

energreen

The logo graphic consists of two overlapping circles. The top circle is yellow with a green outline and a small green dot in the center. The bottom circle is green with a yellow outline and a small yellow dot in the center.

COOPERACIÓN COOPÉRATION
TERRITORIAL TERRITORIALE
ESPAÑA-FRANCE-ANDORRA

La selección de una especie adecuada es un aspecto fundamental para asegurar un proceso eficiente de obtención de bio-energía a través del cultivo de microalgas (Griffiths & Harrison 2009). Las especies del género *Chlorella* se consideran óptimas candidatas para su obtención por las altas productividades que muestran en cultivos a escala industrial. El poder calorífico de este género puede alcanzar los 29 kJ/g, valor muy cercano a los 39 kJ/g que ofrece el aceite de colza, lo que muestra el potencial de esta microalga como fuente de biodiesel (Illman et al., 2000). La composición proximal de *Chlorella* incluye proteínas, carbohidratos, lípidos y fibra en proporciones variables, haciendo de su biomasa e una materia prima versátil que puede ser empleada para obtención de diversas formas de energía como diesel, bioetanol, metano e hidrógeno. Sin embargo, numerosos factores nutricionales y ambientales aplicados durante el cultivo pueden modificar radicalmente la composición de la biomasa y su valor energético.

Dentro de la actividad **Desarrollo de estrategias de cultivo de microalgas** para obtención de biomasa con alto contenido lipídico, **NEIKER** llevó a cabo un estudio del efecto de diferentes condiciones de cultivo (grado de aporte de nitrógeno y dióxido de carbono, composición de medios y nivel de irradiancia) sobre el crecimiento y contenido en lípidos de la biomasa. El objetivo buscado fue seleccionar las condiciones mas adecuadas para una producción eficiente de biomasa de alto valor energético con esta especie.

Los resultados obtenidos indican que el contenido lipídico de *C. vulgaris* NK08, cultivada bajo condiciones de crecimiento no restrictivas, no supera el 16% del peso seco, conteniendo una fracción de lípidos neutros o triglicéridos (TAGs) inferior al 5% del peso seco de la biomasa.

El contenido en lípidos se puede incrementar un **25%** sometiendo los cultivos a una limitación nutritiva progresiva (deficiencia en nitrógeno). Aunque el incremento del contenido de lípidos totales no fue tan sustancial como el reportado para otras cepas de este género, se comprobó que la limitación en nitrógeno provoca una modificación gradual de la composición de los lípidos, con un incremento progresivo de la fracción de lípidos neutros. Tras 5 días de limitación el contenido de TAGs alcanza el 12% del peso seco (**Fig. 1**). Puesto que ésta es la fracción adecuada para transformar en biodiesel, se puede considerar que la limitación en nitrógeno es una estrategia efectiva para mejorar el contenido en aceites de esta especie.

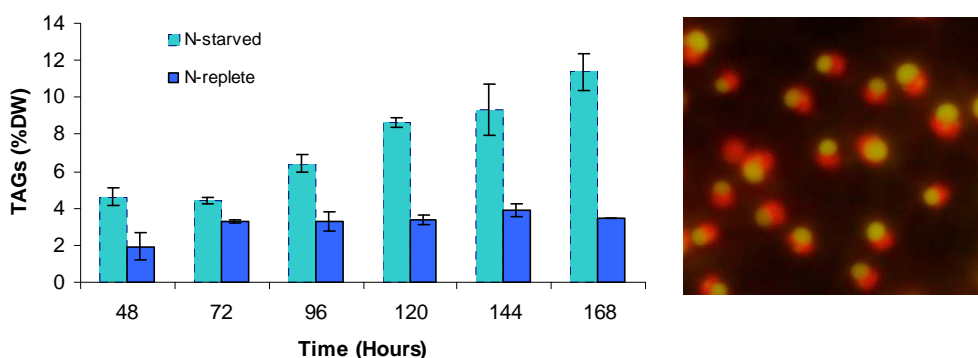


Figura 1. Evolución temporal del contenido TAGs (% peso seco) en cultivos de *C.vulgaris*-NK08 creciendo bajo condiciones no restrictivas (N-replete) y bajo limitación en nitrógeno (N-depleted). A derecha imagen de microscopía combinada el marcador lipídico Rojo de Nilo, mostrando las acumulación de lípidos neutros (fluorescencia amarilla) en las células limitadas por nitrógeno.

