

Producción de lípidos a partir de *Chlorella protothecoides* mantenida con CO₂ proveniente de la fermentación alcohólica

HERNÁNDEZ-ROJO, Abigail*†, HERNÁNDEZ-REYES, Mara, JIMÉNEZ-ISLS, Donaji y VENEGAS-SÁNCHEZ, Josué.

Recibido Octubre 7, 2016; Aceptado Noviembre 14, 2016

Resumen

Las microalgas son microorganismos con altas tasas de crecimiento y no son utilizadas para consumo humano. Por lo tanto, el uso de cultivos de microalgas no compete con los costos relacionados a los insumos alimenticios y pueden ser empleadas para la producción de biocombustibles. En el presente trabajo, el crecimiento de la especie *Chlorella protothecoides* cultivada de manera autótrofa, usando como fuente de Carbono el CO₂ producido de la fermentación alcohólica en adición con el CO₂ presente en el ambiente fue evaluada. Las microalgas se cultivaron en contenedores con volúmenes de 4 000 ml, con aireación constante, fotoperiodo 12:12 con 2500 luxes, temperatura ambiente y pH de 7.5. Se comparó el crecimiento de la biomasa de la cepa por el método de conteo en cámara de Neubauer y peso seco. El Nitrógeno (N) Se inhibió del medio de cultivo, para evaluar el efecto del nutriente resultando en ambos casos que la biomasa en los cultivos no limitados de nitrógeno tuvieron un mayor índice de crecimiento. La biomasa en los cultivos que contenían nitrógeno tuvieron un mayor índice de crecimiento, para el cultivo con y sin adición de CO₂ a partir de la fermentación alcohólica fueron 25.83x10⁶ cel. /mL y 90.0x10⁶ cel. /mL respectivamente. La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases, dando como resultado que la concentración de ácido palmítico tiene una mayor concentración de los casos estudiados

Microalgas, fotoperiodo, cromatografía de gases

Abstract

Microalgae are microorganism with high growing rates and they are not use for human consume. Therefore, the use of microalgae does not compete with the costs related to food supplies and can be used for the production of biofuels. In this paper, the rate of growing of microalgae *Chlorella protothecoides* cultured in autotrophic medium using as carbon source CO₂ from an alcoholic fermentation and CO₂ from the atmosphere was evaluated. Microalgae were grown in containers with volumes of 4000 ml, with constant aeration, photoperiod 12:12, and light intensity of 2500 lux, room temperature and pH of 7.5. The biomass growth was evaluated by the method of counting in Neubauer chamber and dry weight. Nitrogen (N) was inhibited culture medium to evaluate the effect of the nutrient, resulting in both cases, in that biomass crops without nitrogen inhibition had a higher growth rate. Biomass cultures containing nitrogen had a higher growth rate for cultivation with and without addition of CO₂ from alcoholic fermentation were 25.83x10⁶ Cel / ML and 90.0x10⁶ cells / mL respectively. The fatty acid composition was determined by gas chromatography, resulting that palmitic acid concentration has a higher concentration for the studied cases.

Microalgae, photoperiod, gas chromatography

Citación: HERNÁNDEZ-ROJO, Abigail, HERNÁNDEZ-REYES, Mara, JIMÉNEZ-ISLS, Donaji y VENEGAS-SÁNCHEZ, Josué. Producción de lípidos a partir de *Chlorella protothecoides* mantenida con CO₂ proveniente de la fermentación alcohólica. Revista de Sistemas Experimentales 2016, 3-9: 24-28

*Correspondencia al Autor (Correo electrónico: javenegas@iteshu.edu.mx)

†Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La baja en los precios de los combustibles fósiles ha reducido considerablemente la economía del país, además debido a las grandes emisiones de contaminantes que producen estos han deteriorado considerablemente el medio ambiente. Derivado de ello ha crecido el interés por el estudio de nuevas fuentes de energía, la biomasa es una alternativa viable en la producción de biocombustibles tanto sólidos como líquidos. En los últimos años han surgido investigaciones para la obtención de los mismos, particularmente biodiesel a través de microalgas, ya que son una opción viable para la obtención de lípidos transesterificables, por la cantidad de lípidos similares comparados con granos de algunos cultivos energéticos [1]. El contenido promedio de lípidos en microalgas varía entre 20 y 40 % del peso celular seco (PS) [2].

Cuando un cultivo se pueden extraer porciones considerables de lípidos además de un aumento en el crecimiento celular considerable [3]. El proceso del crecimiento de la biomasa microalgal requiere luz, CO₂, agua y nutrientes inorgánicos, estos pueden ser nitratos, fosfatos, hierro y algunos elementos traza [4, 5,6]. Además es importante mencionar que se deben de tomar en cuenta condiciones de temperatura, iluminación, pH.

El presente trabajo tuvo como objetivo comparar los parámetros cinéticos de crecimiento, así como la recuperación de biomasa (peso seco) y el contenido de lípidos totales en la cepa *Chlorella protothecoides*, la cual creció de manera autótrofa mantenida con el CO₂ proveniente de una fermentación alcohólica y el CO₂ presente en el ambiente.

