

## Capítulo II Biofloculación de la microalga de agua dulce *chlorella sorokiniana* asistida por hongos filamentosos

### Chapter II Bioflocculation of the freshwater microalgae *chlorella sorokiniana* assisted by filamentous fungi

TOSCANO-PALOMAR, Lydia<sup>1</sup> †\*, STOYTICHEVA-STILIANOVA, Margarita<sup>2</sup>, MEDINA-PALOMERA, Amalia<sup>1</sup> y ARREDONDO-ESPINOZA, Michelle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instituto Tecnológico de Mexicali*

<sup>2</sup>*Universidad Autónoma de Baja California*

ID 1<sup>er</sup> Autor: *Lydia, Toscano-Palomar* / **ORC ID:** 0000-0002-2472-4826, **Researcher ID Thomson:** O-1442-2018, **CVU CONACYT ID:** 306380

ID 1<sup>er</sup> Coautor: *Margarita, Stoytcheva-Stilianova* / **ORC ID:** 0000-0002-8281-9823, **Researcher ID Thomson:** A-6530-2018 y **CVU CONACYT ID:** 215808

ID 2<sup>do</sup> Coautor: *Amalia, Medina-Palomera* / **ORC ID:** 0000-0003-3382-7365, **CVU CONACYT ID:** IT16D841

ID 3<sup>er</sup> Coautor: *Michelle, Arredondo-Espinoza* / **ORC ID:** 0000-0002-1703-0324, **Researcher ID Thomson:** F-8751-2019

**DOI:** 10.35429/H.2019.4.16.38

L. Toscano, M. Stoytcheva, A. Medina y M. Arredondo

toscano.lydia@itmexicali.edu.mx

A. Marroquín, J. Olivares, P. Díaz, L. Cruz. (Dir.) La ciencia y las mujeres en Mexico. Handbooks-©ECORFAN-Mexico, Queretaro, 2019.

## Resumen

Hoy en día, el cultivo conjunto de células de hongos y microalgas se considera una tecnología potencial que podría minimizar el costo de recolección y los insumos de energía en el enfoque de las algas en los biocombustibles. En el presente estudio; el co-cultivo de cinco hongos filamentosos seleccionados con la microalga *Chlorella sorokiniana* para formar glóbulos celulares se evaluó en diferentes condiciones tales como el contenido de fuente de carbono orgánico (glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa) y de nitrógeno (urea, peptona, extracto de levadura y nitrato de sodio) con y sin la presencia de una fuente de carbono alternativa (paja de trigo); y una relación inicial de esporas fúngicas / células microalgales en crecimiento mixotrófico. Se realizaron mediciones de la actividad enzimática de celulasa y del potencial zeta para comprender mejor el proceso de co-floculación. Se encontró que *Aspergillus flavus* era el más eficaz para la co-floculación en medio de cultivo BG-11 suplementado a pesar de su pH alcalino (7.5-8.3) bajo co-cultivo mixotrófico, pudiendo cosechar hasta el 96% de las células de microalgas (concentración inicial de la microalga  $4.2 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) en 48 h cuando el cultivo se suplementó con 5, 10 y 1 g L<sup>-1</sup> de fructosa, NaNO<sub>3</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, respectivamente. También se estudió la eficacia de la cosecha en términos de densidad óptica a 750 nm, así como la velocidad de consumo de los azúcares, el pH y la actividad de la enzima celulasa (2,3 U ml<sup>-1</sup> valor máximo) con el tiempo. La cepa *A. flavus* investigada en este trabajo podría surgir como un método eficiente y económicamente viable en la cosecha de microalgas para la producción de biocombustibles, así como en la producción de otros compuestos valiosos a partir de metabolitos fúngicos extracelulares.

## Co-cultivo, Co-floculación, Cosecha de microalga, Fongos filamentosos

### Abstract

Nowadays, co-cultivation of fungal and microalgal cells is considered as a potential technology that could be able to minimize the harvesting cost and energy inputs in the algae-to-biofuel approach. In the present study; co-cultivation of five selected filamentous fungus and microalgae *Chlorella sorokiniana* to form cell pellets was evaluated under different conditions such as organic carbon (glucose, fructose, sucrose, and maltose) and nitrogen (urea, peptone, yeast extract and sodium nitrate) source content with and without the presence of alternative carbon source (wheat straw); and initial fungal/microalgae cells ratio for mixotrophic growing. In addition, cellulase activity and zeta potential measurements were carried out in order to get a better understanding of the pelletization process. *Aspergillus flavus* was found most efficient for pelletizing in the nutrient supplemented spent BG-11 in spite of its alkaline pH (7.5-8.3) under mixotrophic growing, being able to harvest up to 96% of the microalgal cells ( $4.2 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup> initial algal concentration) within 48h at supplementation of 5, 10 and 1 g L<sup>-1</sup> of fructose, NaNO<sub>3</sub> and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, respectively. The harvesting efficiency in terms of optical density at 750 nm as well as the variation of residual sugars, pH, and cellulase enzyme activity (2.3 U mL<sup>-1</sup> maximum value) with time was also studied. *A. flavus* strain investigated in this work could emerge as an efficient, and economically viable method in microalgae harvesting for biofuel production as well as in the production of other valuable compounds from extracellular fungal metabolites.

## Co-culture, Co-pelletization, Filamentous fungi, Microalgae harvest

### 1. Introducción

La biomasa algal es considerada una fuente renovable de energía prometedora para la producción de biocombustibles y para la producción de sustancias química (Foley, et al., 2011; Gonçalves, Pires & Simões, 2013). El cultivo de las microalgas, a diferencia de los cultivos tradicionales de semillas oleaginosas, puede proporcionar más biomasa con un mayor contenido de lípidos utilizando menos agua en un área de tierra más pequeña cuyo cultivo puede realizarse en tierras no agrícolas, evitando así la competencia con la producción agrícola (Ahmad, Yasin, Derek & Lim, 2011). Sin embargo, independientemente de estas ventajas, la falta de un método económico para la recolección de cultivos de las microalgas es uno de los cuellos de botella en su comercialización en la industria de los biocombustibles debido principalmente a la alta tasa de dilución de estos cultivos, al tamaño de las células y a la carga de la superficie celular electronegativa (Uduman, Qi, Danquah, Forde & Hoadley, 2010).

La recolección de microalgas por sedimentación y filtración simple es solo posible para especies más grandes debido al pequeño tamaño de las células de microalgas (2-20  $\mu\text{m}$ ) lo que representa hasta el 20-30% del costo total de la producción de biomasa (Barros, Gonçalves, Simões, & Pires, 2015). La recolección de microalgas actualmente involucra métodos mecánicos, químicos, biológicos y, en menor medida, eléctricos. Es muy común combinar dos o más de estos métodos para obtener una mayor tasa de separación a costos más bajos (Milledge & Heaven, 2013).

Varios estudios han demostrado que es posible utilizar hongos filamentosos como un medio para la recolección de microalgas (Zhang & Hu, 2012; Vandamme, Foubert & Muylaert, 2013; Zhou, et al., 2013; Prajapati, Kumar, Malik & Choudhary, 2014; Wrede, et al., 2014). Estos estudios concuerdan en que los hongos filamentosos poseen una capacidad única para formar agregados de microalgas-hongos junto con la producción de cantidades considerables de enzimas extracelulares, incluida la celulasa. La asociación de microalgas y hongos filamentosos ocurre naturalmente en los líquenes. Simbióticamente, las microalgas fijan el  $\text{CO}_2$  y producen compuestos orgánicos, promoviendo el crecimiento de los hongos que, a cambio, brindan protección a las microalgas al retener el agua y servir de soporte para los nutrientes minerales (Gultom & Hu, 2013). La biofloculación de microalgas asistida por hongos filamentosos a través del co-cultivo entre las especies se basa en la adhesión de células de algas en las hifas del micelio de los hongos, aunque el mecanismo de acción no se conoce bien, parece estar respaldado por las diferencias en la carga superficial entre las células algales y fúngicas (Zhang & Zhang, 2016). El co-cultivo de la microalga *Chlorella sorokiniana* con la especie del hongo filamentoso *Isaria fumosorosea* para lograr la bio-floculación asistida ha sido recientemente reportado como un proceso integrado para la producción hidrotérmica de metano (Mackay, Gomes, Holliger, Bauer & Schwitzguébel, 2015).

