

“Identificación de pigmentos fotosintéticos de *Chlorella* sp., utilizada como captadora del CO₂ de la fermentación vínica”

Albaretí, Santiago ^a; Groff, Carla ^{a,b,c}; Fernández, Cecilia ^{a,b}; Manzanares, Ana ^a; Bizutti, Victoria ^c; Scaglia, Gustavo ^{a,b}.
^a IIQ-FI-UNSJ. Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan, J5400ARL, Argentina.
^b CONICET.
^c IBT-FI-UNSJ. Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan, J5400ARL, Argentina.
 mcarlagroff@gmail.com

Resumen

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, que utilizan energía lumínica y dióxido de carbono (CO₂) para crecer, liberando oxígeno a la atmósfera. Esto puede ser aprovechado a escala industrial para mitigar las emisiones de CO₂, y al mismo tiempo obtener una biomasa microalgal de alto valor. En esta oportunidad, en la Bodega Casimiro Wines (Angaco, San Juan), se acopló un fotobiorreactor batch inoculado con *Chlorella* sp. (FAUBA-17) a un tanque de fermentación de 300L inoculado con *Saccharomyces cerevisiae* comercial y mosto de uvas blancas. Se monitoreó la temperatura y la densidad (°Bé) de la fermentación vínica, y la concentración celular (N°cél/mL) y el pH del fotobiorreactor. Luego de dos semanas de fermentación, se cosechó la biomasa de *Chlorella* sp. y se analizó su perfil de pigmentos. Se procedió a la ruptura celular y extracción de los pigmentos, con una técnica en caliente, empleando etanol durante 1h a 60°C. Una vez hecho esto se procedió con la identificación de pigmentos utilizando la técnica de Cromatografía en Placa Fina (TLC), con una Placa PET con Gel de Sílice (Fluka) y acetato de etilo:hexano (8:2) como fase móvil. Luego de transcurridos 10min, se logró apreciar la presencia de clorofila a, clorofila b y carotenoides. Estos pigmentos naturales pueden ser utilizados en la industria de alimentos en reemplazo de pigmentos sintéticos. Este trabajo confirma la importancia de la implementación de fotobiorreactores en la industria local, propiciando la transferencia del conocimiento científico al sector industrial, fomentando el desarrollo sostenible y la economía circular de los procesos.

Palabras clave: Microalgas; dióxido de carbono; fermentación; pigmentos fotosintéticos.

INTRODUCCIÓN

Los pigmentos son cruciales para el metabolismo fotosintético de las microalgas y también proporcionan actividades antioxidantes para proteger a las células de los daños (Fig. 1) [1]:

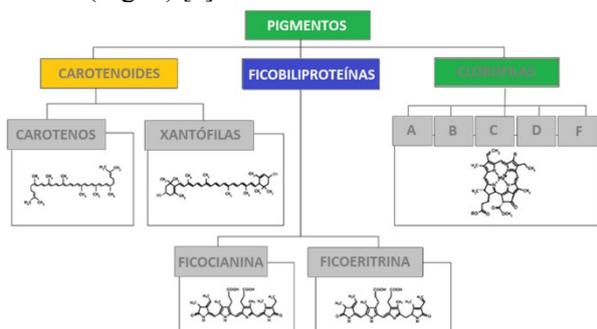


Fig. 1. Pigmentos de microalgas.

Los pigmentos microalgales se explotan en diversas industrias, como colorantes alimentarios y productos para la salud. Comercialmente los pigmentos que tienen mayor interés son: Clorofilas a y b de *Chlorella*

(hasta un 4,5% peso seco); β-caroteno a partir de la microalga *Dunaliella salina* (14 % peso seco); Astaxantina de color rojo-rosado proveniente de *Haematococcus pluvialis* (0.2-5.0% peso seco); luteína de color amarillo que se encuentra en *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Muriellopsis* spp; y ficocianina de *Spirulina* spp. Y ficoeritrina de *Porphyridium* spp [1].

Para la detección e identificación de estos pigmentos suelen utilizarse técnicas cromatográficas. La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica de laboratorio, sencilla y de bajo costo, que permite separar los componentes de la mezcla mediante migración diferencial a través de un lecho plano de una fase estacionaria, con la fase móvil fluyendo por fuerzas capilares. Una vez completada la cromatografía, los solutos se detectan en la superficie de la placa de capa fina [2]. La TLC se puede utilizar para analizar casi cualquier clase de sustancia, incluidos lípidos, nucleótidos, glucósidos, carbohidratos, ácidos grasos, alcaloides, fenoles, pesticidas, esteroides y glucósidos [3].

