

**AGRADECIMIENTOS.**

Quiero agradecer a mi cotutor David por todo lo que me ha enseñado sobre este campo y por toda la ayuda y apoyo que me ha brindado a lo largo de la realización del Trabajo Final de Grado. Él ha conseguido que, pese a las dificultades que se presentaron, este trabajo se pueda realizar a tiempo.

## RESUMEN.

Las cianobacterias son microorganismos capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica. Hoy en día, son consideradas una fuente viable para la producción de biofueles o compuestos farmacéuticos entre otros.

En el presente Trabajo Final de Grado, se pretende modelizar matemáticamente los procesos químicos asociados al cultivo de microorganismos (la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803, en concreto) en fotobiorreactores. Para ello se analizarán fenómenos como la solubilización del CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo, la transferencia Gas-Líquido presente en el interior del fotobiorreactor o los mecanismos de concentración de carbono inorgánico presentes en éstos microorganismos fotosintéticos. También se tendrán en cuenta variables importantes como la luz, crecimiento o pH del medio de cultivo.

Una vez obtenido el modelo matemático, se procederá a su validación. Para ello se realizarán simulaciones y se llegará a unas conclusiones, viendo así si el modelo se ajusta a la realidad o no.

La presente investigación se enmarca dentro del proyecto de la Comisión Europea Cyanofactory (FP7-Energy 308518) conformado por un consorcio de universidades y empresas europeas que tiene el fin de crear organismos cultivados en fotobiorreactores que sean capaces de producir hidrógeno. Pues, se colaborará con dichas entidades para la consecución del aquí propuesto trabajo.

**Palabras clave:** Fotobiorreactor, cianobacterias, dióxido de carbono, transferencia Gas-Líquido, reacciones de solubilización, modelo matemático.

**ABSTRACT.**

Cyanobacteria are microorganisms which are capable of doing oxygenic photosynthesis. Nowadays, they are considered as a viable source for the production of biofuels and pharmaceutical compounds, between others.

This thesis presents a mathematical model for modelling the chemical processes associated to the culture of photosynthetic microorganisms (*Synechocystis* sp. PCC6803, specifically) in photobioreactors. To achieve this, an analysis of phenomena like CO<sub>2</sub> solubilisation in the medium, Gas-Liquid mass transfer and uptake and concentration mechanisms of inorganic carbon (characteristic of cyanobacteria) is required. Also, important variables like light, growth or the pH of the growth medium will be analysed.

Once the mathematical model is obtained, the next step will be his validation. Simulations will be created, seeing if the model fits reality or not.

This research project is part of the European Commission Cyanofactory (FP7-Energy 308518) formed by a consortium of European universities and companies, which objective is the production of hydrogen by photosynthetic microorganisms in photobioreactors.

**Keywords:** Photobioreactor, cyanobacteria, carbon dioxide, Gas-Liquid mass transfer, solubilisation reactions, mathematical model.

## RESUM.

Les cianobactèries son microorganismes capaços de dur a terme la fotosíntesi oxigènica. Hui en dia, són considerades una font viable per a la producció de biofuels o compostos farmacèutics entre altres.

En el present Treball Final de Grau, es pretén modelitzar matemàticament els processos químics associats al cultiu de microorganismes fotosintètics (*synechocystis* sp. PCC6803, en concret) en fotobiorreactors. Per a açò, s'analitzaran fenòmens com a la solubilització del CO<sub>2</sub> en el medi de cultiu, la transferència Gas-Líquid present a l'interior del fotobiorreactor o els mecanismes de concentració de carboni inorgànic presents en aquests microorganismes fotosintètics. També, es tindran en compte variables importants com la llum, el creixement o el pH del medi de cultiu.

Una vegada obtingut el model matemàtic, es procedirà a la seua validació. Per a açò es realitzaran simulacions i s'arribarà a unes conclusions, veient així si el model s'ajusta a la realitat o no.

La present recerca s'emmarca dins del projecte de la Comissió Europea Cuanofactory (FP7-Energy 308518) conformat per un consorci d'universitats i empreses europees que té la fi de crear hidrogen a partir de organismes fotosintètics en fotobiorreactors. Doncs, es col·laborarà amb aquestes entitats per a la consecució de l'ací proposat treball.

**Paraules clau:** fotobiorreactor, cianobacteria, diòxid de carboni, transferència Gas-Líquid, reaccions de solubilització, model matemàtic.

Tabla 1: Lista de símbolos y abreviaciones		
Nombre	Definición	Unidades
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	
O <sub>2</sub>	Oxígeno	
HCO <sub>3</sub>	Anión bicarbonato	
CO <sub>3</sub>	Anión carbonato	
Na <sup>+</sup>	Ión Sodio	
H <sup>+</sup>	Hidrógen, también llamado Protón	
OH <sup>-</sup>	Hidroxilo	
ATP	Trifosfato de adenosina	
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	
Ci	Carbono inorgánico	
AC	Anhidrasa carbónica	
$R_i$	Velocidad de reacción del compuesto $i$	uM/s
$C_i$	Concentración del compuesto $i$	
$k_j$	Constante de velocidad de la reacción $j$	s-1
$k_{-j}$	Constante de velocidad de la reacción $j$ en la dirección inversa	s-1
$K_j$	Constante de equilibrio de la reacción $j$	uM
$v_i^{a \rightarrow b}$	Velocidad de transporte del compuesto $i$ del medio $a$ al medio $b$	uM/s
$V_{max\_i}^Z$	Velocidad máxima de la enzima $Z$ respecto al compuesto $i$	uM/s
$K_{m\_i}^Z$	Constante de Michaelis-Menten de la enzima $Z$ respecto al compuesto $i$	uM
$[i]_a$	Concentración del compuesto $i$ en el medio $a$	uM
$V_a$	Volumen de células presentes en el medio $a$	L
$R_i^a$	Velocidad de reacción del compuesto $i$ en el medio $a$	uM/s
$k_L a_{CO_2}$	Coefficiente volumétrico de transferencia de materia para el CO <sub>2</sub>	s-1
$k_H^{CO_2}$	Constante de Henry para el CO <sub>2</sub> en agua	Pa·L/umol
R	Constante de los gases ideales	J/(mol·K)
T	Temperatura	K
$RT'$	R·T/1000*	J/mol
$u_G$	Velocidad superficial de la fase gaseosa	m/s
$e_G$	Gas holdup	
h	Altura de la columna de líquido	m
H	Altitud	km
$P_{b0}$	Presión en la burbuja a tiempo cero	Pa
$dR_a$	Variación temporal de la ecuación $R$ en el medio $a$	
Hpres	Presión de salida	Pa

\*Se realiza por comodidad, para un ajuste más fácil de las unidades del modelo.

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN TEÓRICA

### 1.1. PROBLEMÁTICA ACTUAL

Hoy en día, la mayor parte de la energía empleada en el mundo proviene de los combustibles fósiles. Éstos se emplean debido a su fácil extracción y a su bajo coste en comparación con otras fuentes de energía. Uno de los problemas que presentan es que tardan muchos años en regenerarse y por tanto se produce un agotamiento de las reservas. Además, emplearlos produce la emisión de gases que resultan tóxicos para la vida y el medio ambiente. La quema de estos combustibles y la deforestación emiten gases de efecto invernadero [1]. Durante la última reunión del Panel Intergubernamental del Cambio Climático, conocido por el acrónimo en inglés IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*), en el 2007, se concluyó en que habían suficientes evidencias como para afirmar que el factor clave del calentamiento global es el aumento de la concentración de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera.

Si se sigue la tendencia de emisiones de gases a la atmósfera, la temperatura superficial de la Tierra aumentará entre 2°C y 6°C al final de este siglo [1]. Todas estas desventajas han intensificado la búsqueda de nuevas energías renovables y limpias con el medio ambiente.

### 1.2. CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias son un amplio grupo de microorganismos fotoautótrofos que combinan la capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica con las características típicas de las células procariotas. Básicamente son bacterias capaces de realizar la fotosíntesis, siendo éstos los únicos procariontes que pueden llevar a cabo este proceso.

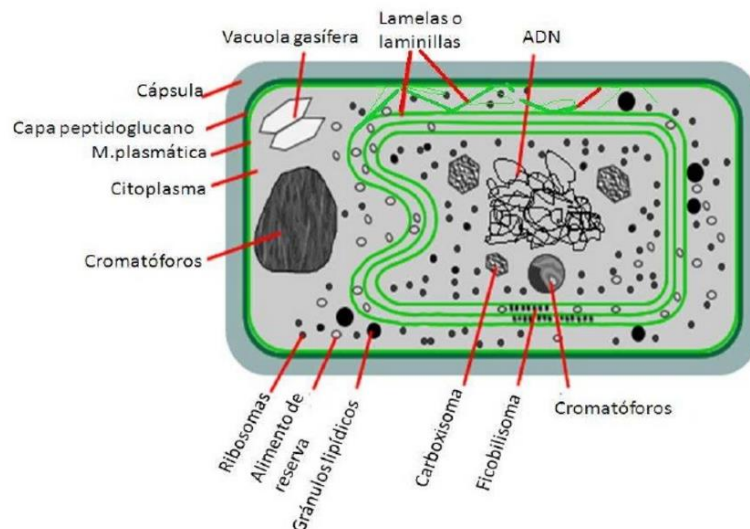


Figura 1. Estructura celular de una cianobacteria.

Hace más de 4.000 millones de años, fueron los primeros organismos en usar la energía solar y el CO<sub>2</sub> atmosférico para sintetizar compuestos más pesados, expulsando O<sub>2</sub> a la atmósfera [2]. Son conocidas por su resistencia a condiciones de estrés ambiental, choques de temperatura [3], deficiencia de nutrientes, cambios de pH [7], salinidad, presión osmótica y luz ultravioleta [4]. Además, estos organismos microscópicos son capaces de vivir en aguas marinas, dulces o en atmósferas ricas en nitrógeno.

Durante décadas se han estudiado las cianobacterias como posible fuente de obtención de compuestos biológicos activos al igual que biocombustibles renovables [5], [6]. Algunas especies de cianobacterias son capaces de expulsar hidrógeno gaseoso a partir de agua [8], [9], [10], el cual es considerado como una de las futuras energías más importantes debido a su emisión cero [11]. También son capaces de producir etanol [12] u otros biofueles importantes, esto es debido a su alta capacidad de convertir el agua y el CO<sub>2</sub> en biomasa empleando la luz solar.

Los microorganismos fotosintéticos no sólo lideraran los procesos industriales de la Tierra, las aplicaciones espaciales serán otro de los principales campos de aplicación. Las compañías y agencias espaciales empezarán a tener una mayor necesidad de materiales en el espacio y sería muy conveniente poder generar *in situ* productos de interés ya que enviar suministros al espacio exterior supone muchos costes. Además, un suministro autónomo de nutrientes y oxígeno será de especial necesidad en los largos viajes espaciales.

### 1.3. *Synechocystis* sp. PCC 6803

Este microorganismo fotosintético, de ahora en adelante llamado *Synechocystis*, es considerado un potente candidato para la obtención de productos de interés socio-económico, consumiendo CO<sub>2</sub> (y/o azúcar) como fuente de carbón y luz solar [13]. Este microorganismo presenta una variedad de aplicaciones industriales inmensa, actualmente se han publicado trabajos sobre la producción heteróloga de metabolitos, además de isopreno, biofueles [14] o biohidrógeno [15].

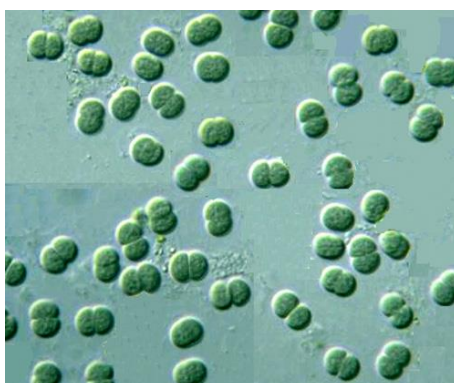


Figura 2. Cúmulo de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (microscopía óptica)

Fue la primera cianobacteria en tener su ADN secuenciado. Su genoma completo fue secuenciado, anotado y publicado en 1996 [16] y ha sido el objetivo de varios modelos metabólicos, especialmente el metabolismo del carbono. Otro aspecto a destacar es que existen bastantes métodos experimentales para modificar la cepa genéticamente [17] y así potenciar y mejorar sus capacidades naturales.

#### 1.4. FIJACIÓN DEL CARBONO

Se trata de la conversión de  $\text{CO}_2$  (carbono inorgánico, de ahora en adelante llamado Ci) en compuestos orgánicos más pesados y la llevan a cabo organismos vivos. Como se ha dicho antes, las cianobacterias son organismos fotoautótrofos, ya que crecen fijando carbono y sintetizan compuestos orgánicos empleando la energía de la luz.

El ejemplo más importante de fijación de carbono es la fotosíntesis, la cual la llevan a cabo las plantas, algas y cianobacterias. Estos organismos son capaces de realizar la fotosíntesis gracias a la clorofila que poseen y a la capacidad de realizar el ciclo de Calvin para fijar el carbono de una manera autótrofa. La fijación de carbono en el ciclo de Calvin se realiza mediante la enzima RuBisCo (Ribulosa Bisfosfatos Carboxilasa Oxidasa).

La fijación del carbono en las cianobacterias se produce en los carboxisomas. Éstos son cuerpos poliédricos con una cubierta proteica en cuyo interior se encuentra la enzima RuBisCO.

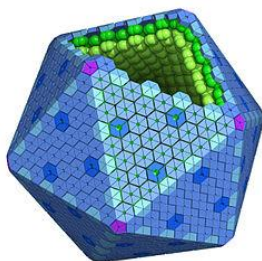


Figura 3. Representación 3D de un carboxisoma.

En primer lugar se produce la fijación del  $\text{CO}_2$ , uniéndose éste a la pentosa ribulosa-1,5-bisfosfato gracias a la enzima RuBisCO. Ésta reacción origina un compuesto inestable de seis carbonos que se descompone en 2 moléculas de 3 carbonos, el ácido 3-fosfoglicérico. A continuación se reduce el  $\text{CO}_2$  fijado consumiendo ATP y NADPH, el ácido 3-fosfoglicérico se reduce a gliceraldehído 3-fosfato. Éste podrá seguir dos vías a continuación, puede regenerar la ribulosa 1-5-difosfato (la gran parte) o puede emplearse para la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos o almidón. El que pasa al citosol origina la glucosa y fructosa.

La regeneración de la ribulosa-1,5-difosfato por medio del gliceraldehído 3-fosfato es un proceso complejo donde se suceden compuestos de cuatro, cinco y siete carbonos.



