

MODELADO METABÓLICO Y OPTIMIZACIÓN DEL CRECIMIENTO NO BALANCEADO DE *CHLORELLA VULGARIS*. APLICACIÓN A LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.

Homero Basso

Laboratorio de Fermentaciones de la FBCB, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (UNL) - Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC), Santa Fe, Argentina.

Director: Dondo, Rodolfo Gabriel
Codirectora: Márquez, Vanina Elizabet

Área: Ciencias Biológicas

Palabras Clave: Chlorella, biocombustibles, modelado.

INTRODUCCIÓN

Existen diferentes alternativas a los combustibles convencionales, más amigables con el medio ambiente. Una de estas alternativas son los biocombustibles que se pueden obtener a partir de microorganismos. Dentro de estos se pueden encontrar productos de acumulación en la microalga *Chlorella vulgaris*, la cual es fotoautótrofa y es capaz de mitigar la emisión de dióxido de carbono al fijarlo en el proceso de fotosíntesis que implica almacenar azúcares en forma de almidón (Barbosa, 2013). Este almidón puede convertirse en etanol para la producción de bioetanol que sirve como biocombustible. Por otro lado, esta microalga almacena gran cantidad de triglicéridos los cuales pueden ser refinados para la producción de biodiesel.

El estudio *in silico* del metabolismo es esencial cuando se tiene como objetivo la maximización de la tasa de crecimiento de las microalgas. Para ello se utilizan modelos matemáticos que son descripciones simplificadas del proceso real que intentan identificar relaciones entre los factores que influyen el crecimiento celular y la generación de productos. Existen enfoques de modelos a escala microscópica que tienen en cuenta a dichos mecanismos intracelulares (Fell, 1992) y modelos a escala macroscópica (Bastin, 1990) que no tienen en cuenta mecanismos intracelulares, pero si las concentraciones de los componentes relevantes y las variables intensivas como por ejemplo, la temperatura y el pH.

Título del proyecto: UTILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS AMBIENTALES PARA LA PRODUCCIÓN SUSTENTABLE DE ACEITES Y BIOPLÁSTICOS.

Instrumento: CAI+D 2020

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: UNL

Director/a: Claudia Studdert

OBJETIVOS

- Obtener datos de performance de cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor, particularmente de rendimientos de biomasa, lípidos, proteínas, carbohidratos y consumo de nitrógeno, con el fin de utilizarlos en un modelo a escala macroscópica.
- Utilizar algoritmos de optimización para determinar las mejores condiciones de crecimiento y producción de metabolitos de interés por parte de *Chlorella vulgaris*.

METODOLOGÍA

Cultivos autotrófico en fotobiorreactor (FBR): Se realizaron 2 cultivos que se desarrollaron en un FBR tanque agitado (Microferm Fermentor, New Brunswick, USA), de 14 L de volumen nominal, utilizando 10 L de volumen de trabajo, empleando el medio Bold 3N. Se inoculó con un cultivo en fase exponencial de la microalga *C. vulgaris* en el mismo medio, de modo de alcanzar una DO_{680 nm} de 3,8. Las condiciones de operación del primer FBR fueron las siguientes: velocidad de agitación 200 RPM, flujo de aireación 1 L/min, fotoperiodo de iluminación 16-8 hs (luz-oscuridad), temperatura 24°C. El segundo FBR se operó con las mismas condiciones excepto la de iluminación, este se realizó sin un fotoperiodo.

Se tomaron muestras periódicas de ambos cultivos en el FBR para determinar la DO a 680 nm y realizar las determinaciones que se describen más adelante: biomasa, lípidos totales, concentración de nitrato en el medio libre de células, carbohidratos.

Determinación de biomasa: Una alícuota de la muestra se centrifugó a 2000 RPM por 10 min, el pellet se secó en estufa a 60°C hasta peso constante.

Determinación de lípidos totales: La medición de lípidos se realizó en la biomasa empleando el método colorimétrico de la sulfo-fosfo-vanillina (SFV) (Mishra, 2014).

Determinación de nitratos: Para la medición de nitratos se utilizó el sobrenadante libre de células, obtenido por centrifugación, empleando el método colorimétrico descrito por Cataldo (1975).

Determinación de hidratos de carbono: A los pellets de las muestras conteniendo la biomasa, se aplicó el método descrito por Dubois (1956).

Análisis estadístico: Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) del modelo de regresión múltiple para establecer si las diferencias observadas resultan significativas, tomando como criterio un p valor menor a 0,05.

Modelo a escala macroscópica: Se desarrolló un modelo con un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) en Matlab para determinar los parámetros cinéticos y rendimientos del modelo. En este sistema ODE se tuvo en cuenta un fenómeno de sombreado entre las células que representaría que el flujo de fotones disminuye a medida que aumenta la cantidad de células y, por lo tanto, la cantidad de biomasa. Este efecto se debe a que las nuevas células generan sombra que limita la entrada de fotones y no llegan al seno del cultivo (Lee 2013).

RESULTADOS

Análisis de resultados: En las figuras 1- 5 se muestran las evoluciones de los parámetros medidos en los cultivos con y sin fotoperiodo. En la **figura 1** se muestra el desarrollo de la curva de proliferación celular, que resultó similar para ambos cultivos. Este crecimiento de la microalga a su vez conlleva un aumento en la concentración de biomasa que se puede apreciar en la **figura 2**, donde también se observa la misma cinética. En la **figura 3** se puede apreciar la evolución en los rendimientos específicos de lípidos totales por célula. Este parámetro si resultó diferente para ambos tipos de cultivos ($p\text{-valor} = 1,57 \cdot 10^{-13}$), obteniéndose mayores rendimientos en el cultivo realizado con fotoperiodo. En la **figura 4** se observa que no hay diferencias en la composición de hidratos de carbono entre cultivos al igual que tampoco se observa diferencias en el consumo de nitratos (**figura 5**).