La limitación nutricional de los cultivos se ha considerado con frecuencia una estrategia poco adecuada para mejorar la productividad de lípidos en muchas microalgas debido a que el proceso de acumulación de lípidos es inversamente proporcional a la productividad final de los cultivos. En el caso de *C. vulgaris* NK08 la limitación impuesta también provocó una reducción del rendimiento final en biomasa (1.6 veces menor que en cultivos sin limitación). Sin embargo el rendimiento final del producto de interés fue 1.8 veces superiores en los cultivos sometidos a limitación (51 mg TAG L⁻¹d⁻¹ frente a 28.6 mg TAG L⁻¹d⁻¹ en cultivos sin limitación). Estos resultados demuestran que en *C. vulgaris* NK08 la restricción del crecimiento ocurrida como consecuencia de la limitación nutricional, se compensa con el incremento del contenido celular de TAGs. Entonces la inducción por limitación en nitrógeno se puede considerar una estrategia adecuada para mejorar el contenido en lípidos de la cepa.

Tabla 1. Biomasa, contenido de lípidos totales y triglicéridos (TAGs) respecto a la biomasa (% peso seco) y productividades de TAGs en cultivos batch de *C. vulgaris* NK08 creciendo bajo condiciones nutricionales no restrictivas y bajo condiciones limitantes de nitrógeno.

	No limitados	Limitados
Biomasa (g ps L⁻¹)	5.1 ± 0.1	2.8 ± 0.1
Lípidos (% PS)	16.9 ± 0.5	22.5 ± 0.2
TAGs (% PS)	3.4 ± 0.1	11.5 ± 0.1
Productividad (mg TAG L⁻¹d⁻¹)	28.6 ± 2.3	51 ± 3.1

Por otro lado, la dosis inicial de nitrato con que se suplementa el medio de cultivo se puede ajustar para optimizar la densidad celular alcanzada antes de la inducción del almacenamiento de lípidos neutros. Los máximos rendimientos se obtuvieron empleando dosis intermedias de nitrato (0.6 g L⁻¹ de KNO₃).

Para alcanzar los rendimientos antes mencionados resultó indispensable aportar CO₂ durante todo el ciclo de cultivo. En la fase inicial de cultivo, cuando no hay restricción nutricional en el medio de cultivo, el aporte de CO₂ favoreció la velocidad de consumo del nitrógeno y aumentó la tasa de crecimiento, generando mayores rendimientos de biomasa por unidad de volumen. Una vez consumido el nitrógeno, el aporte de CO₂ también favoreció el proceso de acumulación de TAGs. Esto demuestra que aunque tras agotarse el nitrógeno del medio el crecimiento celular se detiene las células mantienen la capacidad de seguir asimilando el carbono disponible e incorporarlo lípidos de reserva.

En relación al efecto de la irradiancia los resultados demostraron que la eficiencia fotosintética de esta especie es estable en un rango de intensidad de 250-500 μmol fotones m⁻²s⁻¹. Teniendo en cuenta los valores de productividad alcanzados y la limitada demanda de irradiación que requiere *Chlorella* NK08 esta cepa podría ser adecuada para explotar en zonas climáticas con dosis de

irradiación limitadas, aunque el efecto de la temperatura sobre el crecimiento también debería ser considerado.

Además de lo expuesto se realizaron ensayos dirigidos a determinar el efecto de modificar las ratios entre los principales nutrientes del medio (N: P: Mg: Fe). Los resultados demostraron que mientras se mantengan las condiciones establecidas para el nitrógeno, la productividad alcanzada con la cepa es bastante estable en un amplio rango de ratios.

Con el objetivo de evaluar el potencial energético de la biomasa obtenida en todas las condiciones de crecimiento ensayadas, **CENER** realizó una caracterización química (composición proximal). Los resultados obtenidos confirman que también la composición de la biomasa es estable bajo las diferentes condiciones ensayadas, conteniendo 16-18% de FAMES (Fatty Acid Methyl Esters). Sin embargo, los hidratos de carbono constituyen la fracción mayoritaria dentro de la biomasa de *Chlorella*, lo que indica que a pesar de acumular lípidos neutros, el almidón podría ser la principal forma de reserva de esta cepa.

En el marco de la actividad de **Evaluación de Sistemas de Extracción y Transformación a Biodiesel**, **CENER** ha desarrollado un conjunto de trabajos dirigidos a optimizar los rendimientos de la extracción de aceites de *C. vulgaris* NK08 empleando métodos convencionales con solventes orgánicos. Para ello se emplearon un conjunto de experimentos multifactoriales donde se incluyeron las siguientes variables de estudio: tiempo de extracción, temperatura de trabajo, número de re-extracciones, tipo de disolventes y relación soluto/disolvente.