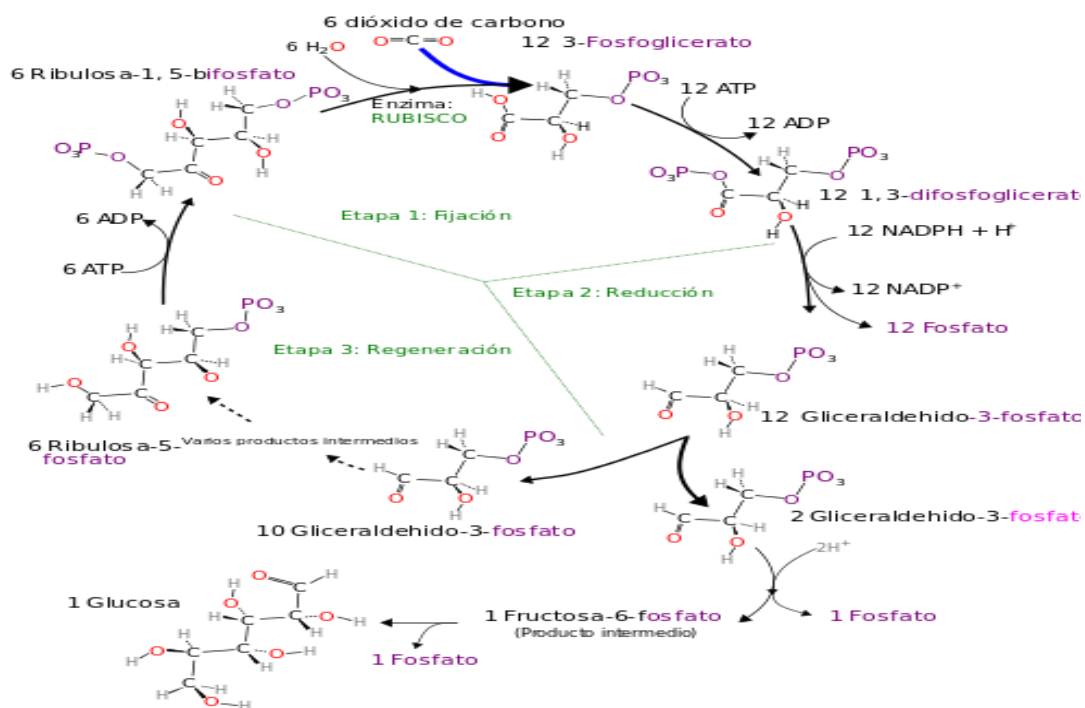


Figura 4. Ciclo de Calvin.

### 1.5. MECANISMOS DE CONCENTRACIÓN DE CARBONO

Originalmente había mucho  $\text{CO}_2$  en la atmósfera y no hacía falta concentrarlo pero a lo largo del tiempo, muchos organismos fotosintéticos han ido evolucionando y adquiriendo mecanismos para aumentar la concentración de  $\text{C}_i$  con el fin de aumentar la cantidad de  $\text{CO}_2$  disponible para el funcionamiento de la enzima RuBisCO, esto se debe a que el  $\text{CO}_2$  es un factor limitante para la fotosíntesis. Estos mecanismos presentan ventajas como un aumento de la tolerancia a atmósferas con bajas concentraciones de  $\text{C}_i$  o una reducción de las pérdidas por fotorrespiración.

La enzima RuBisCO de las cianobacterias tiene una afinidad para el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{O}_2$  mucho menor que cualquier otra alga o planta. Sin embargo, tiene una constante catalítica por unidad de proteína mucho mayor. Estas propiedades enzimáticas mejoran la eficiencia del uso del nitrógeno en la fotosíntesis ya que los mecanismos de concentración permiten operar cerca de su velocidad máxima a la enzima RuBisCO, de forma que se necesita una menor cantidad de nitrógeno para conseguir un buen rendimiento fotosintético.

En medio acuático, la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  es severamente limitante. Una de las principales causas de la escasa disponibilidad es el hecho de que la difusión del  $\text{CO}_2$  en el agua es  $10^4$  veces más lenta que en el aire. Otro factor que influye es que el equilibrio químico entre  $\text{HCO}_3^-$  (principal fuente de suministro de  $\text{CO}_2$ ) y el  $\text{CO}_2$  es relativamente lento, especialmente en los valores de pH entre los que nos movemos (entre 7 y 8.5). Por tanto, habrá que tener en cuenta que la concentración de  $\text{C}_i$  total depende del pH.

Los mecanismos de concentración de carbono de las cianobacterias son muy eficaces, siendo capaces de lograr una tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  exógeno de al menos  $10\text{-}15 \text{ uM}$  a pesar del hecho

de que las enzimas RuBisCO de las cianobacterias tienen una baja afinidad por el  $\text{CO}_2$ , con una  $K_{m_{\text{CO}_2}}$  mayor que 150  $\mu\text{M}$ . [35.] Generalmente, se supone que los costes metabólicos adicionales asociados a la acumulación activa de Ci son superados significativamente por las ventajas que ofrecen los mecanismos de concentración [36].

Estas cianobacterias están preparadas para el crecimiento en la mayoría de los ambientes acuáticos naturales (Típicamente  $[\text{CO}_2] < 15 \mu\text{M}$ ), incluidos los entornos de agua de mar donde el nivel de Ci permanece ligeramente constante, en torno a 2 mM.

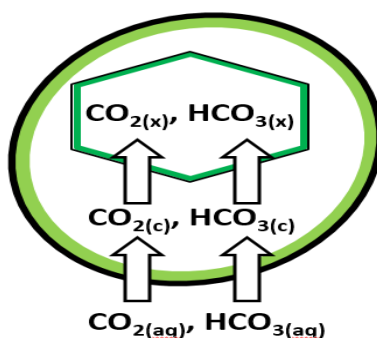


Figura 5. Distribución de especies carbónicas en la cianobacteria.

Las fuentes de energía para la fijación del Ci pueden ser ATP, NADPH o ferredoxina reducida (captación de  $\text{CO}_2$ ). También puede haber un transporte pasivo mediante un gradiente electroquímico [38].

Los transportadores de Ci a través de la membrana son:

- BCT1: Se trata un transportador inducido, codificado por el operón *cmpABCD*, que tiene gran afinidad fotosintética por el  $\text{HCO}_3$ . Se ha demostrado que la transcripción genética del operón *cmpABCD* es fuertemente inducida en condiciones de baja concentración de Ci [37]
- SbtA: Es un transportador inducido dependiente de los iones  $\text{Na}^+$  que tiene una gran afinidad por el  $\text{HCO}_3$  [39]. Se presume que se trata de un cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3$  pero esto no ha sido claramente demostrado, de igual manera que tampoco se sabe el ratio de transporte entre  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3$ . En *Synechocystis*, se necesita alrededor de 1 mM de  $\text{Na}^+$  para conseguir la mitad de la máxima fijación de  $\text{HCO}_3$  [39]. En el estudio de Shibata se llega a la conclusión de que el transportador SbtA tiene una afinidad por el  $\text{HCO}_3$ , alrededor de 16  $\mu\text{M}$ . El problema de ese estudio es que ahora se ha descubierto que la *Synechocystis* posee un tercer transportador de  $\text{HCO}_3$  llamado BicA, el cual no se tuvo en cuenta en el cálculo [40].
- BicA: Se trata de un transportador dependiente de los iones  $\text{Na}^+$  que presenta una baja afinidad por el  $\text{HCO}_3$  y que pertenece a la extensa familia SulP de transportadores de aniones [40]. Debe ser también un cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3$ , pero al igual que ocurre con SbtA, esto no se ha demostrado. En *Synechocystis*, los genes del transportador BicA parecen estar constitutivamente expresados [41].

Además de transportadores, también existen sistemas de captación de CO<sub>2</sub> situados en la membrana. Se trata de complejos NADPH deshidrogenasa modificados. Estos sistemas permiten que el CO<sub>2</sub> atraviese la membrana de una forma pasiva y seguidamente lo transforman en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> para introducirlo al citoplasma. Son complejos NDH-1 especializados en la captación de CO<sub>2</sub> [42]. Hay dos: NDH-14 y NDH-13, éste último tiene una mayor afinidad de captación que el primero ya que puede ser inducido bajo condiciones de Ci limitado y se ha confirmado que en *Synechocystis* está localizado en la membrana tilacoidal [43]. La reacción que se lleva a cabo en estos sistemas de captación es la siguiente:

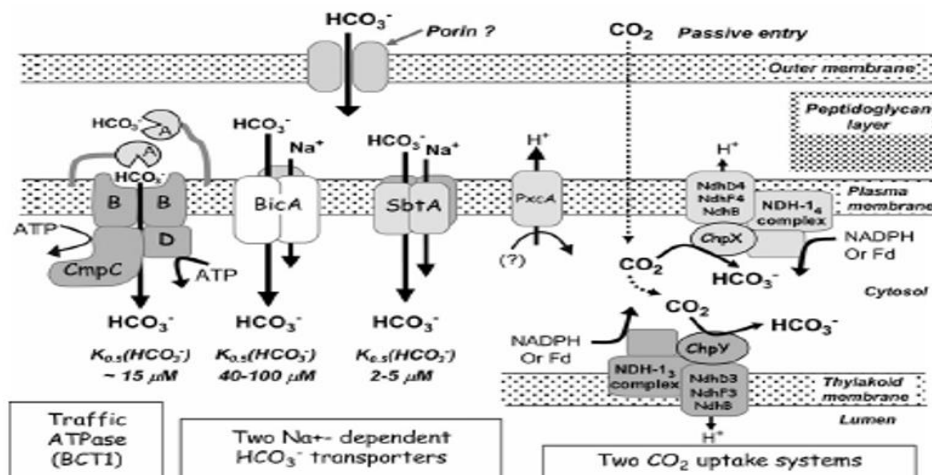


Figura 6. Esquema con la estructura probable y localización en la membrana de las cinco formas de transportar el Ci en cianobacterias.

Existe una consiguiente acumulación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dentro de las células 1000 veces más alta que los niveles de Ci exógeno. La concentración de Ci en el interior de la cianobacteria suele oscilar entre 20-40 mM [44]. Siendo una forma iónica del Ci, el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> presenta una permeabilidad a través de la membrana celular de 3·10<sup>-4</sup> cm/s, mientras que la del CO<sub>2</sub> es 0.3 cm/s [32]. Esto se debe a que la polaridad que presenta el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, la apolaridad y geometría del CO<sub>2</sub> y a la selectividad de la membrana. Es por esto que el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es la forma iónica preferida para acumular el Ci dentro de la célula, especialmente cuando el pH citoplasmático está entre 7.8-8.2.

Durante la fase inicial de iluminación, el CO<sub>2</sub> es el sustrato principal para captar y acumular. Esta captación del CO<sub>2</sub> es fuertemente activada durante los primeros segundos de iluminación y, dependiendo del CO<sub>2</sub> disponible en el medio, suele persistir hasta los 30 segundos. Después de eso, la obtención del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es lentamente activada (entre los 20-60 segundos) y se obtiene una concentración total de Ci mayor a los 2 minutos. Durante el periodo inicial, que corresponde a la captación fuerte de CO<sub>2</sub>, la concentración de Ci en el interior de la célula puede llegar a 20 mM o más.

Como se ha dicho anteriormente, se necesita una conversión de  $\text{CO}_2$  a  $\text{HCO}_3^-$  para evitar el escape del  $\text{C}_i$  de la célula al medio, esto supone un grupo  $\text{OH}^-$  por  $\text{CO}_2$  hidratado durante el proceso de captación. Esto implica que 20 mM de  $\text{H}^+$  deben ser neutralizados o expulsados del citoplasma para mantener el pH interno. El resultado es que se acidifica el medio puntualmente.

La producción genética de PxcA (una proteína cuya función es la extrusión de protones) en *Synechocystis* es esencial para la extrusión de esos  $\text{H}^+$  durante la fase inicial de captación de  $\text{CO}_2$ . La actividad de PxcA depende del transporte de electrones en el PSII y parece que juega un papel importante en la captación de  $\text{HCO}_3^-$  y nitratos (mediante transporte pasivo ya que entran en juegos iones  $\text{Na}^+$ ). Por otro lado, los  $\text{H}^+$  producidos por la fijación del  $\text{CO}_2$  tenderán a mantener el pH estable debido a que éstos son empleados por convertir el  $\text{HCO}_3^-$  en  $\text{CO}_2$  en los carboxisomas.

Cabe destacar que durante la fotosíntesis, si el  $\text{HCO}_3^-$  es el sustrato predominante, los  $\text{H}^+$  consumidos en la conversión de  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{CO}_2$  en los carboxisomas darán lugar a grupos  $\text{OH}^-$  dentro de la célula. Estos grupos  $\text{OH}^-$  deben ser expulsados o neutralizados con la absorción de  $\text{H}^+$  del medio. En conclusión, con bicarbonato como sustrato se termina basificando el medio.

Para un rendimiento óptimo de la anhidrasa carbónica (enzima que cataliza la conversión de  $\text{CO}_2$  y agua a  $\text{HCO}_3^-$  y protones en el carboxisoma) se debe trabajar lo más cerca posible de la máxima fijación de  $\text{CO}_2$  [45]. Existe un escape de  $\text{CO}_2$  a través de las paredes del carboxisoma, éste  $\text{CO}_2$  que se escapa del carboxisoma es reciclado transformándose en  $\text{HCO}_3^-$  antes de abandonar la célula.

Es conocido que los transportadores de  $\text{C}_i$  de las cianobacterias están inactivos en la oscuridad pero son rápidamente activados cuando hay iluminación, comenzando la absorción de  $\text{CO}_2$  y de  $\text{HCO}_3^-$  a los 20-60 segundos de la post-iluminación. La inactivación de estos transportadores en la oscuridad es requerida para prevenir ciclos de bombeo y fuga, los cuales no son de interés ya que suponen un gasto innecesario de la energía metabólica. Existen evidencias de que la activación de los transportadores de  $\text{HCO}_3^-$  inducen señales redox. Hay otras evidencias que afirman que una activación total de los transportadores de  $\text{HCO}_3^-$  induce una fotofosforilación vía serina/treonina proteína kinasa. Es altamente probable que esta activación induzca fenómenos de fosforilación pero aún no se ha demostrado.

## 1.6. FOTOBIORREACTORES

### 1.6.1. Introducción a los fotobiorreactores

Un fotobiorreactor es un dispositivo destinado al cultivo masivo de microorganismos fotosintéticos. Para ello, tiene que mantenerse un medio estable (temperatura, pH, concentración de CO<sub>2</sub>) y proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento incluyendo la luz. Se trata de un equipo cerrado que no tiene contacto físico con el ambiente, de forma que se aumenta el rendimiento y con ello la producción de biomasa. De esta forma las variables del proceso son más fáciles de analizar y se consigue un mejor control de los procesos fotobiológicos. Además, los fotobiorreactores minimizan la posible contaminación exterior y hace posible un mayor ratio de producción de biofueles y compuestos de interés [18].

Hoy en día hay una gran variedad en el diseño de los fotobiorreactores, éstos presentan una gran variedad en cuanto a geometría, régimen de trabajo y tipo de luz incidente. Los fotobiorreactores pueden trabajar en continuo, semicontinuo o discontinuo. A gran escala, es deseable trabajar en semicontinuo ya que se obtienen ratios de producción constantes, se puede controlar el proceso y regular el crecimiento [19]. Además, se elimina el tiempo de limpieza y esterilización en el caso de procesos en discontinuo.



Figura 7. Diferentes fotobiorreactores.

### 1.6.2. LUZ

Para los organismos fotosintéticos, la luz incidente es una de las variables más importantes a optimizar. Como se prefieren cultivos densos para maximizar la producción, la luz normalmente es un factor limitante para obtener un fotobiorreactor rentable. Por otro lado, cultivos densos son más apropiados para un correcto funcionamiento del fotobiorreactor [20] aunque una elevada concentración de microorganismos fotosintéticos aumentaría los gastos de operación [33]. Es por ello que la optimización de la iluminación y de la densidad celular es necesaria para aumentar la actividad fotosintética y minimizar la respiración oscura [19].

Desde el punto de vista de la propagación de la luz, hay importantes diferencias entre las condiciones de aguas abiertas o dentro de un fotobiorreactor en fase acuosa. El uso de luz artificial, ciclos de luz innaturales, la geometría del recipiente o la profundidad de éste son las

principales diferencias. En los fotobiorreactores no hay fenómenos de estratificación, existe un mezclado de forma que los microorganismos fotosintéticos se mueven rápidamente entre las zonas internas y externas del reactor, esto hace posible un reparte más uniforme de la luz.

Un aspecto importante a tener en cuenta es el espectro de la luz incidente al fotobiorreactor, el cual puede ser seleccionado y optimizado. Para la selección del espectro no solo es importante ver que los picos de emisión de la lámpara se solapen con el espectro de absorción de la célula, también hay que tener en cuenta factores como el rendimiento cuántico, fenómenos de dispersión y balance de excitación entre ambos tipos de fotosistemas [21].

