



*“Una red de centros tecnológicos para  
desarrollar una biorefinería a base de  
algas”*

EFA037/15

Ajuste de requerimientos nutricionales y  
establecimiento de parámetros de cultivo a  
escala 1-5 litros

Actividad\_3.1

24/03/2017

Título de Informe	Ajuste de requerimientos nutricionales y establecimiento de parámetros de cultivo a escala 1-5 litros
Version	
Responsable del Entregable	NEIKER
Actividad	Actividad 3.1
Autor	Sonia Suarez Alvarez
Colaborador/es	All partners
Referencia	EFA037/15
Programa	Programa INTERREG V-A España-Francia-Andorra POCTEFA 2014-2020
Fecha de comienzo del Proyecto	01/06/2016
Duración	36 meses
Jefe de Filas	NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario

## RESUMEN

El objetivo de esta actividad fue definir los parámetros de cultivo necesarios para establecer un procedimiento estándar y a escala de laboratorio para el cultivo heterotrófico de microalgas oleaginosas.

El desarrollo de la actividad se inició con una serie de experimentos de crecimiento a pequeña escala (50-200 ml) dirigidos a seleccionar la cepa y establecer unas condiciones preliminares para su cultivo. En una etapa posterior, las condiciones preestablecidas se transfirieron a fermentadores (3 litros) donde se procedió a la optimización de los parámetros hasta establecer un procedimiento de cultivo (PDC) definitivo.

El proyecto ha sido cofinanciado al 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Interreg V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2014-2020). El objetivo del POCTEFA es reforzar la integración económica y social de la zona fronteriza España-Francia-Andorra. Su ayuda se concentra en el desarrollo de actividades económicas, sociales y medioambientales transfronterizas a través de estrategias conjuntas a favor del desarrollo territorial sostenible.

## INDICE

RESUMEN .....	2
1 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD.....	4
1.1 Selección de la cepa en base a su capacidad de crecimiento.....	4
1.2 Evaluación de un proceso preliminar a escala de 3 litros.....	4
1.3 Mejora del proceso a escala de 3 litros .....	5
1.4 Evaluación de fuentes alternativas de nitrógeno y carbono .....	8
2 CONCLUSIONES.....	10

# I RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD

## 1.1 Selección de la cepa en base a su capacidad de crecimiento

Para empezar esta actividad se evaluaron dos cepas heterotróficas del género *Chlorella*: *C. vulgaris* y *C. protothecoides*.

Para seleccionar la más adecuada, se realizó un ensayo en el que se comparó el crecimiento de ambas especies durante un periodo de 5 días. Para este ensayo se empleó un medio de cultivo muy simple compuesto por glucosa, extracto de levadura y una solución de microelementos in (Figura 1). Los cultivos se llevaron a cabo en oscuridad, a 24°C y con agitación orbital (140 rpm)

Bajo las condiciones de cultivo descritas, el rendimiento de biomasa resultante del crecimiento ( $\text{g PSL}^{-1}$ ) fue 6 veces superior para la especie *C. protothecoides*, (Figura 1), siendo por tanto ésta la especie seleccionada para los siguientes desarrollos .

COMPOSITION	( $\text{g L}^{-1}$ )
Glucose (Carbon Source)	10
Yeast Extract (N Source)	2
Total Nitrogen	0.2
Aminoacids	0.9
Inorganic microelements	1

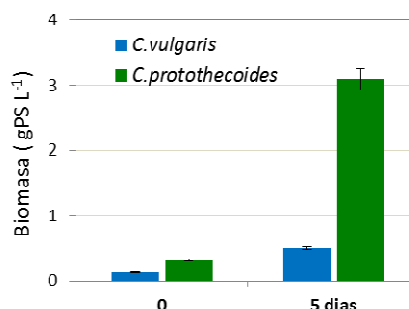


Figura 1. Composición química del medio de cultivo empleado para la selección de la especie y gráfica mostrando el crecimiento de ambas especies tras 5 días de cultivo.

