

# Determinación de incidencia de la relación carbono: nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos de la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio

pags 21-29

Grupo de Investigación en Biotecnología  
Katherine Castro• Elkin Ortiz• Diego Rubio••

Recibido: 4 de marzo de 2014 Aceptado: mayo 30 de 2014

## RESUMEN

Se buscó establecer el efecto que tiene la variación de la relación Carbono: Nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos en la microalga *Chlorella vulgaris*, empleando como medio de cultivo y medio de control fertilizante foliar en forma líquida. Fueron evaluadas tres diferentes relaciones Carbono: Nitrógeno (1:1, 1:5 y 15:1), comparadas con el medio control a escala laboratorio, además se evaluó la concentración celular por medio de curvas de crecimiento durante 15 días. La biomasa obtenida luego de procesos secuenciales de sedimentación, centrifugación y liofilización, fue evaluada en términos de rendimiento, siendo el mejor para la relación 15:1 (0,71 g/L). Finalmente, se determinó que la concentración de Nitrógeno en el medio de cultivo alteró de manera significativa la composición de ácidos grasos producidos por las células microalgales tras un análisis del perfil lipídico obtenido por cromatografía de gases.

**Palabras Clave:** Relación Carbono: Nitrógeno, *Chlorella vulgaris*, Biomasa, Ácidos grasos, Fertilizante foliar, Glucosa, Nitrato de Potasio.

## ABSTRACT

Sought to establish the effect of varying the carbon: nitrogen ratio in the production of biomass and fatty acids in the microalgae *Chlorella vulgaris*, using liquid foliar fertilizer as culture medium and control medium. Three different Carbon: Nitrogen ratios (1:1, 1:5 and 15:1) were evaluated compared with control medium at laboratory scale. Cell concentration was assessed by growth curves over 15 days. The biomass obtained after sequential processes sedimentation, centrifugation and lyophilization was evaluated in terms of performance, with the best for the 15:1 ratio (0.71 g/L). Finally, it was determined that the concentration of nitrogen in the growth medium altered fatty acid composition produced by significantly microalgal cells by analysis of lipid profile obtained by gas chromatography.

**Key Words:** Carbon: Nitrogen ratio, *Chlorella vulgaris*, Biomass, Fatty acids, Foliar fertilizer, Glucose, Potassium nitrate.

• Estudiantes investigadores programa de Ingeniería Química. Universidad de América.  
•• Docente investigador Universidad de América, Biólogo, Magister en ciencias - Biología.

## INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de nuevos combustibles que no generen un alto impacto medioambiental ha surgido la alternativa de los biocombustibles, entre ellos el biodiesel. Sin embargo, Pistonesi *et al.* (2008) comentan cuestionamientos sobre la sostenibilidad de la producción de éstos, principalmente porque la gran demanda de ellos requiere monocultivos para la producción de aceites de origen vegetal, lo que genera problemas para el medio ambiente como la deforestación y el consumo de grandes cantidades de agua, herbicidas, insecticidas, fertilizantes y productos químicos para controlar las posibles plagas, originando riesgos de contaminación y erosión del suelo; de modo que se ha impulsado la búsqueda de nuevas fuentes para la producción de estos biocombustibles.

Lopera-Quezada y Holguín (2010) detallan las ventajas de la producción de biodiesel a partir de microalgas, como el mayor rendimiento de aceite frente a cualquier otro cultivo convencional, una huella ecológica pequeña, los requerimientos de una superficie reducida para cubrir la demanda actual de diésel de petróleo y la versatilidad de las microalgas oleaginosas, las cuales pueden ser cultivadas en agua de mar, en agua salobre o en aguas residuales.

Palomino M. *et al.* (2010) aprovechan las microalgas como microorganismos fotosintéticos con requerimientos simples de crecimiento que producen lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades y en cortos periodos de tiempo, los cuales se procesan para lograr biocombustibles o productos de mayor valor agregado. Así mismo, muestran las tecnologías y procedimientos para la producción de microalgas, las tecnologías de conversión y extracción de sus aceites, métodos de cosecha, floculación y sedimentación, extracción y purificación de biomasa.