La cantidad de luz que reciben los microorganismos depende de la geometría del fotobiorreactor, ya que los fenómenos de dispersión y atenuación de la luz dependen directamente de ella. Es por ello que se deben realizar cálculos previos para averiguar la luz media que le llega a éstos teniendo en cuenta la forma del fotobiorreactor. Comúnmente, éstos suelen ser planos o cilíndricos y la luz se orienta perpendicularmente al fotobiorreactor aunque también se puede orientar transversalmente. La luz no sigue una distribución homogénea a través del fotobiorreactor ya que, además de la geometría y el material del que está hecho el panel, hay que tener en cuenta que hay microorganismos en suspensión dentro del fotobiorreactor y la luz no se va a repartir de forma uniforme entre ellos. Se irán haciendo sombra unos a otros progresivamente, de forma que si el fotobiorreactor es muy profundo, a los microorganismos de una cara no les incidirá apenas luz. También se debe tener en cuenta que si los microorganismos reciben un exceso de radiación sufre fenómenos de fotoinhibición [22].

### **1.6.3. CRECIMIENTO**

El crecimiento de los microorganismos juega un papel muy importante en el funcionamiento del fotobiorreactor. Es por ello que es deseable trabajar en discontinuo, de esta forma se puede mantener el cantidad de éstos constante El crecimiento se mide mediante la densidad óptica, que es una magnitud física que mide la absorbancia de un objeto por unidad de distancia para una longitud de onda dada. Es proporcional al paso óptico de la muestra y a la concentración de la sustancia presente, e inversamente proporcional a la transmitancia.

El medio de cultivo es muy importante para el crecimiento de las cianobacterias. Éste consiste en una disolución acuosa con metales y sales disueltas. Estos compuestos son los nutrientes de los microorganismos y hacen posible su vida. El medio de cultivo más empleado es el *BG-11 Freshwater Solution* (ver Anexo para más información).

Como se ha comentado anteriormente, trabajar en régimen semicontinuo tiene la ventaja de poder mantener el número de células estable. Para ello se introduce medio de cultivo fresco en el fotobiorreactor [23] y por el otro extremo se extrae el mismo volumen que se ha introducido, de forma que el volumen permanece constante. De esta forma se extraen microorganismos y los que hay en el interior crecerán, manteniéndose estable la densidad celular.

#### **1.6.4. DISPONIBILIDAD DE CO<sub>2</sub>**

Otro factor importante es el CO<sub>2</sub> de entrada al fotobiorreactor ya que limita el crecimiento de los microorganismos. Suele introducirse aire enriquecido en CO<sub>2</sub> por la parte inferior del fotobiorreactor, de esta forma burbujea hacia la parte superior favoreciendo el régimen turbulento y con ello la transferencia de materia. Se trata de un parámetro muy importante a optimizar económicamente ya que supone hasta un 15% de los gastos de operación totales. Para la *Synechocystis* se introduce aire enriquecido en CO<sub>2</sub> al 1-2%, esto aumenta el crecimiento pero requiere de un tampón para mantener el pH [24]. Cabe destacar que las cianobacterias captan una pequeña parte del CO<sub>2</sub> introducido, así que por la parte superior sale CO<sub>2</sub> junto a los gases producidos por las reacciones fotosintéticas de los microorganismos.

#### **1.6.5. TEMPERATURA**

La temperatura se mantendrá constante durante el proceso. Las cianobacterias viven a unas temperaturas medianamente altas, de 15 a 30°C. En el caso de la *Synechocystis*, se produce el mayor crecimiento entre 32 y 38°C [23]. Es importante tener esta variable controlada ya que la temperatura afecta a la actividad enzimática, a las membranas celulares y a los orgánulos en general, generando estrés celular.

#### **1.6.6. pH**

El pH del medio en el que se encuentran también es una variable importante a tratar ya que es de vital importancia que los microorganismos estén en condiciones de no estrés. Las cianobacterias viven en un pH que va desde 6 hasta 9. En el caso de la *Synechocystis*, el pH idóneo está entre 7 y 8,5 [24]. Se trata de una variable difícil de controlar ya que depende directamente del CO<sub>2</sub> disuelto y de las reacciones metabólicas de los microorganismos, las cuales lo varían ligeramente. Para mantener el pH en el valor deseado, se va introduciendo tampón al medio. Se trata de una mezcla de un ácido débil y su base conjugada que afectan a la concentración de protones en la disolución acuosa, estabilizando el pH. También se tendrá en cuenta la fuerza iónica, que afecta a las constantes de disociación y puede variar ligeramente el pH.

La introducción de medio de cultivo fresco y de tampón al fotobiorreactor se denomina factor de dilución. Esto se realiza para poder trabajar en semicontinuo y además poseer un control sobre el pH, introduciendo más o menos medio tamponador. Este factor de dilución siempre ha de ser menor o igual al volumen extraído por el otro extremo del fotobiorreactor. De esta forma se evitan fenómenos de lavado, es decir, quedarse sin microorganismos en el interior del fotobiorreactor. También ha de tenerse en cuenta que el factor de dilución hace oscilar el pH ya que el medio de cultivo introducido presenta especies carbónicas disueltas.

Otra variable que puede hacer oscilar el pH es la fuerza iónica del medio de cultivo. Éste parámetro afecta a las constantes de disociación ácido/base y con ello al pH. En el medio de

cultivo hay muchas sales disueltas, además se está diluyendo introduciendo medio tamponador y más medio de cultivo. En el presente modelo se tendrá en cuenta, ya que puede hacer oscilar el pH unas décimas.

Un aspecto a destacar es que las células tienen sus propios mecanismos de tamponación y son muy eficaces. Se ha observado que un cambio de dos unidades en el pH del medio induce un cambio de únicamente dos décimas en el pH del citoplasma. A partir de un pH de 10,5 las capacidades fotosintéticas se van inhibiendo. Como estos microorganismos sobreviven hasta un pH de 11 ésta puede ser una buena técnica para evitar contaminación biológica. Cabe destacar que a pH tan elevados pueden precipitar los alcalinotérreos disueltos en el medio.

### 1.7. MODELOS PREVIOS

Para el modelado del fotobiorreactores a nivel químico, además de la transferencia de materia entre el  $\text{CO}_2$  que se introduce al medio y el propio medio, se deben tener en cuenta dos fenómenos: la solubilización del  $\text{CO}_2$  y los mecanismos de fijación/concentración del carbono

Los diferentes modelos que se han propuesto hasta ahora se distinguen en la cantidad de reacciones de solubilización del  $\text{CO}_2$  que han incluido en su desarrollo. Esta molécula puede reaccionar de varias formas con el medio acuoso:

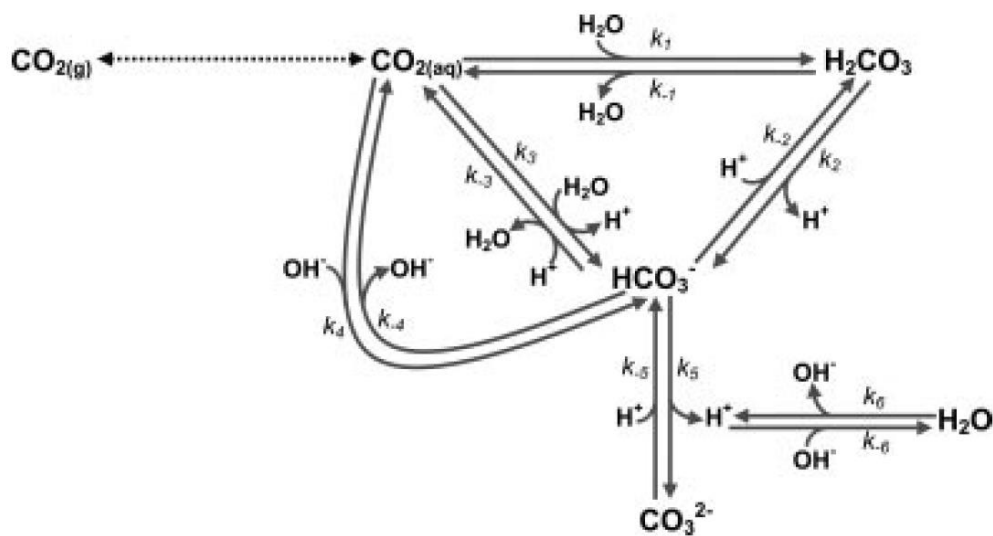


Figura 8. Distintas reacciones que tienen lugar en la solubilización del  $\text{CO}_2$



Tabla 1. Comparación de los distintos modelos describiendo las reacciones de solubilización de CO <sub>2</sub>		
Modelo	Reacciones incluidas	Parámetros cinéticos
Erickson et al. [26]	1, 2, 4, 5 y 6	Para 25°C
Cornet et al. [27]	3, 5 y 6	Valores no dados
Rubio et al. [28]	3, 5 y 6 (en equilibrio)	Para 20°C
Rigobello-Masini y Masini [29]	3, 5 y 6 (en equilibrio)	Para 20°C
Rodríguez-Maroto et al. [30]	1, 2 y 4	Valores no dados
Nedbal et al. [2]	3	Ajustados a datos experimentales
González-López et al. [31]	4, 5 y 6	Ajustados a datos experimentales
El presente trabajo	1, 2, 3, 4, 5 y 6	Correlaciones (5-40°C)

Respecto a los mecanismos de fijación y concentración de carbono inorgánico, los modelos propuestos coinciden en tratarlos como complejos enzimáticos cuya cinética sigue un comportamiento Michaelis-Menten reversible o irreversible, como transporte pasivo a través de la membrana cuyo comportamiento se rige según las leyes de difusividad o como cotransportadores dependientes de la concentración de Na<sup>+</sup>.

## **CAPÍTULO 2: OBJETIVO DEL DOCUMENTO**

En la introducción se ha puesto de manifiesto la importancia de las cianobacterias como fuente de obtención de compuestos de interés socio-económico. Para alcanzar este objetivo, estos microorganismos fotosintéticos se deben explotar a escala industrial en los denominados fotobiorreactores. Para un buen funcionamiento del proceso se necesita un buen control de las variables, y para ello se debe conocer la dinámica del sistema.

Por ello, el objetivo de este Trabajo Final de Grado es el desarrollo de un modelo matemático que explique y prediga la dinámica del sistema.

Para ello se redactará el modelo matemático y a continuación se procederá a su validación, realizando simulaciones virtuales en un programa informático (*RStudio*).

## CAPÍTULO 3: MODELO MATEMÁTICO PROPUESTO

Para el modelado del  $\text{CO}_2$  en el interior del fotobiorreactor se ha tenido en cuenta la solubilización del  $\text{CO}_2$ , los mecanismos de fijación y concentración presentes en los microorganismos fotosintéticos y la transferencia gas-líquido presente en todo el fotobiorreactor.

### 3.1. SOLUBILIZACIÓN DEL $\text{CO}_2$

Como se ha comentado anteriormente, en el presente trabajo se tendrán en cuenta todas las posibles reacciones que entran en juego en la solubilización del  $\text{CO}_2$ . Se trata de la de la conversión del  $\text{CO}_2$  en distintas especies carbónicas disueltas en el medio acuoso.

Siguiendo la nomenclatura empleada en la figura 9, se obtienen las expresiones cinéticas de cada especie presente:

$$R_{\text{CO}_2} = C_{\text{H}_2\text{CO}_3}k_{-1} + C_{\text{H}}C_{\text{HCO}_3}k_{-3} + C_{\text{HCO}_3}k_{-4} - C_{\text{CO}_2}(k_1 + k_3 + C_{\text{OH}}k_4) \quad (1)$$

$$R_{\text{H}_2\text{CO}_3} = C_{\text{CO}_2}k_1 + C_{\text{H}}C_{\text{HCO}_3}k_{-2} - C_{\text{H}_2\text{CO}_3}(k_{-1} + k_2) \quad (2)$$

$$R_{\text{HCO}_3} = C_{\text{H}_2\text{CO}_3}k_2 + C_{\text{CO}_2}k_3 + C_{\text{CO}_2}C_{\text{OH}}k_4 + C_{\text{H}}C_{\text{CO}_3}k_{-5} - C_{\text{HCO}_3}(C_{\text{H}}(k_{-2} + k_{-3}) + k_{-4} + k_5) \quad (3)$$

$$R_{\text{CO}_3} = C_{\text{HCO}_3}k_5 - C_{\text{H}}C_{\text{CO}_3}k_{-5} \quad (4)$$

$$R_{\text{H}} = C_{\text{H}_2\text{CO}_3}k_2 + C_{\text{CO}_2}k_3 + C_{\text{HCO}_3}k_5 + k_6 - C_{\text{H}}(C_{\text{HCO}_3}(k_{-2} + k_{-3}) + C_{\text{CO}_3}k_{-5} + C_{\text{OH}}k_{-6}) \quad (5)$$

$$R_{\text{OH}} = C_{\text{HCO}_3}k_{-4} + k_6 - C_{\text{OH}}(C_{\text{CO}_2}k_4 + C_{\text{H}}k_{-6}) \quad (6)$$

Para aplicar las ecuaciones (1)-(6) se requiere de ratios de reacción constantes tanto en el sentido directo como en el inverso. Los ratios de reacción (1)-(3) no pueden ser determinados individualmente, es por ello que la expresión de la concentración de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  es reemplazada por la expresión de equilibrio químico:

$$C_{\text{H}_2\text{CO}_3} = \frac{C_{\text{H}}C_{\text{HCO}_3}}{K_2} \quad (7)$$

Las ecuaciones (1) y (2) dan lugar a (8) y (9), respectivamente:

$$R_{\text{CO}_2} = C_{\text{H}_2\text{CO}_3} \left( C_{\text{H}} \left( \frac{k_{-1}}{K_2} + k_{-3} \right) + k_{-4} \right) - C_{\text{CO}_2}(k_1 + k_3 + C_{\text{OH}}k_4) \quad (8)$$

$$R_{H_2CO_3} = C_{CO_2}k_1 + C_H C_{HCO_3} k_{-2} - C_H C_{HCO_3} \frac{k_{-1}}{K_2} - C_{H_2CO_3} k_2 \quad (9)$$

Las constantes cinéticas de la ecuación (8) están tabuladas para un rango de temperaturas de 5-40°C, lo que significa que la velocidad cinética del CO<sub>2</sub> disuelto solo se determinará en este rango de temperaturas. Por otro lado, las ecuaciones (2), (5) y (6) son casi instantáneas y sus constantes cinéticas están determinadas para 25°C. Habrá que trabajar con las constantes de equilibrio ya que éstas sí que están tabuladas a distintas temperaturas. Por tanto se eliminarán las constantes cinéticas de las ecuaciones (2), (5) y (6) para que el modelo no sea dependiente de la temperatura:

$$K_5 = \frac{C_{CO_3} C_H}{C_{HCO_3}} \quad (10)$$

$$K_6 = C_{OH} C_H \quad (11)$$

Se emplea la ecuación (7) para correlacionar las velocidades de reacción de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CO<sub>3</sub> y OH<sup>-</sup> con las velocidades de reacción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y H<sup>+</sup>:

$$R_{H_2CO_3} = \frac{C_H R_{HCO_3} + C_{HCO_3} R_H}{K_2} \quad (12)$$

$$R_{CO_3} = \frac{K_5}{C_H} R_{HCO_3} - \frac{C_{HCO_3} K_5}{C_H^2} R_H \quad (13)$$

$$R_{OH} = -\frac{K_6}{C_H^2} R_H \quad (14)$$

Se pueden emplear las ecuaciones (12)-(14) es posible debido a que las reacciones (2), (5) y (6) llegan al equilibrio químico casi instantáneamente. Dando como resultado que las ecuaciones (7), (10) y (11) siempre sean válidas.

