

Evaluación del crecimiento y calidad de biodiesel en cultivos de *Chlorella vulgaris* bajo limitación de N₂ empleando diferentes espectros de luz y fotobiorreactores.

Angel de Jesus Quijano-Armengol, Juan Carlos Robles-Heredia y Asteria Narvaez-García *

Laboratorios de la Facultad de Química, Universidad Autónoma del Carmen, Ciudad del Carmen, Campeche, México.

Energías Renovables (Biocombustibles). **Ponencia Virtual.**

Recibido: 16 de junio de 2023

Aceptado: 16 de octubre de 2023

Publicado: 23 de noviembre de 2023

Resumen: El presente trabajo se centra en la evaluación de crecimiento celular y composición de ácidos grasos de la microalga *Chlorella vulgaris*, así como en la calidad del biodiesel bajo condiciones de limitación de Nitrógeno; el estudio se realizará utilizando condiciones autótrofas bajo distintos espectros de luz (Violeta, rojo y azul), dentro de un fotobiorreactor de forma tubular, el cual contará con mangueras en diseño de serpentín delimitado por zonas de diferentes colores en el cual pasará la microalga, los análisis de crecimiento celular serán realizados por duplicado y con ayuda de un sistema de bombeo, esto con la finalidad de que todo el medio de cultivo tenga un recorrido más completo, absorba la mayor cantidad de luz posible durante la fase de crecimiento exponencial y se evite que ocurran fotoinhibiciones, así como daños por estrés que repercutan en su crecimiento celular. Los análisis de crecimiento ocurrirán bajo el escenario Two Stage (Condiciones ricas en nutrientes "90 mgL⁻¹" y su posterior limitación "30 mgL⁻¹") para lograr determinar y comparar sus incrementos en densidad celular, biomasa peso seco, clorofila y lípidos. La hipótesis del presente trabajo consiste en verificar si las variaciones en los espectros de luz colocados de esta manera ocasionan en las células mayor crecimiento, generación de lípidos y una mejor calidad de biodiesel.

Palabras clave: Biodiesel, limitación de N, espectro de luz, *Chlorella vulgaris*.

Evaluation of the growth and quality of biodiesel in *Chlorella vulgaris* crops under N₂ limitation using different light spectrums and photobioreactors.

Abstract: The present work focuses on the evaluation of cell growth and fatty acid composition of the microalgae *Chlorella vulgaris*, as well as on the quality of biodiesel under Nitrogen limitation conditions; The study will be carried out using autotrophic conditions under different light spectrums (Violet, red and blue), inside a tubular photobioreactor, which will have hoses in a serpentine design delimited by zones of different colors in which the microalga will pass. The cell growth analyzes will be carried out in duplicate and with the help of a pumping system, this in order that the entire culture medium has a more complete path, absorbs the greatest amount of light possible during the exponential phase and is avoided. that photoinhibitions occur, as well as stress damage that affects their cell growth. The growth analyzes will occur under the Two Stage scenario (Conditions rich in nutrients "90 mgL⁻¹" and its subsequent limitation "30 mgL⁻¹") to determine and compare their increases in cell density, dry weight, chlorophyll and lipids. The hypothesis of the present work consists in verifying if the variations in the spectra of light placed in this way cause greater growth in the cells, generation of lipids and a better quality of biodiesel.

Keywords: Biodiesel, Nitrogen limitation, light spectrum, *Chlorella vulgaris*.

Introducción

Las microalgas son microorganismos fotoautótrofos que cuentan con una estructura unicelular con la que logran transformar la energía proveniente del sol en energía química a través de la fijación de CO₂, por lo general, se encuentran en sistemas de agua dulce y sistemas de agua salada como océanos, lagos y estanques, aunque algunas especies también pueden crecer en suelos húmedos y rocas. Las diferentes especies varían mucho, pero todas las microalgas comparten una cosa: son capaces de producir su propio alimento a través de la fotosíntesis (Reijnders, 2020). Diversos estudios han demostrado que las microalgas tienen un amplio potencial que aún no ha sido explotado del todo en el área de la bioquímica.