Chica y Parra (2011) investigaron cómo influye la longitud de onda en el crecimiento de la microalga *Chlorella* y la acumulación de ácidos

grasos en ésta. Se determinó que todas las longitudes de onda dentro del espectro visible permiten el crecimiento de la microalga, pero, si se requieren grandes concentraciones de biomasa, es necesario utilizar la luz roja (longitud de onda de 700 nm) y, a pesar de no mostrarse diferencias significativas en los diferentes fotoperiodos, se recomienda utilizar el de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Ángel y Pimienta (2012) estudiaron la influencia del nitrógeno en la cepa *Chlorella vulgaris* en el aumento de ácidos grasos y el crecimiento celular de ésta. En la investigación fueron evaluadas tres diferentes concentraciones (100%, 20% y 10%) de la fuente de nitrógeno utilizada ( $\text{NaNO}_3$ ) en medio Bold Basal (BBM) y se evidenció que la tasa de crecimiento de *C. vulgaris* disminuye en las concentraciones limitantes de nitrógeno. También se observó que el contenido de lípidos, tras la disminución del 80 y 90% de nitrato de sodio, ocasionó un incremento superior al doble de la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados respecto a la concentración básica de este nutriente. Sin embargo, la producción de ácidos grasos monoinsaturados disminuyó notablemente desde un 45,46% en el primer ensayo a un 14,79 y 11,06% en los ensayos 2 y 3, respectivamente.

Por lo cual, se pretende investigar y establecer la relación Carbono: Nitrógeno que aumente la producción de biomasa y ácidos grasos en la microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando fuentes económicas de nutrientes y medio de cultivo, para facilitar la producción de biocombustibles a partir de microalgas, lo cual es de gran interés en el desarrollo de bioprocesos sostenibles que puedan ser acoplados e implementados en la Ingeniería Química.

## MATERIALES Y METODOS

La microalga utilizada fue *Chlorella vulgaris*, suministrada por el grupo de Investigación en Biotecnología BIOTECFUA de la Universidad de América en medio de cultivo de fertilizante foliar líquido.

## LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: ECONOMÍA DEL HIDRÓGENO

De acuerdo a estudios de Bullock *et al.* (2006), Barajas *et al.* (2011), Serrano (2012), y a en las investigaciones realizadas con anterioridad en el grupo de investigación en Biotecnología BIOTECFUA, se seleccionaron las siguientes condiciones de cultivo: temperatura de  $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ , agitación por aireación a 3 L/min, luz roja, fotoperiodo 12L: 12O, pH 6,7-7,0 y medio de cultivo de fertilizante foliar líquido al 0,2% v/v.

Se utilizó como fuentes de Carbono y Nitrógeno para complementar el medio de cultivo, la glucosa y nitrato de potasio respectivamente, debido a sus bajos costos, alta disponibilidad y facilidad en la manipulación y adquisición.

Se construyó un sistema de crecimiento microalgal con capacidad de 9 litros usando poliestireno expandido de 2 cm de espesor como aislamiento térmico, recubierto con lámina de aluminio de 0,2 mm de espesor para favorecer el calentamiento del sistema, además tres bombillos rojos de 10 Watts cada uno, que funcionaron como fuentes de luz y calor para el cultivo.