Además, también se ha empleado una ecuación para la electroneutralidad:

$$R_{HCO_3} + 2R_{CO_3} + R_{OH} - R_H = 0 \quad (15)$$

Junto con las ecuaciones (13) y (14) se puede correlacionar la velocidad de reacción de H<sup>+</sup> con la velocidad de reacción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

La velocidad de reacción de  $\text{HCO}_3^-$  se obtiene a partir de una ecuación que la relaciona con las velocidades de reacción de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  y  $\text{CO}_3^{2-}$ :

$$R_{\text{H}_2\text{CO}_3} + R_{\text{HCO}_3^-} + R_{\text{CO}_3^{2-}} = C_{\text{CO}_2}(k_1 + k_3 + C_{\text{OH}^-}k_4) - C_{\text{HCO}_3^-} \left( C_{\text{H}^+} \left( \frac{k_{-1}}{K_2} + k_{-3} \right) + k_{-4} \right) \quad (16)$$

Las ecuaciones (12)-(15) son sustituidas en la ecuación (16) dando lugar a:

$$R_{\text{HCO}_3^-} = \frac{C_{\text{CO}_2}(k_1+k_3+C_{\text{OH}^-}k_4)-C_{\text{HCO}_3^-}(C_{\text{H}^+}((k_{-1}/K_2)+k_{-3})+k_{-4})}{[(C_{\text{H}^+}/K_2)+1+(K_5/C_{\text{H}^+})+(1+(2K_5/C_{\text{H}^+}))((C_{\text{HCO}_3^-}/K_2)-(C_{\text{HCO}_3^-}K_5/C_{\text{H}^+}^2))]/(1+(2C_{\text{HCO}_3^-}K_5/C_{\text{H}^+}^2)+(K_6/C_{\text{H}^+}^2))]} \quad (17)$$

Esta ecuación es correcta entre 5-40°C y no presenta control de pH. El resto de velocidades de reacción se obtienen sustituyendo la ecuación (17) en las ecuaciones (12)-(15).

Si el pH se mantiene constante con la adición de ácido/base o de una disolución tamponadora, se deben usar otras ecuaciones de velocidades de reacción. Esto es debido a que las velocidades de reacción de  $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^-$  son nulas ya que sus concentraciones permanecen constantes. Se obtiene la siguiente ecuación:

$$R_{\text{HCO}_3^-} = \frac{C_{\text{CO}_2}(k_1+k_3+C_{\text{OH}^-}k_4)-C_{\text{HCO}_3^-}(C_{\text{H}^+}((k_{-1}/K_2)+k_{-3})+k_{-4})}{((C_{\text{H}^+}/K_2)+1+(K_5/C_{\text{H}^+}))} \quad (18)$$

Para el  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$  y  $\text{CO}_3^{2-}$ , las ecuaciones (8), (12) y (13) siguen siendo correctas.

### 3.2. MECANISMOS DE FIJACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE CARBONO

Las ecuaciones anteriores tienen únicamente en cuenta las reacciones químicas asociadas a la solubilización del CO<sub>2</sub>. Para un correcto modelado de un fotobiorreactor se deben incluir los mecanismos que presentan los microorganismos fotosintéticos para fijar el carbono y después, concentrarlo.

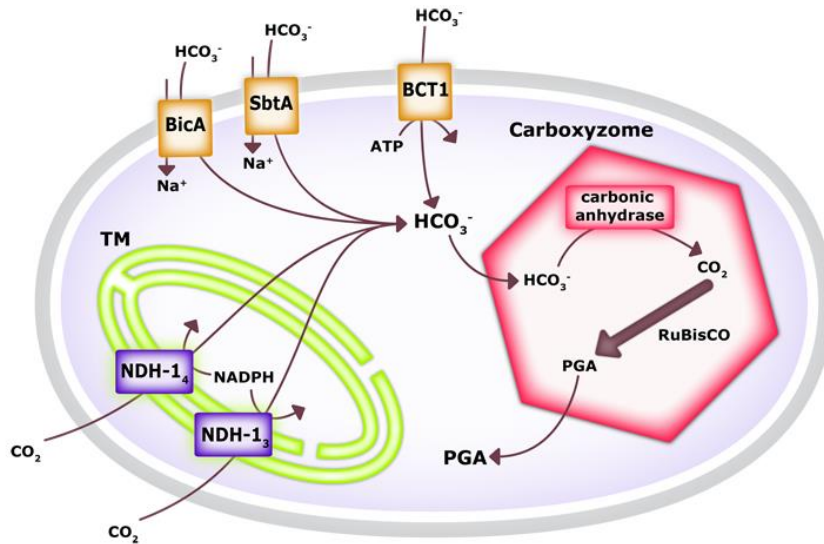


Figura 9. Ciclo metabólico del CO<sub>2</sub> en el interior de una cianobacteria.

El transporte de CO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub> a través de la membrana celular es pasivo y reversible, al igual que ocurre con la membrana del carboxisoma:

$$v_{CO_2}^{aq \rightarrow c} = k_{CO_2}^{aq \rightarrow c} \cdot ([CO_2]_{aq} - [CO_2]_c) \quad (19)$$

$$v_{HCO_3}^{aq \rightarrow c} = v_{HCO_3}^{aq \rightarrow c} \cdot ([HCO_3]_{aq} - [HCO_3]_c) \quad (20)$$

$$v_{CO_2}^{c \rightarrow x} = k_{CO_2}^{c \rightarrow x} \cdot ([CO_2]_c - [CO_2]_x) \quad (21)$$

$$v_{HCO_3}^{c \rightarrow x} = k_{HCO_3}^{c \rightarrow x} \cdot ([HCO_3]_c - [HCO_3]_x) \quad (22)$$

Para describir las velocidades de reacción de las reacciones enzimáticas presentes en los transportadores NDH-13, NDH-14, BicA y SbtA se emplea la cinética de Michaelis-Menten irreversible:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (23)$$

Las expresiones para los transportadores NDH-13 y NDH-14, los cuales transforman el  $CO_2(c)$  en  $HCO_3(c)$ , son las siguientes:

$$v_{CO_2}^{NADPH3} = \frac{V_{\max\_CO_2}^{NADPH3} \cdot [CO_2]_c}{K_m^{NADPH3} + [CO_2]_c} \quad (24)$$

$$v_{CO_2}^{NADPH4} = \frac{V_{\max\_CO_2}^{NADPH4} \cdot [CO_2]_c}{K_m^{NADPH4} + [CO_2]_c} \quad (25)$$

Por otro lado, las expresiones para los transportadores BicA y Sbt, que transforman el  $HCO_3(aq)$  en  $HCO_3(c)$ , quedan de la siguiente forma:

$$v_{HCO_3}^{BicA} = \frac{V_{\max\_HCO_3}^{BicA} \cdot [HCO_3]_{aq}}{K_m^{BicA} + [HCO_3]_{aq}} \quad (26)$$

$$v_{HCO_3}^{SbtA} = \frac{V_{\max\_HCO_3}^{SbtA} \cdot [HCO_3]_{aq}}{K_m^{SbtA} + [HCO_3]_{aq}} \quad (27)$$

Existen 3 transportadores de  $HCO_3$  pero el modelo tendrá en cuenta dos, el restante (BCT1) se admite de manera basal. La cinética de la enzima RuBisCO, que transformará el  $CO_2(x)$  en  $PGA(x)$ , también se considera de comportamiento Michaelis-Menten:

$$v_{CO_2}^{Rubisco} = \frac{V_{\max\_CO_2}^{Rubisco} \cdot [CO_2]_x}{K_m^{Rubisco} + [CO_2]_x} \quad (28)$$

La cinética de la anhidrasa carbónica (AC), que transforma el  $HCO_3(x)$  en  $CO_2(x)$ , sigue un comportamiento de una Michaelis-Menten reversible:

$$v_{HCO_3}^{AC} = \frac{V_{\max\_AC}^f \cdot \frac{[HCO_3]_x}{K_m^{AC\_HCO_3\_x}} - V_{\max\_AC}^r \cdot \frac{[CO_2]_x}{K_m^{AC\_CO_2\_x}}}{\left(1 + \frac{[HCO_3]_x}{K_m^{AC\_HCO_3\_x}}\right) + \left(1 + \frac{[CO_2]_x}{K_m^{AC\_CO_2\_x}}\right)} - 1 \quad (29)$$

### 3.3. OBTENCIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

Todas las unidades están en uM para las concentraciones y uM/s para las constantes cinéticas.

Con la combinación de las expresiones de solubilización del CO<sub>2</sub> en el medio y las de los mecanismos de fijación y concentración de carbono, obtenemos las verdaderas velocidades de reacción de las distintas especies carbónicas presentes en el sistema.

En el caso de las velocidades de reacción en el citoplasma y en el carboxisoma se obtienen unas ecuaciones bastante simples, ya que solo hay presente HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>2</sub>:

$$R_{HCO_3}^c = v_{HCO_3}^{aq \rightarrow c} - v_{HCO_3}^{c \rightarrow x} \cdot \frac{V_x}{V_c} + v_{CO_2}^{NADPH3} + v_{CO_2}^{NADPH4} + v_{CO_2}^{BicA} + v_{CO_2}^{SbtA} \quad (30)$$

$$R_{CO_2}^c = v_{CO_2}^{aq \rightarrow c} - v_{CO_2}^{c \rightarrow x} \cdot \frac{V_x}{V_c} - v_{CO_2}^{NADPH3} - v_{CO_2}^{NADPH4} \quad (31)$$

$$R_{HCO_3}^x = v_{HCO_3}^{c \rightarrow x} - v_{HCO_3}^{AC} \quad (32)$$

$$R_{CO_2}^x = v_{CO_2}^{c \rightarrow x} + v_{HCO_3}^{AC} \quad (33)$$

En el caso de las velocidades de reacción en el medio acuoso, las expresiones se complican un poco por la presencia de otras especies carbónicas. Además, se han de tener en cuenta los H<sup>+</sup> y OH<sup>-</sup> presentes en el medio y el CO<sub>2</sub> que se está introduciendo al reactor en forma de gas (transferencia de materia).

Para simplificar el desarrollo, se formulan los siguientes parámetros:

$$A_0 = V_c \cdot (R_{HCO_3}^c + R_{CO_2}^c) + V_x \cdot (R_{HCO_3}^x + R_{CO_2}^x) \quad (34)$$

$$B_0 = V_c \cdot R_{HCO_3}^c + V_x \cdot R_{HCO_3}^x \quad (35)$$

$$P_0 = 1 + \frac{K_6 + 2[HCO_3]_{aq} \cdot K_5}{[H]_{aq}^2} \quad (36)$$

Con estas simplificaciones se procede a la obtención de las expresiones que definen las variaciones temporales de la concentración de las distintas especies carbónicas en el medio acuoso:

$$R_{CO_2}^{aq} = [HCO_3]_{aq} \cdot ([H]_{aq} k_{-13} + k_{-4}) - [CO_2]_{aq} \cdot \left( k_{13} + \frac{K_6}{[H]_{aq}} \cdot k_4 \right) - \frac{V_c}{V_{aq}} \cdot v_{CO_2}^{aq \rightarrow c} \quad (37)$$



$$R_{HCO_3}^{aq} = \frac{-V_{aq} \cdot R_{CO_2}^{aq} + A_0 + B_0 \cdot [HCO_3]_{aq} \cdot \left(\frac{1}{K_2} - c\right)}{V_{aq} \cdot \left(1 + \frac{[H]_{aq}}{K_2} + \frac{K_5}{[H]_{aq}} + \left(\frac{[HCO_3]_{aq}}{K_2} - \frac{[HCO_3]_{aq} \cdot K_5}{[H]_{aq}^2}\right) \cdot \left(1 + \frac{2K_5}{[H]_{aq}}\right)\right)} \quad (38)$$

$$R_H^{aq} = \frac{R_{HCO_3}^{aq} \cdot \left(1 + \frac{2K_5}{[H]_{aq}}\right)}{P_0} + \frac{B_0}{V_{aq} \cdot P_0} \quad (39)$$

$$R_{OH}^{aq} = -\frac{K_6}{[H]_{aq}^2} \cdot R_H^{aq} \quad (40)$$

$$R_{H_2CO_3}^{aq} = R_{HCO_3}^{aq} \cdot \left(\frac{[H]_{aq}}{K_2} + \frac{\frac{[HCO_3]_{aq}}{K_2} \cdot \left(1 + \frac{2K_5}{[H]_{aq}}\right)}{P_0}\right) + \frac{[H]_{aq} \cdot B_0}{V_{aq} \cdot P_0} \quad (41)$$

$$R_{CO_3}^{aq} = R_{HCO_3}^{aq} \cdot \left(\frac{K_5}{[H]_{aq}} - \frac{[HCO_3]_{aq} \cdot K_5}{[H]_{aq}^2} \cdot \left(\frac{1 + \frac{2K_5}{[H]_{aq}}}{P_0}\right)\right) - \frac{[HCO_3]_{aq} \cdot K_5}{[H]_{aq}^2} \cdot \frac{B_0}{V_{aq} \cdot P_0} \quad (42)$$

Para la obtención de la expresión del CO<sub>2</sub> (gas) se ha de tener en cuenta la transferencia de materia que ocurre entre la burbuja y el medio acuoso:

$$R_{CO_2}^{Gas} = \frac{k_L a_{CO_2}}{1 - e_G} \cdot \frac{[CO_2]_{aq} \cdot k_H^{CO_2} + (P_{b0} - [CO_2]_{aq}) \cdot k_H^{CO_2} \cdot \left(\frac{u_G \cdot k_H^{CO_2}}{-k_L a_{CO_2} \cdot RT' \cdot h}\right) \cdot \left(\exp\left(\frac{k_L a_{CO_2} \cdot RT' \cdot h}{u_G \cdot k_H^{CO_2}}\right) - 1\right)}{k_H^{CO_2} - [CO_2]_{aq}} \quad (43)$$

También, se obtiene una expresión para explicar la variación temporal de la presión de salida:

$$R_{PresH} = \frac{u_G}{h \cdot H} \cdot \left([CO_2]_{aq} \cdot k_H^{CO_2} + (P_{b0} - [CO_2]_{aq}) \cdot k_H^{CO_2}\right) \cdot \exp\left(\frac{k_L a_{CO_2} \cdot RT' \cdot h}{u_G \cdot k_H^{CO_2}}\right) - PresH \quad (44)$$

Además, se realizan un balance de materia y de carga:

$$dCi_{total}/dt = V_c \cdot (R_{HCO_3}^c + R_{CO_2}^c) + V_x \cdot (R_{HCO_3}^x + R_{CO_2}^x) + V_{aq} (R_{HCO_3}^{aq} + R_{CO_2}^{aq} + R_{CO_3}^{aq} + R_{H_2CO_3}^{aq}) - V_x \cdot v_{CO_2}^{Rubisco} + V_{aq} \cdot R_{CO_2}^{Gas} \quad (45)$$

$$V_c \cdot R_{HCO_3}^c + V_x \cdot R_{HCO_3}^x + V_{aq} (R_{HCO_3}^{aq} - R_H^{aq} + R_{OH}^{aq} + 2 \cdot R_{CO_3}^{aq}) = 0 \quad (46)$$

Con todas estas ecuaciones se puede proceder a resolver el sistema con ayuda de un programa informático. Para ello, se determinan a continuación las variaciones de cada parámetro, las cuales se deberán incluir dentro del algoritmo que resolverá el sistema de ecuaciones diferenciales lineales.

$$dCO2_{aq} = R_{CO2}^{aq} + R_{CO2}^{Gas} \quad (47)$$

$$dCO2_c = R_{CO2}^c \quad (48)$$

$$dCO2_x = R_{CO2}^x - v_{CO2}^{Rubisco} \quad (49)$$

$$dHCO3_x = R_{HCO3}^x \quad (50)$$

$$dHCO3_c = R_{HCO3}^c \quad (51)$$

$$dHCO3_{aq} = R_{HCO3}^{aq} \quad (52)$$

$$dH_{aq} = R_H^{aq} \quad (53)$$

$$dOH_{aq} = R_{OH}^{aq} \quad (54)$$

$$dH2CO3_{aq} = R_{H2CO3}^{aq} \quad (55)$$

$$dCO3_{aq} = R_{CO3}^{aq} \quad (56)$$

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todo el presente trabajo se ha realizado *in silico*, se ha empleado un ordenador portátil Asus X540LA-XX021T Intel® Core™ i3.