OBJETIVOS

Extraer e identificar los pigmentos fotosintéticos de la biomasa de *Chlorella* sp. (FAUBA-17) generada en el proceso de biocaptación del CO₂ proveniente de la fermentación vínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

i) Preparación de inóculo de *Chlorella* sp.

Se adquirió la cepa *Chlorella* sp. (FAUBA-17) de la Colección de Cultivos de Microalgas de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (CCM-FAUBA). Se desarrolló el inóculo en la sala de cultivo de microalgas del Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan (IIQ-FI-UNSJ), utilizando Medio Basal de Bold (MBB) [4], a 25°C con una irradiación continua de luz de 240 μmol.m⁻².s⁻¹, durante 15 días. Luego, se hizo observación microscópica y recuento celular en cámara de Neubauer.

ii) Biocaptura de CO₂ en la Bodega Casimiro Wines.

El inóculo preparado se utilizó para realizar la biocaptura del CO₂ proveniente de la fermentación vínica en la Bodega Casimiro Wines (Angaco, San Juan). Se trabajó a temperatura ambiente de 18°C, con un 10%v/v del inóculo en MBB, operando dos fotobiorreactores tubulares verticales (volumen total de 7L cada uno) acoplados al tanque de fermentación vínica de 300L. La fermentación vínica se realizó con mosto de uva blanca inoculado con levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial (midiendo temperatura y densidad en °Bé). El fotobiorreactor se operó en modo *batch* durante 16 días. Se cosechó la biomasa de microalgas y se trasladó al laboratorio del IIQ-FI-UNSJ para su análisis.

iii) Extracción e identificación de pigmentos de biomasa de *Chlorella* sp.

Se procedió a la ruptura celular de la biomasa de microalgas según [5]. Se colocó 15mL de suspensión de microalgas en tubo falcon y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. El precipitado de microalgas se lavó dos veces en agua destilada resuspendiendo mediante agitación en vórtex y centrifugación a 3500 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se transfirió el precipitado a eppendorf de 2 mL con el

agregado de 1 mL de etanol y se agitó en vórtex. Se cubrió el tubo con papel aluminio y se incubó en baño de agua a 60 °C durante 1 h. Se enfrió y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. El sobrenadante quedó enriquecido con los pigmentos fotosintéticos. La identificación de los pigmentos se realizó como se muestra en la Fig. 2 utilizando la técnica de Cromatografía en Placa Fina (TLC), con una Placa PET con Gel de Sílice (Fluka) y acetato de etilo:hexano (8:2) como fase móvil [6]:

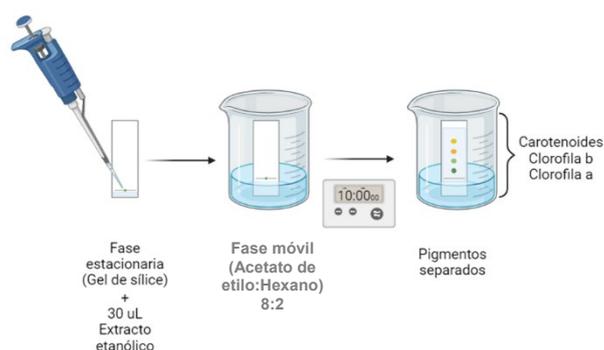


Fig. 2. Pasos para separación de pigmentos de microalgas con TLC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo una concentración celular de *Chlorella* sp. de 2.57 x 10⁷ cél/mL y se realizó observación microscópica para identificar su morfología (Fig. 3):

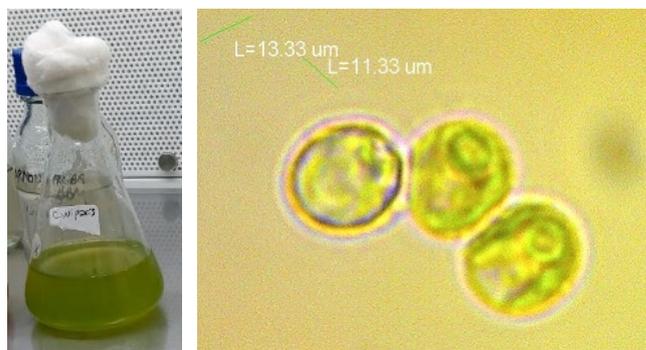


Fig. 3. Inóculo de microalga y observación microscópica en 100X.