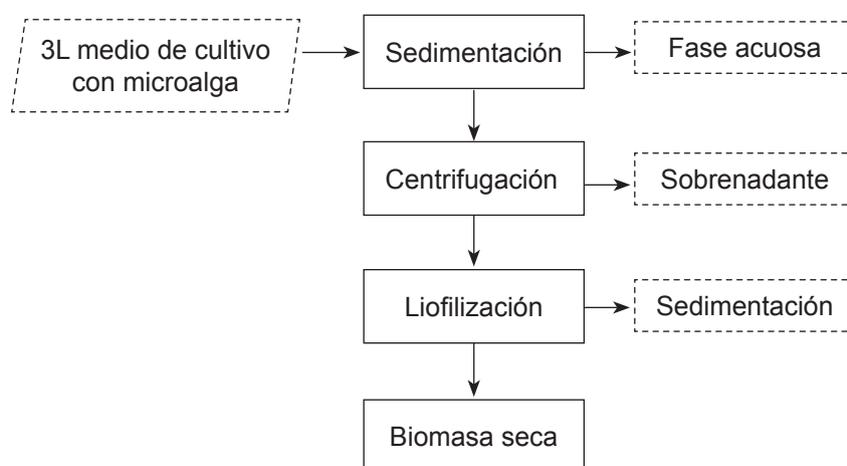
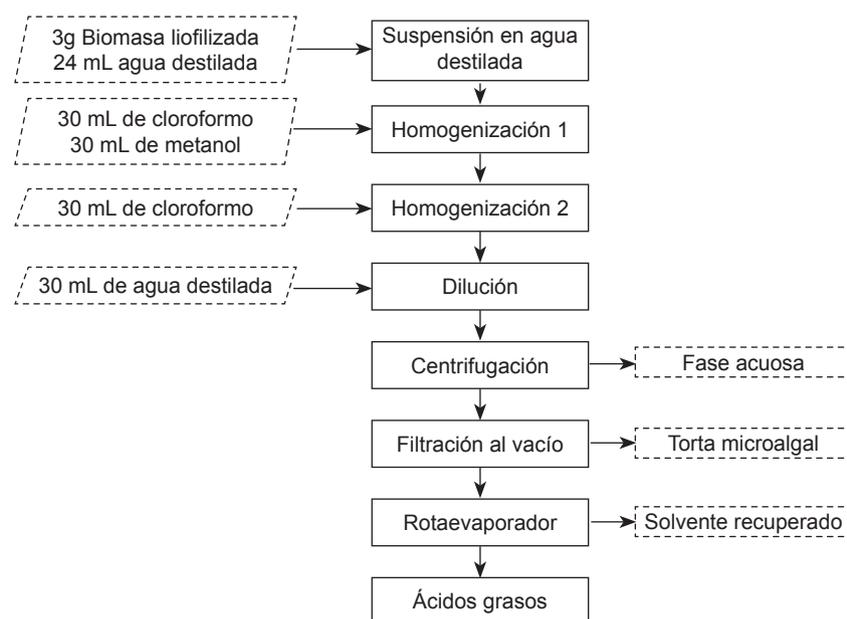
Se realizó un crecimiento previo a la experimentación siguiendo los parámetros por Ángel y Pimienta (2012) en medio de cultivo con fertilizante foliar al 0,2% v/v hasta alcanzar una concentración celular de  $1 \times 10^7$  Cel/mL.

Pérez *et al.* (2010), Cheirsilp *et al.* (2011), Quevedo *et al.* (2011) y Ángel y Pimienta (2012) encontraron que las concentraciones con mayor producción de biomasa y ácidos grasos se daban en un rango de 5 a 20 g/L de glucosa (hasta 8.03 g/L de Carbono) y de 1 a 8 g/L de Nitrógeno. Con el fin de complementar la información encontrada y fundamentar con datos experimentales las relaciones a trabajar, se decidió hacer un pre-experimento para seleccionar aquellas que presentaran un mayor crecimiento. Para esto se establecieron siete relaciones en peso Carbono: Nitrógeno (1:5, 1:10, 1:15, 1:1, 5:1, 10:1, 15:1), con la intención de evaluar datos dentro y fuera de los rangos encontrados.

Tras analizar los resultados obtenidos en el pre-experimento se seleccionaron tres relaciones Carbono: Nitrógeno (15:1, 1:5, 1:1), con las cuales se realizó un estudio completo (tres réplicas de cada experimento) comparando con el medio de control por 15 días a las condiciones de cultivo seleccionadas. Posteriormente, se realizaron recuentos celulares en cámara de Neubauer cada 24 horas para todas las réplicas.

Para la obtención de la biomasa se siguió la secuencia mostrada en la figura 1. El proceso de sedimentación consistió en retirar el sistema de aireación y dejar durante 12 horas en reposo los contenedores, logrando que las microalgas se sedimentaran por gravedad. Para la centrifugación se usó una centrífuga con una velocidad angular de 4000 RPM por un periodo de 10 minutos. Y el proceso de liofilización se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Para la extracción de ácidos grasos se tomaron 3g de biomasa liofilizada y se suspendieron en 24 mL de agua destilada en un erlenmeyer de 500 mL. Posteriormente, según lo planteado por Herrera *et al.* (2003), se añadieron 30 mL de cloroformo y 30 mL de metanol y se homogenizó agitando durante 30 segundos; a esta mezcla se agregaron otros 30 ml de cloroformo y se homogeneizaron por 30 segundos, para luego diluir con 30 ml de agua y volver a homogeneizar por 30 segundos más. La mezcla se distribuyó en tubos de centrifuga y se centrifugó a 900 xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante obtenido que correspondía a la fase acuosa. La capa inferior se filtró a través de un embudo de Büchner, por papel filtro Whatman 1, con vacío, separando la torta microalgal de la solución de ácidos grasos con cloroformo. El filtrado, el cual corresponde a la capa clorofórmica, se llevó al rotaevaporador a  $60^{\circ}\text{C}$  y 474 mbar para evaporar el cloroformo y separar así los ácidos grasos de la mezcla. Tras el proceso de extracción de ácidos grasos (figura 2), estos fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