La bioquímica de microalgas es una forma de producción de biomasa muy similar a la agricultura convencional, presentando algunas ventajas, ya que las algas son fotosintéticamente más eficientes que las plantas comunes (Phwan et al., 2018). Además, las microalgas pueden alcanzar productividades de biomasa más alta, tasas de crecimiento más rápida, mayor fijación de CO₂ y mayores tasas de producción de O₂ en comparación con plantas superiores (Norsker,

2020). Otra de las ventajas es que algunas especies son capaces de crecer empleando materia orgánica como fuente de energía o de carbono. Por lo tanto, las microalgas por su metabolismo pueden dividirse en:

- **Autótrofa:** Ocurre cuando las microalgas obtienen energía a través de la fotosíntesis, estrictamente bajo iluminación artificial o natural, obteniendo el carbono de compuestos inorgánicos.
- **Heterótrofa:** Emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono en ausencia de luz.
- **Mixotrófica:** Muchas algas son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía ocurre bajo un proceso de aprovechamiento de luz y materia orgánica durante ciclos de luz/oscuridad. En algunos casos las microalgas bajo esta condición de cultivo pueden llegar a tener la capacidad de aprovechar tanto carbón inorgánico como orgánico.

Una de las aplicaciones hoy día de la bioquímica algal es la búsqueda de combustibles renovables (Biocombustibles) que se ha visto incrementada por la creciente generación de emisiones de gases de efecto invernadero, acumulándose dramáticamente en la atmósfera de la Tierra como resultado de las actividades humanas y la industrialización. En la actualidad, los biocombustibles se producen principalmente a partir de diferentes cultivos (soja, aceite de palma, jatropha, etc.), grasa animal y aceite de cocina usado pero su recolección, procesamiento y comercialización son incipientes (Sosa-Rodríguez & Vazquez-Arenas, 2021), aunado a esto, el biocombustible obtenido de estas fuentes está lejos de satisfacer la demanda de combustibles actuales. En este caso, las microalgas son una fuente confiable de biocombustibles ya que pueden satisfacer la demanda mundial debido a su rápido crecimiento, alto contenido de lípidos, bajos requerimientos de zonas de cultivo y compatible al medio ambiente (Elshobary et al., 2019). Además, los biocombustibles producidos a partir de microalgas son biodegradables y no son tóxicos. En el enfoque biológico, las microalgas parecen más fotosintéticamente eficientes que las plantas terrestres y son candidatos para fijar CO₂ eficientemente (Jacobi et al., 2010).

La fijación de CO₂ mediante fotosíntesis de microalgas y la conversión de biomasa en combustible líquido se considera un proceso simple y apropiado para la circulación de CO₂ en la Tierra (Acquah et al., 2020). Sin embargo, algunos aspectos técnicos deben tomarse en cuenta como es el desafío para llevar a cabo la cosecha de biomasa para la producción de biocombustible debido al pequeño tamaño celular, la baja densidad celular en el agua y la gran cantidad de agua que se debe eliminar (Jacobi et al., 2010).

Las microalgas han evolucionado para absorber más luz de la que se necesita para sus propias necesidades fotosintéticas, el exceso de energía luminosa se disipa en forma de calor y fluorescencia (Elshobary et al., 2019).

El presente trabajo se centra en la idea de presentar una alternativa viable sobre el enfoque que se tiene de los fotobiorreactores para el crecimiento de las microalgas puesto que una configuración de luz y aireación adecuada permiten estimular su comportamiento y elevar sus niveles de producción de biomasa, clorofila y productividad de lípidos. En la siguiente presentación se detallará el sistema a utilizar para el crecimiento celular, igualmente se pretende mediante la experimentación demostrar la viabilidad del trabajo presentado y poder fijar las bases para la experimentación a escala piloto.

Materiales y Métodos

La microalga *Chlorella vulgaris* será cultivada bajo las condiciones de agua residual estudiada por Ruiz Marín y col. (2010), en un medio rico en nutrientes, el cual contendrá: $7 \text{ mg L}^{-1} \text{ NaCl}$, $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, y $115 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ en 1 litro de agua. Los metales traza y vitaminas serán agregados de acuerdo con el medio equivalente (Guillard, 1972).

La microalga se mantendrá no axénica monoespecífica en cultivos con medio de agua residual artificial para su aclimatación en los laboratorios de la facultad de Química de la Universidad Autónoma del Carmen, en matraces de 250 ml Pyrex a 25 ± 1 °C con iluminación continua de lámparas de luz fría blanca fluorescente.