## 1.2 Evaluación de un proceso preliminar a escala de 3 litros

El primer estudio de crecimiento en bioreactores de 5 litros se planteó con el objetivo de evaluar la productividad de *C. protothecoides* bajo condiciones de cultivo ensayadas previamente. Con dicho objetivo, se estableció un proceso en modo batch o estático de 90 horas de duración, empleando para el cultivo un medio compuesto tan sólo por extracto de levadura ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) y Dextrosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ).

Con respecto a los parámetros de cultivo se establecieron valores fijos para la agitación (200 rpm), para la aireación (1vvm) y para la temperatura (24°C), analizando la evolución de las variables pH y presión de oxígeno ( $\text{pO}_2$ ) como resultado del crecimiento.

El patrón de crecimiento resultante de este primer proceso se muestra en la Figura 2. Con un crecimiento exponencial hasta las 72 horas, y una fase estacionaria a partir de este momento, el proceso permitió generar 8 g PS/L biomasa. La productividad del proceso fue por tanto de de  $2.7 \text{ gPSL}^{-1}\text{d}^{-1}$  (determinada a las 72 horas).

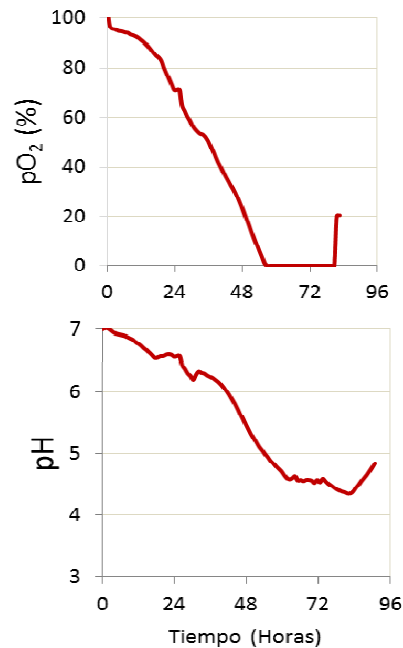
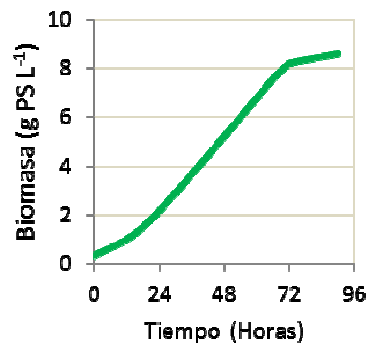


Figura 2. (Arriba.) Patrón de crecimiento de *Chlorella* bajo las condiciones de cultivo establecidas para el primer proceso. (Dcha.) Evolución de la presión de oxígeno (pO<sub>2</sub>) y el pH durante el proceso.

Como muestra la Figura 2, la demanda de oxígeno mostró una relación directa con el crecimiento, tal como refleja la reducción gradual de la pO<sub>2</sub> en el medio, que llega a ser limitante para el crecimiento a partir de las 48 horas. Así mismo, se observó una reducción progresiva del pH hasta alcanzar un valor 4.5. Esta acusada acidificación del medio de cultivo podría no ser ventajosa para el crecimiento.

Para mejorar el rendimiento del proceso en desarrollo se establecieron tres puntos de mejora:

- Aumento de del grado de agitación para mejorar el intercambio gaseoso y aumentar la pO<sub>2</sub> del sistema en el sistema.
- Enriquecimiento de la solución nutritiva aportando macronutrientes adicionales al carbono y nitrógeno.
- Valoración el efecto del efecto del pH en el rendimiento productivo.

### 1.3 Mejora del proceso a escala de 3 litros

#### Modificaciones inmediatas

Considerando los resultados descritos en el Apdo, 2.2, se introdujeron 2 modificaciones en los parámetros y las condiciones de cultivo que habían sido definidas en el proceso previo:

- Enriquecimiento del medio de cultivo con aporte de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.5 gL<sup>-1</sup>) y MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O (0.3 gL<sup>-1</sup>).

- Incremento de la disponibilidad de oxígeno durante del proceso (mínimo 25%) con un control de la agitación en cascada el valor de  $pO_2$ .