**Figura 1. Secuencia de concentración y deshidratación de biomasa.****Figura 2. Proceso de extracción de ácidos grasos.**

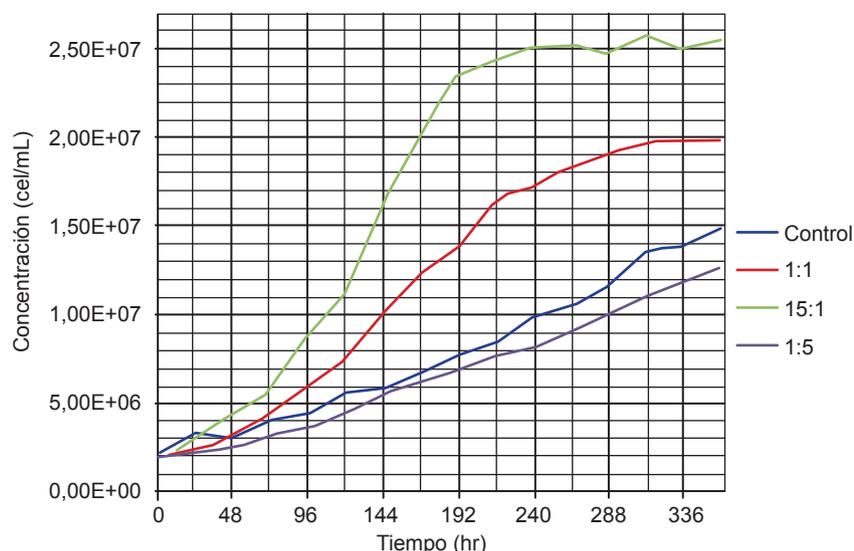
## RESULTADOS Y ANÁLISIS

### Crecimiento microalgal en relaciones seleccionadas

Contrastando las curvas de crecimiento promedio obtenidas en los cuatro experimentos (gráfica 1), se observa que el aumento de Nitrógeno en la relación Carbono: Nitrógeno en el medio de cultivo, reduce la tasa de crecimiento de las microalgas y alarga la fase de adaptación, en comparación con los otros medios de cultivo.

Así mismo, las microalgas responden al aumento de Carbono en la relación Carbono: Nitrógeno, con una rápida adaptación al medio de cultivo y una fase exponencial que, aunque es más corta que la del el medio de cultivo de referencia, presenta la mayor concentración celular (crecimiento máximo de  $2,4 \times 10^7$  Cel/mL). Para una relación Carbono: Nitrógeno equitativa se obtienen fases de adaptación y exponencial cortas, pero obtiene un crecimiento máximo de  $2 \times 10^7$  Cel/mL, siendo el segundo experimento con mayor crecimiento.

