

Optimización de la concentración de inóculo y pH del medio de cultivo, para aumentar la producción de *Chlorella vulgaris* en suero de ricota

Optimization of the inoculum concentration and pH of the culture medium, for the increase of the production of *Chlorella vulgaris* in ricotta cheese whey

Presentación: 6-7/10/2020

Doctorando:

Nahuel E. Casá

Centro de Tecnologías Químicas, Facultad Regional Buenos Aires, Universidad Tecnológica Nacional - Argentina.
ncasa@est.frba.utn.edu.ar

Director/es:

Marina de Escalada Pla

Co-director/es:

-

Resumen

El objetivo de este trabajo fue la determinación de las condiciones óptimas de concentración de inóculo (CI) y pH, respecto a su efecto sobre el aumento de la concentración celular de la microalga *Chlorella vulgaris*, cultivada en suero de ricota pretratado por microfiltración.

Se realizó un diseño central compuesto con 2 variables independientes en 3 niveles (3^2), siendo éstas la CI y el pH. La respuesta medida fue el recuento celular, el cual fue medido con una Cámara de Neubauer y un microscopio. Adicionalmente, se midió el pH final de todos los sistemas.

Los sistemas se prepararon por incorporación de 5mL de inóculo en 45 mL de suero de ricota microfiltrado en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad. El pH de cada sistema se ajustó post-inoculación por agregado de soluciones esterilizadas de NaOH 1M y HCl 1M. Las muestras inoculadas fueron cultivadas durante 96h a 26 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12/12h de luz/oscuridad. La fuente lumínica utilizada fue luz tipo LED de color azul con una intensidad de $46,46 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Además, se aplicó una agitación orbital continua a una velocidad de 100 rpm.

Los resultados fueron analizados mediante la metodología de superficie de respuesta usando el software estadístico Statgraphics Centurion XV (02/15/06 V, 2007). El pH inicial óptimo fue de 8,28. Los sistemas mostraron una tendencia a la autoregulación de los pH, encontrándose todos al fin del ensayo dentro del rango 7,90-9,11. La CI nominal óptima hallada fue de 0,1. Se deberán realizar nuevos ensayos para confirmar o refutar el valor de la CI, dada su condición de extremo de la superficie de respuesta.

Palabras clave: Microalgas, *Chlorella vulgaris*, suero de ricota, inoculación, pH, microfiltración, diseño central compuesto, superficie de respuesta.

Abstract

The aim of this study was to determine the optimum conditions of both inoculum concentration (IC) and pH, regarding their effect on the increase of cellular concentration of the microalga *Chlorella vulgaris*, cultivated in microfiltered ricotta cheese whey.

A central composite design with 2 independent variables in 3 levels was carried out. The independent variables were IC and the pH. The response was measured through the cell's concentration with an improved Neubauer Chamber and a microscope. Moreover, final pH of each system was measured.

Systems were prepared with the addition of 5 mL of inoculum in 45 mL of microfiltered ricotta cheese whey in Erlenmeyers of 250 mL. The pH of each system was adjusted post inoculation by the addition of sterilized solutions of NaOH 1M and HCl 1M. Systems were grown during 96h at 26 ± 2 °C with a 12/12h light/dark photoperiod. The source of light was a blue LED light with an intensity of $46.46 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Furthermore, orbital shaking was applied at a constant speed of 100 rpm.

Results were analyzed by means of a response surface methodology using the statistics software Statgraphics Centurion XV (02/15/06 V, 2007). The optimum initial pH value was 8.28. Systems showed a trend to the self-regulation of pH, as at the end of the essay all of them were found inside the range 7.90-9.11. The optimum nominal IC was determined at a DO_{680} value of 0.1. Further essays should be carried out to confirm the IC value, as the optimum determined by this study was found to be at the edge of the response surface.

Keywords: Microalgae, *Chlorella vulgaris*, ricotta cheese whey, inoculation, pH, microfiltration, central composite design, response surface.