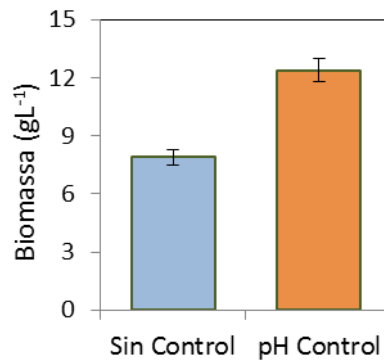
Empleando estas nuevas condiciones se procedió a evaluar el efecto del pH.

### Evaluación del efecto del pH

Para determinar la importancia del pH sobre rendimiento del proceso se compararon los siguientes condiciones: (1) proceso *sin control* de pH y por tanto con una acidificación progresiva del medio, (2) proceso con pH estable a un valor fijo mediante la adición a demanda de NaOH (*pH Control*).

El resultado de este estudio se muestra en la Figura 3, donde se observa que aplicando con control del pH (*pH control*) durante el procesos de cultivo se consigue un incremento de 1.5 veces en el rendimiento obtenido con respecto al proceso *sin control* (12 y 8 gPS/L, respectivamente).

Teniendo en cuenta este resultado, el control del valor de pH se estableció como el tercer punto de mejora para el proceso.



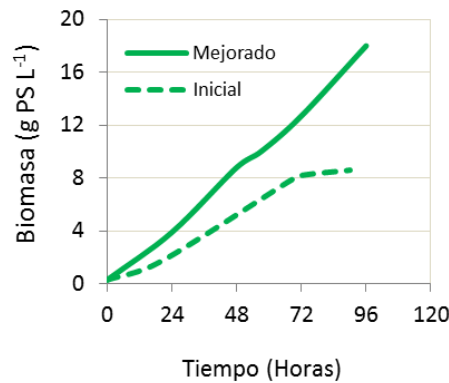
**Figura 3.** Efecto del control del pH en el rendimiento final de biomasa en un proceso de 72 horas de duración.

### Duración del proceso

El último aspecto evaluado para la optimización del proceso fue la duración del mismo. Dado que las modificaciones introducidas permitieron mejorar el crecimiento en un periodo de cultivo de 72 horas, se procedió a evaluar si aplicando estos nuevos parámetros de cultivo, un alargamiento de 24 horas en periodo de permitía obtener un mayor incremento de biomasa.

El resultado de proceso mostró que bajo las condiciones anteriores es posible extender la fase de crecimiento, resultando en un aumento concentración de biomasa hasta 18 gPSL<sup>-1</sup> (Figura 4). Esto representa un incremento de 1.5 veces con respecto al valor alcanzado en el mismo proceso a las 72 horas (12 g/L) y un incremento de 2.5 veces con respecto al proceso inicial. Para conseguir esta mejora fue necesario sin embargo un suplemento de glucosa de 15 gL<sup>-1</sup> a partir de las 72 horas de cultivo.

Una comparación entre las curvas de crecimiento del proceso inicial y del proceso optimizado se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** (Arriba.) Patrón de crecimiento de *Chlorella* en las condiciones del Proceso Inicial (o preliminar) y bajo las condiciones del Proceso Mejorado.