**Gráfica 1. Curvas de crecimiento promedio para los experimentos.**

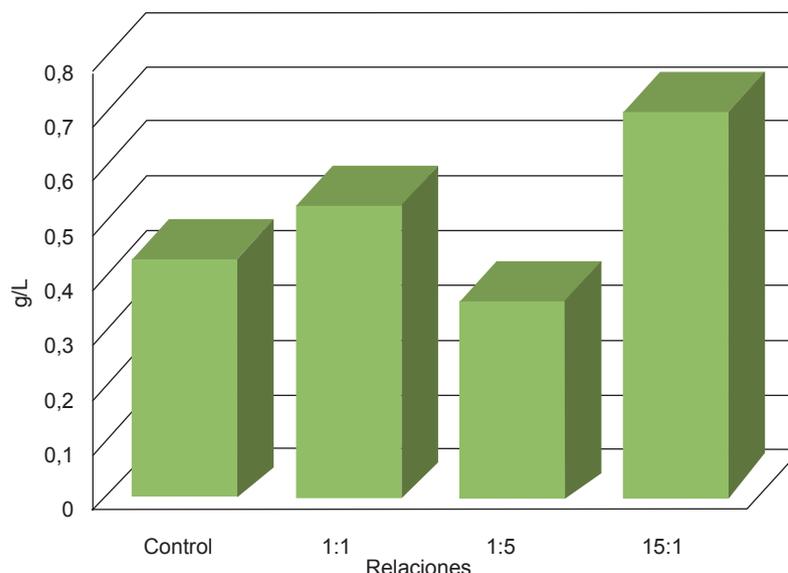


**Obtención de Biomasa**

La grafica 2 muestra la cantidad de biomasa seca en gramos por cada litro de medio de cultivo de cada relación, en donde se ve que el rendimiento de biomasa en el medio de cultivo control es de 0.4 g/L, resultado similar a los reportados por Alvear *et al.* (2010), quienes afirman que *Chlorella sp.* tiene un rendimiento de aproximadamente 0,3 g/L cultivada en agua destilada, con adición del medio enriquecido de Walne (Conwy). La productividad varía con

las diferentes relaciones de Carbono: Nitrógeno estudiadas: si la relación es mayor en concentración de Nitrógeno, la productividad de biomasa se ve levemente reducida, pero, al aumentar la concentración de Carbono, el rendimiento se eleva en un 40%. Con lo anterior se demuestra que una relación de Carbono: Nitrógeno 15:1 aumenta la producción de biomasa en la microalga *Chlorella vulgaris*, en comparación al medio de cultivo control y a resultados reportados por estudios referentes a la producción de biomasa microalgal.

**Gráfica 2. Rendimiento Biomasa Seca**



### Obtención de Ácidos grasos

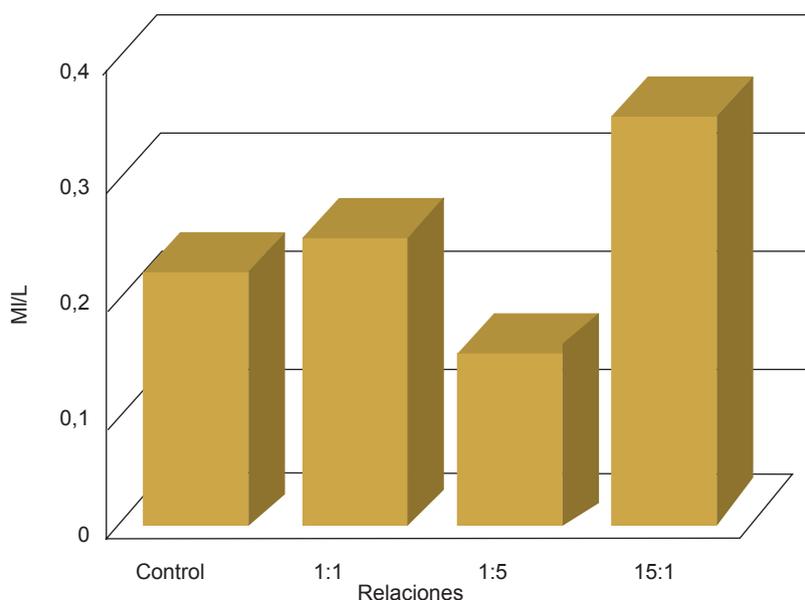
La gráfica 3 muestra, para cada relación, la cantidad de ácidos grasos que se obtienen por cada litro de medio de cultivo, en donde el mayor rendimiento de ácidos grasos se presenta en la relación 15:1 (0,36 mL/L), puesto que de ésta se obtiene mayor cantidad de biomasa. En consecuencia se puede establecer que la cantidad de ácidos grasos es dependiente de la cantidad de biomasa obtenida, además se determina que una relación de Carbono: Nitrógeno 15:1 aumenta la producción de ácidos grasos por

litro de medio de cultivo en la microalga *Chlorella vulgaris*, en comparación con el medio de cultivo control 0,22 mL/L y con los resultados reportados por Alvear *et al.* (2010) referentes a la producción de ácidos grasos microalgales, donde se afirma que *Chlorella* tiene un rendimiento de aproximadamente 0,174 mL/L.