Introducción

Las microalgas son estudiadas debido a su potencial rol en el desarrollo de procesos más sustentables, así como también a su posible uso como fuente de compuestos biológicos de alto valor agregado. *Chlorella vulgaris* en particular, es una microalga que actualmente es aceptada en varios países para su uso en la alimentación humana. En lo que respecta a su producción, los nutrientes y el agua, necesarios para su cultivo, son los factores de contribución mayoritarios al costo del proceso productivo (Farooq et al., 2013). Con el objetivo de reducir estos costos a un nivel económicamente viable, efluentes y subproductos fueron propuestos como potenciales medios de cultivo (Ende & Noke, 2018). El suero de ricota es un coproducto de la producción de queso ricota (Lavarda, 1972). A pesar de que éste presenta valor nutricional, su uso para el consumo humano es limitado debido a su alta salinidad. Además, debido a su elevado contenido de agua, su transporte es costoso. Como resultado, el suero de ricota producido por muchas de las PyME es destinado a alimentación animal o tratado como un efluente, debido a su alta demanda biológica (DBO) y química de oxígeno (DQO), que rondan los 50 g.L⁻¹ and 80 g.L⁻¹, respectivamente (Sansonet et al., 2009). *Chlorella* ha demostrado ser capaz de crecer en permeado de suero de quesería pre-hidrolizado (Espinosa-Gonzalez et al., 2014). Asimismo, *Chlorella vulgaris* demostró resultados satisfactorios al ser cultivada en medios de cultivo inorgánicos suplementados con suero de quesería hidrolizado (Abreu et al., 2012). Más recientemente, Velichkova et al. (2016) demostró que otras especies de microalgas pueden además consumir lactosa como fuente de carbono. A pesar de esto, no se han encontrado reportes respecto al estudio de suero de ricota o permeado de suero de ricota como medio de cultivo para la producción de biomasa microalgal. Dentro del marco de la Tesis Doctoral "Revalorización de subproductos de la industria láctea para la obtención de biomasa microalgal", en la cual se estudia la optimización de las condiciones de producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* empleando suero de ricota como medio de cultivo, este trabajo estudia las condiciones óptimas de concentración de inóculo (CI) y pH respecto a su efecto sobre el aumento de la concentración celular de la microalga *Chlorella vulgaris*, cultivada en suero de ricota pretratado por microfiltración.

Desarrollo

La microalga *Chlorella vulgaris* - UNPSJB fue obtenida de la colección del Laboratorio de Microalgas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (Trelew, Chubut, Argentina) y mantenida en condición autótrofa en medio de cultivo BG11 (Stanier et al., 1971) en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de la Facultad Regional de Buenos Aires de la Universidad Tecnológica Nacional (Ciudad de Buenos Aires, Argentina).

El suero de ricota (SR) fue provisto por una PyME productora de Queso y Queso Ricota, localizada en Marcos Paz, Buenos Aires, Argentina, y fue almacenado a -18 °C hasta el momento de su utilización. El SR, antes de ser utilizado como medio de cultivo, fue microfiltrado mediante filtración de flujo tangencial. El objetivo del pretratamiento fue clarificar el medio para mejorar la penetración de la luz en el cultivo, así como también reducir la carga microbiológica del suero. Para esto se utilizó una membrana autoclavable de fibra hueca de 0.1 μm de tamaño de poro (1 mm id de

fibra) y con un área de filtración de 420 cm² compuesta de polisulfona (GE Healthcare Life Sciences, Modelo CFP-1-E-4A). La filtración se realizó a 50°C para que los lípidos se mantengan en estado líquido y así evitar que se tape la membrana.