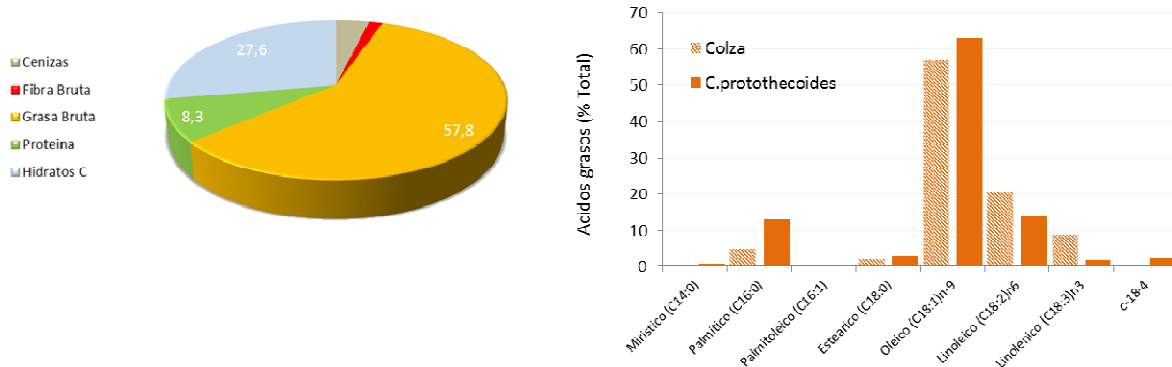
Teniendo en cuenta el rendimiento de biomasa alcanzado (18 g peso seco L<sup>-1</sup>) y la duración del proceso (4 días), la productividad conseguida mediante este proceso fue de 4.5 gPSL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

### Caracterización química

La biomasa obtenida aplicando el procedimiento de cultivo anterior se analizó químicamente para determinar su calidad como materia prima para obtención de biodiesel.

Los resultados del análisis de composición proximal indicaron que la biomasa presentaba alrededor de un 8% de proteína, un 28 % de carbohidratos y cerca de un 58 % de materia grasa (Fig. 5). En relación al perfil de ácidos grasos, más del 75% de los mismos corresponden al ácido oleico, linoleico y linolénico, siendo de éstos el oleico significativamente mayoritario (Fig. 5).

Este perfil de ácidos grasos es similar al que muestra la colza (material de referencia para la obtención de biodiesel), lo que se puede considerar como un indicador inicial del potencial del aceite derivado de esta microalga como fuente de biodiesel



**Figura 5.** Izda. Composición química de la biomasa de *C. protothecoides* obtenida mediante el procedimiento de cultivo desarrollado. Dcha. Perfiles de ácidos grasos de la biomasa de *C. protothecoides* y de la semilla de colza (análisis proporcionado por CENER, Navarra).

## 1.4 Evaluación de fuentes alternativas de nitrógeno y carbono

Para establecer un procedimiento de referencia para el cultivo y producción de biomasa oleaginosas de *C. protothecoides*, se emplearon como fuente de carbono y nitrógeno dextrosa (D-glucosa de uso industrial) y extracto de levadura, respectivamente. Estos compuestos se emplean normalmente para la el cultivo heterotrófico de microorganismos. Sin embargo, la finalidad del presente proyecto es establecer una tecnología de cultivo basada en la reutilización de residuos orgánicos que se integren como nutrientes en el medio de cultivo. Dado que estos residuos no pueden contener azúcares diferentes a la glucosa, se procedió a evaluar la capacidad de asimilación de fuentes alternativas de carbono y nitrógeno que presente *C. protothecoides*.

### Alternativas a la glucosa como fuente de carbono

El objetivo de este estudio fue evaluar azúcares alternativas a la glucosa como fuentes de carbono para el crecimiento *C. protothecoides*.

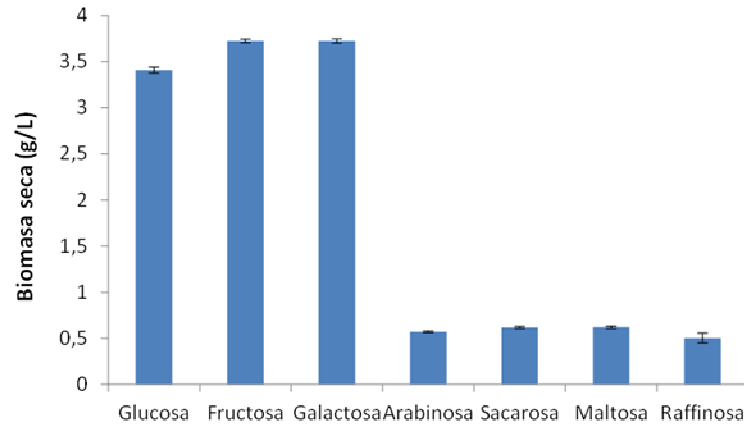
El estudio se realizó a escala de laboratorio. Se preparó una batería de medios de cultivo de composición idéntica a la descrita en la tabla de la Fig. 1 del Apto. 11., en los que la glucosa se reemplazó por cada uno de los siguientes azúcares: fructosa, galactosa, arabionosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. Como control se emplearon cultivos suplementados con glucosa.