Recientemente, Zou, Luo & Li, 2016, investigaron los efectos del contenido de glucosa y la crema de levadura en el comportamiento de los sistemas de simbiosis de agregados celulares de hongo-*Chlorella* sp. Estos estudios revelaron la capacidad de los hongos filamentosos para atraer células de la microalga formando flóculos de biomasa en presencia de fuentes de carbono orgánico como la glucosa. También indican que el co-cultivo de algas y hongos en la biofloculación son altamente sensibles a las condiciones de cultivo (autótrofas / heterótrofas) y requieren altos aportes de glucosa para apoyar el crecimiento de hongos con un tiempo de proceso relativamente largo (mínimo 48 h) para lograr una importante extracción de microalgas (Ummalyma, et al., 2017). En este trabajo, se analizaron cinco cepas fúngicas filamentosas (*A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *P. chrysogenum* y *T. harzianum*) para determinar su eficacia de floculación contra la cepa *Chlorella sorokiniana* de microalgas utilizando otras fuentes de carbono y nitrógeno que la glucosa y crema de levadura, respectivamente. El nivel de lípidos y la composición de ácidos grasos se analizaron en gránulos de algas y hongos cultivados en condiciones heterotróficas y mixotróficas.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Preparación de los monocultivos

La cepa *Chlorella sorokiniana* se obtuvo de la colección NAABB/LANL, se caracterizó e identificó como *Chlorella* DOE 1412 (Lammers, et al., 2017). Las microalgas se cultivaron en medio BG-11 modificado en condiciones estériles. La composición química del medio BG-11 modificado fue la siguiente:  $\text{NaCl}$  (5  $\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{NaNO}_3$  (1.5  $\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.04  $\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.075  $\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,036  $\text{g L}^{-1}$ ), ácido cítrico (0,006  $\text{g L}^{-1}$ ), citrato de amonio férrico (0,006  $\text{g L}^{-1}$ ), EDTA (0,001  $\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,02  $\text{g L}^{-1}$ ) y mezcla de metales traza (1.0 mL). La mezcla de metales traza consistió en  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (2.86  $\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1.81  $\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.222  $\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.39  $\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,079  $\text{g L}^{-1}$ ) y  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,05  $\text{g L}^{-1}$ ). Para iniciar un cultivo de algas, se inocularon 3 l de medio BG-11 con 150 ml de cultivo de *C. sorokiniana*, de la reserva de inóculo. El cultivo se mantuvo en un matraz Erlenmeyer de 4 L utilizado como foto-biorreactor a temperatura ambiente (22 °C) y las lámparas fluorescentes se dispusieron a un lado del foto-biorreactor para suministrar iluminación con un fotoperíodo de 12 h. Se proporcionó agitación magnética para mezclar. Las condiciones de crecimiento del cultivo microalgal fue fotoautotrófico hasta alcanzar una densidad óptica (medida a 750 nm, denominada  $\text{OD}_{750}$ )  $\approx 1.2$  y se mantuvieron a 4 °C en la oscuridad hasta el momento del experimento de biofloculación el mismo día. La tasa de crecimiento ( $\mu$ , día<sup>-1</sup>) se analizó mediante la producción de biomasa y se calculó de la siguiente manera:  $\mu = [\ln(DW_t) - \ln(DW_0)] / t$ , en la que  $DW_t$  y  $DW_0$  fueron la biomasa del día  $t$  y el día 0, respectivamente.

Para el estudio de la biofloculación algal asistida por hongos filamentosos se utilizaron cinco cepas de hongos, aisladas de suelo agrícola e identificadas como: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma harzianum* mediante análisis morfológico e identificación molecular para la estimación de la eficacia de biofloculación. Las especies de hongos se almacenaron en agar de dextrosa de papa (PDA). Para la activación, las esporas almacenadas se cultivaron a  $29 \pm 1$  °C durante cinco días en placas con PDA. Se añadió una solución estéril de glicerina al 0,1% para la preparación de la suspensión de esporas. Esta suspensión de esporas se utilizó como inóculo para el co-cultivo después de determinar la concentración de esporas.

## 2.2 Identificación Molecular de los hongos filamentosos

Las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) del ADN ribosomal fúngico (ADNr) se utilizaron para la identificación de los hongos. El ADN de las cepas fúngicas se extrajo de acuerdo con: Lacap, Hyde & Liew., 2003; Almakarem, Heilman, Conger, Shtarkman & Rogers, 2012. Las regiones ITS4-ITS5 del rDNA de cada aislamiento se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores universales, ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC e ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG (White, Bruns, Lee & Taylor, 1990). Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el programa BioEdit (versión 7.2) y se analizaron utilizando el nucleótido BLAST (Herramienta de búsqueda básica de alineación local) disponible en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information por sus siglas en Inglés). La identificación a nivel de especie se basó en más del 95% de la identidad entre las secuencias ITS de referencia.

## 2.3 Diseño experimental

En el presente estudio se realizaron tres series diferentes de experimentos para las cepas fúngicas seleccionadas en función de su capacidad de formación de agregados celulares: 1) Determinación de la concentración óptima de inóculo fúngico, 2) Diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en co-cultivos 3) Crecimiento de co-cultivos por agitación rotatoria y por agitación por borboteo de aire. Estos se describen en las secciones siguientes. En todos los experimentos, las biomásas fúngicas iniciales utilizadas fueron similares a las reportadas por otros investigadores para su uso en procedimientos relevantes para el co-cultivo de microalgas y hongos en la formación de los agregados celulares (Wrede, et al., 2014; Gultom, Zamalloa & Hu, 2014). El tiempo de tratamiento en los diferentes experimentos se seleccionó en base al tiempo necesario para formar agregados celulares estables.

## 2.4 Eficiencia de formación de agregados miceliales

En la determinación de la habilidad para formar agregados miceliales por las cepas fúngicas, los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad usando 150 mL de cultivo. Se utilizó como medio GB11 gastado como medio de cultivo, obtenido por separación de cultivo maduro de microalgas, el cual fue esterilizado para su posterior uso. El medio BG11 estéril fue suplementado con glucosa ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), nitrógeno como extracto de levadura ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) y fosfato como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1.0 \text{ g L}^{-1}$ ).

El pH se ajustó a 5.5 por adición de soluciones de ácido sulfúrico 2M o hidróxido de sodio 2M. La habilidad de los hongos para formar agregados miceliales se determinó a diferentes concentraciones iniciales de esporas ( $4 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  y  $4 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ). Estos cultivos fúngicos se incubaron con agitación rotatoria (120 rpm) a  $29 \pm 1$  °C por 72 h. El crecimiento y la formación de los agregados miceliales se registraron por observación visual.

## 2.5 Efecto de fuentes de carbono y nitrógeno en la formación de los co-agregados célula/micelio

Para estudiar el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la morfología de los agregados microalga/micelio, se trataron cultivos autótrofos de la microalga de *C. sorokiniana* con una densidad celular promedio de  $4 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  con diferentes tipos de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, y maltosa) usando 5, 10 and  $20 \text{ g L}^{-1}$  para cada uno y suplementados con extracto de levadura ( $2.5 \text{ g L}^{-1}$ ) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) como fuentes de nitrógeno y fosfato, respectivamente. Los cultivos de microalga suplementados fueron inoculados con suspensión de esporas fúngicas (relación espора-célula de 1:500 hongo/microalga) y cultivados en placas de 12 pozos.

El mismo procedimiento se aplicó para la determinación de la mejor fuente de nitrógeno. Se utilizaron cuatro diferentes fuentes de nitrógeno (urea, peptona, extracto de levadura y nitrato de sodio) con concentraciones de 5, 10 and 20 g L<sup>-1</sup> y suplementados con glucosa (2.5 g L<sup>-1</sup>) como fuente de carbono. El pH de los co-cultivos se ajustó a 5.5 y se incubaron en un orbital rotatorio (120 rpm) bajo condiciones mixotróficas a 29 ± 1 °C en ciclo de luz y oscuridad por periodo de 12h/12h. La densidad óptica del sobrenadante en los cultivos se midió a 750 nm y se hicieron observaciones visuales para determinar el momento de formación de co-agregados célula/micelio. Las fuentes de carbono y nitrógeno fueron llevadas a autoclave para su esterilización separadamente y agregadas a los co-cultivos bajo condiciones asépticas.