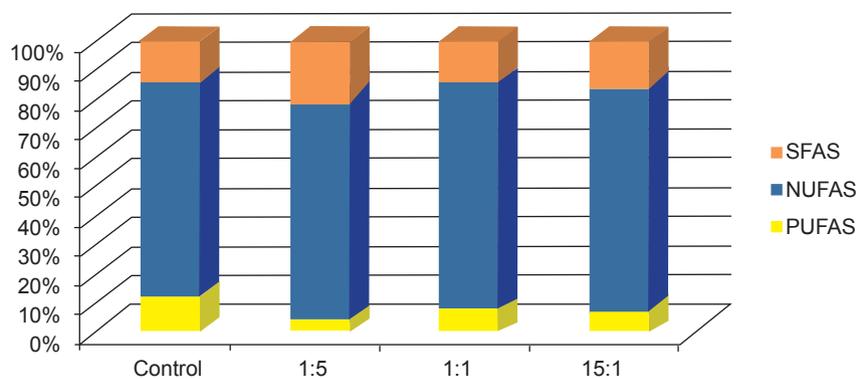
### Perfil de Ácidos grasos

Tras analizar los ácidos grasos presentes en cada muestra de aceite para cada relación, se clasificaron según lo expone la gráfica 4.

**Gráfica 3. Rendimiento ácidos grasos por litro de medio de cultivo.**



**Gráfica 4. Ácidos grasos poliinsaturados, monoinsaturados y saturados en los experimentos.**



## LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: ECONOMÍA DEL HIDRÓGENO

En los tres experimentos se aprecia una reducción en los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) con respecto al cultivo control, entre 4 y 5% para las relaciones 1:1 y 15:1, y un 7,64% para la relación 1:5; un leve aumento en los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAS), 0,11% para la relación 1:5, 1,62% para la relación 1:1 y 2,42% para la relación 15:1; y un incremento en los ácidos grasos saturados (SFAS) en las tres relaciones, 7,51% para la 1:5, 2,48% para la 1:1 y 2,29% para la 15:1. Estos resultados indican que la microalga *Chlorella vulgaris* almacena mayor cantidad de SFAS en medios con alta concentración de Nitrógeno; también que la presencia de Carbono en el medio disminuye la cantidad de PUFAS, efecto que se ve potenciado con la concentración de Nitrógeno, en contraste con lo dicho en por Ángel y Pimienta (2012) donde afirman que el contenido de PUFAS aumenta en condiciones de limitación de Nitrógeno; además, las cantidades de MUFAS idénticas entre los experimentos, señalan que la acumulación de éstos no es alterada por las diferentes concentraciones de Carbono y Nitrógeno en el medio.

## CONCLUSIONES

Tras la evaluación de la concentración celular por medio de curvas de crecimiento durante 15 días, se probó que el crecimiento de *Chlorella vulgaris* disminuye en presencia de altas con-

centraciones de Nitrógeno (5 g/L) (crecimiento máximo de  $1,5 \times 10^7$  Cel/mL) y aumenta en altas concentraciones de Carbono (15 g/L) (crecimiento máximo de  $2,4 \times 10^7$  Cel/mL) respecto al medio de control.

La biomasa obtenida luego de procesos secuenciales de sedimentación, centrifugación y liofilización fue evaluada en términos de rendimiento, siendo el mejor para la relación 15:1 (0,71 g/L), seguida de la 1:1 (0,54 g/L), el medio control (0,44 g/L) y la relación 1:5 (0,156 g/L).

Adicionalmente, el volumen de ácidos grasos contenido en la biomasa microalgal no aumentó significativamente con la concentración de Carbono, en cambio, al aumentar la concentración de Nitrógeno, disminuyó un 13,3% la cantidad los ácidos grasos en comparación con el medio control. Por otra parte, tras realizar un análisis del perfil lipídico obtenido por cromatografía de gases, se determinó que la concentración de Nitrógeno en el medio de cultivo alteró la composición de ácidos grasos producidos por las células microalgales de manera significativa.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores presentan agradecimientos a la Dirección del Departamento de Investigaciones de la Universidad de América por el apoyo dado al proyecto y a la línea de investigación.

## REFERENCIAS

- ÁNGEL, María Camila. PIMIENTA, Wendy. Evaluación de la incidencia del nitrógeno en el medio de cultivo bold basal para la producción de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor, para la obtención de ácidos grasos. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de América. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química, 2012, p. 90, 103.
- ALVEAR, Mario R. et al.. Obtención y comparación de los aceites obtenidos de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella nativa* como materia prima para la producción de biodiesel. [En línea] World Congress & Exhibition ENGINEERING. ARGENTINA. 2010. [Citado el 21 de marzo de 2013]. Disponible en internet: [http://www.apiperu.com/argentina/trabajos/ECC\\_187\\_Alvear\\_Alayon\\_Mario.pdf](http://www.apiperu.com/argentina/trabajos/ECC_187_Alvear_Alayon_Mario.pdf)
- BARAJAS et al.. Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel. En: Biblioteca Digital de Agronet: publicación de Universidad Industrial de Santander – UIS.