Metodología a desarrollar

La cepa se adquirió del CINVESTAV en placa de agar, la adaptación de la cepa se llevó en medio Basald Bold (ver tabla 1). Los experimentos se llevaron a cabo en contenedores 4000 mL, a los cuales se les burbujeo de manera continua CO₂ del medio ambiente. Para estudiar el efecto de la adición de CO₂ se añadió a la corriente el CO₂ producto de una fermentación alcohólica. Así mismo, se limitó la presencia de Nitrógeno, analizando el efecto de nitrógeno presente en el medio cultivo BB modificado. Las microalgas se mantuvieron a temperatura ambiente, en fotoperiodo 12:12 a 2500 luxes medidos con un luxómetro (MAVOLUX 5032B USB) y pH de 7.5.

Reactivo	Stock	Cantidad
NaNO ₃	10g/400ml H ₂ O	30ml/L
CaCl ₂ -2 H ₂ O	1g/400ml H ₂ O	10ml/L
MgSO ₄ -7 H ₂ O	3g/400ml H ₂ O	10ml/L
K ₂ HPO ₄	3g/400ml H ₂ O	10ml/L
KH ₂ PO ₄	7g/400ml H ₂ O	10ml/L
NaCl	1g/400ml H ₂ O	10ml/L
P-IV Solución de Metales	1 de ver tabla 2	40 ml/L
Solución Soliwater	ver tabla 3	6 ml/L

Tabla 1 Medio de cultivo Basald Bold

Reactivo	Stock
Na ₂ EDTA-2 H ₂ O	0.75 g/L H ₂ O
FeCl ₃ -6 H ₂ O	0.097 g/L H ₂ O
MnCl ₂ -4 H ₂ O	0.041 g/L H ₂ O
ZnCl ₂	0.005 g/L H ₂ O
CoCl ₂ -6 H ₂ O	0.002 g/L H ₂ O
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0.004 g/L H ₂ O

Tabla 2 P-IV Solución de Metales

Reactivo	Stock
CaCO ₃	1mg/200ml H ₂ O

Tabla 3 Solución Soliwater

Se obtuvo la cinética de crecimiento por conteo en cámara de Neubauer (.1mm Tiefe Depth Profondeup). Las mediciones se realizaron cada 48 horas por triplicado.

La biomasa microalga (peso seco) se obtuvo a través de centrifugación a 4000 rpm., durante 10 min. (Centrifugadora UNICO C8704x) separando el supernatante de las microalgas

La extracción de lípidos, se llevó a cabo la extracción por el método Bligh & Dyer [7]. El cual consiste en adicionar una mezcla de solventes cloroformo: metanol (1:2). Las muestras se incubaron por 24h en refrigeración y protegidas de la luz (favoreciendo la extracción de ácidos grasos). Subsiguientemente se centrifugaron continuamente a 4000 rpm en intervalos de tiempo de 10-20 min., agregando cloroformo: metanol, agua y cloroformo respectivamente. Finalmente se separó la fase orgánica lipídica en un tubo previamente pesado, llevando el proceso de secado con gas de Nitrógeno. La evaluación de la composición de ácidos grasos se realizó por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama, previa derivatización como Metil Esteres [CINVESTAV. Cd. De México].

Resultados

Los resultados obtenidos en los experimentos con la adición de ambos elementos (CO₂ y N), el crecimiento es mayor. Al limitar la presencia de Nitrógeno en el medio, la ruta metabólica del microorganismo es modificada, causando una disminución en el crecimiento celular, pero aumentando la producción de lípidos [3].

En el gráfico 1 se observa mayor crecimiento en los experimentos en los días 8-10 llegando a su fase exponencial, en particular el experimento con medio BB, con adición de CO₂ proveniente de la fermentación presento 90.0x10⁶ cel. /mL, mientras que el medio BB con adición de CO₂ del medio ambiente solo presenta 25.83x10⁶ cel. /mL, esto se debe que a concentraciones más altas de CO₂ permite que el proceso de reproducción sea mayor. Por otro lado en los medios limitados presento un mayor crecimiento al que se le suministro CO₂ de una fermentación el cual indico 32.167x10⁶ cel. /mL mientras que solo con el CO₂ presente en el ambiente mostro 20.37 x10⁶ cel. /mL. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Fan et al. [3], donde un cambio en las condiciones del cultivo trae consigo cambios en las fases de adaptación y crecimiento exponencial.

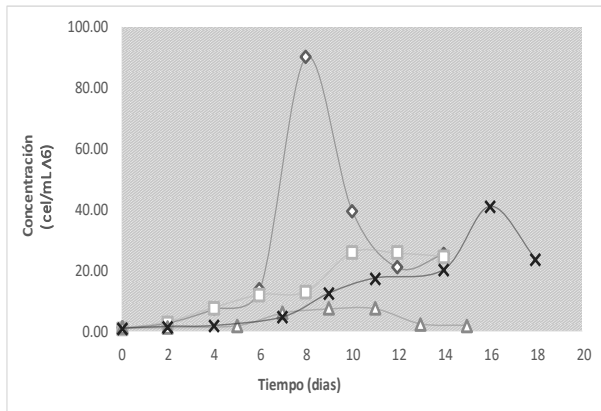


Gráfico 1 Crecimiento celular de la microalga *Chlorella protothecoides* en medio BB y medio BB limitado. ◇ Con adición de CO₂ y N, □ Sin adición de CO₂ y con N, △ Sin adición de CO₂ y sin N, × Con adición de CO₂ y sin N.