Para el diseño del experimento se aplicó un diseño factorial del tipo central compuesto (DCC) con tres niveles de cada variable independiente (3²) y un punto central que se realizó por triplicado, dando un total de 11 muestras (n=11). Las variables independientes fueron la CI y el pH. La Tabla 1 resume la preparación de los sistemas, considerando la densidad óptica a una longitud de onda de 680 nm (DO₆₈₀) como la concentración nominal del inóculo. La respuesta medida fue el recuento celular y la respuesta a comparar entre las muestras fue el ln(Rec/Rec₀), siendo: "Rec₀" recuento celular inicial y "Rec" el recuento celular a las 96h de cultivo. El recuento celular fue medido en cámara de Neubauer según lo recomendado por Borowitzka & Moheimani (2013) con una Cámara de Neubauer Mejorada y un microscopio (Kyowa, modelo Microlux-62, Japón). Además, se midió el pH final de todos los sistemas.

Los sistemas se prepararon por incorporación de 5mL de inóculo en 45 mL de suero de ricota microfiltrado en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad. El pH de cada sistema se ajustó post-inoculación por agregado de soluciones esterilizadas de NaOH 1M y HCl 1M. Las muestras inoculadas fueron cultivadas durante 96h a 26 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12/12h de luz/oscuridad, iniciando el ciclo con 12h de luz. La fuente lumínica utilizada fue luz tipo LED de color azul con una intensidad de 46,46 μmol.m⁻²s⁻¹ (aproximadamente 3000 lux), medida como el flujo de fotones a través del rango de la clorofila (radiación fotosintéticamente activa o PAR) con un sensor radiométrico cuántico Delta Ohm LP 471 PAR, conectado a un radiómetro Delta Ohm HD2302.0. Además, se aplicó una agitación orbital continua a una velocidad de 100 rpm (Cole Parmer, modelo OS-200, USA) de acuerdo a lo realizado por Wang et al. (2010).

A pesar de que cepa microalgal empleada no fue axénica y que el SRMF no fue esterilizado, tanto la preparación del medio, como la inoculación y el muestreo fueron realizados bajo condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar (Microfilter, modelo FHP 1e) con el fin de mantener la variabilidad sistemática originada por el cultivo no axénico y la microflora natural del SRMF pero prevenir la introducción de otras condiciones que pudiesen generar condiciones aleatorias de variabilidad. Los materiales de laboratorio fueron esterilizados en autoclave (Chamberland VZ, Modelo 100).

Los resultados fueron analizados mediante la metodología de superficie de respuesta usando el software estadístico Statgraphics Centurion XV (02/15/06 V, 2007). La superficie de respuesta obtenida se muestra en la Figura 1.

Sistema	Conc. Nominal del inóculo (DO ₆₈₀)	pH inicial nominal
A	0,3	9
B	0,3	9
C	0,3	9
D	0,2	8
E	0,4	8
F	0,2	10
G	0,4	10
H	0,1	9
I	0,3	11
J	0,3	7
K	0,5	9

Tabla 1. Preparación de los sistemas ensayados.

Resultados y conclusiones

La respuesta medida fue el Recuento Celular en cámara de Neubauer a las 96h de cultivo y la respuesta a comparar entre las muestras fue el ln(Rec/Rec₀).

El pH inicial óptimo fue de 8,28 y el comportamiento de la respuesta para esta variable fue similar para todas las CI. Los sistemas mostraron una tendencia a la autoregulación de los pH, encontrándose todos al fin del ensayo dentro del rango 7,90-9,11. La Tabla 2 muestra los pH finales de todos los sistemas.

La CI nominal óptima hallada fue de 0,1. Dado que este resultado corresponde a un valor que se posiciona como un extremo de la superficie de respuesta, esto nos indica que la CI óptima podría estar fuera del rango estudiado. Como resultado, no podemos asumir que la CI óptima hallada es realmente la CI óptima y se deberán realizar nuevos ensayos para confirmar o refutar este valor. En este contexto, se rescata como resultado positivo el haber podido observarse una tendencia al incremento de la concentración celular a medida que se usa un inóculo sucesivamente menos concentrado.

Las 3 réplicas del punto central presentaron una repetibilidad calculada como el coeficiente de variación porcentual del 5%.

