



ECUADOR
UNIVERSIDAD
INTERNACIONAL
SEK
SER MEJORES

Facultad de Ciencias Naturales y
Ambientales

**EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA
LAGUNA DE LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA
PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.**

Autora: Soledad Subía Muñoz

Director: Jefferson Rubio

Revisores: Pablo Castillejo, Johanna Medrano

INTRODUCCIÓN

Área energética

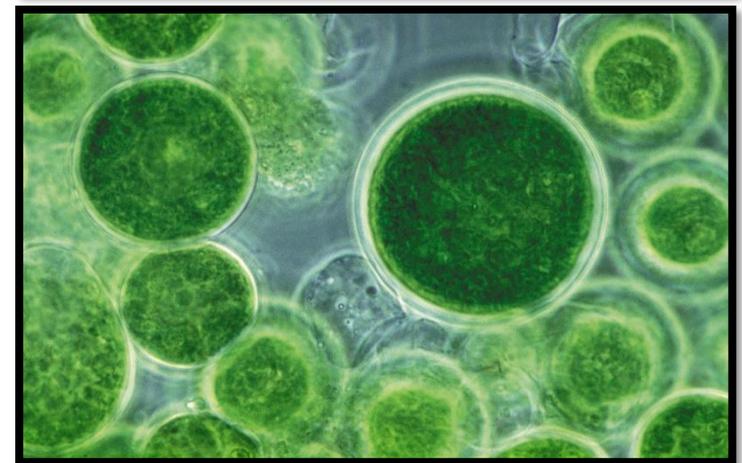
Reducción de
reservas petroleras



Contaminación/cambio
climático

Biocombustibles

- Primera generación
- Segunda generación
- Tercera generación



MICROALGAS

Reducción de la dependencia de los combustibles fósiles



Disminución de emisiones de CO₂



Biodiesel

Tratamiento de aguas residuales



- Autótrofos unicelulares, coloniales filamentosos
- Pigmentos fotosintéticos que les permiten realizar fotosíntesis oxigénica

- Fuente importante de biomoléculas y metabolitos
- Lípidos, proteínas y carbohidratos

- Facilitar el control de las emisiones de carbono mediante absorción y biofijación de grandes cantidades de CO₂

HIPÓTESIS

- Se conoce que las moléculas de triésteres de glicerilo pertenecientes a los aceites vegetales y animales, intervienen en el proceso de transesterificación para la producción de biocombustibles. Es por eso que la biomasa de microorganismos como las microalgas es una apuesta a largo plazo para el desarrollo de energías más limpias al tener en su estructura una cantidad importante de dichas biomoléculas.
- *La biomasa de consorcios de microalgas provenientes de la Reserva Biológica “Limoncocha” puede ser aprovechada por su contenido de lípidos totales y perfil lipídico para la producción de biocombustibles de tercera generación.*

OBJETIVOS

■ **Objetivo General:**

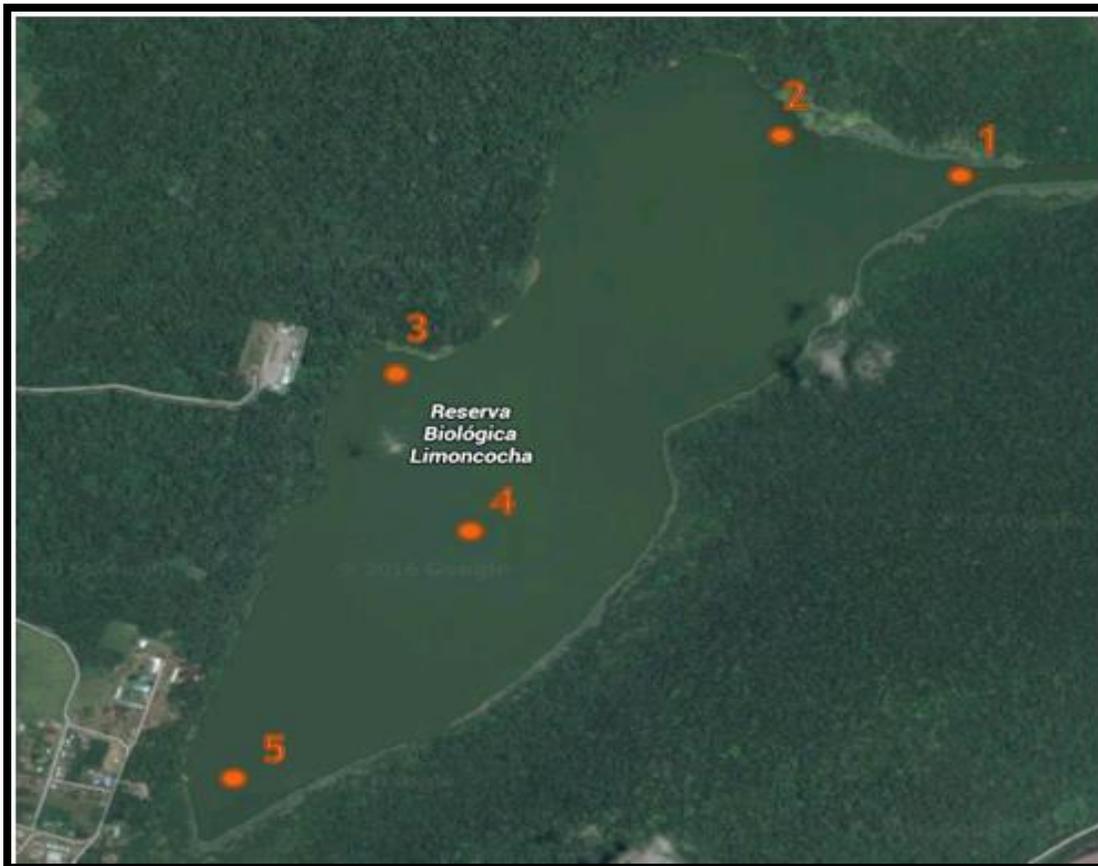
- Obtener biomasa de microalgas provenientes de la laguna de Limoncocha utilizando fotobiorreactores a escala de laboratorio para su posterior caracterización y su aplicación en la producción de biocombustibles

■ **Objetivos específicos**

- Cultivar diferentes cepas de microalgas controlando las variables de cultivo.
- Determinar la cinética de crecimiento de las microalgas mediante conteo celular y densidad óptica.
- Establecer la productividad de biomasa seca en los fotobiorreactores.
- Implementar los métodos de caracterización en la cuantificación de lípidos totales, perfil lipídico y proteínas.