Para su uso en el fotobiorreactor se ajustó la concentración del inóculo a 1 x 10⁶ cél/mL. Luego del proceso de biocaptura del CO₂ de la fermentación vínica en Bodega, se cosechó la biomasa de microalgas en una concentración promedio entre ambos reactores

de 1.05 g/L, siendo este rendimiento reportado en bibliografía como un valor aceptable y esperable.

Aplicando la técnica de extracción de pigmentos, se constató la solubilidad de las clorofilas y carotenoides en etanol, un solvente amigable con el medio ambiente, evitando el uso de solventes orgánicos más contaminantes.

La cromatografía en capa fina reveló la presencia de los pigmentos extraídos de la biomasa de microalga biocaptadora del CO₂ proveniente de la fermentación vínica (Fig. 4).

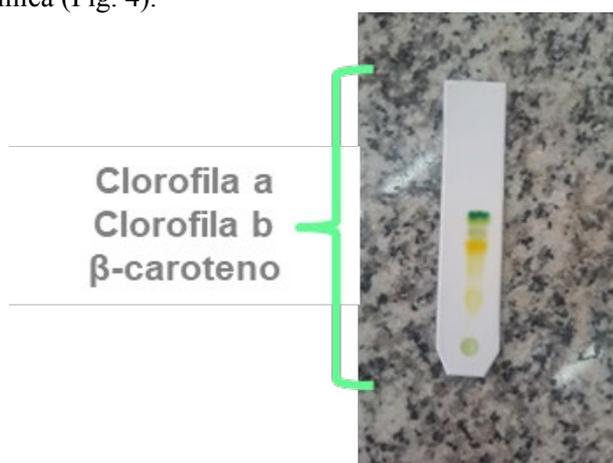


Fig. 14. Placa de TLC con los pigmentos separados.

Clorofila y carotenoides son los pigmentos dominantes presentes en las microalgas verdes. Gracias a la aplicación de la técnica TLC y a la búsqueda de cromatogramas en bibliografía [7], se pudo identificar la presencia de clorofila a, clorofila b y β-caroteno en la cepa *Chlorella* sp. (FAUBA-17) estudiada.

CONCLUSIONES

Las técnicas de laboratorio desarrolladas permitieron identificar los principales pigmentos fotosintéticos de la biomasa de microalgas biocaptadoras de CO₂ en la Bodega. Luego de una producción a escala y de una etapa de purificación, dichos pigmentos podrían utilizarse como colorantes naturales en sustitución de los pigmentos sintéticos actualmente utilizados en alimentos, otorgándole un uso comercial a la biomasa generada. Como trabajo futuro se pretende analizar el contenido de proteínas, lípidos e hidrato de carbono de la biomasa microalga, para definir otras aplicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. Kiani, R. Aznar, M. M. Poojary, B. K. Tiwari, and R. Halim, "Chromatographic Techniques to Separate and Identify Bioactive Compounds in Microalgae," *Front. Energy Res.*, vol. 10, no. June, pp. 1–24, 2022, doi: 10.3389/fenrg.2022.904014.
- [2] E. Hahn-deinstrop, *Applied Thin-Layer Chromatography*, E. Hahn-deinstrop, 2007.
- [3] S. Kumar, K. Jyotirmayee, and M. Sarangi, "Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive," *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 126–132, 2013.
- [4] M. Gómez, "Evaluación de la capacidad de remoción de metal en especies de algas aisladas de ambientes contaminados," 2020.
- [5] S. Sathya, "Separation of algal pigments by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC)," *World J Pharm Res*, vol. 6, no. January, 2017, doi: 10.20959/wjpr201716-10328.
- [6] G. Maneesh, "Extraction & Analysis of Algal Pigments by Thin Layer Chromatography & Spectrophotometric Analysis," *Int. J. Curr. Sci. Res. Rev.*, vol. 05, no. 03, pp. 754–759, 2022, doi: 10.47191/ijcsrr/v5-i3-20.
- [7] A. Rajput, D. P. Singh, J. S. Khattar, G. K. Swatch, and Y. Singh, "Evaluation of growth and carotenoid production by a green microalga *Scenedesmus quadricauda* PUMCC 4.1.40. under optimized culture conditions," *J. Basic Microbiol.*, vol. 62, no. 9, pp. 1156–1166, 2022, doi: 10.1002/jobm.202100285.