Sistema	pH inicial medido	pH final medido
A	9,02	8,19
B	9,06	8,18
C	9,00	8,07
D	8,01	7,9
E	7,99	8,05
F	9,98	8,45
G	10,04	8,49
H	9,01	8,24
I	11,00	9,11
J	7,00	7,97
K	9,01	8,39

Tabla 2. Valores de pH inicial medido y pH final de cada sistema

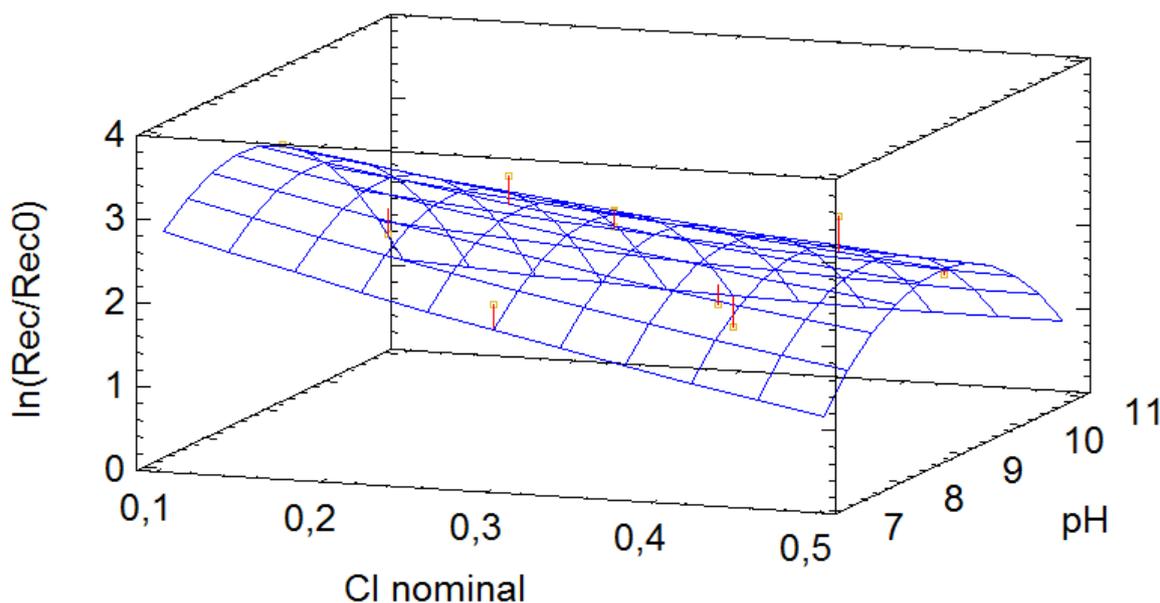


Figura 1: Superficie de respuesta de $\ln(\text{Rec}/\text{Rec}_0)$ en función de la CI nominal y al pH inicial

Referencias

- Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J., & Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*, 118, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.055>
- Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2013). Algae for Biofuels and Energy. In *Algae for Biofuels and Energy*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ende, S. S. W., & Noke, A. (2018). Heterotrophic microalgae production on food waste and by-products. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1565–1571. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1697-6>
- Espinosa-Gonzalez, I., Parashar, A., & Bressler, D. C. (2014). Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production. *Bioresource Technology*, 155, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.028>
- Farooq, W., Lee, Y. C., Ryu, B. G., Kim, B. H., Kim, H. S., Choi, Y. E., & Yang, J. W. (2013). Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. *Bioresource Technology*, 132, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.034>
- Lavarda, J. (1972). Preparation of ricotta cheese curd. United States Patent 3,704,136 A.
- Sansonetti, S., Curcio, S., Calabrò, V., & Iorio, G. (2009). Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass and Bioenergy*, 33(12), 1687–1692. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.09.002>
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., & Mandel, M. (1971). Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales). 35(2), 171–205.
- Velichkova, K. N., Sirakov, I. N., Beev, G. G., Denev, S. A., & Pavlov, D. H. (2016). Treatment of wastewater originating from aquaculture and biomass production in laboratory algae bioreactor using different carbon sources. *Sains Malaysiana*, 45(4), 601–608.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., & Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>