Se realizarán cultivos bajo limitación de nitrógeno (Escenario conocido como two-stage), donde la microalga *Scenedesmus* sp será puesta en medio enriquecido dentro de un fotobiorreactor de 5 L de forma tubular, el cual contará con mangueras en forma de serpiente delimitado por zonas de diferentes colores en el cual pasará la microalga con un

contenido de nitrógeno de 90 mg L^{-1} . Durante la fase de crecimiento, los fotobiorreactores serán cosechados a una densidad celular de $1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ para posteriormente ser trasladados a un medio fresco con contenido de 30 mg L^{-1} repitiendo el mismo procedimiento que en la primera etapa, durante ambas etapas la parte de la manguera en forma de serpentín contará con iluminación externa de 70 y $140 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Para obtener diferentes longitudes de onda se emplearán filtros de color: violeta, roja y azul; el fotobiorreactor contará con un sistema de bombeo que ayudará a que la microalga tenga un recorrido más completo a través de la manguera con forma de serpentín y así logre absorber la mayor cantidad de luz posible durante la fase de crecimiento exponencial y se evite que ocurran fotoinhibiciones, así como daños por estrés que repercutan en su crecimiento celular (Negar Azhand, et al., 2020), como se muestra en la Figura 1.

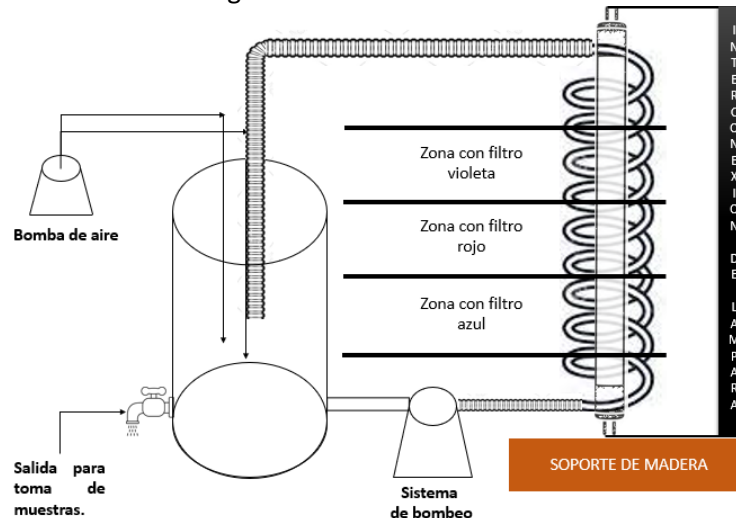


Figura 1. Diseño de fotobiorreactor tubular propuesto con recirculación en forma de serpentín.

Diferentes diseños cerrados de fotobiorreactores fueron evaluados para el cultivo de las microalgas debido a que la transmisión de luz en el espectro de longitud de onda puede variar dependiendo de la geometría del fotobiorreactor (Chenba Zhu et al., 2019). El diseño experimental consistirá en realizar cultivos de la microalga *Chlorella vulgaris* primeramente bajo condiciones ricas en Nitrógeno (90 mg L^{-1}) para posteriormente ser cultivadas a condiciones de 30 mg L^{-1} , obteniendo durante su periodo de crecimiento las variables respuesta: Crecimiento celular, Clorofila y Composición de Ácidos grasos. Como se muestran en la Figura 2.

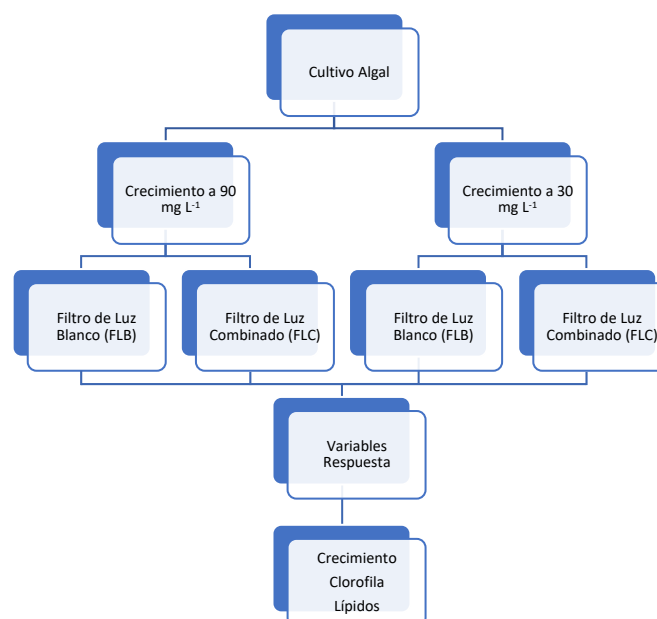


Figura 2. Diseño experimental.