Para el diseño y simulación del modelo se ha empleado el lenguaje R (versión 2.14.1). R es un lenguaje de programación con el que se pueden realizar potentes análisis estadísticos como regresiones lineales y no-lineales, tests estadísticos, análisis de series de tiempo o resolución de sistemas empleando algoritmos. Además, también presenta potentes herramientas para la proyección de los resultados en gráficos (<http://www.r-project.org/>).

Para hacer posible las siguientes simulaciones, se han inicializado ciertas variables (Ver Anexo pág. 13-15) y algunos valores de los parámetros del proceso se han calculado (Ver Anexo pág. 7-11) y otros se han fijado coherentemente (Ver Anexo pág. 12).

En el modelado matemático que se ha explicado anteriormente, no se ha tenido en cuenta el crecimiento de los microorganismos fotosintéticos en el interior del reactor. Para hacer posible esto, se formula una expresión que recrea el crecimiento de los microorganismos y se ponen el resto de parámetros en función de éste (Ver Anexo pág. 3, línea 8).

El modelo propuesto se trata de un conjunto de ecuaciones diferenciales temporales lineales que se va a resolver con la rutina *ode*. Esta rutina se encuentra en la librería *deSolve* y en nuestro caso ha funcionado muy bien ya que el modelo presentado no tiene problemas de *stiff* (todos los incrementos de las variables presentes son de una magnitud bastante similar).

Se procede a comenzar las simulaciones, empezando por las concentraciones de las distintas especies carbónicas en los distintos medios.

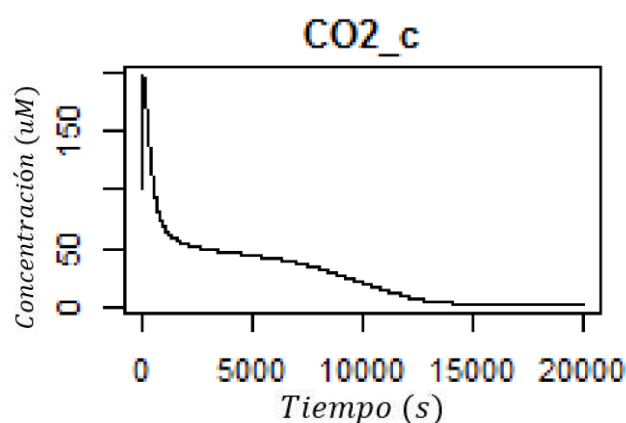


Figura 10. Representación de la concentración de CO<sub>2</sub> presente en el citoplasma frente al tiempo.

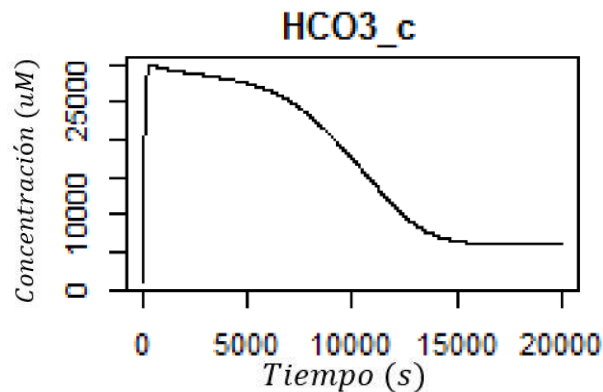


Figura 11. Representación de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  presente en el citoplasma frente al tiempo.

En el caso del citoplasma, en la figura 11 se observa que la concentración de  $\text{CO}_2$  crece inicialmente ya que el microorganismo fotosintético lo está fijando y concentrando pero una vez se llega al máximo, la concentración empieza a descender. Esto se debe a que la forma preferida de los microorganismos para almacenar el carbono inorgánico es el  $\text{HCO}_3^-$  ya que éste no es permeable a la membrana celular y así se consigue que no se escape, por tanto la concentración de  $\text{CO}_2$  va disminuyendo ya que se transforma a  $\text{HCO}_3^-$ . Además, cada vez hay más microorganismos en el fotobiorreactor ya que estos crecen y el  $\text{CO}_2$  presente se va consumiendo hasta agotarse.

En la figura 12 también se observa un incremento de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  ya que las células lo están captando del medio acuoso o están transformando el  $\text{CO}_2$  a  $\text{HCO}_3^-$ . Después se observa un comportamiento descendente ya que ésta es la principal fuente de carbono inorgánico dentro de la célula y se va consumiendo hasta llegar a un equilibrio y no agotarse, esto se debe a que los microorganismos lo almacenan dentro del citoplasma como reserva.

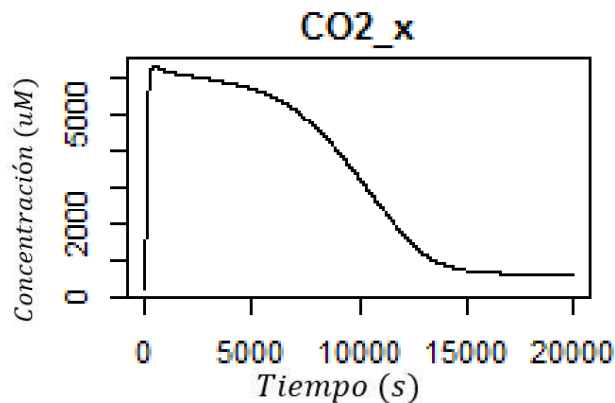


Figura 12. Representación de la concentración de  $\text{CO}_2$  presente en el carboxisoma frente al tiempo.

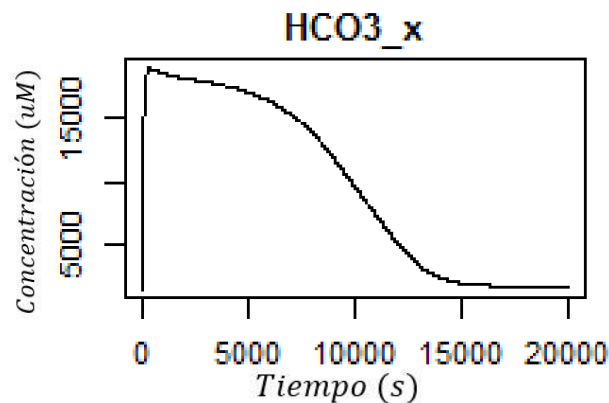


Figura 13. Representación de la concentración de  $\text{HCO}_3$  presente en el carboxisoma frente al tiempo.

En las figuras 13 y 14 se observan las variaciones de la concentración de las distintas especies carbónicas presentes en el carboxisoma. Si se presta atención a los valores de concentración, se observa que los valores de la concentración en el carboxisoma son mucho más elevados comparados con los del citoplasma, esto se debe a que el volumen del carboxisoma es mucho menor y en él el carbono inorgánico está mucho más concentrado, facilitando así el funcionamiento de la enzima RuBisCO.

En la figura 13 se observa como al principio aumenta mucho la concentración de  $\text{CO}_2$  para concentrar carbono inorgánico y así conseguir un buen rendimiento de la enzima RuBisCO. A continuación, aumenta la demanda de  $\text{CO}_2$  debido al crecimiento de los microorganismos y la concentración de  $\text{CO}_2$  empieza a disminuir hasta llegar a un equilibrio debido a que la anhidrasa carbónica está convirtiendo todo el  $\text{HCO}_3$  disponible en  $\text{CO}_2$ .

En la figura 14 se observa que la concentración de  $\text{HCO}_3$  sigue el mismo comportamiento que la de  $\text{CO}_2$ . La diferencia es que el  $\text{HCO}_3$  se agota ligeramente más rápido.

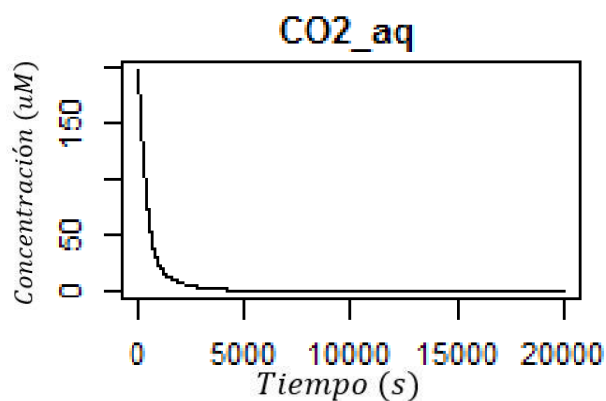


Figura 14. Representación de la concentración de  $\text{CO}_2$  presente en el medio acuoso frente al tiempo.

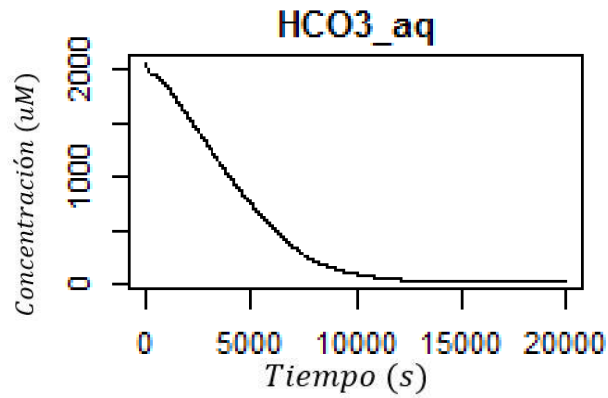


Figura 15. Representación de la concentración de  $\text{HCO}_3$  presente en el medio acuoso frente al tiempo.

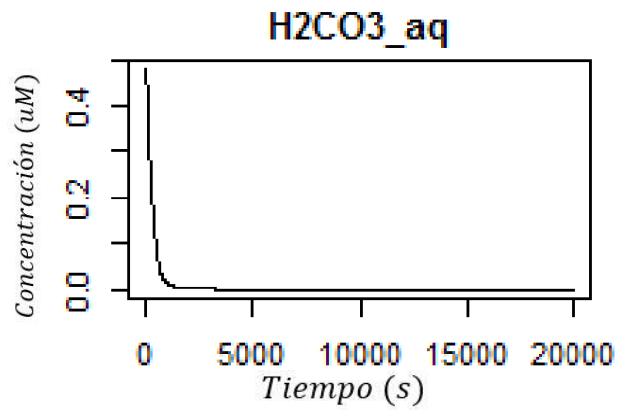


Figura 16. Representación de la concentración de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  presente en el medio acuoso frente al tiempo.

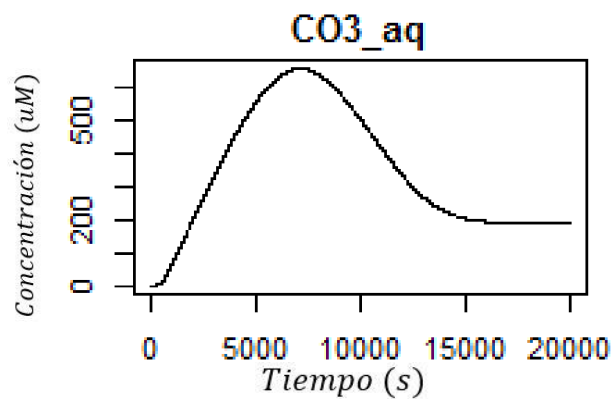


Figura 17. Representación de la concentración de  $\text{CO}_3$  presente en el medio acuoso frente al tiempo.

En las figuras 15, 16 y 17 se observa como la concentración de estas especies carbónicas en el medio acuoso va disminuyendo debido a que los microorganismos fotosintéticos las están consumiendo. El primero en agotarse es el  $\text{H}_2\text{CO}_3$  debido a que se empieza a desprotonar rápidamente para dar lugar a  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_3^{2-}$ . Seguidamente, se agota el  $\text{CO}_2$  ya que éste atraviesa más fácilmente la membrana celular que el  $\text{HCO}_3^-$ , el cual se agota en el último puesto debido a que requiere un transporte activo a través de la membrana celular. Cabe destacar el detalle que el  $\text{HCO}_3^-$  es la especie carbónica más presente en el medio acuoso mientras que el  $\text{H}_2\text{CO}_3$  apenas está presente.

En la figura 18 se observa que al principio aumenta la concentración del anión  $\text{CO}_3^{2-}$  debido a que éste se va acumulando en el medio acuoso. Esto se produce porque este anión debe protonarse para poder atravesar la membrana celular ya que estos microorganismos no presentan mecanismos para transportarlo a través de su membrana. Como estamos en pH relativamente básicos (entre 7,5 y 11) al  $\text{CO}_3^{2-}$  le cuesta encontrar esos protones y a esto se debe su acumulación inicial en el medio acuoso. El consiguiente consumo de  $\text{CO}_3^{2-}$  se debe a que los microorganismos fotosintéticos empiezan a consumirlos. Como se aprecia en la figura 19, el  $\text{CO}_3^{2-}$  es la especie carbónica más estable a partir de un pH de 10,5 aproximadamente, siendo así la fuente de carbono inorgánico predominante. No llega a agotarse sino que alcanza un equilibrio químico ya que se han alcanzados pH elevados y es difícil que se protonen y puedan atravesar la membrana celular.

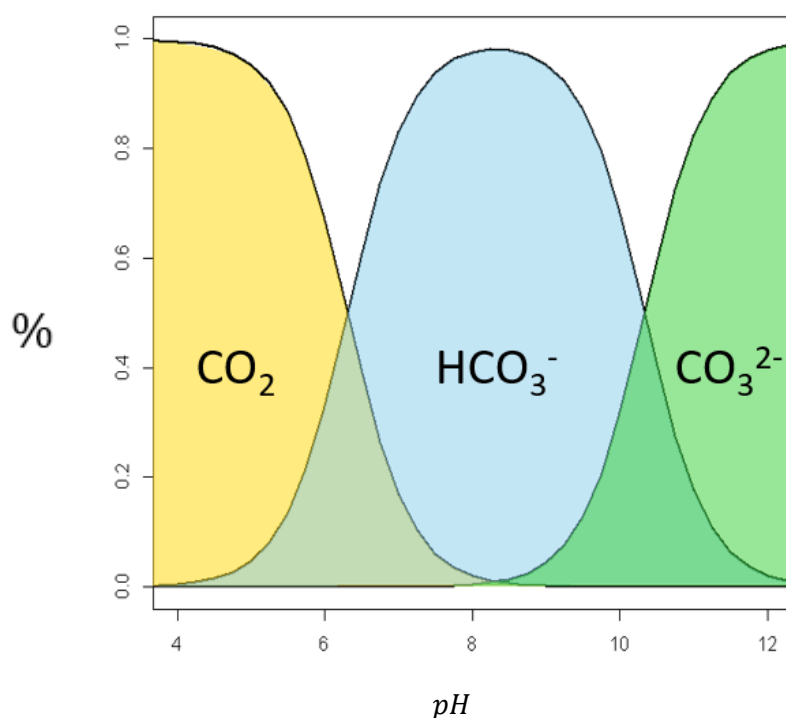


Figura 18. Distribución de distintas especies carbónicas en función del pH.