El ensayo se llevó a cabo en Erlenmeyers de 200mL con un volumen final de 40mL, que se mantuvieron con agitación orbital (140 rpm), a 24°C y en oscuridad durante 96 horas. Pasado este periodo los cultivos se cosecharon mediante centrifugación. El pellet se deshidrató por liofilización y se empleó para determinar la concentración de biomasa por gravimetría.

De las fuentes de carbono evaluadas tan sólo Fructosa y Galactosa permitieron alcanzar rendimientos similares a los alcanzados con el azúcar de referencia



(glucosa). El resto de los compuestos evaluados no fueron asimilados eficientemente por esta especie (Fig. 6).



**Figura 6.** Comparación de la concentración de biomasa en cultivos de *C. protothecoides* suplementados con diferentes azúcares como fuentes de carbono.

### Alternativas extracto de levaduras como fuente de nitrógeno

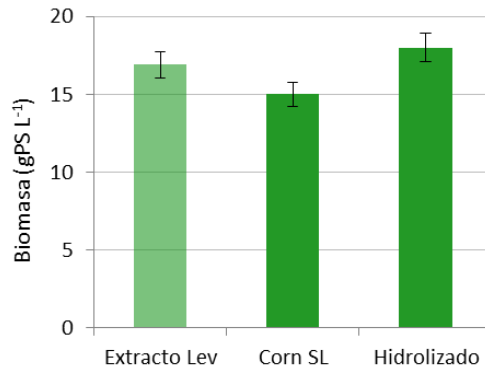
La evaluación de fuentes alternativas de nitrógeno se realizó en bioreactores siguiendo el mismo procedimiento optimizado que se describe en el apartado 2.3.

Como alternativa al extracto de levadura, se evaluó el Corn Step Liquour (un subproducto de la molienda húmeda del maíz rico en nitrógeno proteico y aminoácidos) y un hidrolizado proteico obtenido mediante digestión enzimática a partir de biomasa residual del desgrasado de un microorganismo oleaginoso.

Los dos compuestos anteriores se aportaron al medio de cultivo para proporcionar la misma cantidad de nitrógeno total que el extracto de levadura empleado como control.

Tras 96 horas de cultivo en idénticas condiciones, se obtuvieron rendimientos similares de biomasa con las tres fuentes de nitrógeno evaluadas (Fig. 7).

Esto indica que el procedimiento de cultivo desarrollado sería potencialmente reproducible empleando otras fuentes de nitrógeno derivadas del procesamiento de residuos orgánicos.



**Figura 7.** Comparación de la concentración de biomasa en cultivos de *C. protothecoides* suplementados con diferentes azúcares como fuentes de carbono.

## 2 CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de la actividad se estableció un procedimiento de cultivo heterotrófico para la especie *C. protothecoides* que permite alcanzar una concentración de biomasa de 18 gPSL<sup>-1</sup> en un periodo de cultivo de 4 días, siendo la productividad de dicho proceso de 4.6 gPSL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

La biomasa obtenida mediante el proceso anterior presenta un contenido superior al 55% de materia grasa en forma de FAMES, lo que supone una productividad de 2.5 g FAMESL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> derivada del proceso de cultivo. Este valor representa un incremento superior a 50 veces en referencia a la productividad que rinden los cultivos fotoautótrofos otras especies del género *Chlorella*.

Los aspectos técnicos imprescindibles para el proceso desarrollado son una elevada relación C/N en la solución nutritiva o medio de cultivo, la estabilización del pH durante el crecimiento y la gestión de agitación/aireación del cultivo para mantener una pO<sub>2</sub> no limitante.

El procedimiento es potencialmente reproducible empleado como nutrientes fuentes alternativas de nitrógeno y carbono.