De los resultados obtenidos se concluyó que los mejores rendimientos en la extracción de los lípidos se obtenían sometiendo directamente la muestra a agitación en presencia de un solvente (**Fig. 2A**). En relación a las condiciones de extracción, los mejores resultados se obtuvieron con dos extracciones sucesivas de 30 minutos y empleando una relación soluto-solvente de 3:40 (p/v). El pellet residual obtenido tras la extracción presentó un aspecto bastante descolorido con respecto a la biomasa antes de la extracción (**Fig. 2C**), indicando una extracción aparentemente eficiente.

Tras la evaporación del solvente empleando un rotavapor se obtuvo una fracción oleica con un aspecto bastante sólido, como se aprecia en la (**Fig. 2B**).

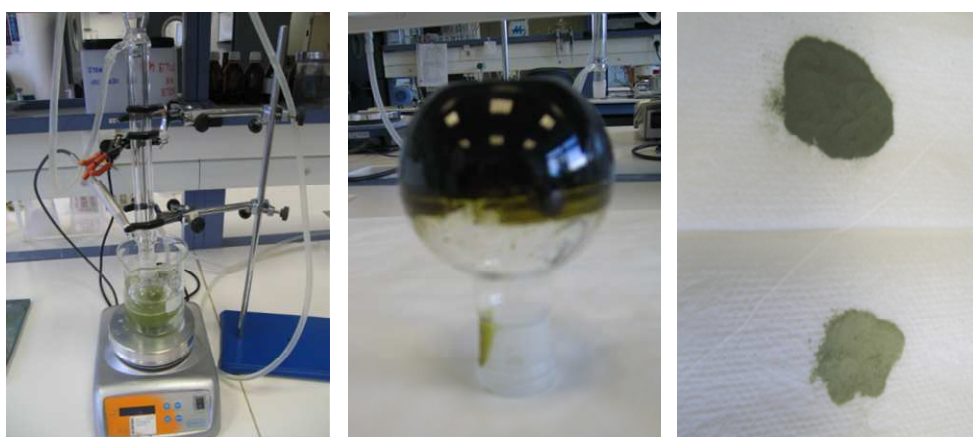


Figura 2. (A) Sistema de extracción de lípidos empleado, (B) Consistencia sólida de los lípidos extraídos, como se aprecia en el matraz invertido, (C) Biomasa de *C. vulgaris* NK08 antes y después de la extracción con solventes.

Para la transformación de aceites extraídos en biodiesel, se emplearon dos procedimientos alternativos.

Por un lado **CENER** evaluó la eficiencia de diversos procedimientos convencionales, incluyendo (1) transesterificación alcalina (catalizador metilato sódico), (2) esterificación ácida (catalizador ácido sulfúrico) y (3) por reacción con cloruro de aceto en metanol de la fracción saponificable después de haber separado previamente la fracción insaponificable (**Fig. 3A-B**). Los resultados más satisfactorios se obtuvieron con el tercero de los métodos, que permitió obtener un biodiesel con aspecto fluido y líquido (**Fig. 3D**), y con un alto porcentaje en FAMES (superiores al 90%). Además se ha podido obtener una fracción insaponificable que podría servir para obtener otros compuestos de alto valor añadido.

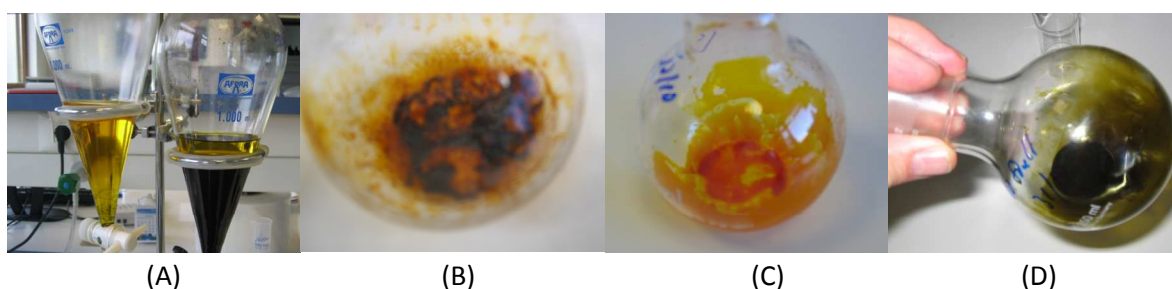


Figura 3. Separación de las fracciones saponificable (A) e insaponificable (B) y (C) tras la evaporación, y Biodiesel obtenido (D).

