



*“Una red de centros tecnológicos para  
desarrollar una biorefinería a base de  
algas”*

EFA037/15

*Evaluación de hidrolizados obtenidos mediante  
fraccionamiento termo- mecánico de residuos  
agroalimentarios como componentes del medio de cultivo*

08/02/2018



Título de Informe	Evaluación de hidrolizados obtenidos mediante fraccionamiento termo- mecánico de residuos agroalimentarios como componentes del medio de cultivo
Version	1
Responsable del Entregable	Neiker-Tecnalia
Actividad	2
Autor	Iratxe Urreta
Colaborador/es	All partners
Referencia	EFA037/15
Programa	Programa INTERREG V-A España-Francia-Andorra POCTEFA 2014-2020
Fecha de comienzo del Proyecto	01/06/2016
Duración	36 meses
Jefe de Filas	NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario

El proyecto ha sido cofinanciado al 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Interreg V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2014-2020). El objetivo del POCTEFA es reforzar la integración económica y social de la zona fronteriza España-Francia-Andorra. Su ayuda se concentra en el desarrollo de actividades económicas, sociales y medioambientales transfronterizas a través de estrategias conjuntas a favor del desarrollo territorial sostenible.

## INDICE

RESUMEN .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1 1. OBJETIVO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2. 1. METODOLOGIA.....	4
3. 1. RESULTADOS.....	4
4. 1 CONCLUSIONES.....	7

# EVALUACIÓN DE HIDROLIZADOS OBTENIDOS MEDIANTE FRACCIONAMIENTO TERMO- MECÁNICO DE RESIDUOS AGROALIMENTARIOS COMO COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

## 1. OBJETIVO

Evaluar la posibilidad de emplear hidrolizados obtenidos a partir de residuos de la industria agroalimentaria como componentes nutricionales para el cultivo de *Chlorella protothecoides* (CP). La finalidad es valorizar estas corrientes residuales integrándolas en la fase de cultivo del proceso global de obtención de biodiesel y otros co-productos a partir de esta especie.

Los hidrolizados empleados (7 en total) han sido proporcionados por Catar y provienen del fraccionamiento (mediante tornillo extrusor) de residuos de ciruela, maíz, linaza (semilla lino) y sorgo.

## 2. METODOLOGÍA

Los residuos de ciruela, maíz y sorgo se caracterizaron en para determinar su contenido en azúcares solubles y aminoácidos libres mediante los métodos colorimétrico de antrona y ninhydrina, respectivamente. El hidrolizado de linaza (linaza) se analizó para determinar su contenido en CHN mediante LECO.

Para evaluar los hidrolizados se empleó como referencia el medio descrito en la Tabla 1. En base a su contenido total de glucosa y nitrógeno, se prepararon un total de siete medios de cultivo, cada 1 suplementado con un único hidrolizado, que aportaban la misma cantidad de equivalentes a gluosa y de nitrógeno amino total (los hidrolizados empleados junto a su composición se pueden ver en la Tabla 2). Los medios se suplementaron además con extracto de levadura cuando el la relación Glucosa: nitrógeno en el hidrolizado no era adecuada para aportar la cantidad final del nitrógeno. Como control se empleó un "medio base" suplementado con D-glucosa y extracto de levadura comerciales (Tabla 1)

El pH de los medios se ajustó a 6 y seguidamente se esterilizaron autoclavándolos a 120°C, durante 20 min.

**Tabla 1.** Medio base de cultivo de CP

Medio base	
Glucosa	10g/L
Extracto levadura	2 g/L
Sales Reef (minerales)	5 g/L
pH	6.7

El Extracto de levadura tiene un 10% de N total en su composición

El inóculo de CP se preparó a partir de una colonia inóculada en 20 mL de *medio base* cultivada durante 3 días a 140 rpm, 24°C y en oscuridad. El cultivo se refrescó una vez más antes de ser utilizada para inocular la batería de medios a testar.

Los cultivos experimentales se prepararon en un volumen final de 30 mL y se cultivaron durante 96h con agitación orbital (140 rpm), a 24°C y en oscuridad. Transcurrido el periodo de crecimiento, la biomasa se cosechó mediante centrifugación (3500 rpm, 10 min, 15°C) y se liofilizó para determinar el peso total final por gravimetría. El sobrenadante se conservó a -20°C hasta su caracterización posterior.

El aspecto microscópico del cultivo se analizó mediante microscopía óptica.

### 3. RESULTADOS

La tabla 2 muestra los resultados de la caracterización del contenido total de equivalentes glucosa y de aminoácidos solubles en los 7 hidrolizados evaluados, así como el pH de los medios suplementados con cada uno de ellos.

Los residuos de ciruela son ricos en hidratos de carbono solubles y también presentan los mayores contenidos de nitrógeno amino, especialmente en el caso del hidrolizado Ciruela 2. Por este motivo, este residuo se utilizó en un medio de cultivo alternativo como fuente única de nutrientes (medio cir 2\*, Figura 1).