## 2.6 Eficiencia de Cosecha de la microalga

Los cultivos preparados de la microalga (DO 1.0 – 1.2 a 750 nm) y cultivados en medio BG11 bajo condiciones autótrofas fueron suplementados con 34 mg L<sup>-1</sup> de cloranfenicol, 10 g L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub> and 1.0 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como fuentes de nitrógeno y fosfatos, respectivamente. Los co-cultivos se iniciaron por inoculación de suspensión de esporas fúngicas hasta una relación final de espора-célula 1:500. Estos cultivos se dividieron en dos partes y se mezclaron con 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, separadamente. Una parte fue suplementada con 1.5 g L<sup>-1</sup> de paja molida de trigo (malla 40) para inducir la producción de celulasa. Los frascos se incubaron aplicando agitación continua (120 rpm) a 29 ± 1°C bajo condiciones mixotróficas de crecimiento en ciclo luz y oscuridad de 12h/12h. Posteriores experimentos fueron conducidos en iguales condiciones aplicando burbujeo de aire para agitación y suministro de oxígeno.

El pH se mantuvo en 5.5 por adición de soluciones de ácido sulfúrico y/o hidróxido de sodio 2M. Se tomaron muestras cada 12 h para ajuste de pH, medición de velocidad de consumo de azúcares, cambio de DO<sub>750</sub> y actividad celulolítica a partir de aparición de biomasa fúngica.

Después de 4 días los co-cultivos se evaluaron de forma cualitativa y cuantitativa para el tamaño y la morfología de los agregados célula/micelio a través de la observación visual, el porcentaje de remoción de microalgas del sobrenadante del co-cultivo y el contenido de biomasa de hongo y de microalga. Los experimentos de control consistieron en monocultivos de microalgas y hongos que se corrieron en cada conjunto de experimentos en duplicados. Para la inoculación, el número de células de la microalga y el número de esporas del hongo se contaron utilizando un hemocitómetro (Hausser Scientific, Horsham, PA, EUA.) bajo un microscopio óptico. A menos que se indique lo contrario, la concentración inicial de inoculación de microalgas y hongos fue de 3.2 x 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup> y 6.4 x 10<sup>4</sup> esporas mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Para el análisis de eficiencia de cosecha de la biomasa algal (EC), se analizaron muestras de co-cultivo 10 minutos después de detener la agitación. La EC se calculó en función de los cambios en OD<sub>750</sub>, el número de células, la biomasa y las concentraciones de clorofila de las células de algas capturadas en los medios de co-cultivo en diferentes momentos según la fórmula: EC (%) = [(AB) / A] x 100, donde A = OD<sub>750</sub>, números de células, biomasa, concentraciones de clorofila en el tiempo 0; B = OD<sub>750</sub>, números de células, biomasa, concentraciones de clorofila en el tiempo t.

## 2.7 Actividad de la enzima celulasa

Una vez que los aglomerados de biomasa algal-fúngica comenzaron a formarse de acuerdo con los métodos descritos, las muestras se extrajeron a intervalos regulares (24 h) para medir la actividad enzimática de la celulasa extracelular producida.

Las muestras se centrifugaron (10, 000 rpm, 10 min) y se analizó el sobrenadante para determinar la actividad enzimática incubando 0,5 ml de extracto del cultivo con 0,5 ml de carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato en solución tampón de citrato 0,05 M (pH 4,8) a 50 ° C durante 60 min. La reacción se terminó mediante la adición de 3 ml de reactivo de ácido dinitrosalicílico. Los tubos se colocaron en un baño de agua en ebullición durante 10 min. y se enfrió a temperatura ambiente. El azúcar reductor formado por la hidrólisis del sustrato durante la incubación de los ensayos se midió leyendo la absorbancia a 540 nm frente a una curva de calibración estándar de glucosa (Miller, 1959; Zhang, Hong & Ye, 2009). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de azúcar reductor por minuto en las condiciones del ensayo.

## 2.8 Análisis de muestras

Después de 96 h de cultivo, se recolectó la biomasa de la co-floculación y se analizó la distribución de la biomasa, el diámetro promedio de los pellets, la eficiencia de cosecha (EC) en los co-cultivos. La biomasa total se determinó gravimétricamente secando las muestras a 60 ° C durante 24 h. Con el fin de diferenciar la biomasa de algas y hongos en muestras de sedimento de co-cultivo, la biomasa de algas de biomasa de algas se determinó indirectamente midiendo la clorofila *a* y la clorofila *b*, [*Chl (a + b)*] concentración. La concentración de clorofila se determinó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Thermo Scientific, Genesys 10S UV-VIS, EUA.) Mediante extracciones con solución de metanol (90% v / v) con tiempos de contacto de 24 h de una cantidad de biomasa seca y molida de los flóculos o agregados con agitación rotatoria de 200 rpm a 60 ° C. Se generaron curvas estándar de la concentración de *Chl (a + b)* frente al peso seco de biomasa algal ( $R^2 = 0.998$ ) para correlacionar la concentración de la clorofila con el peso seco de la microalga (Becker, 1994).

La biomasa fúngica se determinó por la diferencia entre el peso total de biomasa seca y el peso de biomasa algal medida. Los aglomerados de biomasa se separaron por filtración utilizando una tela filtrante de nailon de malla 30 y la biomasa separada se colocó en una placa de vidrio para medir el diámetro con una escala. La concentración de azúcares residuales en el medio se estimó cada 12 h utilizando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Se realizaron extracciones y análisis de rendimiento de lípidos y análisis de composición de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de algas, hongos y de agregados de algas/micelio.

La biomasa seca se procesó con una mezcla de 10 ml de cloroformo y metanol (2:1 v / v) para extraer el aceite microbiano mediante extracción asistida por microondas (Sistema de reacción acelerada por microondas MARS-X, Matthews, NC, EE. UU.). Finalmente, se generó FAME mediante reacción de transesterificación en un baño de agua a 60 ° C (Modelo 202, Isotemp Fisher Scientific, Hampton, NH, EUA.) Durante 10 minutos con una solución 3 M de HCl / metanol. El producto de transesterificación (FAME) se disolvió en diclorometano (DCM) y se analizó por cromatografía de gases en un sistema Agilent 7890A GC acoplado a un detector selectivo de masa (MSD) Agilent 5975C con Detector de triple eje (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) (Gong & Jiang, 2011). Los parámetros utilizados en el análisis de FAMEs fueron los siguientes: gas portador He, flujo 1,0 ml min<sup>-1</sup>, columna: Omegawax 250, Supelco, Bellefonte (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), temperatura del horno: comenzó a 90 ° C y aumentó a 240 ° C, temperatura de la fuente de espectrometría de masas (MS): 180 ° C. Se recogieron los espectros de masas de impacto electrónico de la muestra. Los FAMEs se determinaron al comparar su patrón de fragmentación con la biblioteca de referencia espectral de masas NIST.

## 2.9 Análisis de carga de superficie celular

La carga superficial de las células de la microalga y de las esporas de los hongos se midió a diferentes valores de pH en condiciones de temperatura ambiente (5, 6, 7 y 8) mediante la medición del potencial zeta utilizando un analizador de potencial zeta (Malvern, Zetasizer Nano ZS, Houston, TX, EUA.) Debido al pequeño tamaño de las esporas de hongos y de las células de la microalga (3-50 µm), la medición de la carga superficial se pudo realizar directamente sin reducción del tamaño de partícula, mientras que los agregados de hongos y de hongo / alga se trituraron después de congelarse con nitrógeno líquido.

## 2.10 Tinción al Rojo Nilo

Para la tinción con Rojo Nilo se realizó para la observar las gotas de aceite intracelulares presentes en los agregados de hongo / microalga. Los agregados del co-cultivo fueron separados por centrifugación (6.000 rpm, 5 min) y se resuspendieron en 1 mL de DMSO al 20% que contenía 5 µL de solución madre de Rojo Nilo (0,10 mg / ml de Rojo Nilo disuelto en acetona) y se incubó a 50 ° C con agitación a 150 rpm durante 5 min. Los gránulos teñidos se observaron luego por microscopía de fluorescencia usando un Olympus BX61 con una cámara adjunta (Olympus DP72) para gotitas de aceite dentro de las células de la microalga. El Rojo Nilo tiene excitación a 543 nm y emisión a 555 - 650 nm.