METODOLOGÍA

Área de estudio y muestreo de cepas



- La reserva de Limoncocha está ubicada a 210 km al este de Quito aproximadamente, en la provincia Shushufindi, parroquia de Limoncocha.

Puntos de muestreo:

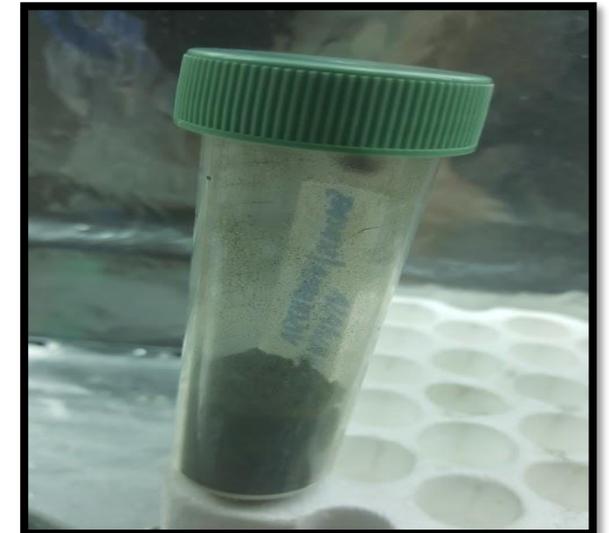
- Punto 1: El Caño;
- Punto 2: Desembocadura del Pishira;
- Punto 3: Desembocadura de Playa Yacu;
- Punto 4: Zona Profunda;
- Punto 5: Muelle

CONDICIONES DE CULTIVO



OBTENCIÓN Y PRE TRATAMIENTO DE BIOMASA

- Método de centrifugación
- Centrifuga modelo K de International Equipment Co. de 1 litro de capacidad y $\frac{3}{4}$ HP (Pellets)
- Secado en la estufa/planchas a 105°C .
- Disrupción celular a -80°C (congelamiento)
- Solución buffer de extracción
- Caracterización



OBTENCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES Y PERFIL LIPÍDICO

Lípidos totales (Método Soxhlet)



Duplicado con 5 g de biomasa seca

300 ml Extracción solvente (cloroformo: metanol 1:2)

Recuperación del solvente: destilación

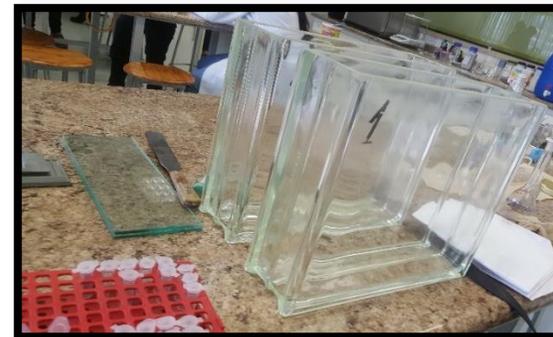
$\% \text{grasa cruda} = \frac{m_2 - m_1}{m} * 100$

m: peso de la muestra

m1: tara del matraz solo

m2: peso matraz con grasa

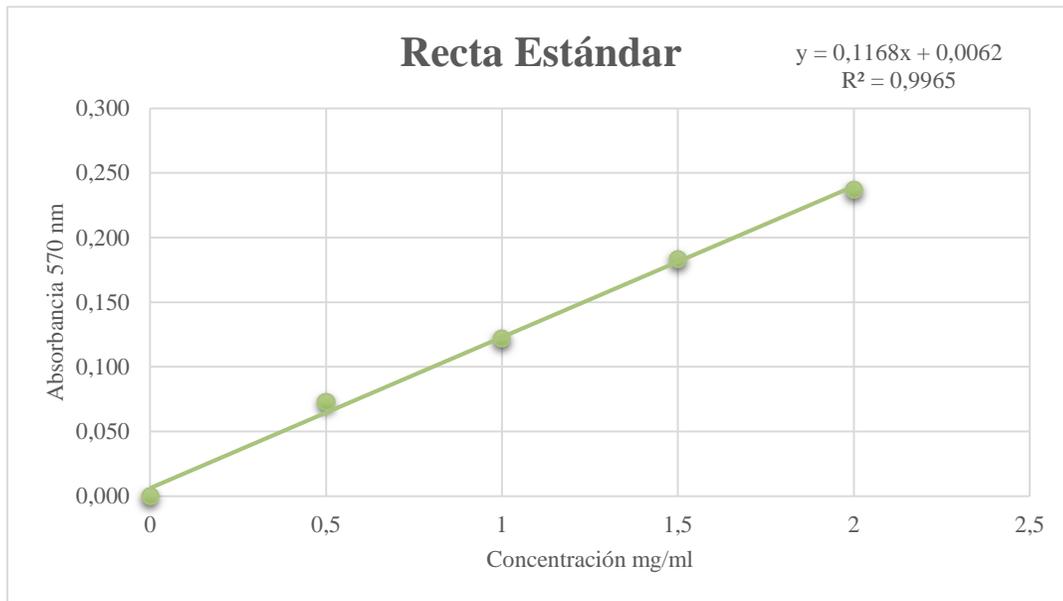
Perfil lipídico (Cromatografía de capa fina)