Por otro lado, la **UPV/EHU** ha realizado estudios preliminares en paralelo para evaluar la utilidad de los biocatalizadores magnéticos que ha desarrollado para la obtención enzimática de biodiesel. Con este fin, hasta el momento, se ha trabajado en la obtención de soportes magnéticos nanoestructurados y con ellos se han obtenido **CLEAs** (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*) de lipasa. El enzimas empleado (CALB, lipasa B de *Candida antarctica*) se ha obtenido de fuentes comerciales. Las nanopartículas magnéticas (MNPs) se han obtenido precipitando sales de hierro en medio alcalino con agitación mecánica (**Fig. 4A**) y, más tarde, sus superficies se han funcionalizado con grupos amino. Las MNPs obtenidas se han caracterizaron estructuralmente empleando microscopía electrónica de transmisión (**Fig. 4B**). La difracción con rayos X confirmó su naturaleza de magnetita (**Fig. 4C**) y la caracterización magnética reveló su carácter superparamagnético, tanto antes como después de la inmovilización del enzima CALB.

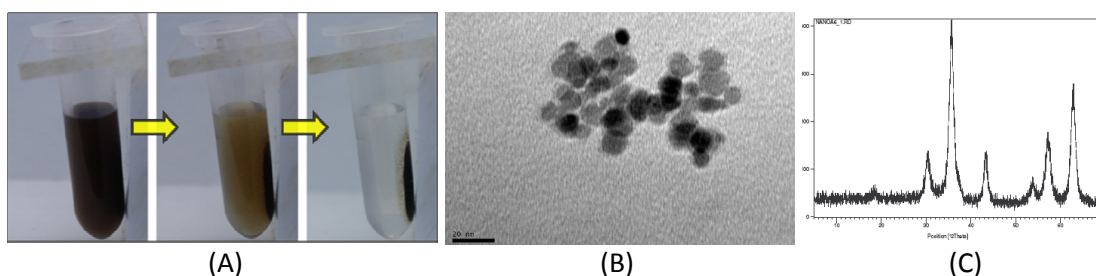


Figura 4. (A) Efecto atractivo de un imán sobre las nanopartículas magnéticas (MNPs) obtenidas. Se muestran imágenes tomadas cada 20 segundos. (B) Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se comprueba que el tamaño de las MNPs es de unos 10 nm. (C) Espectro de difracción de rayos X que indica que las MNPs están constituidas por magnetita.

Por otro lado, las MNPs se han empleado para obtener CLEAs de lipasa CALB, y se ha caracterizado tanto la actividad hidrolítica como sintética de las mismas en medios acuosos y en disolventes orgánicos, respectivamente. Se comprobó que las CLEAs eran capaces de catalizar la reacción de transesterificación en biodiesel del 70% del aceite extraído de *C. vulgaris* NK08, en un tiempo de 20 horas y a una temperatura de 40°C. Al cabo de 42 horas de incubación todo el aceite se había convertido en biodiesel (FAPE). El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en capa delgada (TLC) en placas de gel de sílice (**Fig. 5**). Esta sencilla técnica analítica permite seguir el progreso de la reacción de esterificación, además de ser de utilidad para detectar los ácidos grasos libres los mono (MG), di (DG) y triglicéridos (TG), así como los pigmentos fotosintéticos clorofilas (G) y carotenoides (C) presentes en el aceite.

Aunque los resultados obtenidos hasta ahora son preliminares, sí son muy positivos ya que indican que los catalizadores magnéticos que se están desarrollando son eficaces para catalizar la producción enzimática de biodiesel a 40°C. Más aún, teniendo en cuenta la gran estabilidad de las CLEAs y la posibilidad por su carácter magnético de ser fácilmente recuperadas para ser reutilizadas en sucesivos ciclos catalíticos.

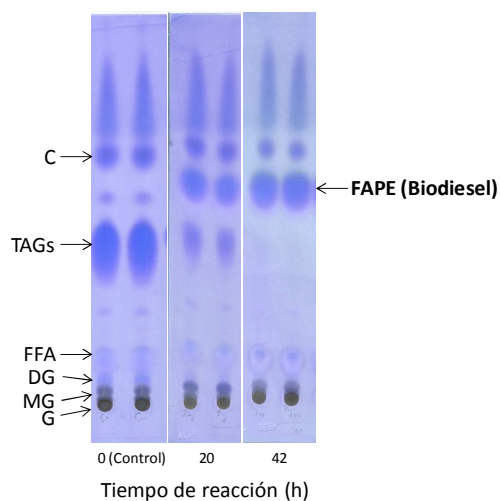


Figura 5. Seguimiento por TLC de la producción de biodiesel (FAPE) a partir de aceites extraídos de *C. vulgaris* NK08. La reacción de transesterificación catalizada por mCLEAs de CALB transcurrió a 40°C en una mezcla de *n*-hexano y 2-propanol. Se observa que después de 42 h de reacción la totalidad de TAGs se han convertido en biodiesel. C, pigmentos carotenoides; TAGs, triglicéridos; FFA, ácidos grasos libres; DG, diglicéridos; MG, monoglicéridos; G, pigmentos verdes.