### 3. Resultados

#### 3.1 Hongos filamentosos con capacidad de formación de agregados miceliales

Se observó que las cepas fúngicas candidatas (*A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *P. chrysogenum* y *T. harzianum*) mostraron micelio fúngico en placas de PDA después de un cultivo de 5 días, lo que sugiere que estas cepas pertenecen a los hongos filamentosos.

Estas cepas de hongos filamentosos se identificaron según la morfología de las colonias y las imágenes microscópicas (no mostradas aquí) de colonias y conidios combinados con el resultado BLAST de la biblioteca de genes de hongos. Las cepas fúngicas se investigaron más para determinar la capacidad de formación de agregados miceliales mediante el crecimiento de esporas fúngicas en medios gastados BG11 cuya composición química demostró ser ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ): carbohidratos 13.70; proteína 286.46; nitrógeno total 2.73; fósforo total 5.71, complementado con glucosa ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), extracto de levadura ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) y fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1.0 \text{ g L}^{-1}$ ) y el pH ajustado a 6. Se encontró que solo la cepa fúngica *T. harzianum* formó agregados irregulares sueltos y esponjosos, mientras que el resto de las cepas fúngicas demostraron capacidad de formación de agregados esféricos y densos (Fig. 1) después de 3 días de cultivo, dicha observación está de acuerdo con los informes que indican que la formación de agregados miceliales por hongos filamentosos en cultivos sumergidos es específica de la especie (Gultom & Hu, 2013; Gibbs, Seviour, & Schmid, 2000).

**Figura 2.1** Comparación de la capacidad de los hongos filamentosos para formar agregados miceliales en medio gastado BG-11, complementado con glucosa, fosfato de potasio y nitrato de sodio como fuentes de carbono, fósforo y nitrógeno, respectivamente. Del 1 al 5, *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *P. chrysogenum* and *T. harzianum*.



Fuente: Elaboración Propia

#### 3.2 Efecto de la concentración inicial de esporas de hongos en el proceso de granulación

Para observar el efecto de la concentración de inóculo fúngico en el tamaño y número de agregados producidos, se inocularon diferentes concentraciones iniciales de esporas fúngicas basadas en una concentración constante de microalgas para la cosecha de la microalga ( $\approx 4.0\text{E} + 07$  células / mL).

La concentración de inóculo de las esporas de hongos se ajustó en función a la relación de número de esporas de hongo con número de células de la microalga en 1:100, 1:500 y 1:1000. Estas relaciones corresponden a concentraciones de esporas de  $4.0\text{E} + 05$ ,  $8.0\text{E} + 04$  y  $4.0\text{E} + 04$  esporas / mL respectivamente.

Los cultivos sumergidos de las cepas fúngicas seleccionadas se realizaron en los medios identificados en la sección anterior como medios BG-11 agotados y suplementados para la formación de los agregados. Las tres concentraciones de esporas diferentes formaron agregados esféricos y densos en cuatro de las 5 cepas de hongos seleccionadas. La cepa *T. harzianum* formó agregados esponjosos y dispersos.

El número de agregados aumentó y el diámetro disminuyó en todos los cultivos con el incremento de la concentración de esporas cuando se usó glucosa y extracto de levadura como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1** Crecimiento micelial y estructura de agregados en medio gastado BG-11 suplementado con glucosa (5 g L<sup>-1</sup>), NaNO<sub>3</sub> (10 g L<sup>-1</sup>) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g L<sup>-1</sup>) a pH ( $\approx$  5.5) para diferentes relaciones de esporas de hongo y células de microalga después de 72 h de fermentación sumergida

Agregados en base a relación Hongo y Microalga (espora/células)									
Hongo filamentoso	1:100			1:500			1:1000		
	Forma	Tamaño (mm)	Agregado (#)	Forma	Tamaño (mm)	Agregado (#)	Forma	Tamaño (mm)	Agregado (#)
<i>Aspergillus flavus</i>	Compacto & esférico	2 $\pm$ 0.5	350	Compacto & esférico	7 $\pm$ 1.0	180	Compacto & esférico	7 $\pm$ 1.0	120
<i>Aspergillus niger</i>	Compacto & esférico	2 $\pm$ 0.5	380	Compacto & esférico	6 $\pm$ 0.5	160	Compacto & esférico	6 $\pm$ 0.5	130
<i>Aspergillus oryzae</i>	Compacto & esférico	2 $\pm$ 1.0	340	Compacto & esférico	8 $\pm$ 1.0	180	Compacto & esférico	9 $\pm$ 1.0	140
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Compacto & esférico	1 $\pm$ 0.5	360	Compacto & esférico	2 $\pm$ 0.5	220	Compacto & esférico	2 $\pm$ 1.0	190
<i>Trichoderma harzianum</i>	Filamentoso & disperso	-	-	Filamentoso & disperso	-	-	Filamentoso & disperso	-	-

150 mL de medio por cultivo

Los valores de la tabla son la media de dos réplicas, con excepción del tamaño del agregado. El tamaño del agregado es la media de la medición de 100 agregados miceliales de cada cultivo con desviaciones estándar de  $\alpha = 0.05$ ,  $n = 2$ .

Fuente: Elaboración Propia

Debido a que el tamaño del agregado disminuyó según el aumento de la cantidad de inóculo del hongo, pudimos confirmar que el tamaño del inóculo del hongo influye en la morfología de los agregados miceliales. Las mismas observaciones de hongos filamentosos como *A. niger* y *A. terreus* se han reportado (Gultom, Zamalloa & Hu, 2014; Shin, Lee, Jeong & Chun, 2017).

### 3.3 Efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la formación de flóculo micelio/microalga

Para evaluar el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la morfología de los agregados de micelio / microalga, cuatro diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa) y de nitrógeno (urea, extracto de levadura, peptona y nitrato de sodio) usando 3 concentraciones diferentes (5, 10 y 20 g L<sup>-1</sup>) de cada fuente se utilizaron para las cepas de hongos filamentosos seleccionados y se cultivaron conjuntamente con cultivo maduro de la microalga *Chlorella sorokiniana* en placas de 12 pocillos. Como se muestra en la Figura 2.2, solo los co-cultivos de *Trichoderma harzianum* no dieron lugar a formas de agregados esféricos y densos, permaneciendo como biomasa filamentosa verde.

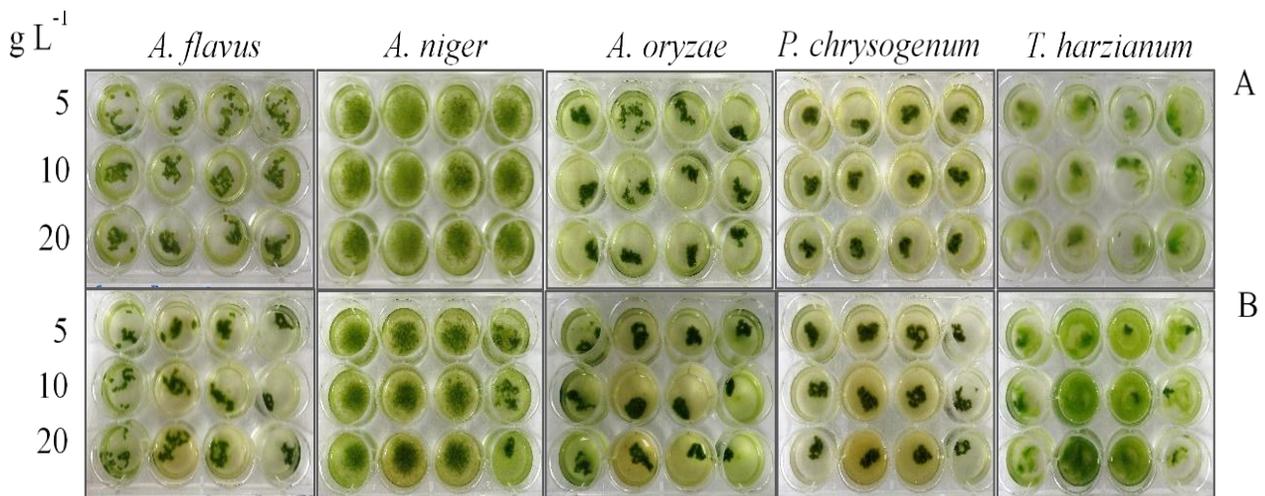
El resto de los co-cultivos formaron agregados miceliales que tenían aproximadamente 1 mm de diámetro. A las 24 h, *A. flavus*, *A. oryzae* y *P. chrysogenum* en co-cultivo con *Chlorella sorokiniana* mostraron una buena agregación de micelio verde y un sobrenadante más claro, lo que indica el atrapamiento de células de microalgas por el micelio fúngico. *A. niger* mostró un proceso de agregación más lento, pero aun así se formaron pequeñas esferas densas de biomasa.