- Placas preparadas de sílica gel
- 10 mg biomasa seca
- Cloroformo/metanol /agua/ hidróxido de amonio (70:30:3:2)
- Lecitina de soya

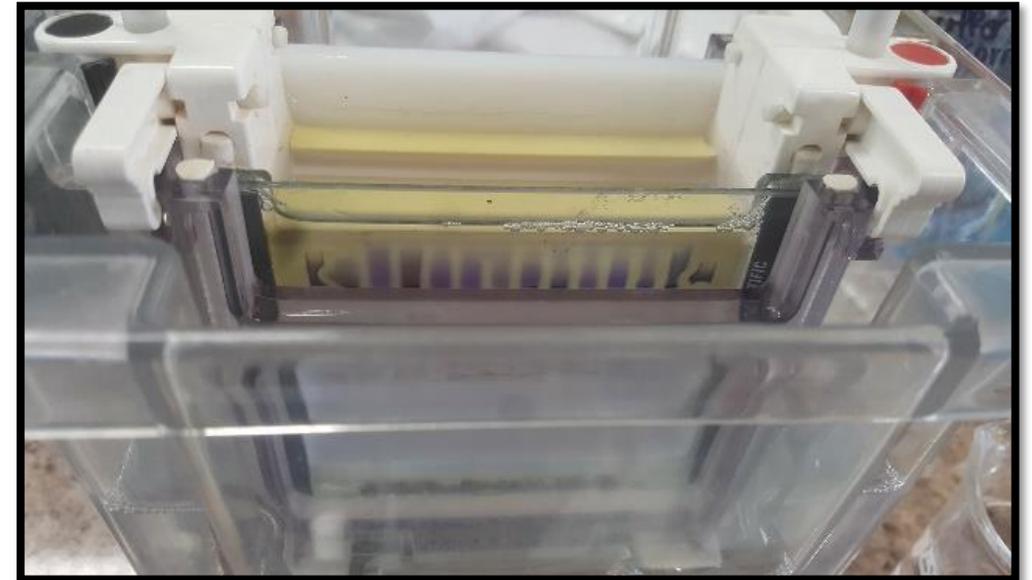
OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS

Método Biuret



- Seroalbúmina bovina (BSA)
- Espectrofotómetro a 570 nm.

Electroforesis



- Gel de poliacrilamida
- 50 mg de biomasa
- Muestras las cuales se mezclaron con 7,5 μ L de *loading buffer* 2x

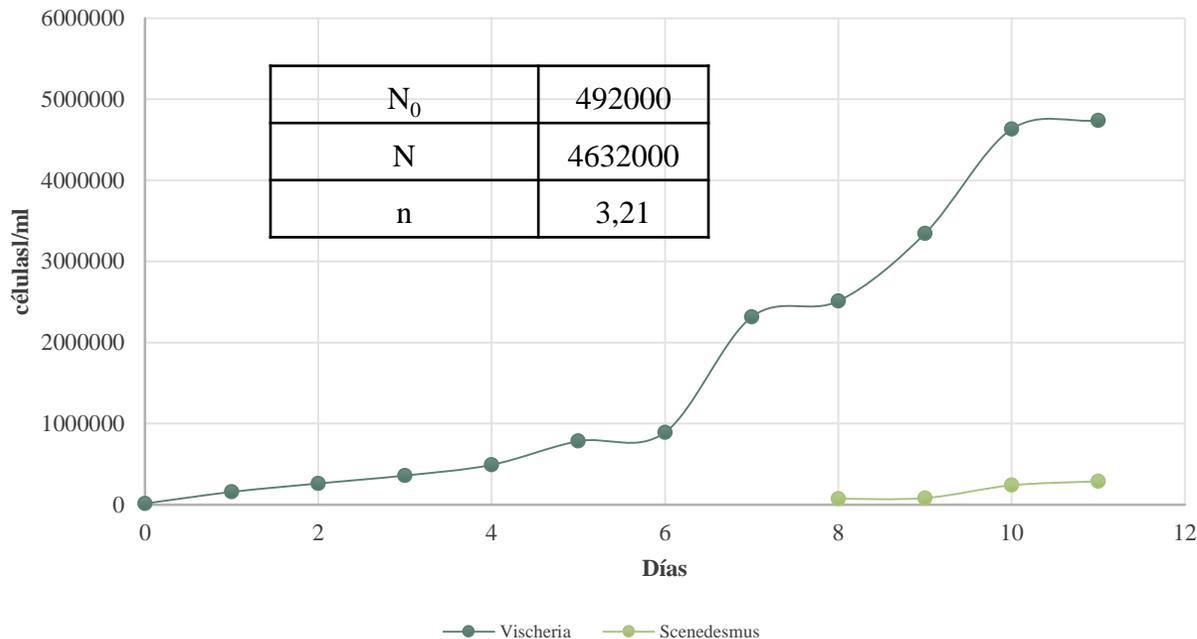
MODELO Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO (*VISCHERIA/SCENEDESMUS SP*)

(*Vischeria/Scenedesmus sp*)