También es de interés un estudio del pH para ver si se ajusta a la solubilización del  $\text{CO}_2$  en el medio acuoso. Para ello se simula la variación de la concentración de  $\text{H}^+$  y de  $\text{OH}^-$ :

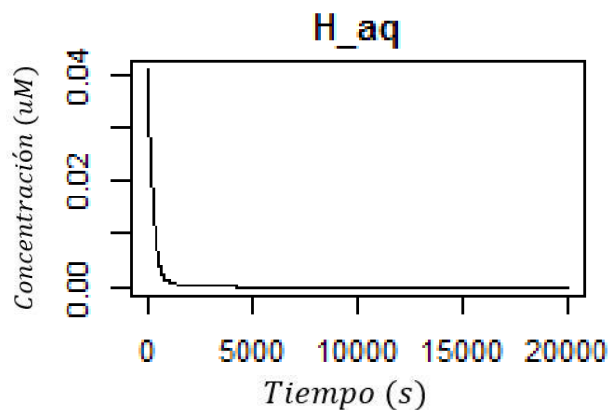


Figura 19. Representación de la concentración de  $\text{H}^+$  presente en el medio acuoso frente al tiempo.

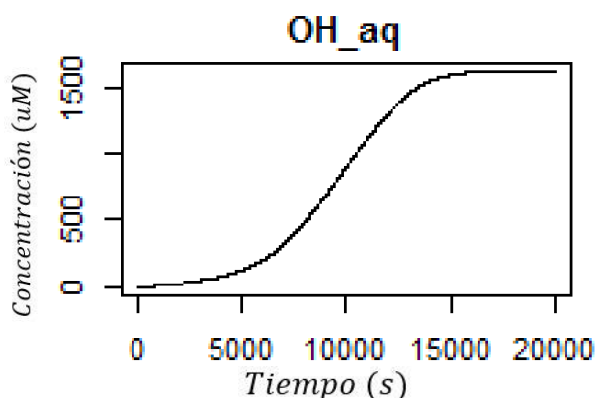


Figura 20. Representación de la concentración de  $\text{OH}^-$  presente en el medio acuoso frente al tiempo.

En la figura 20 se observa que los protones disueltos en el medio se consumen rápidamente probablemente para protonar el anión  $\text{CO}_3^-$ . Además se observa que están en muy bajas concentraciones en el medio acuoso, esto se debe a que estamos en un pH relativamente básico.

En la figura 21 se observa que, efectivamente, la concentración de  $\text{OH}^-$  es mucho más elevada que la de  $\text{H}^+$  ya que nos encontramos en pHs básicos. Se observa también que la concentración de estos grupos hidroxilo aumenta. Esto ocurre porque cuando el  $\text{HCO}_3^-$  es el sustrato predominante, los  $\text{H}^+$  consumidos en la conversión de  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{CO}_2$  en los carboxisomas darán lugar a grupos  $\text{OH}^-$  dentro de la célula. Estos grupos  $\text{OH}^-$  deben ser expulsados o neutralizados con la absorción de  $\text{H}^+$  del medio. Al estar empleando bicarbonato como sustrato principal, se termina basificando el medio y esto implica que aumente la concentración de  $\text{OH}^-$  en él.



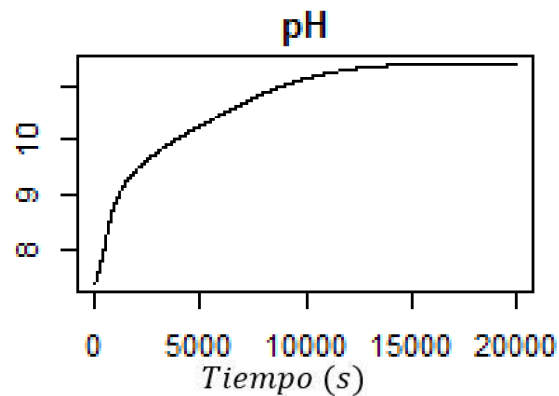


Figura 21. Representación del pH del medio acuoso frente al tiempo.

En la figura 22 se aprecia esa basificación del medio a lo largo del tiempo. También se observa que efectivamente se alcanza el pH de 10,5 a partir del cual el  $\text{CO}_3$  es la especie carbónica predominante y por tanto, el sustrato principal. Como el resto de las gráficas, tiende a un estado estacionario en el cual está el sistema acuoso en equilibrio.

El interés del modelo es crear bucles y poder simular el comportamiento de una variable según la variación de otra. A continuación, se realizarán simulaciones variando el número de células presentes en el fotobiorreactor.

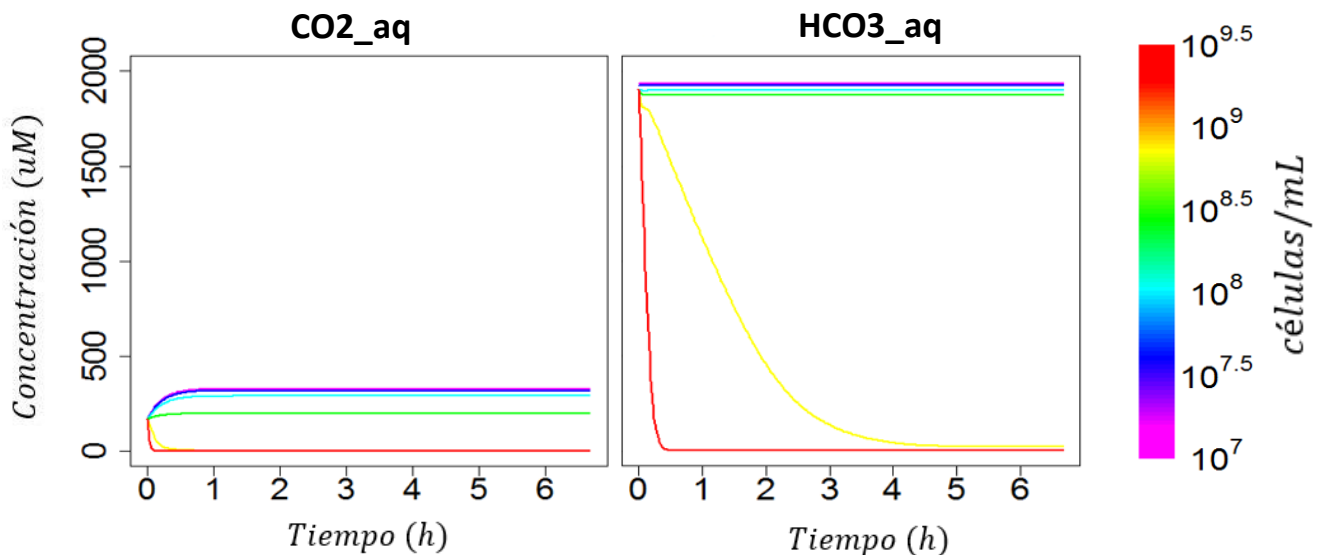


Figura 22. A la izquierda, la variación del  $\text{CO}_2$  en el medio acuoso frente al tiempo. A la derecha, la variación del  $\text{HCO}_3$  en el medio acuoso frente al tiempo. Ambas simulaciones son para distintos números de células en el fotobiorreactor.

En la figura 23 se observa como las células no son capaces de captar todo el  $\text{CO}_2$  hasta que hay  $10^9$  células por mL. Cuando ya hay un número considerable de microorganismos fotosintéticos en el fotobiorreactor, el  $\text{CO}_2$  del medio acuoso se consume rápidamente. Respecto al bicarbonato en medio acuoso ocurre lo mismo, hasta que no hay una gran cantidad de microorganismos fotosintéticos prácticamente permanece constante ya que hay mucha cantidad de él en el medio.

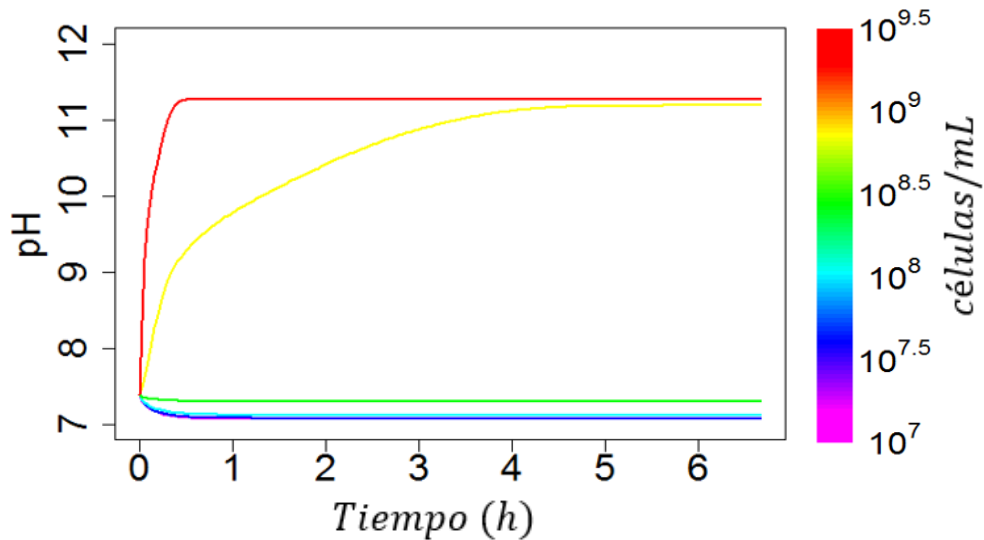


Figura 23. Variación del pH respecto al tiempo para diferentes cantidades de células en el fotobiorreactor.

En la figura 24 se observa que a mayor número de microorganismos fotosintéticos, más rápidamente se basicifica el medio debido a que emplean como sustrato principal el anión  $\text{HCO}_3^-$ . Mientras que a concentraciones bajas de células permanece prácticamente constante.

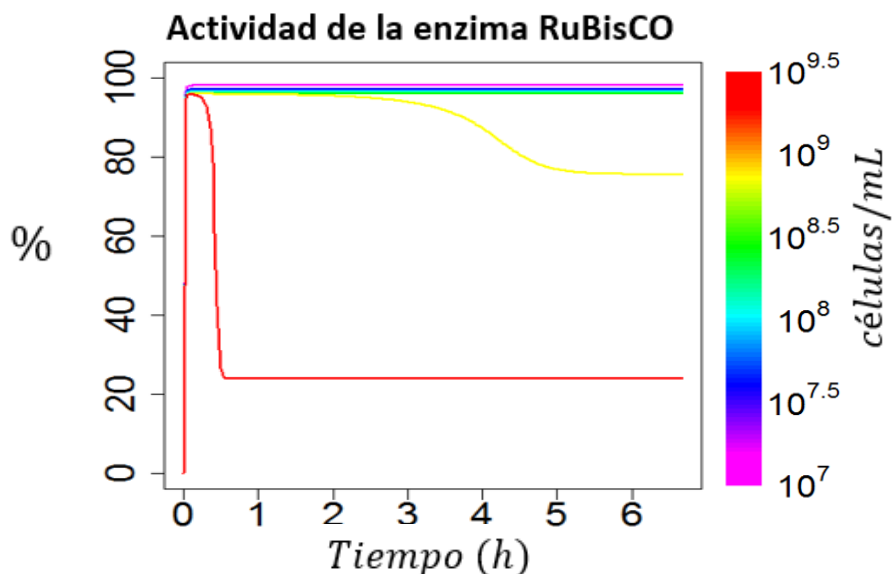


Figura 24. Variación de la actividad enzimática de RuBisCO frente al tiempo para distintas cantidades de células en el fotobiorreactor.

En la figura 25 se observa como la enzima RuBisCO solo se satura con altas densidades de microorganismos fotosintéticos. Se ve cómo va disminuyendo su actividad hasta saturarse, saturándose más rápido a elevadas concentraciones de microorganismos.

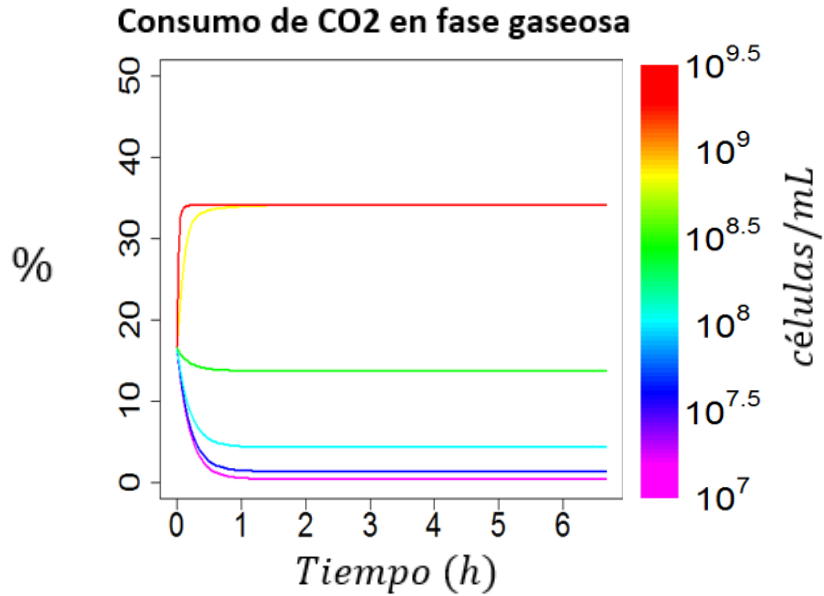


Figura 25. Consumo de CO<sub>2</sub> (g) respecto al tiempo para distintas cantidades de células en el fotobiorreactor.

En la figura 26 se observa como para bajas densidades de células en el medio el consumo es bajo. Para densidades altas de células el consumo se ve limitado por la transferencia Gas-Líquido (el límite se encuentra entorno al 34%).

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y FUTURO TRABAJO

El presente Trabajo Final de Grado ha consistido en el análisis y modelado de los procesos químicos asociados al cultivo de organismos fotosintéticos en fotobiorreactores.

Tras el modelado matemático y la simulación de éste, se han obtenido las siguientes conclusiones:

- El modelo, que posee las seis reacciones de solubilización del  $\text{CO}_2$ , funciona correctamente y, a pesar de no poseer un análisis experimental, parece que se ajusta a la realidad.
- El hecho de que estos microorganismos fotosintéticos empleen el  $\text{HCO}_3$  como principal sustrato provoca un aumento del pH del medio que es de gran importancia a tener en cuenta en el modelado.
- Se ha observado que la transferencia de materia Gas-Líquido pone una limitación en la solubilización del  $\text{CO}_2$  burbujeado al fotobiorreactor en el medio.
- 

Como futuro trabajo se propone:

- Incluir en el modelo un factor de dilución para trabajar en semicontinuo. Si se va a introducir medio de cultivo fresco al fotobiorreactor se deberán recalcular todas las expresiones de solubilización del  $\text{CO}_2$ .
- Si se va a controlar el pH se deberían incluir las ecuaciones referentes al medio tamponador que se va a introducir.
- Algunos fotobiorreactores presentan un volumen dentro donde no llega el medio de cultivo (*headspace*), en él se acumulan los gases provenientes del fotobiorreactor. Si se va a trabajar con uno de este tipo, se deben recalcular las ecuaciones de solubilización del  $\text{CO}_2$  ya que éste se puede volver a disolver en el medio.

## CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- [1] BP Statistical Review of World Energy, June 2012.
- [2] Nedbal L. et al. (2008). Experimental validation of a nonequilibrium model of CO<sub>2</sub> fluxes in a flat-panel photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng*, 100:902-910.
- [3] Waterbury J. (2006). *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: bacteria-firmicutes and cyanobacteria*. New York, Springer Science, vol 4 p 1140.
- [4] Mullineaux C.W. (2001). How do cyanobacteria sense and respond to light? *Mol. Microbiol.* 41:965-971.
- [5] Toloupakis E., Silva Benavides A.M., Cicchi B., Torzillo G. (2016). Growth and hydrogen production of outdoor cultures of *Synechocystis* PCC 6803. *Algal Research*, 18:78-85
- [6] Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3):294-306.
- [7] Blanco-Rivero A., Leganes F., Fernandez-Valiente E., Calle P., Fernandez-Pinas F. (2005). MRPA, a gene with roles in resistance to Na<sup>+</sup> and adaptation to alkaline pH in the cyanobacterium *anabaena* sp. Pcc7120. *Microbiology*, 151:1671-1682.
- [8] Dutta D., De D., Chaudhuri S., Bhattacharya S.K. (2005). Hydrogen production by cyanobacteria. *Microb Cell Fact* 4:36.
- [9] Kruse O., Rupprecht J., Mussgnug J.R., Dismukes G.C., Hankamer B. (2005). Photosynthesis: A blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies. *Photochem Photobiol Sci* 4(12):957-970.
- [10] Schutz K., Happe T., Troshina O., Lindblad P., Leitao E., Oliveira P., Tamagnini P. (2004). Cyanobacterial H<sub>2</sub> production – A comparative analysis. *Planta* 218(3):350-359.
- [11] Ghirardi M.L., Mohanty P. (2010). Oxygenic hydrogen photoproduction – current status of the technology. *Current Science* 98:499-507.
- [12] Deng M.D., Coleman J.R. (1999). Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 65(2):523-528.
- [13] Lindberg .P, Park S., Melis A. (2010). Engineering a platform for photosynthetic isopreneproduction in cyanobacteria using *Synechocystis* as the model organism. *Metab Eng* 12:70-79.
- [14] Liu X. et al (2010). Production and secretion of fatty acids in genetically engineered cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. USA* 107:13189.
- [15] Navarro E. et al (2009). Metabolic flux analysis of the hydrogen production potential in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Int J Hydrogen Energy* 34:8828-8838.
- [16] Kaneko T. et al (1996). Sequence analysis of the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3:109-136.

- [17] Krufryk G.I. et al (2002). Transformation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a tool for genetic mapping: optimization of efficiency. *FEMS Microbiol. Lett.* 206:215-219
- [18] Singh R., Sharma S. (2012). Development of suitable photobiorreactor for algae production- A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(4):2347-2353.
- [19] Posten C. (2009). Design principles of photo-biorreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences* 9, 165-177.
- [20] Richmond A. (2003). Growth characteristics of ultrahigh-density microalgal cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8(6):349-353.
- [21] Morel A. (1987). Chlorophyll-specific scattering coefficient of phytoplankton a simplified theoretical approach. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 34:1093-1105.
- [22] Molina Grima E., Fernández 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(1):59-69.
- [23] Zavrel T. et al (2015). Characterization of a model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 autotrophic growth in a flat-panel photobioreactor. *Engineering in Life Sciences* 12(2):453-472.
- [24] Heidorn T., Camsund D., Huang H. et al (2011). Synthetic biology in cyanobacteria: Engineering and analysing novel functions.
- [25] Sugai-Guerios M.H. et al (2013). Mathematical model of the CO<sub>2</sub> solubilisation reaction rates developed for the study of photobioreactors. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* vol. 92.
- [26] Erickson L.E., Curless C.E., Lee H.Y., Ann N.Y.(1987). *Acad. Sci.* 506:308.
- [27] Cornet J.F., Dussap C.G., Gros J.B. (1998). Kinetics and energetics of photosynthetic microorganisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 59, 153-224.
- [28] Rubio F.C., Fernández F.G., Pérez J.A., Camacho F.G., Molina E. (1999). *Biotechnol. Bioeng.* 62, 71.
- [29] Rigobello-Masini M., Masini J.C. (2001). *Anal. Chim. Acta* 448, 239.
- [30] Rodríguez-Maroto J.M., Jimenez C., Aguilera J., Niell F.X. (2005). *Acuac. Eng.* 32,493.
- [31] González-López C.V., Fernández F.G., Fernández-Sevilla J.M. Fernández J.F., Grima E.M. (2012). *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1637.
- [32] Mangan N.M., Brenner M.P. (2014). Systems analysis of the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in cyanobacteria. *eLife*, 3:e02043.
- [33] Norsker N.H., Barbosa M.J., Vermuë M.H., Wijffels R.H. (2011). Microalgal production – a close look at the economics. *Biotechnology Advances*, 29(1):24-27.

- [34] Price G.D., Badger M.R., Woodger F.J., Long B.M. (2008). Advances in understanding the cyanobacterial CO<sub>2</sub>-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59 No. 7 pp. 1441-1461.
- [35] Badger M.R., Andrews T.J. (1987). Co-evolution of RuBisCO and CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. *Progress in photosynthesis research* (3)9:601.
- [36] Raven J.A., Lucas W.J. (1985). Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms. *3:431-512*.
- [37] McGinn P.J. et al (2003). High Light enhances the expression of low-CO<sub>2</sub>-inducible transcripts involved in the CO<sub>2</sub>-Concentrating mechanism in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant, Cell & Environment* 27(5):615-626.
- [38] Badger M.R., Price G.D. (2003). CO<sub>2</sub> Concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany* 54:609-622.
- [39] Shibata M. et al (2002). Two CO<sub>2</sub> uptake systems in cyanobacteria: four systems for inorganic carbon acquisition in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Functional Plant Biology* 29(3)123-129.
- [40] Price G.D. et al (2004). Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 28;101(52):18228-33.
- [41] Wang H.L. et al (2004). Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator. *J Biol Chem* 13;279(7):5739-51.
- [42] Maeda S., Badger M.R., Price G.D. (2002). Novel gene products associated with NdhD3/D4-containing NDH-1 complexes are involved in photosynthetic CO<sub>2</sub> hydration in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. *Mol Microbiol* 43(2):425-35.
- [43] Prommeenate P., Lennon A.M., Markert C., Hippler M., Nixon P.J. (2004). Subunit Composition of NDH-1 Complexes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 IDENTIFICATION OF TWO NEW *ndh* GENE PRODUCTS WITH NUCLEAR-ENCODED HOMOLOGUES IN THE CHLOROPLAST Ndh COMPLEX. *The journal of Biological Chemistry* 27(5):615-626.
- [44] Price G.D. et al (1998). The functioning of the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: a review of general physiological characteristics, genes, proteins, and recent advances. *Canadian Journal of Botany*, 76(6):973-1002.
- [45] Price G.D., Badger M.R. (1989). Expression of human carbonic anhydrase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 creates a high CO<sub>2</sub>-requiring phenotype. Evidence for a central role for carboxysomes in the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism. *Plant Physiology* 91, 505-513.

## ANEXO

### 1. Composición del medio de cultivo BG-11

NaNO <sub>3</sub>	1.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.04 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.036 g
Citric acid	0.006 g
Ferric ammonium citrate	0.006 g
EDTA (disodium salt)	0.001 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02 g
Trace metal mix A5	1.0 ml
Agar (if needed)	10.0 g
Distilled water	1.0 L

The pH should be 7.1 after sterilization

#### Trace metal mix A5:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.222 g
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.39 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.079 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	49.4 mg
Distilled water	1.0 L

### 2. Modelo en RStudio

```
library(deSolve)
```

```
MMfraction<-function(x,Kmx) {x/Kmx}
```

```
Transp<-function (k1,a,b) {v<-k1*(a-b)}
```

```
M_Mirr<-function(V,S,Km) {V*S/(Km+S)}
```

```
M_Mrev<-function(Vmaxf, Vmaxr, a,Kma, c,Kmc){
```

```
v<-(Vmaxf*MMfraction(a,Kma)-Vmaxr*MMfraction(c,Kmc))/
```



```
((1+MMfraction(a,Kma))+(1+MMfraction(c,Kmc))-1)

return(v)

}
```

```
PBRCO2 <- function(t, y, parms) {
```

```
with(as.list(y), {
```

```
#CO2(aq)-> passive reversible cell membrane transport -> CO2(c)
```

```
vMMM_aq_c_CO2_Transp<-Transp(k_aq_c_CO2_Transp,CO2_aq,CO2_c)
```

```
#HCO3(aq)-> passive reversible cell membrane transport -> HCO3(c)
```

```
vMMM_aq_c_HCO3_Transp<-Transp(k_aq_c_HCO3_Transp,HCO3_aq,HCO3_c)
```

```
#CO2+22(c)-> passive reversible carboxysome membrane transport -> CO2(x)
```

```
vMMM_c_x_CO2_Transp<-Transp(k_c_x_CO2_Transp,CO2_c,CO2_x)
```

```
#HCO3(c)-> passive reversible carboxysome membrane transport -> HCO3(x)
```

```
vMMM_c_x_HCO3_Transp<-Transp(k_c_x_HCO3_Transp,HCO3_c,HCO3_x)
```

```
#CO2 (c) -> (NDH-13)-> HCO3-(c)
```

```
vCO2NADPH3 <- M_Mirr(Vmax_CO2NADPH3,CO2_c,Km_CO2NADPH3)
```

```
#CO2 (c) -> (NDH-14)-> HCO3-(c)
```

```
vCO2NADPH4 <- M_Mirr(Vmax_CO2NADPH4,CO2_c,Km_CO2NADPH4)
```

```
#HCO3-(aq) -> (BicA)-> HCO3-(c)
```

```
vHCO3BicA <- M_Mirr(Vmax_HCO3BicA,HCO3_aq,Km_HCO3BicA)
```

```
#HCO3-(aq) -> (SbtA)-> HCO3-(c)
```

```
vHCO3SbtA <- M_Mirr(Vmax_HCO3SbtA,HCO3_aq,Km_HCO3SbtA)
```

**#HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(x) -> (Carbonic Anhydrase)-> CO<sub>2</sub>(x)**

vconcentr <-

M\_Mrev(Vmaxf\_concentr,Vmaxr\_concentr,HCO<sub>3</sub>\_x,Km\_HCO<sub>3</sub>x\_concentr,CO<sub>2</sub>\_x,Km\_CO<sub>2</sub>x\_concentr)

**#CO<sub>2</sub>(x) -> (Rubisco)-> PGA(x)**

vRubiscoCO<sub>2</sub> <- M\_Mirr(Vmax\_RubiscoCO<sub>2</sub>,CO<sub>2</sub>\_x,Km\_RubiscoCO<sub>2</sub>)

#vRubiscoO<sub>2</sub> <- MMirr(E\_RubiscoO<sub>2</sub>,k\_RubiscoO<sub>2</sub>,O<sub>2</sub>x,Km\_RubiscoO<sub>2</sub>)

vcells<-n\_cell\*(1+((2^(t\*mu/(log(2)\*3600))-1)\*min(vRubiscoCO<sub>2</sub>/Vmax\_RubiscoCO<sub>2</sub>,light\_k/light\_k)))

**#Todas las unidades estan en uM para concentraciones,**

**#uM/s para todas las ks)**

R\_HCO<sub>3</sub>\_c<-vCMM\_aq\_c\_HCO<sub>3</sub>\_Transp -

vCMM\_c\_x\_HCO<sub>3</sub>\_Transp\*V\_x\_tot(n\_cell)/V\_c\_tot(n\_cell) +vCO<sub>2</sub>NADPH<sub>3</sub> +vCO<sub>2</sub>NADPH<sub>4</sub>  
+vHCO<sub>3</sub>BicA +vHCO<sub>3</sub>SbtA

R\_CO<sub>2</sub>\_c<- vCMM\_aq\_c\_CO<sub>2</sub>\_Transp -

vCMM\_c\_x\_CO<sub>2</sub>\_Transp\*V\_x\_tot(n\_cell)/V\_c\_tot(n\_cell) -vCO<sub>2</sub>NADPH<sub>3</sub> -vCO<sub>2</sub>NADPH<sub>4</sub>

R\_HCO<sub>3</sub>\_x<- vCMM\_c\_x\_HCO<sub>3</sub>\_Transp -vconcentr

R\_CO<sub>2</sub>\_x<- vCMM\_c\_x\_CO<sub>2</sub>\_Transp +vconcentr

$$A0 <- V\_c\_tot(n\_cell)*(R\_HCO3\_c + R\_CO2\_c) + V\_x\_tot(n\_cell)*(R\_HCO3\_x + R\_CO2\_x)$$

$$B0 <- V\_c\_tot(n\_cell)*R\_HCO3\_c + V\_x\_tot(n\_cell)*R\_HCO3\_x$$

$$P0 <- 1 + (K6 + 2 * HCO3\_aq * K5) / (H\_aq ** 2)$$

$$R\_CO2\_aq <- HCO3\_aq * (H\_aq * k13inv + k4inv) - CO2\_aq * (k13 + K6 / H\_aq * k4dir) - V\_c\_tot(n\_cell) / V\_aq * vCMM\_aq\_c\_CO2\_Transp$$

$$\#HCO3\_aq\_ini * (H\_aq\_ini * k13inv + k4inv) - CO2\_aq\_ini * (k13 + OH\_aq\_ini * k4dir) - V\_c\_tot(n\_cell) / V\_aq * Transp(k\_aq\_c\_CO2\_Transp, CO2\_aq\_ini, CO2\_c\_ini)$$

$$\#A0\_i <- V\_c\_tot(n\_cell)*(R\_HCO3\_c\_ini + R\_CO2\_c\_ini) + V\_x\_tot(n\_cell)*(R\_HCO3\_x\_ini + R\_CO2\_x\_ini)$$

$$\#B0\_i <- V\_c\_tot(n\_cell)*R\_HCO3\_c\_ini + V\_x\_tot(n\_cell)*R\_HCO3\_x\_ini$$

$$\#P0\_i <- 1 + (K6 + 2 * HCO3\_aq\_ini * K5) / (H\_aq\_ini ** 2)$$

$$R\_HCO3\_aq <- -(V\_aq * R\_CO2\_aq + A0 + B0 * HCO3\_aq * (1 / K2 - K5 / H\_aq ** 2) / P0) / (V\_aq * (1 + H\_aq / K2 + K5 / H\_aq + (HCO3\_aq / K2 - HCO3\_aq * K5 / H\_aq ** 2) * (1 + 2 * K5 / H\_aq) / P0))$$

$$R\_H\_aq <- R\_HCO3\_aq * (1 + 2 * K5 / H\_aq) / P0 + B0 / (V\_aq * P0)$$

$$R\_OH\_aq <- -K6 / (H\_aq ** 2) * R\_H\_aq$$

$$R\_H2CO3\_aq <- R\_HCO3\_aq * (H\_aq / K2 + HCO3\_aq / K2 * (1 + 2 * K5 / H\_aq) / P0) + HCO3\_aq / K2 * B0 / (V\_aq * P0)$$

```
R_CO3_aq <- R_HCO3_aq*(K5/H_aq-HCO3_aq*K5/(H_aq**2)*(1+2*K5/H_aq)/P0) -  
HCO3_aq*K5/(H_aq**2)*B0/(V_aq*P0)
```

```
R_CO2_Gas <- kLaCO2/(1-eG)*((CO2_aq*kHCO2+(Pb0-CO2_aq*kHCO2)*(uG*kHCO2/(-  
kLaCO2*R0T*h))*(exp(-kLaCO2*R0T*h/(uG*kHCO2))-1))/kHCO2-CO2_aq) #  
CO2(L)
```

```
R_CO2_Rubisco <- vRubiscoCO2
```

```
R_PresH <- (uG/hH)*(CO2_aq*kHCO2+(Pb0-CO2_aq*kHCO2)*exp(-  
kLaCO2*R0T*h/(uG*kHCO2))-PresH)
```

```
R_CO2_I <- V_I(F_I)/V_aq*(CO2_I-CO2_aq)
```

```
R_HCO3_I <- V_I(F_I)/V_aq*(HCO3_I-HCO3_aq)
```

```
Mass_Balance <-  
V_c_tot(n_cell)*(R_HCO3_c+R_CO2_c)+V_x_tot(n_cell)*(R_HCO3_x+R_CO2_x)+V_aq*(R_CO2_  
aq+R_HCO3_aq+R_H2CO3_aq+R_CO3_aq) -V_x_tot(n_cell)*R_CO2_Rubisco  
+V_aq*R_CO2_Gas
```

```
Mass_Balance_inside <-  
V_c_tot(n_cell)*(R_HCO3_c+R_CO2_c)+V_x_tot(n_cell)*(R_HCO3_x+R_CO2_x)+V_aq*(R_CO2_  
aq+R_HCO3_aq+R_H2CO3_aq+R_CO3_aq)
```

```
Charge_Balance <-  
V_c_tot(n_cell)*R_HCO3_c+V_x_tot(n_cell)*R_HCO3_x+V_aq*(R_HCO3_aq-  
R_H_aq+R_OH_aq+2*R_CO3_aq)
```

**#Ojo con volúmenes y moles**

```
dCO2_aq <- R_CO2_aq +R_CO2_Gas +R_CO2_I
```

```
dCO2_c <- R_CO2_c
```

```
dCO2_x <- R_CO2_x -R_CO2_Rubisco
```

```
dHCO3_x <- R_HCO3_x
```

```
dHCO3_c <- R_HCO3_c
```

**#Vf\_I acorde con tiempo de escala**

```
dHCO3_aq <- R_HCO3_aq +R_HCO3_I
```

```
dH_aq <- R_H_aq
```

```
dOH_aq <- R_OH_aq
```

```
dH2CO3_aq <- R_H2CO3_aq
```

```
dCO3_aq <- R_CO3_aq
```

```
dPresH <- R_PresH
```

```
list(c(dCO2_c,dHCO3_c,dCO2_x,dHCO3_x,dCO2_aq,dHCO3_aq,dH_aq,dOH_aq,dH2CO3_aq,dCO3_aq,dPresH),
```

```
  c(pH=-  
log10(H_aq/10^6),vCMM_aq_c_CO2_Transp=vCMM_aq_c_CO2_Transp,vCMM_aq_c_HCO3_T  
ransp=vCMM_aq_c_HCO3_Transp,vCMM_c_x_CO2_Transp=vCMM_c_x_CO2_Transp,vCMM_c  
_x_HCO3_Transp=vCMM_c_x_HCO3_Transp,
```

Análisis y modelado de los procesos químicos asociados al cultivo de organismos fotosintéticos en fotobiorreactores.