Los flóculos formados durante las 24 h iniciales del co-cultivo, bajo las condiciones iniciales de crecimiento mixotrófico (medio de cultivo agotado BG11 suplementado, pH 5,5), mantuvieron su morfología durante todo el período de cultivo (48 h). Las cuatro fuentes de carbono probadas (glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa) en las placas de 12 pocillos demostraron ser fuentes de carbono adecuadas para *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae* y *P. chrysogenum* para co-flocular con *Chlorella sorokiniana*.

Se observó que, con la glucosa como fuente de carbono, la microalga *Chlorella sorokiniana* exhibe un crecimiento mucho más rápido (crecimiento exponencial durante 36 h, llegando a la fase estacionaria después de 48 h) que con otras fuentes de carbono como la fructosa, sacarosa y maltosa (Qiao & Wang, 2009; Gomez, Höffner & Barton, 2016). Esto es un inconveniente para la germinación de las esporas de hongos debido a la competitividad entre hongos y microalga por la glucosa.

Se registró una disminución de 60 a 90% en  $DO_{750}$  en la co-floculación de las especies de hongos filamentosos, *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae* y *P. chrysogenum* con la microalga *Chlorella sorokiniana* cuando se usaron nitrato de sodio y urea como fuentes de nitrógeno. En general, las otras dos fuentes de nitrógeno, el extracto de levadura y la peptona, fueron menos efectivas para disminuir la  $DO_{750}$ , tal vez porque se logra una mayor biomasa de algas cuando las fuentes de nitrógeno orgánico están presentes en el co-cultivo (Kim, Mujtaba & Lee, 2016).

**Figura 2.2** Morfología de agregados de micelio / microalga a las 24 h de co-cultivo en placa de 12 pozos suplementados con diferentes concentraciones de fuentes de carbono y nitrógeno (5, 10, and 20  $g L^{-1}$ ). Formados a partir de inóculo de suspensión de esporas de hongo filamentosos en la relación espora/célula 1:500. (A) Para cuatro diferentes fuentes de carbono. De izquierda a derecha; glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa. (B) Para cuatro diferentes fuentes de nitrógeno. De izquierda a derecha; urea, extracto de levadura, peptona y nitrato de sodio



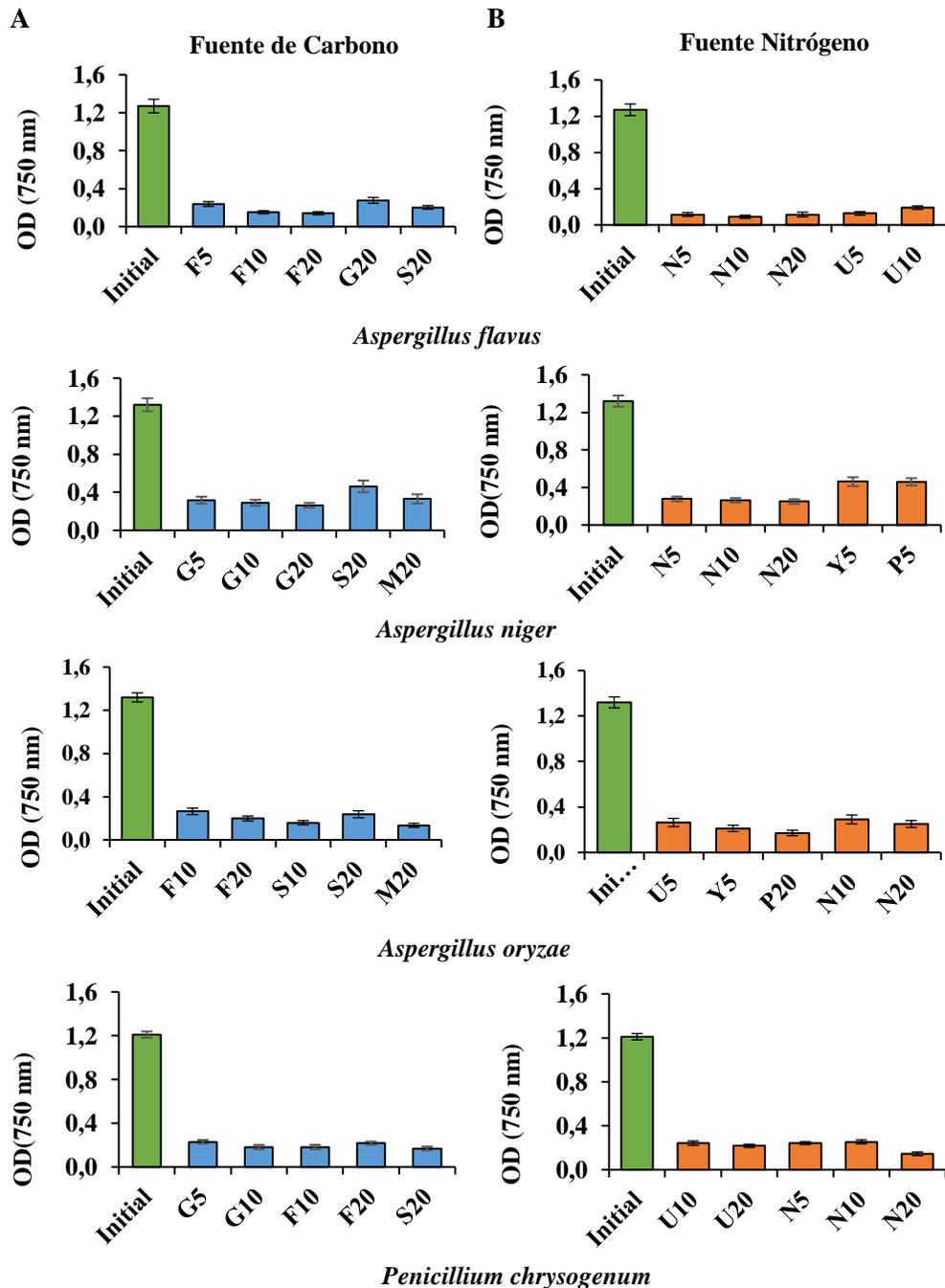
Fuente: Elaboración Propia

Las densidades ópticas a 750 nm de longitud de onda de los co-cultivos se midieron para determinar los efectos de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la agregación de microalgas al micelio fúngico (Gráfico 2.1 A y B).

Este primer análisis del efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la capacidad del hongo para formar agregados micelio/microalga bajo fermentación sumergida mostró que una fuente de nitrógeno inorgánico es fundamental para la eficiente extracción de la microalga.

La idoneidad de las fuentes de nitrógeno inorgánico para formar micelio fúngico también se ha observado en otros trabajos al probar diferentes fuentes para encontrar los requisitos fisiológicos óptimos para el crecimiento de *P. stipticus* para su uso como bioindicador / biosensor (Prasher, Chandel & Chauhan, 2014).