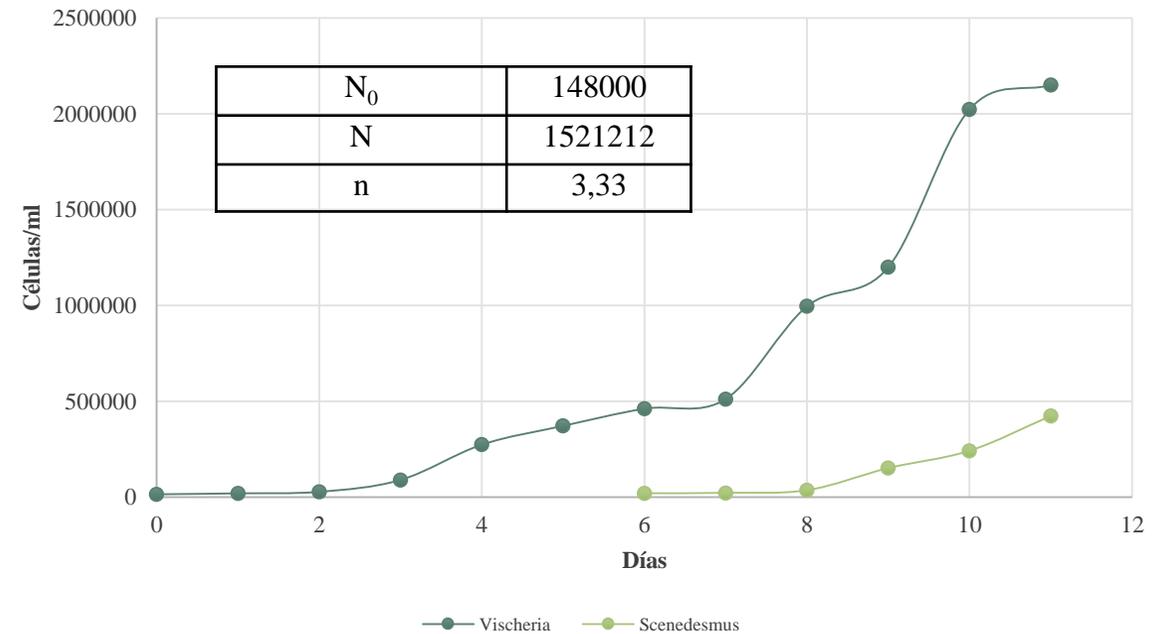
100 mL :15157 cel/mL

Para establecer la cinética de crecimiento de cada uno de los fotobiorreactores se utilizó el modelo de crecimiento exponencial $N = N_0 * (2)^n$

Cultivo 2



Cultivo 6

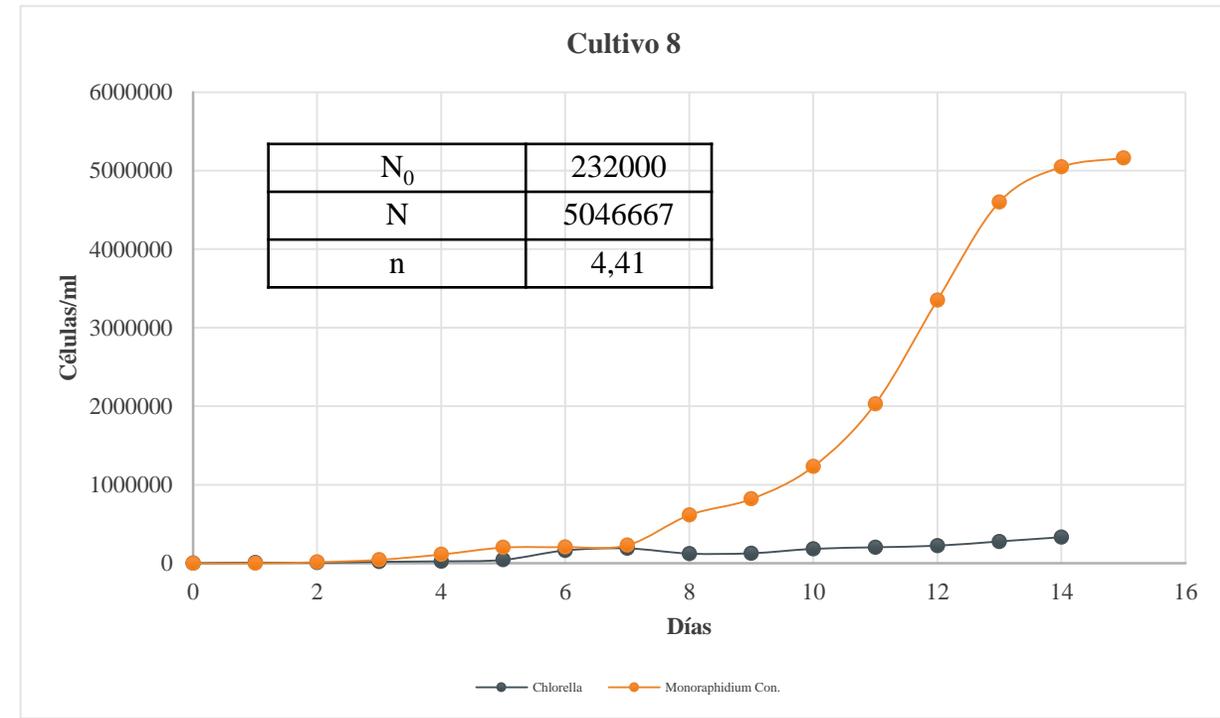
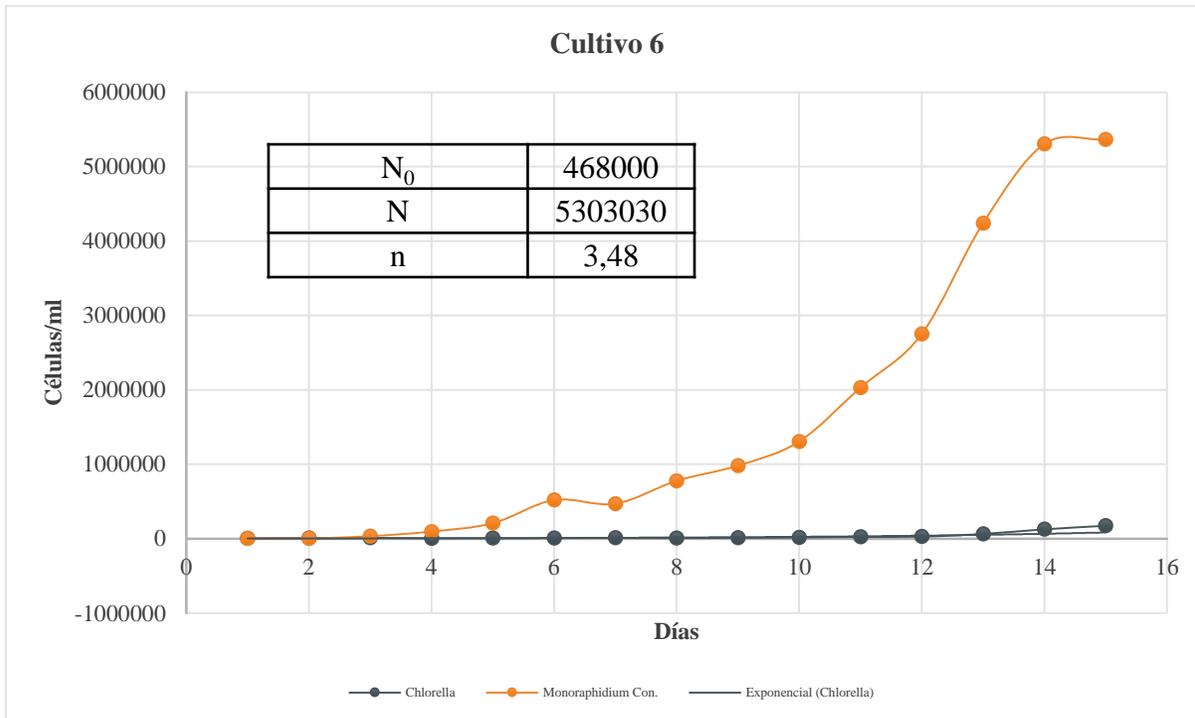