Los obtenidos a partir de residuos de Maíz presentan 7 veces menos cantidad de glucosa (comparados con cualquiera de los extractos de Ciruela) y un contenido de aminoácidos desigual. En el caso del Sorgo, el contenido de hidratos de carbono es alto pero no el de aminoácidos solubles. Finalmente, la linaza parecía ser una fuente importante de proteínas (39% según análisis de N total por CHN) por lo que en estos ensayos se ha utilizado como fuente de nitrógeno.

Tabla 2. Caracterización de los residuos

Hidrolizado	glucosa (g/L)	aminoácidos (g/L)	Nitrógeno total (%)	pH medio
Ciruela 1	230	2.7	nd	3.54
Ciruela 2	231	9.7	nd	3.20
Maíz 1	29.6	-	nd	6.84
Maíz 2	29.8	3.9	nd	4.25
Sorgo IS	96.5	0.49	nd	4.69
Sorgo EVG	85.5	0.47	nd	4.77
Linaza	nd	nd	6.2	6.98



Figura 1. Aspecto de los medios tras autoclavar; ciruela 1 y 2, cir 2\*, maíz 1 y 2, control, sorgo EVG, sorgo IS, y linaza, de izq. a dcha.

En relación al experimento de crecimiento, tras 96 horas de cultivo, los cultivos mostraron diferencias tanto en el crecimiento, como en el contenido residual de glucosa y en aspectos físico-químicos como el color, olor y pH (Figura 2, Tabla 3).



Figura 2. A, aspecto de los cultivos tras 96 h de crecimiento a 140 rpm, 24°C y en oscuridad. B, aspecto de los pellet celulares tras su proceso de liofilización. C, control; cir1, ciruela 1; cir2, ciruela 2; cir2\*, ciruela 2 sin extracto de levadura; M1, maíz 1; M2, maíz 2.

La producción de biomasa fue muy desigual entre los diferentes residuos.

Los dos hidrolizados de ciruela y el hidrolizado Maíz 2 resultaron en rendimientos de biomasa similares a los del Control (3.1-3.5 g/L), En el caso de los hidrolizados de maíz 1, sorgo EVG y linaza los rendimientos de biomasa fueron menores. En los cultivos con estos últimos hidrolizados el consumo de glucosa fue de un 30-70% menor que en el control. El hidrolizado Sorgo IS no fue adecuado como fuente de nutrientes tal como demuestra la nula producción de biomasa. Los residuos de sorgo, a pesar de tener cantidades de carbohidratos importantes no son adecuados para el cultivo de CP, ya que la microalga no es capaz de asimilarlos

Entre todos los hidrolizados empleados destaca el Ciruela\_2, que fue adecuado tanto como fuente carbohidratos como de aminoácidos.

En relación a otras características de los cultivos, cabe resaltar las diferencias en el color y del pH de los cultivos crecidos con los residuos de maíz, que presentaron un color verdoso muy diferente al de los cultivos control y otros hidrolizados con crecimiento positivo). A este cambio de color se suma el incremento del pH del medio detectado al final del periodo de cultivo que contrasta con la acidificación característica resultante del crecimiento de esta especie en el medio control y que parece estar relacionado con un cambio en el tipo de metabolismo del alga.

Así mismo, se observaron diferencias en el olor de los cultivos que fue suave y dulce en el caso de los residuos suplementados con hidrolizados Ciruela y Maíz, en contraste con el olor a fermento típico de los cultivos de CP en el medio control. En los cultivos con hidrolizados de sorgo y linaza se apreció un olor muy poco intenso.

**Tabla 3.** Resumen de los parámetros de crecimiento de CP a lo largo de 96 horas de cultivo

Cultivo	Biomasa (g/L)	Consumo glucosa (%)	pH final	Color pellet
Control	3.3±0.046	100	4.60	amarillo
Ciruela 1	3.2±0.027	100	5.08	amarillo
Ciruela 2	3.15±0.025	100	4.40	amarillo
Ciruela 2*	3.13±0.10	100	4.16	amarillo
Maíz 1	2.9±0.018	41.3	7.67	verde
Maíz 2	3.5±0.015	30.9	6.74	Verde
Sorgo IS	0.01±0	0.9	4.93	-
Sorgo EVG	1.78±0.12	47.9	5.33	Amarillo
Linaza	2.91±0.010	69.6	4.40	Blanquecino

A nivel microscópico también se observaron diferencias entre los tratamientos que concuerdan con los resultados presentados anteriormente. En presencia de los cultivos suplementados con hidrolizado de maíz las células muestran un tamaño incremento pero no evidencias de acumulación lipídica. La ausencia de células en el medio preparado con sorgo IS es confirma la ausencia de crecimiento con este hidrolizado y sugiere incluso algún grado de toxicidad asociado al mismo (Figura 4).