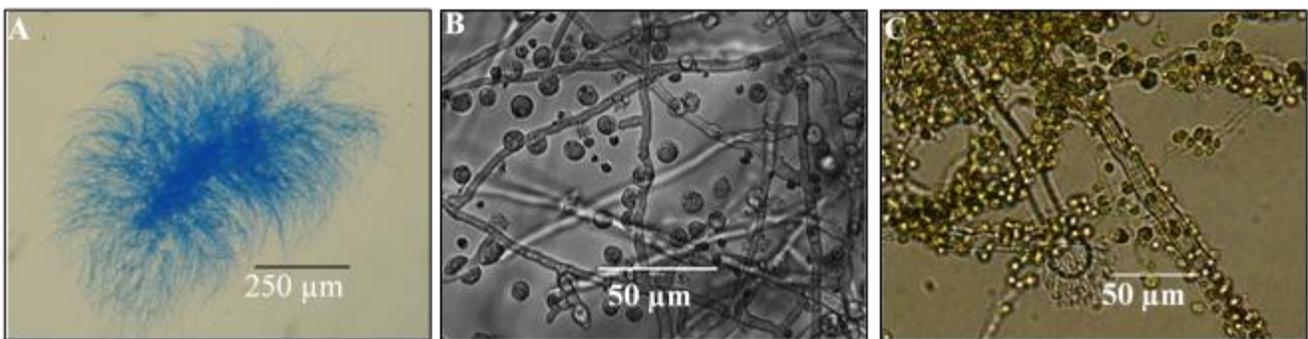
**Gráfico 2.1** Efecto de Fuentes de carbono (A) y de nitrógeno (B) en la eficiencia de cosecha de la microalga *C. sorokiniana* harves en base a disminución de DO750 (750 nm) Después de 48 h de co-cultivo de la microalga con *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae* y *P. chrysogenum*. El crecimiento de los co-cultivos se realizaron bajo condiciones mixotróficas en placas de 12 pozos. (A) Cuatro diferentes fuentes de carbono fueron probadas para la co-floculación micelial/algal: Las letras G, F, S, y M significan glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, respectivamente y (B) cuatro diferentes fuentes de nitrógeno; U, Y, P y N para urea, extracto de levadura, peptona y nitrato de sodio, respectivamente. Para cada diferente suplemento de carbono y nitrógeno se usaron tres diferentes concentraciones: 5, 10 y 20 g L<sup>-1</sup> (barras: SD  $\pm$  1, n = 2)



Fuente: Elaboración Propia

Las características morfológicas de la agregación de hongos y algas se observaron utilizando microscopios con diferentes aumentos (Figura 2.3). Las micrografías mostraron cómo un germinado primario (Figura 2.3 A) de *A. niger* comienza a formarse después de 24 h de inoculación de esporas en el cultivo de algas y un agregado micelio/microalga completo de *A. flavus* (Figura 2.3 B). La visualización adicional de los lípidos intracelulares en las células de la microalga atrapadas en un flóculo utilizando la tinción con Rojo Nilo confirmó que las células de la microalga se incrustaron en el micelio de las hifas fúngicas (Figura 3 C).

**Figura 2.3** Visualización microscópica de la estructura de los agregados micelio/microalga: (A) Microscopia de luminosa de flóculo micelial primario de *A. niger* por tinción con azul de lactofenol. (B) Imagen de co-flóculo de *A. flavus/Chlorella* por microscopía de fluorescencia. Se observan las células de la microalga adheridas a las hifas miceliales del hongo. (C) Imagen de agregado micelio-microalga *A. oryzae/Chlorella* por microscopia de fluorescencia por tinción al Rojo Nilo para la observación de lípidos intracelulares (color amarillo brillante).



Fuente: Elaboración Propia

### 3.4 Análisis de potencial zeta

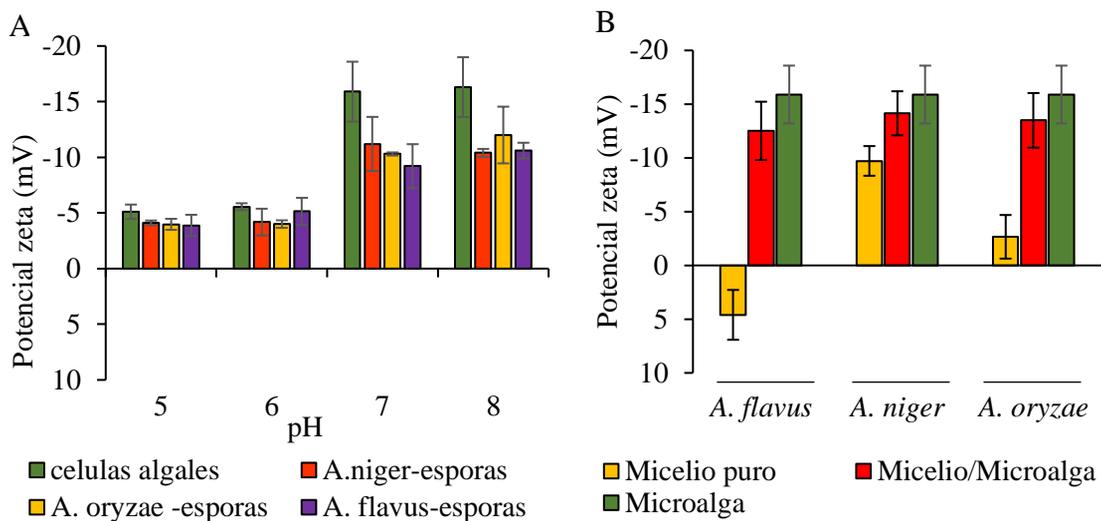
La co-floculación hongo / microalga es un proceso en el cual las hifas de los hongos sirven como floculante en la separación de las células de la microalga en el cultivo. La atracción entre el micelio aglomerado de los hongos y las células de la microalga se puede explicar a través del potencial zeta en cada superficie celular (Gultom & Hu, 2013). Sobre la base de la teoría DVLO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek), la interacción entre las partículas cargadas coloidales se describe mediante la repulsión electrostática y las fuerzas de Van der Waals (Gregory, 2005).

Se dice que esta repulsión entre partículas es fuerte cuando los valores de potencial zeta son más de  $\pm 25$  mV, y en contraste, cuando el potencial zeta es cercano a cero, las partículas se atraen entre sí debido a las fuerzas de Van der Waals. En términos de carga superficial, se informó que los potenciales zeta y las eficiencias de floculación dependían del pH [9]. El efecto del pH sobre la carga superficial de las células de la microalga *C. sorokiniana* y las esporas de hongos filamentosos a diferentes pH, de 5 a 8 se muestra en la Gráfico 2.2-A.

El potencial zeta de las células de microalgas y las esporas fúngicas fue negativo en todos los análisis de pH. Estaba claro que la carga superficial de las células de microalgas era más negativa (hasta -16.3 mV) que las esporas fúngicas (hasta -11.3 para *A. niger*) a un pH más alto. Estos resultados confirman otros estudios que informaron una carga superficial más negativa a un pH alto (Zamalloa, Gultom, Rajendran & Hu, 2017).

Para analizar si los agregados miceliales de *A. flavus*, *A. niger* y *A. oryzae* tienen efecto sobre la captura de células de *Chlorella sorokiniana*, se midieron los potenciales zeta de estos agregados en cultivos puros de hongos filamentosos y en co-cultivos hongo /microalga en medio BG-11 gastado. Los agregados de micelio / microalga mostraron valores de potencial zeta negativos más bajos (-12.5 a -14.1 mV) que el valor observado en las células de la microalga, tal vez debido a la reducción de la carga superficial negativa por la carga superficial menos negativa e incluso positiva (*A. flavus*) del micelio fúngico (Gráfico 2.2-B), promoviendo la co-floculación entre células de microalgas y micelio fúngico.

**Gráfico 2.2** (A) Potenciales zeta: Células de Microalga *Chlorella sorokiniana* y esporas de *A. flavus*, *A. niger* y *A. oryzae* a diferentes pH. (B) Potenciales zeta de agregados miceliales puros, micelio/alga y células algales para su comparación a  $\text{pH } 5.5 \pm 0.5$  (barras:  $\text{SD} \pm 1$ ,  $n = 100$ ).



Fuente: Elaboración Propia

### 3.5 Escalamiento de la co-floculación algal-fúngica

Sobre la base de los resultados preliminares (efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la formación de co-flóculos micelio/microalga) se llevaron a cabo experimentos adicionales a escala en frascos de 500 ml de capacidad con la variable de fuente de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa) y se mantuvo constante la fuente de nitrógeno (nitrato de sodio,  $10 \text{ g L}^{-1}$ ), complementado con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ), cloruro de sodio ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), pH inicial ( $\approx 5,5$ ) y temperatura de co-floculación de  $29 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , utilizando las cepas de *A. flavus*, *A. oryzae* y *A. niger* por separado. Se diseñaron dos series de experimentos en condiciones de crecimiento mixotrófico (12 h / 12 h, período oscuro y claro). Una serie de experimentos se realizó con agitación a 120 rpm, y en la otra serie de experimentos se aplicó burbujeo de aire ( $350 \text{ ml min}^{-1}$  por matraz) a los co-cultivos como medio de agitación. Ambos conjuntos de experimentos se repitieron agregando  $1.5 \text{ g}$  de paja de trigo  $\text{L}^{-1}$  estéril (malla 40). Cada experimento se realizó por duplicado por duplicado.