MODELO Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO (*CHLORELLA/MONORAPHIDIUM CONTORTUM SP*)

(*Chlorella/Monoraphidium Contortum sp*)

50 mL :2342 cel/mL

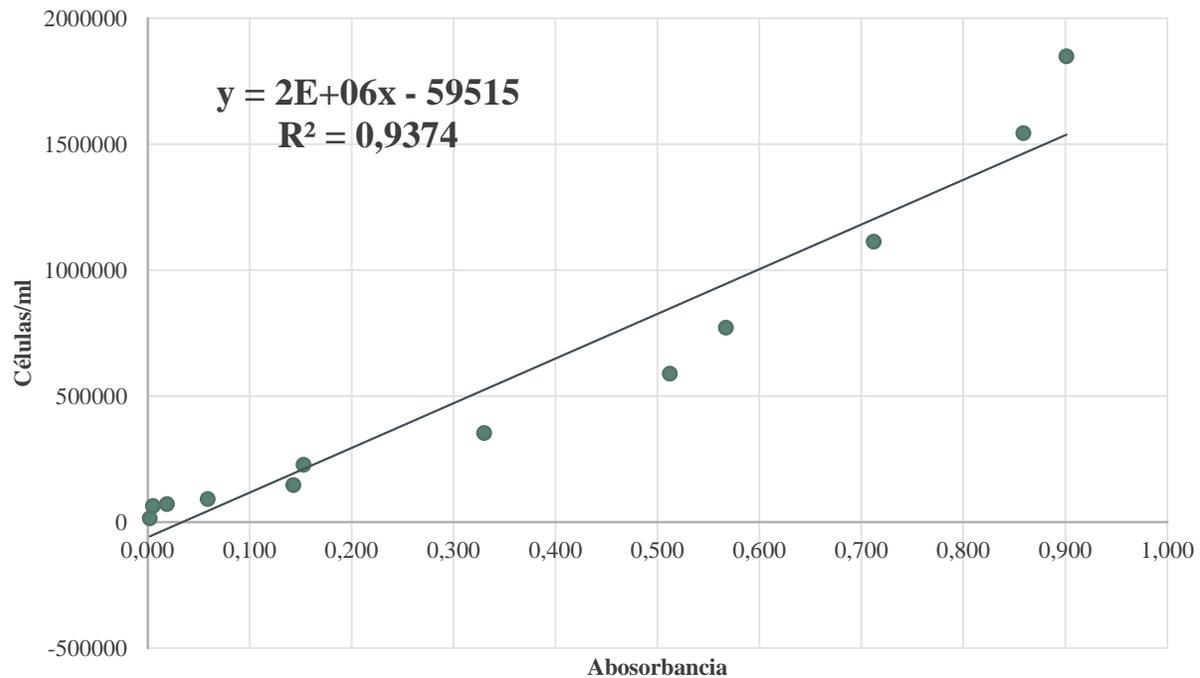
Para establecer la cinética de crecimiento de cada uno de los fotobiorreactores se utilizó el modelo de crecimiento exponencial $N = N_0 * (2)^n$



