effects of temperature and illuminance on *Chlorella* growth uncoupled from cell division. *Plant Physiology* 37(1): 37-42



Sorokin, C., Myers, J., 1953. A High-Temperature Strain of *Chlorella*. *Science* 117: 330-331

Spearing, A.M., Karlander, E.P., 1979. Effects of light and low temperatures on chlorophyll content and metabolism of *Chlorella sorokiniana* Shihira and Krauss. *Environmental and Experimental Botany* 19: 237-243

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2): 87-96

Takache, H., Christophe, G., Cornet, J.F., Pruvost, J., 2010. Experimental and theoretical assessment of maximum productivities for the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in two different geometries of photobioreactors. *Biotechnology Progress* 26(2): 431-440

Tennessee, D.J., Singsaas, E.L., Sharkey, T.D., 1994. Light-emitting diodes as a light source for photosynthesis research. *Photosynthesis Research* 39: 85-92

Thomson, C.D., 2004. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *European Journal of Clinical Nutrition* 58: 391-402

Tredici, M.R., 2010. Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels* 1(1): 143-162



R



ílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I., Vega, J.M., 2011. Review: Marine carotenoids: Biological functions and commercial applications. *Marine Drugs* 9: 319-333

Vonshak, A., Guy, R., 1992. Photoadaptation, photoinhibition and production in the blue-green alga *Spirulina platensis* grown outdoors. *Plant, Cell and Environment* 15: 613-616

Vonshak, A., Torzillo, G., 2004. Environmental stress physiology. In: Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. United Kingdom: Blackwell Science pp 57-82

Vonshak, A., Torzillo, G., Masojídek, J., Boussiba, S., 2001. Sub-optimal morning temperature induces photoinhibition in dense outdoor cultures of the alga *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta). *Plant, Cell and Environment* 24: 1113-1118



ahlen, B.D., Willis, R.M., Seefeldt, L.C., 2011. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresource Technology* 102(3): 2724-2730

Wang, C.Y., Fu, C.C., Liu, Y.C., 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal* 37 (1): 21-25



Watanabe, K., Imase, M., Aoyagi, H., Ohmura, N., Saiki, H., Tanaka, H., 2008. Development of a novel artificial medium based on utilization of algal photosynthetic metabolites by symbiotic heterotrophs. *Journal of Applied Microbiology* 105(3): 741-751

Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329: 796-799

Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., 2010. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Bio-refining* 4: 287–295

Y

oshida, N., Ikeda, R., Okuno, T., 2006. Identification and characterization of heavy metal-resistant unicellular alga isolated from soil and its potential for phytoremediation. *Bioresource Technology* 97(15): 1843-1849

Z

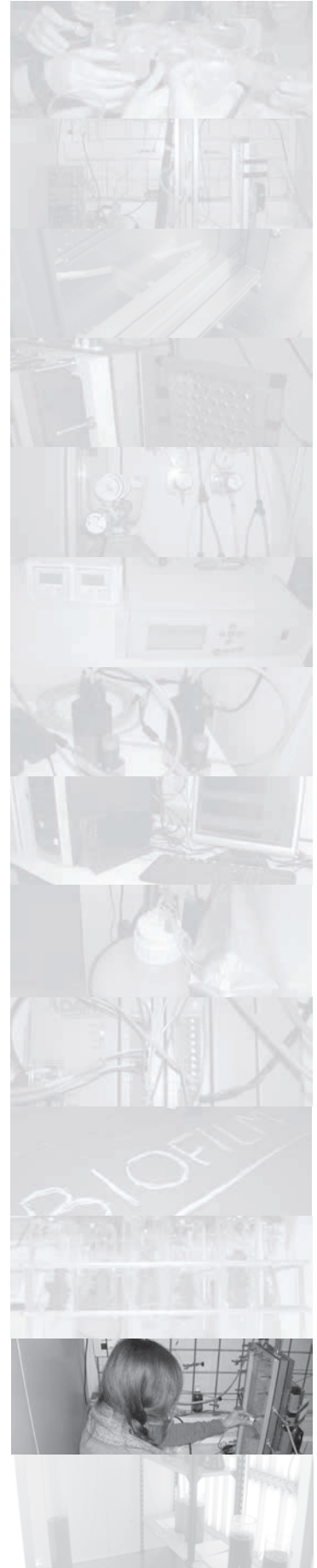
hang, K., Kurano, N., Miyachi, S., 1999. Outdoor culture of a cyanobacterium with a vertical flat-plate photobioreactor: effects on productivity of the reactor orientation, distance setting between the plates, and culture temperature. *Applied Microbial Biotechnology* 52: 781-786

R

Zijffers, J.W., Schippers, K.J., Zheng, K., Janssen, M., Tramper, J., Wijffels, R.H., 2010. Maximum photosynthetic yield on green microalgae in photobioreactors. *Marine Biotechnology* 12: 708-718

Zittelli GC, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR (2006) Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261: 932-943

Curriculum vitae



María Cuaresma Franco was born in Huelva, Spain, on April 23rd 1981. In 1999 she started her studies on “Environmental Sciences” in the Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Spain. During her studies she realized two internships both at the chemical company “FMC Foret S.L.” in the department of “Quality, Security and Environmental Policy”. During the last year of her studies she started to collaborate inside the group “Biotechnology of Microalgae”, within the