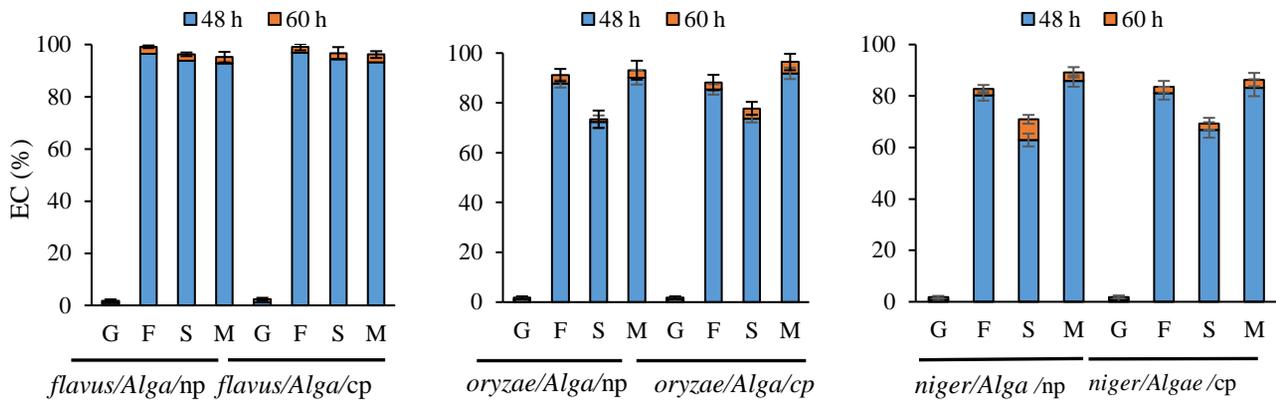
Del efecto de las fuentes de carbono, se observó crecimiento de hongos en todas las condiciones, excepto en los cultivos de glucosa, donde se observó un importante crecimiento de la microalga y un nulo crecimiento micelial. Se corrieron paralelamente a las experimentaciones de co-floculación, cultivos de control de la microalga sola con las cuatro fuentes de carbono diferentes. La comparación de la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) entre estos controles mostró un valor más alto para el control del cultivo de glucosa sobre los otros azúcares en condiciones de crecimiento mixotrófico ( $0.1609$ ,  $1.0464$ ,  $0.2397$ ,  $0.1737$  y  $0.1610 \text{ d}^{-1}$  para el control de blanco, glucosa, fructosa, sacarosa y de maltosa respectivamente). Tal comportamiento podría explicarse por una alta competitividad algal para la glucosa con cepas de hongos (Liu, et al., 2010).

### 3.6 Co-floculación en matraces con agitación rotatoria.

Para los experimentos escalados de co-floculación, se utilizó la relación esporas / células de 1: 500 para las cepas de hongos filamentosos *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. niger* y la microalga *C. sorokiniana*. Los co-cultivos del medio se suplementaron con  $\text{NaNO}_3$  ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) y como fuente de carbono ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), se incubaron a  $29 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , agitando a 120 rpm. *A. flavus* mostró hasta un 96% de co-floculación después de 48 h de co-cultivo cuando se utilizó fructosa como fuente de carbono sin diferencias obvias en la eficiencia de floculación entre cultivos con y sin paja de trigo. *A. oryzae* y *A. niger* presentaron su mayor eficiencia de cosecha en 90% y 85% respectivamente con maltosa como fuente de carbono. Las concentraciones de células microalgales capturadas aumentaron ligeramente después de las 48 h a las 60 h de co-pelletización.

La Figura 2.6 muestra los resultados de la eficiencia de la co-peletización para las cepas de hongos elegidas. Después de las 60 h de co-floculación la densidad óptica del sobrenadante a 750 nm, aumentó ligeramente (disminución de la eficiencia de recolección), lo que puede explicarse por la liberación de células de algas de los flóculos y / o por el crecimiento de células de algas no capturadas en los medios (Gultom & Hu, 2013; Zhang & Zhang, 2016; Ummalyma, et al, 2017).

**Gráfico 2.3** Eficiencia de cosecha de la microalga *C. sorokiniana* por co-floculación con *A. flavus*, *A. oryzae* y *A. niger* en base a la reducción de la OD750 después de 48 h y 60 h de co-cultivo, np cultivo sin paja y cp cultivo con paja (barras: SD  $\pm$ 1, n= 2)



Fuente: Elaboración Propia

La razón de la ausencia de flóculos de micelio en los cultivos con glucosa podría explicarse por la tendencia de estos cultivos a tener un pH alcalino (8-9). Los medios de pH básicos parecen inhibir la agregación de esporas de hongos. Por lo tanto, la agregación de esporas fue más baja a un pH alto que a un pH bajo (Zhou, et al., 2013; Zhang & Zhang, 2016; Nair, Lennartsson & Taherzadeh, 2016). La Tabla 2.2 muestra los valores promedio de pH y la morfología de los co-flóculos de todos los cultivos en condiciones de crecimiento mixotrófico mediante incubación con agitación rotatoria a temperatura constante. El pH del co-cultivo inicial se ajustó a 5.5 antes de la inoculación de las esporas de hongos, considerando trabajos previos para inducir la agregación micelial de hongos más rápida, y se midió cada 12 h (Zhou, et al., 2013; Nair, Lennartsson & Taherzadeh, 2016).

**Tabla 2.2** Perfiles de pH y forma de los agregados de microalga/micelio en la co-floculación bajo condiciones mixotróficas de crecimiento

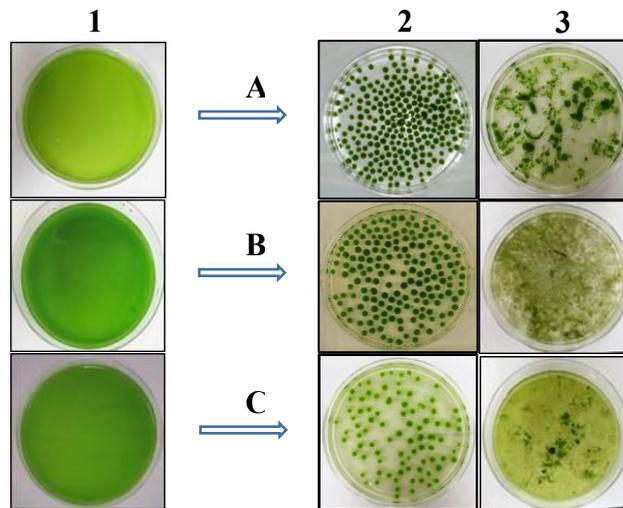
Co-cultivo Alga/hongo	Aspergillus flavus			Aspergillus oryzae			Aspergillus niger		
	AFF	Agregado Forma	pH	AFF	Agregado Forma	pH	AFF	Agregado Forma	pH
Control	x	NF	6.9	x	NF	7.1	x	NF	7.0
G/np	x	filamentos	8.7	x	filamentos	8.8	x	filamentos	8.5
F/np	o	esféricos	6.1	o	esféricos	6.0	o	esféricos	5.3
S/np	o	esféricos	5.9	o	esféricos	6.0	o	esféricos	5.5
M/cp	o	esféricos	5.8	o	esféricos	5.9	o	esféricos	5.5
G/cp	x	filamentos	7.9	x	filamentos	8.2	x	filamentos	8.4
F/cp	o	flóculo amorfo	6.3	o	flóculo amorfo	5.9	o	flóculo amorfo	6.0
S/cp	o	flóculo amorfo	5.9	o	flóculo amorfo	5.7	o	flóculo amorfo	5.5
M/cp	o	flóculo amorfo	5.8	o	flóculo amorfo	5.9	o	flóculo amorfo	5.6

NF; Flóculo no presente; AFF; Habilidad de formación de flóculo (“x” no-formadora de agregados; “o” formadora de agregados, Control; Co-cultivos microalga/hongo de control sin suplemento de azúcares en el medio de cultivo. G, F, S, M, cp y np; co-cultivos suplementados con glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, con paja de trigo y sin paja de trigo, respectivamente.