CORRELACIÓN DENSIDAD ÓPTICA

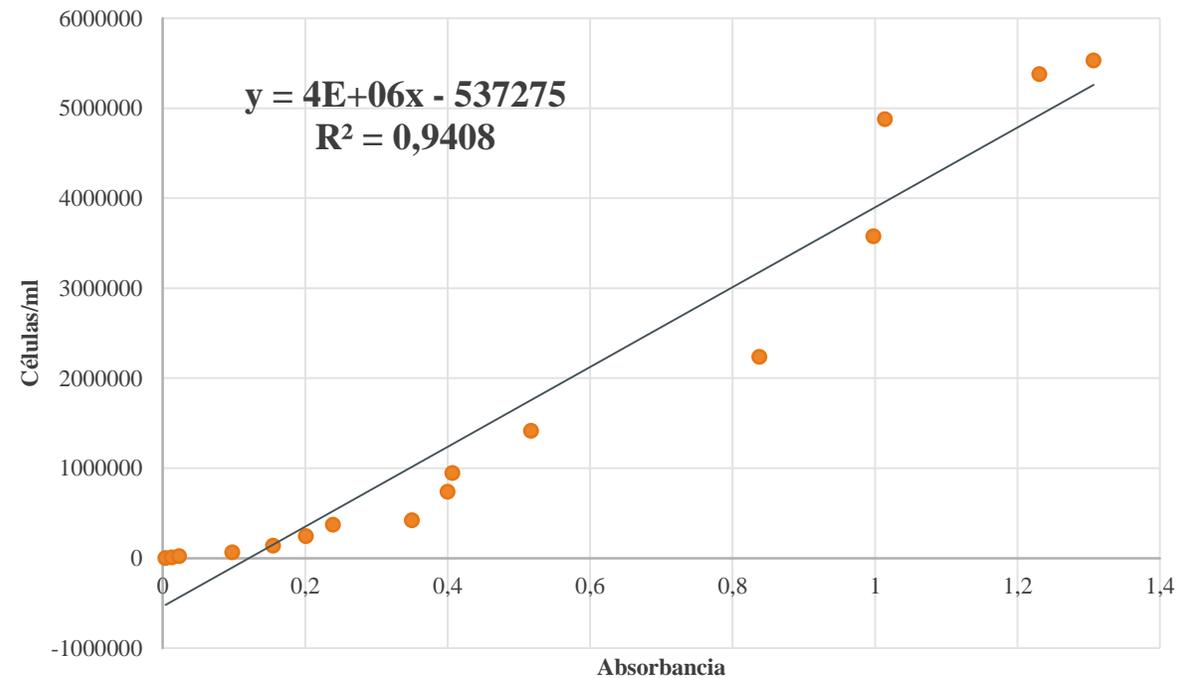
(Vischeria/Scenedesmus sp)

Cultivo 3



(Chlorella/Monoraphidium Contortum sp)

Cultivo 8



PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA SECA

(Vischeria/Scenedesmus sp)

(Chlorella/Monoraphidium Contortum sp)

Productividad g biomasa seca/L			
	g	L	g/L
Cultivo 2	3,0211	2,220	1,36
Productividad batch	26,48 gramos		

Productividad g biomasa seca/L			
	g	L	g/L
Cultivo 6	3,2848	2,045	1,60
Productividad batch	31,53 gramos		

LÍPIDOS TOTALES

(Vischeria/Scenedesmus sp)

Ensayo 1

m: peso de la muestra g	5,00
Lípidos totales	16 %

Ensayo 2

m: peso de la muestra g	5,00
Lípidos totales	15 %

(Chlorella/Monoraphidium Contortum sp)

Ensayo 1

m: peso de la muestra g	5,00
Lípidos totales	42 %

Ensayo 2

m: peso de la muestra g	5,00
Lípidos totales	41 %

PRODUCCIÓN DIARIA DE LÍPIDOS

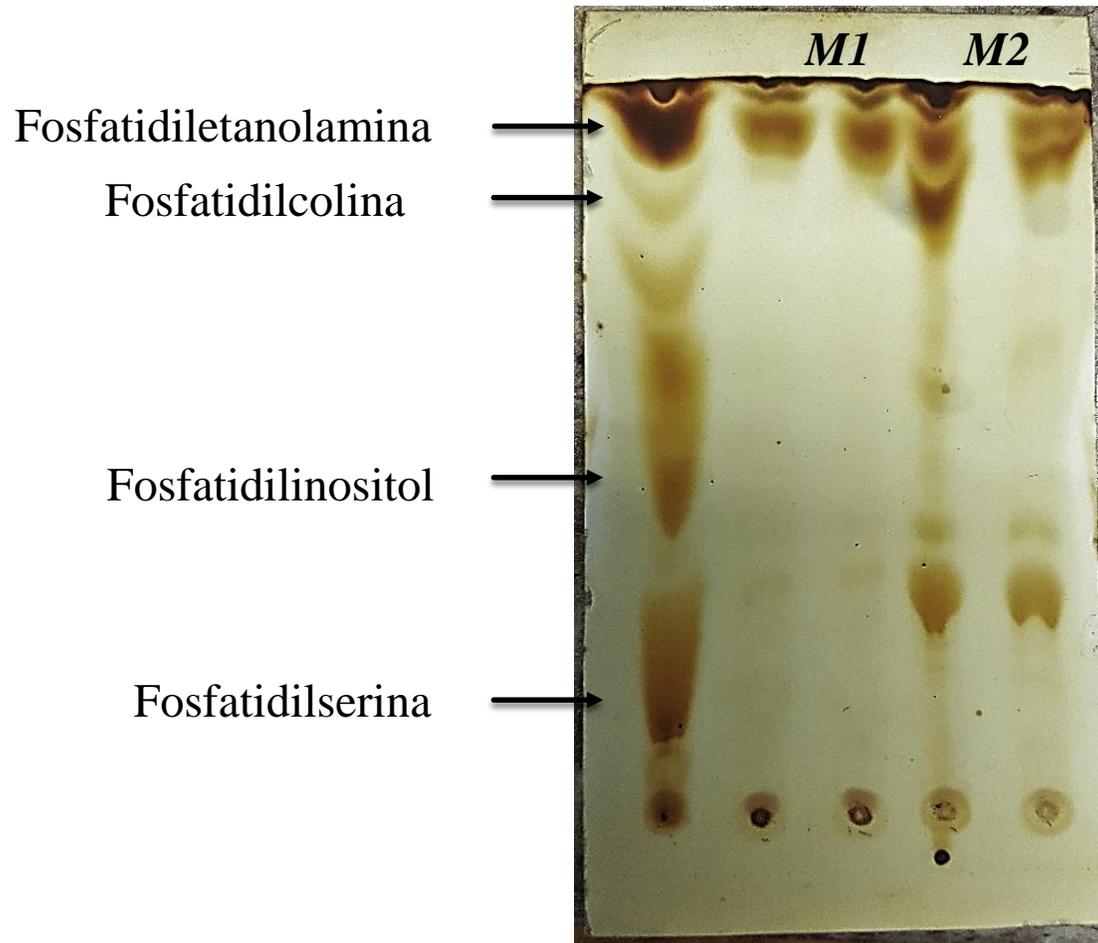
(Vischeria/Scenedesmus sp)