---

```
vCO2NADPH3=vCO2NADPH3,vCO2NADPH4=vCO2NADPH4,vHCO3BicA=vHCO3BicA,vHCO3SbtA
=vHCO3SbtA,vconcentr=vconcentr,vcells=vcells/n_cell,
```

```
R_HCO3_aq=R_HCO3_aq,R_CO2_aq=R_CO2_aq,R_H2CO3_aq=R_H2CO3_aq,R_CO3_aq=R_CO
3_aq,R_HCO3_c=R_HCO3_c,R_CO2_c=R_CO2_c,R_HCO3_x=R_HCO3_x,R_CO2_x=R_CO2_x,
```

```
Mass_Balance=Mass_Balance,Mass_Balance_inside=Mass_Balance_inside,Charge_Balance=Ch
arge_Balance,R_CO2_Rubisco=R_CO2_Rubisco,R_CO2_Gas=R_CO2_Gas,Kw=H_aq*OH_aq,Kw_
Test=(K6-H_aq*OH_aq)/K6))
```

```
})
```

```
}
```

```
# TC -----
```

```
TC
```

```
light_k
```

```
par(mfrow=c(1,1))
```

```
par(mar=c(4,3,2,2))
```

```
#plot(outPBRCO2[,"time"]/3600,outPBRCO2[,"vcells"],xlab="Time (h)",ylab="Cell
Growth",ylim=c(0,2),type="n",cex.axis=1.5,cex.lab=1.5)
```

```
#for (q in 1:2){
```

```
# for (j in 1:2){
```

```
#TC=20 + (q-1)*10
```

```
#light_k=800
```

```
#light=600 + (j-1)*200
```

```
# TC -----
```

Análisis y modelado de los procesos químicos asociados al cultivo de organismos fotosintéticos en fotobiorreactores.

---

###-----T experiment----

light\_k=100

TC=20

$T=(273.15+TC)$       **#Temperatura (K)**

$R=8.314472$       **#Constante de los gases ideales (J/mol.K)**

$RT=R*T$

$ROT=RT/1000$

$H=0.0$       **#Altitud (km)**

$D=2*(0.0063/3.14159)**0.5$       **#Diámetro de la columna (m)**

$A=3.14159*(D**2.)/4.$       **#Área transversal de los tubos (m<sup>2</sup>)**

Sec=0.000172

$uG=0.0000033/A$       **#Velocidad superficial de la fase gaseosa (m/s)**

$uL=0.0000001$       **#Velocidad superficial de la fase líquida (m/s)**

pH=4      **#pH**

$L=1200.0$       **#Tiempo de la simulación (s)**

$R\_CO2\_bio=0.0$       **#Velocidad de reacción biológica del CO2 (mol/m<sup>3</sup>/s)**

$R\_O2\_bio=0.0$       **#Velocidad de reacción biológica del O2 (mol/m<sup>3</sup>/s)**

#pb1=998      **#Presión parcial a la entrada para t>0**

$V\_aq0=1$       **# Volumen del fotobiorreactor (L)**

$h=V_{aq0}/1000/A$     **#Altura de la columna de líquido**

$hH=Sec/A$     **#Altura del espacio del gas (m)**

$\mu=0.04+(TC-20)*0.005$     **#Crecimiento bacteriano (h-1)**

$MML=(2*1.00794+15.9994)/1000$     **#Masa molecular de la fase líquida (kg/mol)**

$MMG=28.9638972/1000$     **#Masa molecular de la fase gaseosa (kg/mol)**

$Patm=100602-10396.5*H$     **#Presión atmosférica (Pa)**

$Patm=101325$     **#Presión atmosférica (Pa)**

$g=9.8066$     **#Aceleración de la gravedad (m/s<sup>2</sup>) Altitud 0 km**

$nn=uG*Patm*A/R/T*10^6$     **#Flujo molar de la fase gaseosa (umol/s)**

$\#nn*Pb0/Patm$

$Tr=T/132.5$     **#Temperatura relativa (K)**

$roL=999.974950*(1-(TC-3.983035)**2.*(TC+301.797)/(522528.9*(TC+69.34881)))$

**#Densidad de la fase líquida (kg/m<sup>3</sup>)**

$roG=MMG*Patm/(R*T)$     **#Densidad de la fase gaseosa (kg/m<sup>3</sup>)**

$roGr=roG/314.3$     **#Densidad relativa de la fase gaseosa (kg/m<sup>3</sup>)**



$miL = \exp(-24.71 + 4209./T + 0.04527 * T - (3.376 * 10.**-5.) * T**2) / 1000.$  **#Viscosidad de la fase líquida (Pa.s)**

$miG = (6.1609 * 10.**-6) * ((0.128517 * Tr + 2.60661 * Tr**0.5 - 1 - 0.709661 / Tr + 0.662534 / Tr**2 - 0.197846 / Tr**3 + 0.00770147 / Tr**4) + (0.465601 * roGr + 1.26469 * roGr**2 - 0.511425 * roGr**3 + 0.2746 * roGr**4))$  **#Viscosidad de la fase gaseosa (Pa.s)**

$sigmaL = 0.2358 * ((647.15 - T) / 647.15)**1.256 * (1 - 0.625 * ((647.15 - T) / 647.15))$  **#Tensión superficial de la fase líquida (N/m<sup>2</sup>)**

$kHCO2 = ((MML * 101325. / roL) * \exp((-4.184 / R) * (-317.658 + 17371.2 / T + 43.0607 * \log(T) - 0.00219107 * T))) / 1000$  **#Constante de Henry para CO2 en agua (Pa.L/umol)**

$kHO2 = ((MML * 101325. / roL) * \exp((-4.184 / R) * (-286.942 + 15450.6 / T + 36.5593 * \log(T) + 0.01876620 * T))) / 1000$  **#Constante de Henry para O2 en agua (Pa.L/umol)**

$kLH2 = 1 / (0.00078 * \exp(500 * (1 / T - 1 / 298.15))) * 10$  **#Constante de Henry para H2 en agua (Pa.L/umol)**

$DCO2 = (2.97 * 10** -6.) * \exp(-18200. / (R * T))$  **#Difusividad de CO2 en agua (m<sup>2</sup>/s)**

$DO2 = (7.4 * 10** -12.) * T * (2.6 * MML * 1000.)**0.5 / (miL * 1000. * (25.6**0.6))$  **#Difusividad de O2 en agua (m<sup>2</sup>/s)**

$eG = .00366$

$kLaCO2 = 6 * eG * (5.63 * 10.**-5) * ((g * DCO2 * roL**2 * sigmaL / (miL**3))**0.5)$  **#Coeficiente volumétrico de transferencia de masa G-L para CO2 (s-1)**

$kLaO2 = 6 * eG * (5.63 * 10.**-5) * ((g * DO2 * roL**2 * sigmaL / (miL**3))**0.5)$  **#Coeficiente volumétrico de transferencia de masa G-L para O2 (s-1)**

$K6 = ((roL^{**2}) * (10^{**(-6013.79/T - 23.6521 * \log_{10}(T) + 64.7013)}) * 10^6)$  **#Constante de equilibrio de ionización del agua (umol<sup>2</sup>/L<sup>2</sup>)**

$K2 = ((1.73 * 10^{**4}) * (10^{**((-5. * 10. ** -5) * ((T - 290.15) ** 2)))) * 1000) * 1000$  **#Constante de equilibrio de la reacción 2 (umol/L)**

$K4 = (roL * (10^{**(-356.3094 - 0.06091964 * T + 21834.37/T + 126.8339 * \log_{10}(T) - 1684915/T ** 2)}) / K6) * 1000$  **#Constante de equilibrio de la reacción 4 (L/umol)**

$K5 = (roL * 10^{**(-2902.39/T + 6.498 - 0.02379 * T)}) * 1000$  **#Constante de equilibrio de la reacción 5 (umol/L)**

$k13 = \exp(1246.98 - 6.19 * 10^{**4}/T - 183. * \log(T))$  **#Constante de velocidad de las reacciones 13 directas (s-1)**

$k13inv = (\exp(1346.24 - 6.44 * 10^{**4}/T - 196.4 * \log(T)) / 1000) / 1000$  **#Constante de velocidad de las reacciones 13 inversas (L/umol.s)**

$k4dir = (10^{**(13.635 - (2895/T))} / 1000) / 1000$  **#Constante de velocidad de la reacción 4 directa (L/umol.s)**

$k4inv = k4dir / K4$  **#Constante de velocidad de la reacción 4 inversa (s-1)**

$Ka1 = -3404.71/T + 14.8435 - 0.032786 * T$

$Ka = (10^{Ka1} * 1000) * 1000$

$Ka$

$\#Ka = 0.000467735 \# \text{ mol/m}^3$

### #Parameters CCM

k\_aq\_c\_CO2\_Transp<- 4

k\_aq\_c\_HCO3\_Transp<- k\_aq\_c\_CO2\_Transp/1000

k\_c\_x\_CO2\_Transp<-4 k\_c\_x\_HCO3\_Transp<-k\_c\_x\_CO2\_Transp

Vmax\_HCO3BicA<-400\*1

Vmax\_HCO3SbtA<-100\*1

Vmax\_CO2NADPH3<-10\*1

Vmax\_CO2NADPH4<-60\*1

Km\_HCO3BicA<-60

Km\_HCO3SbtA<-5

Km\_CO2NADPH3<-2

Km\_CO2NADPH4<-15

Vmaxf\_concentr<-100000000

Vmaxr\_concentr<-100000000

Km\_HCO3x\_concentr<-9000

Km\_CO2x\_concentr<-3000

Vmax\_RubiscoCO2<-20000

Km\_RubiscoCO2<-250

**#Initial values**

pH=5

PresH\_ini=1000 #946 **#pH=4**

Pb0=3000 #1962 **#pH=4**

pH=7.4

PresH\_ini=510 #510 **#pH=7.4**

Pb0=998 #998 **#pH=7.4**

Ca<-1

CO2\_c\_ini<-100\*Ca

HCO3\_c\_ini<-1000\*Ca

CO2\_x\_ini<-200\*Ca

HCO3\_x\_ini<-1500\*Ca

998/1000000\*101325

1962/101325\*100

CO2\_aq\_ini=PresH\_ini/kHCO2

H\_aq\_ini=(10\*\*(-pH)\*1000)\*1000

$$\text{OH\_aq\_ini} = K6 / \text{H\_aq\_ini}$$

$$\text{HCO}_3\text{\_aq\_ini} = K_a * \text{CO}_2\text{\_aq\_ini} / \text{H\_aq\_ini}$$

$$\text{H}_2\text{CO}_3\text{\_aq\_ini} = \text{HCO}_3\text{\_aq\_ini} * \text{H\_aq\_ini} / K_2$$

$$\text{CO}_3\text{\_aq\_ini} = K_5 * \text{HCO}_3\text{\_aq\_ini} / \text{H\_aq\_ini}$$

$$\text{pH\_BG11} = 7.5$$

$$\text{CT\_BG11} = 0.02 / 106 \text{ \#Molar}$$

$$\text{H\_I} = (10^{**(-\text{pH\_BG11})} * 1000) * 1000$$

$$\text{KK} = \text{H\_I}^2 + \text{H\_I} * K_a + K_a * K_5$$

$$\text{HCO}_3\text{\_I} = \text{CT\_BG11} * K_a * \text{H\_I} / \text{KK} * 1000000 \text{ \#uM}$$

$$\text{CO}_2\text{\_I} = \text{CT\_BG11} * \text{H\_I}^2 / \text{KK} * 1000000 \text{ \#uM}$$

yini<-

c(CO2\_c=CO2\_c\_ini,HCO3\_c=HCO3\_c\_ini,CO2\_x=CO2\_x\_ini,HCO3\_x=HCO3\_x\_ini,CO2\_aq=CO2\_aq\_ini,HCO3\_aq=HCO3\_aq\_ini,H\_aq=H\_aq\_ini,OH\_aq=OH\_aq\_ini,H2CO3\_aq=H2CO3\_aq\_ini,CO3\_aq=CO3\_aq\_ini,PresH=PresH\_ini)

times <- seq(from = 0, to = 20000, by = 10)

by.t<-(tail(times,1)-times[1])/(length(times)-1)

n\_cell=1\*10^12 # cell per l

V\_c=3\*10^-15 # in l

V\_c\_tot = function(n\_cell) V\_c\*n\_cell

V\_x=V\_c/100

```
V_x_tot = function(n_cell) V_x*n_cell
```

```
V_aq=V_aq0 # in l
```

```
V_g=uG*A*10^3 # in l/s
```

```
F_l=0*0.1/3600
```

```
V_l=function(F_l) F_l*by.t # in l/s or per time step unit
```

```
V_c_tot_func<-function(t) V_c*n_cell*(vRubiscoCO2/Vmax_RubiscoCO2)^(t/(12*3600))
```

```
V_x_tot(n_cell)*(HCO3_x_ini+CO2_x_ini)+V_c_tot(n_cell)*(HCO3_c_ini+CO2_c_ini)+V_aq*(HCO3_aq_ini+CO2_aq_ini+H2CO3_aq_ini+CO3_aq_ini)
```

```
#----ode solver----
```

```
outPBRCO2<- ode(func = PBRCO2, parms = NULL, y = yini, times = times,method="lsode")
```

```
plot(outPBRCO2)
```

```
#plot(outPBRCO2[,"time"]/3600,outPBRCO2[,"vcells"],type="l",xlab="Time (h)",ylab="Cell Growth")
```

```
lines(outPBRCO2[,"time"]/3600,outPBRCO2[,"vcells"],type="l",xlab="Time (h)",ylab="Cell Growth",col=j,lty=2*q-1,lwd=2) }
```

```
plot(time,outPBRCO2[,"vcells"])
```