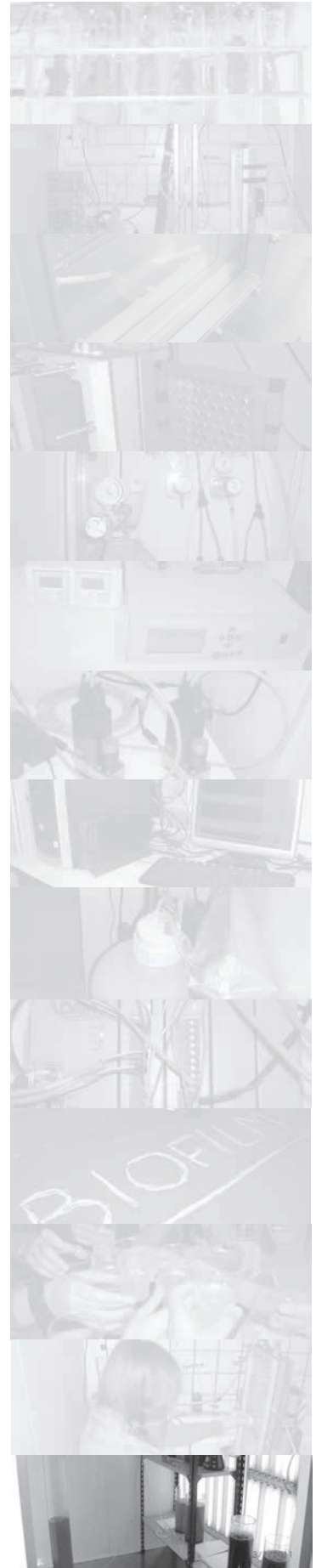


Biochemistry and Molecular Biology Area of the department of Chemical and Material Sciences, University of Huelva. In 2003 she graduated and started to develop her own research line inside the same group, which was related to isolation and cultivation of extremophilic microalgae from a local acidic river. At the same time, on May 2005, she started to work at “FMC Foret, S.L.” inside the department of Technology (R+D).

In 2006 she obtained the Advanced Research Certificate from University of Huelva with the project entitled “Isolation, cultivation and biotechnological potential of *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto River”. In May 2006 she quit her job at FMC Foret, S.L. to start with a PhD project co-founded by University of Huelva in Spain and Wageningen University in the Netherlands. She focused on the maximization of microalgae photosynthetic efficiency under high irradiance conditions in a lab-scale photobioreactor. On 27th of June 2011 she obtained the PhD degree by the University of Wageningen.

Since March 2011 she is working as a postdoctoral researcher at AlgaePARC in Wageningen. She is leading the screening process for microalgae for biofuel production. In addition, she is also working on the optimization of operational conditions for microalgae production in lab-scale photobioreactors, as well as in pilot systems outdoors (2.4 m²). Since January 2012 she is involved in a project funded by the 7th European Framework, on the development of a modular, scalable and automatic biofilm reactor for CO₂ capture and biomass production with low operational and installation costs.

Publications



- Cuaresma, M.**, Janssen, M., van den End, E.J., Vilchez, C., Wijffels, R.H. (2011) Luminostat operation: a tool to maximize microalgae photosynthetic efficiency in photobioreactors during the daily light cycle?. *Bioresource Technology* 102: 7871–7878
- Cuaresma, M.**, Buffing, M.F., Janssen, M., Vilchez, C., Wijffels, R.H. (2011) Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions. *Journal of Applied Phycology*. DOI: 10.1007/s10811-011-9687-y
- Vilchez, C., Forján, E., **Cuaresma, M.**, Bédmar, F., Garbayo, I. (2011) Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Marine Drugs* 9(3), 319-333
- Cuaresma, M.**, Janssen, M., Vilchez, C., Wijffels, R. (2011) Horizontal or Vertical photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency. *Bioresource Technology* 102: 5129–5137
- Casal, C., **Cuaresma, M.**, Vega, J.M., Vilchez, C. (2011) Enhanced productivity of a lutein-enriched novel acidophile microalga grown on urea. *Marine Drugs* 9: 29-42
- Cuaresma, M.**, Casal, C., Forján, E., Vilchez, C. (2011) Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems. *Journal of Industrial Microbial Biotechnology* 38:167-177
- Mogedas, B., Forján, E., **Cuaresma, M.**, Garbayo, I., Vega, J.M., Vilchez, C. (2009) Production of lutein-enriched microalgal biomass. *New Biotechnology* 25(1): S297
- Cuaresma, M.**, Janssen, M., Vilchez, C., Wijffels, R. (2009) Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. *Biotechnology Bioengineering* 104(2): 352-359.
- Garbayo, I., Cuaresma, M., Vilchez, C., Vega, J.M. (2008) Effect of abiotic stress on the production of lutein and b-carotene by *Chlamydomonas acidophila*. *Process Biochemistry* 43: 1158-1161.
- Cuaresma, M.**, Garbayo, I., Vega, J.M., Vilchez, C. (2006) Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 158-162.
- Garbayo, I., Forján, E., Salguero, A., **Cuaresma, M.**, Vega, J.M. & Vilchez, C. (2005) Enhancement of photorespiration in immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biotechnology Letters* 27:265-267.
- Garbayo, I., Domínguez, M.J., **Cuaresma, M.**, Vilchez, C. & Vígara, J. (2005) Influencia de condiciones nutricionales en el consumo y metabolismo del nitrógeno en microalgas extremófilas. (Vega et al., eds.) *Avances en el metabolismo del nitrógeno: de los microorganismos a las plantas*. Publications service of University of Huelva, pps. 435-441. ISBN: 84-96373-55-X.

The research described in this thesis was financially supported by the University of Huelva, Ministerio de Educación y Ciencia (MEC, Grant AGL2006-12741) and Junta de Andalucía (Proyectos de Excelencia, AGR-4337) in Spain, and a SenterNovem subsidy (The Netherlands) in the frame of the "Únieke Kans Regeling" program (Grant 02013), with Technogrow BV as industrial partner.