N°	g*L ⁻¹ Productividad	g L ⁻¹ *día ⁻¹	lípidos g L ⁻¹ *día ⁻¹
Cultivo 2	1,36	0,11	0,018

(Chlorella/Monoraphidium Contortum sp)

N°	g*L ⁻¹ Productividad	g L ⁻¹ *día ⁻¹	lípidos g L ⁻¹ *día ⁻¹
Cultivo 6	1,60	0,13	0,021

PERFIL LIPÍDICO

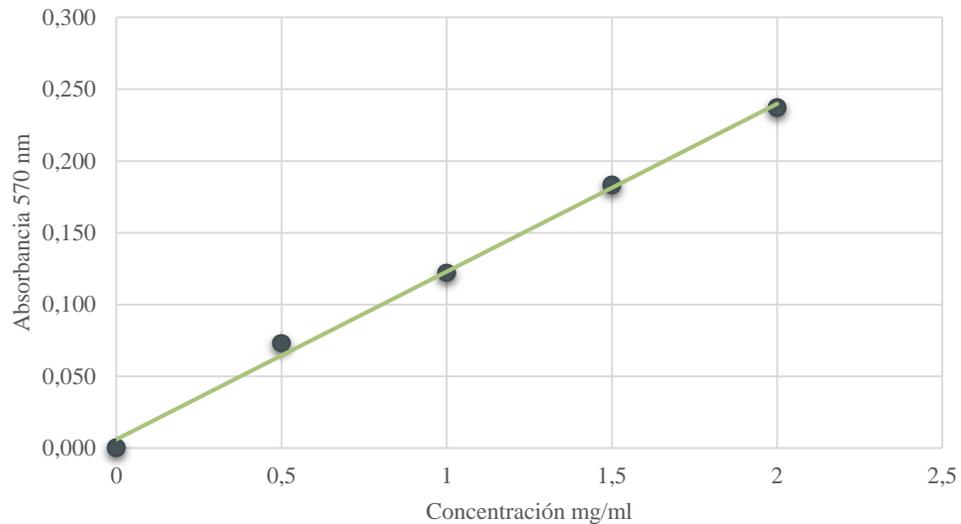


Rf= Distancia de la muestra desde el origen/Distancia del eluyente desde el origen

	Rf	M1 (<i>Vischeria/Scenedesmus</i> sp)	M2 (<i>Chlorella/Monoraphidium Contortum</i> sp)
Fosfatidilserina	0,13	-	-
Fosfatidilinositol	0,20	0,25	0,23
Fosfatidilcolina	0,68	-	0,73
Fosfatidiletanolamina	0,80	0,83	0,82

PROTEÍNAS MÉTODO BIURET

Recta Estándar



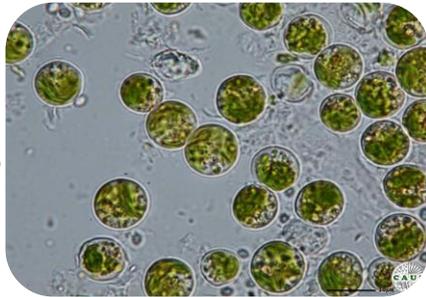
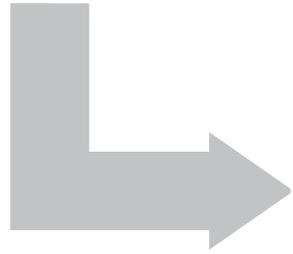
$$y = 0,1168x + 0,0062$$
$$R^2 = 0,9965$$

Consortio	Muestra	Cantidad mg	Abs 570nm	% Proteína
Vischeria/Scenedesmus sp	M1	50	0,135	2,20
Chlorella/Monoraphidium Contortum sp	M2	50	0,182	1,50

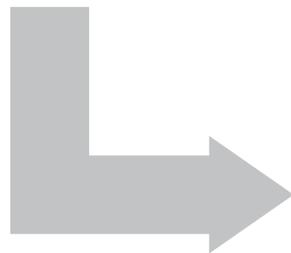
PROTEÍNAS ELECTROFORESIS



- Pretratamiento de la biomasa



- La resistencia de la pared celular al rompimiento no permite liberación de los componentes de las microalga



- Gel de eletroforesis
- Interpretar e indentificar las bandas

- Medios químicos: Tratamiento con solventes orgánicos, con alcálisis, con ácidos
- Medios físicos: ondas de ultrasonido, homogenización en alta presión, o microondas
- Medios enzimáticos: lisis enzimática

CONCLUSIONES

- Las condiciones de cultivo en medio BBM, pH 6,6, rango de temperatura de 26 ± 2 °C, luz artificial continua (lámparas LED's) y aireación constante favorecen el crecimiento exponencial de la cepa *Visheria sp* en el primer consorcio de microalgas y de la cepa *Monoraphidium Contortum sp* para el segundo consorcio de microalgas.
- Si no se tiene un monocultivo o cultivo axénico de microalgas es posible que la aplicación del método indirecto para la determinación del crecimiento celular mediante densidad óptica no sea viable, dando como resultado correlaciones bajas.