En el gráfico 2 se aprecia la concentración de peso seco mostrando resultados favorables en el medio de cultivo BB, que contiene CO₂ del ambiente, a razón de que al mantener la cepa en condiciones de cultivo normales su adaptación es más rápida, por lo tanto refleja mayor índice de peso seco.

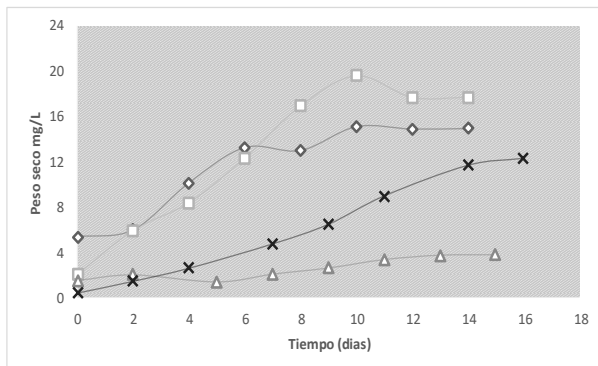


Gráfico 2 Peso de la microalga *Chlorella protothecoides* en medio BB y medio BB limitado. ◇ Con adición de CO₂ y N, □ Sin adición de CO₂ y con N, △ Sin adición de CO₂ y sin N, × Con adición de CO₂ y sin N.

En la tabla 4 se muestra la composición de ácidos grasos de extractos de microalgas, en las cuales se puede observar que al adicionar CO₂ del medio ambiente en combinación con el CO₂ de la fermentación alcohólica proveniente del ambiente muestran porcentajes mayores de ácido palmítico y oleico siendo ácidos grasos de saturación mejorando las propiedades del biocombustible (poder calorífico, estabilidad oxidativa) [4].

Agradecimiento

Se agradece al CONACYT por el proyecto otorgado "Proyecto de fomento a las vacaciones Científicas y tecnología en niños y jóvenes mexicanos", con código C-291045.33/2016

Conclusiones

Cuando se regula tanto la cantidad de Carbono como de nitrógeno se está cambiando la ruta metabólica de la cepa aumentando la producción de biomasa comparada con los medios en condiciones estándar. Los experimentos llegaron a su fase exponencial entre los días 8-10 teniendo un mayor incremento celular, el experimento que refleja un mejor resultado el cual en condiciones de adición de CO₂ de la fermentación alcohólica en medio BB, sin embargo cuando se alteran algunas condiciones la ruta metabólica de la microalga cambia, viendo esto reflejado el experimento con presencia de CO₂ captado del medio ambiente en medio BB posee una mayor concentración de peso seco a razón que el microorganismo no fue privado de ninguna condición entonces el proceso de adaptación es más acelerado.

Composición de ácidos grasos		
Muestra	CO ₂ de la fermentación en medio BB 90.1mg	CO ₂ del ambiente en medio BB 68.5 mg
Ácidos Grasos	%	%
Laurico	0.22	-----
Tidecanoico	0.21	-----
Miristoleico	0.45	1.26
Palmítico	7.95	6.65
Cis-10-Heptadecanoico	0.88	-----
Esteárico	3.6	2.63
Oleico	10.83	10.07
Linoleico	25.15	6.66
α-Linolenico	12.83	6.47
Cis-11,14-Eicosadienoico	-----	23.12
Behenico	1.05	-----

Tabla 4 Composición de ácidos grasos de *Chlorella protothecoides*

Referencias

[1]. Garibay A., Velazquez R., Biodiesel a Partir de Microalgas. *BioTecnología*, .13 (3): (2009).

[2]. Chisti Y. Biodiesel from microalgae – a review. *Biotechnol. Adv.* 1 (25): 294–306. (2007).

[3]. Barajas A, Godoy C. y Morroy D. Improvement of CO₂ sequestration by *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 on lab scale photobioreactors. *rev.ion*, 25(2):39-47, (2012)

[4]. Brennan, L. y Owende P. “Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577, 2010.

[5]. Angel D. González 1, Dr. Viatcheslav K., Dr. Guzmán A. Of methods of extraction of oil in the production line of biodiesel from microalgae. *Prospect. 7 (2)*: 53-60 (2009)

[6]. Plata V., Dr. Kafarov V, Dr. Moreno N. Development of a methodology of transesterification of oil in the production line of biodiesel from microalgae. *Prospect. 7 (2)*: 35-41 (2009)

[7]. Aguilar C., Chang I., Tenorio L., Ynga G. Determinación de la biomasa microalgal potencialmente acumuladora de lípidos para la obtención de combustible. *FINCyT – PIBAP* (2007)