La acumulación lipídica fue importante en el cultivo con linaza, donde CP se vio limitada severamente en el aporte de nitrógeno durante todo el periodo ensayado. Toda la glucosa asimilada se habría convertido en lípidos.

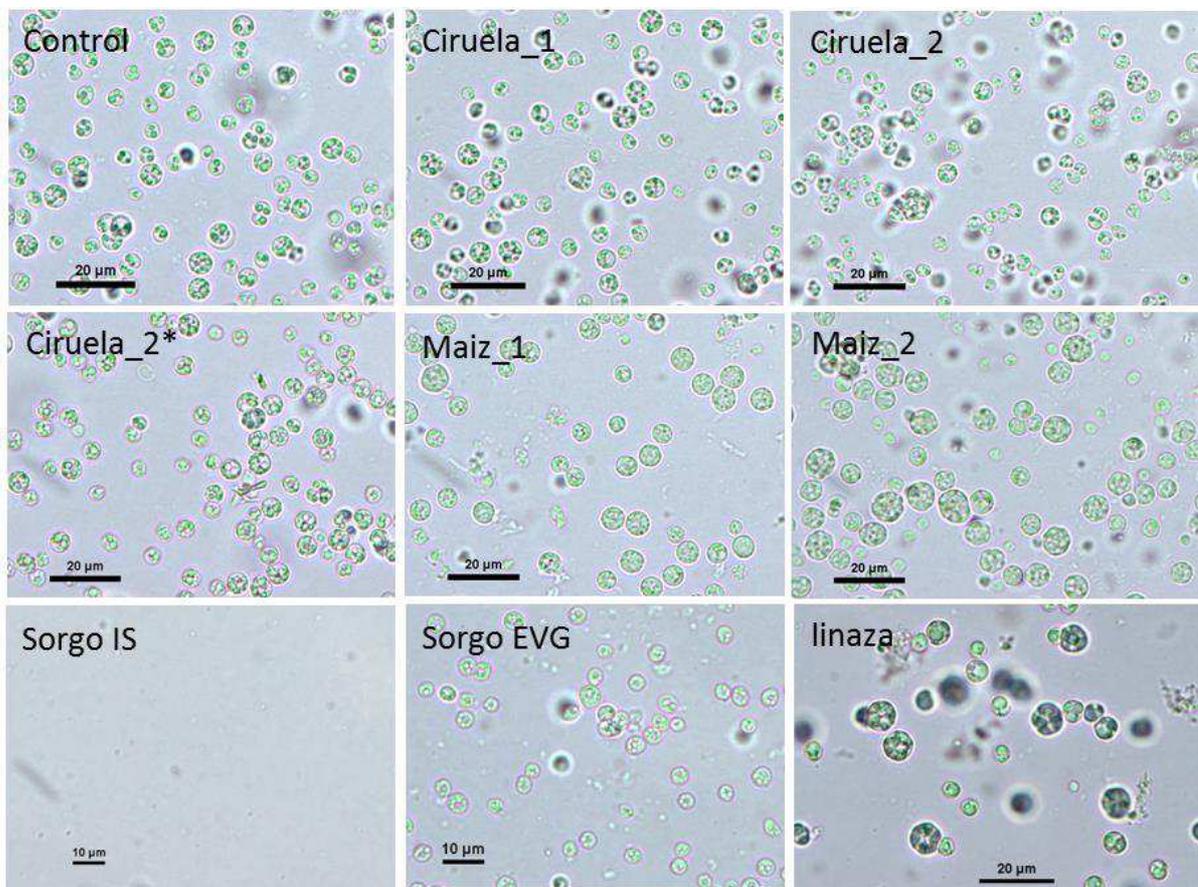


Figura 3. Aspecto microscópico de CP en los medios de cultivo ensayados con diferentes residuos.

## 4. CONCLUSIONES

- ✓ Entre los 7 hidrolizados evaluados, tan sólo los obtenidos a partir de residuos de ciruela resultaron adecuados como suplementos nutritivos en el medio de cultivo empleado para el crecimiento de CP. Estos hidrolizados presentan los contenidos más elevados de azúcar asimilable, además de aportar aminoácidos suficientes para cubrir los requerimientos nutricionales del alga de modo comparable al medio control. El extracto Ciruela 2 fue especialmente idóneo por su óptima relación glucosa:aminoácidos.
- ✓ En los hidrolizados de maíz y sorgo, una parte del azúcar estimado como equivalente glucosa no resultó asimilable por el alga, limitando la disponibilidad de carbono y consecuentemente la síntesis de lípidos de reserva.
- ✓ A pesar de su elevado contenido en nitrógeno total, el residuo de linaza resultó limitante en aminoácidos solubles. Esto sugiere que el nitrógeno de este hidrolizado se encuentra en forma proteica y que debería ser sometido previamente a un proceso de hidrólisis para liberar aminoácidos.