CONCLUSIONES

- En relación a la productividad de biomasa microalgal la implementación de condiciones de cultivo a escala de laboratorio produce buenos rendimientos en el crecimiento celular de ambos consorcios de microalgas.
- Para el periodo de cultivo el inóculo inicial es un factor esencial para el comienzo o arranque de la fase exponencial de crecimiento de las microalgas en los fotobiorreactores, siendo este de 12 a 15 días hasta alcanzar la fase estacionaria.

CONCLUSIONES

- En la extracción de lípidos totales mediante el método Soxhlet el segundo consorcio compuesto por *Chlorella/Monoraphidium Contortum sp* tiene mejores rendimientos en la producción de biocombustibles debido a su alto contenido de lípidos totales.
- Mediante la cromatografía en capa fina T.L.C es posible la identificación de lípidos anfipáticos como son los fosfolípidos contenidos en la biomasa de consorcios de microalgas, usando lecitina de soya como indicador y una fase móvil de cloroformo/metanol/agua/hidróxido de amonio.

CONCLUSIONES

- El método físico de congelamiento como pretratamiento de la biomasa de microalgas no logra el rompimiento de la pared celular, por lo tanto los datos obtenidos en la cuantificación mediante el método de Biuret y electroforesis demuestran un contenido bajo en proteínas en ambos consorcios.

RECOMENDACIONES

- Para determinar la mejor cepa de microalgas en la producción de biocombustibles es necesario obtener un monocultivo o cultivo axénico de dichos microorganismos mediante los procesos de aislamiento como son el aislamiento con pipeta, diluciones seriadas o aislamiento mediante placas de agar
- Para posteriores estudios se debe implementar otros métodos de ruptura celular tal como la aplicación de enzimas o ácidos que garanticen el rompimiento de esta barrera para lograr con eficiencia la caracterización de biomasa de microalgas.
- Si bien es cierto mediante la T.L.C se puede determinar el contenido de fosfolípidos en la biomasa de microalgas, análisis como la cromatografía de gases determinará el perfil de ácidos grasos, los cuales intervienen directamente en la reacción de transesterificación en la producción de biodiesel

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, M. (2013). Evaluación del potencial energético de la microalga *Chlorella protothecoides* en el Ecuador para la obtención de biocombustibles. *Diseño de Calderas Con Regeneración*, 54–107.
- Antequera, Y., & Martínez, E. (2006). INFORME DE SUPLENIMIENTOS FOSFOLÍPIDOS.
- Arredondo-vega, B. O. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento, (July 2014).
- AST ingeniería S. L. (2013). Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 69. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, 1–6.
- Bravo, A. (2017). CARACTERIZACIÓN DE MICROALGAS DE LA LAGUNA DE LIMONCOCHA Y OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO IN VITRO PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASA.
- Colorado, M., Moreno, D., & Pérez, J. (2013). Desarrollo, producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. *Ambiente Y Desarrollo*, 17(32), 113–126.
- Cotidiano, E. (2009). Los Biocombustibles.
- Daniela, L. T., Carlos, H. M. A., Tejada-benítez, L., Henao-argumedo, D., Alvear-alayón, M., & Castillo-saldarriaga, C. R. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Characterization and lipid profile of oil from microalgae* *Caracterização e perfil lipídico de azeites de microalgas*, 24(39), 43–54.
- Fraunhofer. (2005). BBM-Medium (Bold's Basal Medium + soil extract + vitamins). *Culture Collection of Cryophilic Algae*, (1963), 6318.
- García, J. (2011). COMPARACIÓN DE METODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS A ESCALA LABORATORIO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL.
- Gonz, A. D., Kafarov, V., & Guzm, A. (2009). Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas in the production line of biodiesel from microalgae, 7(2), 53–60.
- Grunewald, C. fuentes. (2011). Uso De Microalgas Marinas Para La Producción De Biodiesel En Chile, 107–113. Retrieved from <http://digital.csic.es/handle/10261/52848>

BIBLIOGRAFÍA

- Hern, A. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios, *49*, 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Keppy, N. K., & Allen, M. W. (2000). The Biuret Method for the Determination of Total Protein Using an Evolution Array 8-Position Cell Changer, 8–9.
- Luis, J., Romero, S., Arturo, R., Peñaranda, N., Autonoma, U., Caribe, D. E. L., ... Peñaranda, N. (2014). Caracterización de las microalgas para la producción de biodiesel a través de medios químicos.
- Maciel, C. Á. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico:mercados actuales y comercio internacional, 63–89.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2013). *Biología de los microorganismos*.
- Oliveira-leite, M., & Reis-, J. S. (2013). Desempeño de dos técnicas de rompimiento celular en la caracterización de ficobiliproteínas en la microalga *scenedesmus sp.*, *79*, 65–79.
- Salas, M. (2015). Perfil lipídico de microalgas antárticas recolectadas en febrero 2013 en el archipiélago Schetland.
- Sánchez, G. (2010). Comprobación de la actividad tintorera en fibras orgánicas y sintéticas.
- Segoviano, A., & Islas, E. A. (2017). ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Phormidium sp* EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO PARA SU APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO. *Aguilera*, (1), 149–153.
- Tamargo-Santos, B. (2011). OBTENCIÓN DE FOSFOLÍPIDOS A PARTIR DE LA LECITINA DE SOYA (*Glicine max L*), PARA USOS BIOMÉDICOS, (June 2017).
- Ulloa, R. (1988). Plan De Manejo Reserva Biologica Limoncocha, 1–101.
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2007). *Técnicas Cromatográficas*.
- Valladares, F., & Niinemets, Ü. (2008). Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173506>
- Ximhai, R. (2006). PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS. *Crisis*, 2, 319–341



■ ¡Gracias!