[Citado el 26 de noviembre de 2012]. Disponible en internet: <[http://201.234.78.28:8080/jsp/ui/bits-tream/123456789/1865/1/\(MicrosoftWord-BIOPROSPECCI.pdf](http://201.234.78.28:8080/jsp/ui/bits-tream/123456789/1865/1/(MicrosoftWord-BIOPROSPECCI.pdf)>

CHEIRSILP, Benjamas. TORPEE, Salwa. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. En: Bioresource Technology. 2012, Vol. 110 No. 2012, p. 511, 514

CÓRDOBA, Lady. Evaluación de la Producción de Hidrogeno en Fotobiorreactor mediante la Microalga *Chlorella vulgaris*. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá D.C. Fundación Universidad de América. Facultad de Ingeniería Química. Departamento de Ingeniería Química. 2011, p. 32.

DRAGONE, Giuliano *et al.*. Third generation biofuels from microalgae. En: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 2010, p. 1356-1363

EL VALLE. AGUILERA. Review: high pressure CO<sub>2</sub> extraction. Fundamentals and applications in the food industry. En: Food Science and Technology International. 1999. Vol. 5. p. 12

ESTRADA, Erick. Evaluación del cultivo de microalgas a nivel de planta piloto para la

extracción de aceite como materia prima en la producción de biodiesel. Guatemala. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2011, p. 22

GONZALES *et al.*. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. [En línea]. Prospect. [Citado el 27 de noviembre de 2012]. Disponible en Internet: <[http://videoconferencias.uac.edu.co/images/stories/publicaciones/revistas\\_cientificas/prospectiva/volumen-7-no-2/articulo6-v7n2.pdf](http://videoconferencias.uac.edu.co/images/stories/publicaciones/revistas_cientificas/prospectiva/volumen-7-no-2/articulo6-v7n2.pdf)>

HERRERA, Néstor A. Utilización de la microalga *Chlorella Vulgaris* en la remoción de contaminantes orgánicos provenientes de las aguas residuales de la empresa CONALSEBOS a escala laboratorio. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de América. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química, 2010, p. 20-21.

INFANTE, Cherlys *et al.*. Propagación de la microalga *Chlorella sp.* en cultivo por lote: Cinética del crecimiento celular. En: Avances en Ciencia e Ingeniería. 2012, Vol. 3 No. 2, p. 160

KRIENITZ, L. y WIRTH, M. The high content of polyunsaturated fatty acids in

Nannochloropsis limnetica (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. En: Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters. 2006, Vol. 36 No. 3, p. 204-210.

MASSON *et. al.* Los lípidos en los alimentos. [En línea] Ministerio De Educación. Gobierno de España Disponible en internet: <[http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/schmidth/06.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidth/06.html)>

MATAA, Teresa M. MARTINS, António A. CAETANO, Nidia. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010, Vol. 14 No. 1, p.221

QUEVEDO, Catalina. LUGO, Catalina. ACOSTA, Alejandro. Efecto de la concentración de carbono, nitrógeno, fósforo y hierro sobre la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella sp.*. En: V Simposio Internacional de Biofábricas. I Congreso Internacional de Flujos Reactivos (Medellín). Memorias. p. 2

RIVERA, Ivanna. VILLANUEVA, Gerardo. SANDOVAL, Georgina. Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática. En: Grasas Y Aceites. 2009, Vol.60 No. 5, p. 470

## LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: ECONOMÍA DEL HIDRÓGENO

SERRANO, Luis. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Trabajo de grado magister Ingeniería Química. Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. 2012, p.19-21

SPOLAORE, Pauline *et al.*. Commercial Applications of Microalgae. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. 2006, Vol. 101 No. 6, p. 92-94

VALENCIA, Juan Pablo. Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y

cuantificación de metilésteres de ácidos. Trabajo de grado tecnólogo químico. Pereira: Universidad Tecnológica De Pereira. Facultad De Tecnología. Escuela De Química. Programa De Tecnología Química, 2008, p. 12