Durante las pruebas serán realizados muestreos por duplicado cada 24 horas para determinar biomasa peso seco (g L⁻¹) y densidad celular mediante conteo del número de células.

Determinación de Biomasa Peso Seco

Para la determinación de Biomasa Peso Seco, serán filtrados 10 ml de cultivo a través de filtros de fibra de vidrio GF-C (47 mm diámetro) previamente incinerados a 450 °C en una mufla (Istotemp Fisher Scientific) durante 4 horas. Una vez filtrados, los filtros con la muestra se colocarán en una estufa hasta obtener un peso seco constante a 120 °C durante 24 horas y colocados en un desecador por 1 h. La diferencia del peso entre los filtros incinerados y los filtros sacados del desecador determinará la Biomasa Peso Seco (g L⁻¹).

Determinación de Clorofila

La determinación de Clorofila será realizada de acuerdo a Parsons y col. (1984); 10 ml de cultivo serán filtrados en filtros de fibra de vidrio GF-C (47 mm diámetro) los cuales se introducirán en tubos conteniendo 10 ml de acetona al 90% y mantenidos a niveles bajos de temperatura en completa oscuridad durante 24 h para la extracción de pigmentos.

La concentración de clorofila se determinará usando un espectrofotómetro HACH DR/2000. La concentración de clorofila a será calculada **como se presenta en la Ecuación 1**.

$$\text{Clorofila } a \text{ (Ca)} = 11.85E664 - 1.54E647 - 0.08E630 \quad (1)$$

Donde E son los valores de absorbancia a las diferentes longitudes de onda (una vez corregidas por la lectura a 750 nm) y Ca es la cantidad de clorofilas (en µg L⁻¹ se emplearán celdas de 1 cm). La cantidad de clorofila en la muestra original será calculada **como se presenta en la Ecuación 2**.

$$\text{mg clorofila } m^{-3} = \frac{C \times v}{V \times 1} \quad (2)$$

Donde v es el volumen (10 mL) de acetona al 90% (en mL), V es el volumen de agua filtrada y C es la cantidad de clorofila calculada con la ecuación anterior.

Determinación de Ácidos Grasos

Para el análisis de ácidos grasos, aproximadamente 10 mg de biomasa algal será mezclada con 4 mL de metanol, 2 mL de cloroformo y 0.5 mL de agua destilada; la mezcla primero será sonicada durante 15-30 min a 10 °C, y después centrifugada a 4000 rpm por 15 min. La fase solvente –lípidos se recuperará a través de lavados con agua destilada, centrifugado y secados a baño María.

Los lípidos extraídos serán transesterificados con 2.5 mL de solución HCl:CH₃OH (5% v/v) por 2 h a 100 °C (Sato y Murata 1988). Los ésteres metil ácidos grasos (FAME) serán extraídos con 3 mL de hexano, y posteriormente lavados con agua destilada, obteniendo muestras de FAME de aproximadamente 1 mL.

Para el análisis del perfil FAME se utilizará un cromatógrafo (GC) Agilent Technology 7890. Un microlitro de la solución hexano-FAME será inyectado en el equipo GC con detector de ionización de flama (FID), con columna de separación DB-23 (60 m de longitud, 0.32 mm ID, 0.25 µm espesor) y empleando helio como gas acarreador.

Para la temperatura del inyector y detector se buscará emplear una temperatura de 250 °C., el programa de temperatura en el horno inicio a 120 °C mantenido por 5 min, con incrementos de 10 °C min⁻¹ hasta alcanzar los 180 °C, sosteniendo esta temperatura durante un tiempo adicional de 30 min, y posteriormente incrementar a 210 °C a una tasa de 10 °C min⁻¹ (manteniendo este incremento por 21 min).