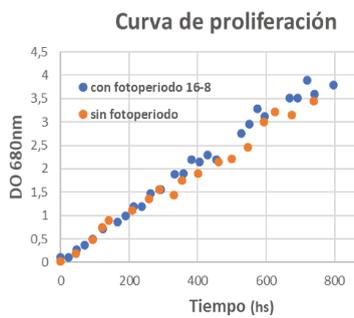


Fig 1: Curva de proliferación celular (DO 680 nm) en cultivos con y sin fotoperiodo.

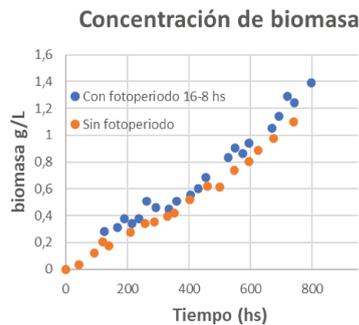


Fig 2: Curva de concentración de biomasa (g/L) en cultivos con y sin fotoperiodo.

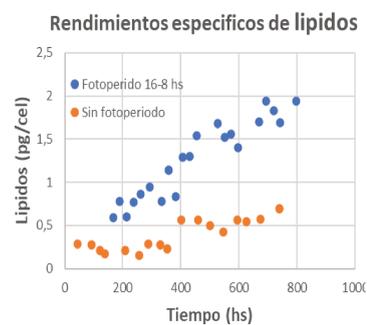


Fig 3: Cantidad de lípidos por célula (pg/cél) vs tiempo (hs) en FBR con y sin fotoperiodo.

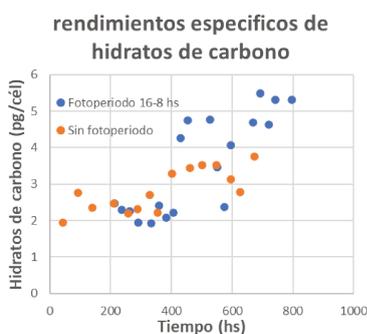


Fig 4: Cantidad de hidratos de carbono por célula (pg H.C./cél) vs tiempo (hs) en FBR con y sin fotoperiodo.

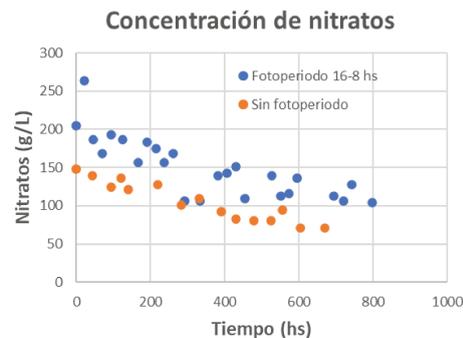


Fig 5: Concentración de nitratos (mg/L) en el medio de cultivo vs tiempo (hs)

Regresión del modelo: El sistema ODE utilizado para estimar los parámetros cinéticos por medio de regresión están enumerados a continuación del 1 al 3:

$$\frac{dDO}{dt} = \mu_{max} \cdot \frac{\left(\frac{1}{DO}\right)^n}{1 + \left(\frac{1}{DO}\right)^n} \cdot DO \quad (1)$$

$$\frac{dN}{dt} = - Y_N \cdot \frac{dDO}{dt} \quad (2)$$

$$\frac{dL}{dt} = \alpha \cdot \frac{dDO}{dt} \quad (3)$$

" μ_{max} " representa la tasa de crecimiento específica máxima, "n" un parámetro relacionado al sombreado entre las células, " Y_N " el rendimiento de consumo de nitrógeno y " α " como un coeficiente para la producción de lípidos. Los resultados que se obtuvieron luego de la regresión fueron:

$$\mu_{max} = 0.0136 \text{ (h}^{-1}\text{)} \quad Y_N = 278 \text{ mg N} \cdot \text{mg biomasa}^{-1} \quad \alpha = 0.0445$$

CONCLUSIÓN

Hemos observado que la presencia de un fotoperiodo no tiene un efecto significativo en la evolución de los rendimientos de biomasa, la composición bioquímica a partir de hidratos de carbono y los rendimientos de nitratos. Sin embargo, sí existe un efecto del fotoperiodo en cuanto a la composición de la biomasa a partir de lípidos totales. Por otro lado se ha visto que el modelado del cultivo de *C. vulgaris* es un método útil para obtener los parámetros de cultivo, que serán utilizados para abordar objetivos relacionados a la optimización de este bioproceso.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Barbosa, M., Wijffels, R.**, 2013. Biofuels from microalgae. En: Handbook Microalgal Culture. Applied Phycology and Biotechnology. Richmond A., Hu. Q. (Eds.). John Wiley y Sons, Ltd. Sussex, Reino Unido. p. 566-578.
- Fell, D.A.**, 1992. Metabolic Control Analysis: a survey of its theoretical and experimental development. Biochem. J. 286, 313–330.
- Bastin, G., Dochain, D.**, 1990. On-line estimation and adaptive control of bioreactors, Elsevier. Elsevier, Amsterdam
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W.** (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. Bioresource technology, 155, 330-333.
- Cataldo, D. A., Maroon, M., Schrader, L. E., & Youngs, V. L.** (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Communications in soil science and plant analysis, 6(1), 71-80.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry, 28(3), 350-356.
- Bajguz A.** (2011). Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 60(3), 406–416.
- Lee, Y. K., Chen, W., Shen, H., Han, D., Li, Y., Jones, H. D., ... & Hu, Q.** (2013). Basic culturing and analytical measurement techniques. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology, 37-68.