Conclusiones

Se espera que los resultados que se obtenga del presente trabajo sirvan como un avance en el estudio del diseño para fotobiorreactores cerrados en cultivos de microalga y se logren obtener tasas de crecimiento celular significativamente mayores que trabajos anteriores y que el crecimiento de *Chlorella vulgaris* se vea reflejado en su biomasa seca, así como la calidad de la luz y los filtros mejoren la calidad de biodiesel y producción de bioetanol.

Se espera que la calidad y filtros de luz a utilizar dentro del estudio puedan superar algunos de los obstáculos de la utilización de la luz solar al controlar las emisiones de luz. Este nuevo concepto tiene aplicaciones potenciales en los sistemas de cultivo de microalgas de la próxima gran generación.

Bibliografía

- A.J. Folayan, P.A.L. Anawe, A.E. Aladejare, A.O. Ayeni, Experimental investigation of the effect of fatty acids configuration, chain length, branching and degree of unsaturation on biodiesel fuel properties obtained from lauric oils, high-oleic and high-linoleic vegetable oil biomass, *Energy Rep.* 5 (2019).
- Abou-Shanab, R.A.I., Ji, M., Kim, H., Paeng, K., Jeon, B., 2013. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production.
- Bhuyar, P., Sundararaju, S., Rahim, M.H.A., Ramaraj, R., Maniam, G.P., Govindan, N., 2019b. Microalgae cultivation using palm oil mill effluent as growth medium for lipid production with the effect of CO₂ supply and light intensity. *Biomass Convers Bior.* 1–9
- Chai Kee Phwan, Hwai Chyuan Ong, Wei-Hsin Chen, Tau Chuan Ling, Eng Poh Ng, Pau Loke Show., 2018. Overview: Comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae.
- Chenba Zhu, Xiaoqian Zhai, Yimei Xi, Jinghan Wang, Fantao Kong, Yunpeng Zhao & Zhanyou Chi., 2019. Progress on the development of floating photobioreactor for microalgae cultivation and its application potential.
- Chia SR, Ong HC, Chew KW, Show PL, Phang S-M, Ling TC, et al. Sustainable approaches for algae utilisation in bioenergy production. *Renew Energy* 2017.
- Dong Woo Kim, Won-Sub Shina, Min-Gyu Sunga, Bongsoo Leed, Yong Keun Changa, 2019. Light intensity control as a strategy to improve lipid productivity in *Chlorella* sp. HS2 for biodiesel production.
- Guillard RLL, Ryther JH., 1962. Studies on marine planktonic diatoms *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229–239.
- Hulatt, C.J., Thomas, D.N., 2011. Energy efficiency of an outdoor microalgal photobioreactor sited at mid-temperate latitude. *Bioresour. Technol.* 102.
- Jean Claude Nzayisenga, Xavier Farge, Sophia Leticia Groll & Anita Sellstedt., 2020. Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater.
- Khan, M.I., Shin, J.H., Kim, J.D., 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products.
- Lam, M.K., Lee, K.T., 2015. Bioethanol production from microalgae. In: *Handbook of Marine Microalgae*.
- Lucas Da Maia Jorge, Soares Cardoso Jessica, Da Silveira Mastrantonio, 2020. Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol production.
- Negar Azhand, Aziz Sadeghizadeh, Rahbar Rahimi., 2020. Effect of superficial gas velocity on CO₂ capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an Airlift photobioreactor with external sparger.
- Norsker, N.-H., Michiels, M., Slegers, P.M., Swinkels, G.J., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., 2019. Productivity of *Nannochloropsis oceanica* in an industrial closely spaced flat panel photobioreactor.
- Parsons TR, Maita Y, Carol CM (1984) *A Manual of Chemical and Biological Method for Seawater Analysis*. Pergamon Press. Oxford: 173p.
- Ruiz-Marín, A; Mendoza-Espinosa, Mendoza-Espinosa L. G., & Stephenson, T., 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semicontinuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101(1), 58-64.
- Scott A. Stuart, Howe J. Christopher, Lea-Smith J David, Smith G. Alison., 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects
- Sosa-Rodriguez Fabiola S., Vazquez Arenas Jorge, 2021. The biodiesel Market in Mexico: Challenges and perspectives to overcome in Latin-American countries.
- Wang Huan, Peng Xiaodong, Zhang Heng., 2021, Microorganisms promoted biodiesel production