Fuente: Elaboración Propia

Se observó que, en algunos cultivos a los que se añadió glucosa como fuente de carbono, el medio de pH aumentaba hasta valores alcalinos. A estas condiciones de co-cultivo de pH alcalino, no se formaron flóculos o la formación fue de flóculos esponjosos muy pequeños. La presencia de paja de trigo en los co-cultivos de alga / hongos como fuente alternativa de carbono para la formación de agregados miceliales, no se observó diferencia en la eficiencia de la recolección de la alga, solamente en la morfología de los co-flóculos (Figura 4).

**Figura 4** Co-floculación microalga/micelio fúngico en condiciones de crecimiento mixotrófico a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ , 120 rpm de agitación con 60 h de incubación. (A) *A. flavus*; (B) *A. oryzae*; (C) *A. niger*. Co-cultivos Alga/Hongo de 1 - 3; Co-Cultivo Control sin fuente de carbono, co-cultivo usando fuente de carbono orgánico y co-cultivo usando fuente de carbono orgánico con suplemento de paja de trigo.



Fuente: Elaboración Propia

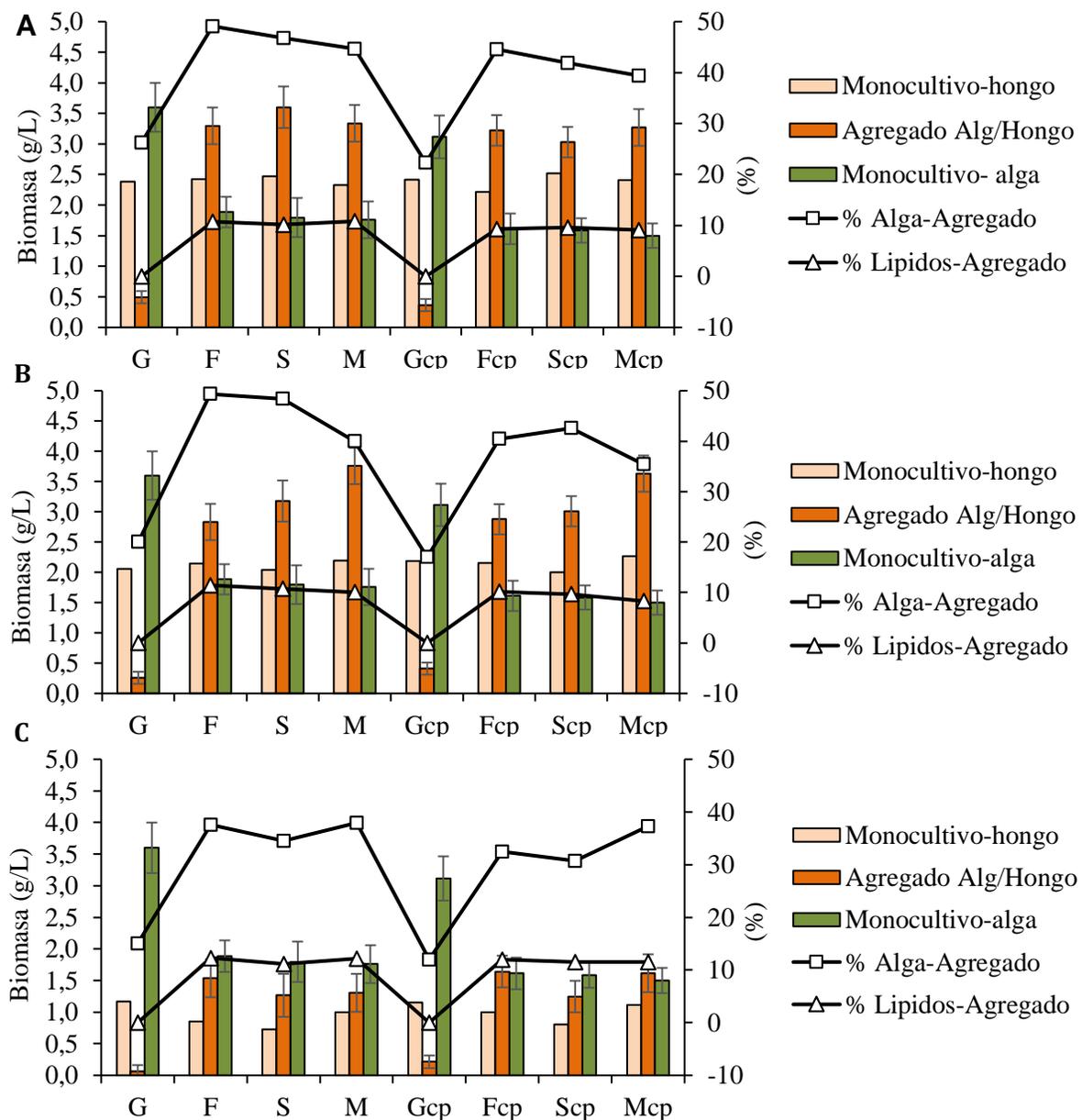
Se produjeron flóculos amorfos sueltos en los co-cultivos suplementados con paja de trigo, tal vez debido a una mayor producción de metabolitos y / o menores tasas de transferencia de oxígeno, que producen agregados esponjosos (Ferreira, Mahboubi, Lennartsson & Taherzadeh, 2016). La elección de la fuente de carbono, excepto la glucosa, no mostró una influencia significativa en la eficiencia de la recolección de las células de microalgas para los co-cultivos de *A. flavus*. Para los co-cultivos de *A. oryzae* y *A. niger* en crecimiento mixotrófico con agitación rotatoria, los cultivos de maltosa mostraron eficiencias de cosecha de la microalga ligeramente mayores en comparación con las eficiencias de cosecha donde se usaron la fructosa y la sacarosa cuando el pH del cultivo se mantuvo en 5.5 - 6.0.

### 3.7 Producción de biomasa y composición de agregados micelio/microalga

Los cultivos mixotróficos combinan características de cultivos autótrofos y heterótrofos. El co-cultivo en las condiciones mixotróficas donde las células de microalgas tienen acceso tanto a carbono ligero como orgánico puede ser un proceso muy complicado. *Chlorella sorokiniana* puede crecer tanto en luz como en carbono orgánico a diferencia de algunas especies de microalgas, que solo pueden crecer de forma heterótrofa si se proporciona azúcar (Li, et al., 2014; Perez, Escalante, de-Bashan & Bashan, 2011). En condiciones mixotróficas, los hongos formarán una relación simbiótica con células de microalgas autótrofas mientras compiten por nutrientes con células de microalgas heterótrofas (Gultom, Zamalloa & Hu, 2014). La biomasa fúngica en estos co-cultivos mixotróficos depende mucho más de la cepa fúngica y de la fuente de carbono en el co-cultivo en comparación con los cultivos puros de hongos, donde la producción de biomasa fue muy consistente para los cuatro azúcares usados (Gráfico 2.4). El contenido de biomasa de la microalga atrapada en los flóculos miceliales fue de aproximadamente 40-50% p / p (base en peso seco) para *A. flavus* y *A. oryzae*, mientras que para *A. niger* fue menor (30-40% p / p). Aquellos co-cultivos en los que la glucosa era la fuente de carbono se observó que *C. sorokiniana* tuvo una mayor producción de biomasa y una biomasa de co-floculación insignificante, principalmente debido a la competitividad de la microalga por la glucosa como fuente de carbono. De los cultivos de hongos puros, todas las cepas de hongos mostraron una producción consistente de biomasa para las cuatro diferentes fuentes de carbono utilizadas en este estudio.

También en el Gráfico 2.4, el contenido de lípidos en los flóculos formados es aproximadamente la mitad ( $\approx 12\%$ ) del contenido normal de lípidos en los cultivos puros de microalgas, lo cual es consistente con el contenido de células algales en el agregado micelial, N. Muradov et al., 2015 informaron resultados similares.

**Gráfico 2.4** Comparación de la producción de biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ) en co-cultivos alga/micelio y monocultivos puros de microalga u hongo después de 60 h. Composición de biomasa algal en co-flóculos y contenido de lípidos (% p/p). A) *A. flavus*, B) *A. oryzae*, and C) *A. niger* para diferentes azúcares sin y con paja (Glucosa, Fructosa, Sacarosa, Maltosa; cp significa con paja; barras:  $\text{SD} \pm 1$ ,  $n = 2$ ).

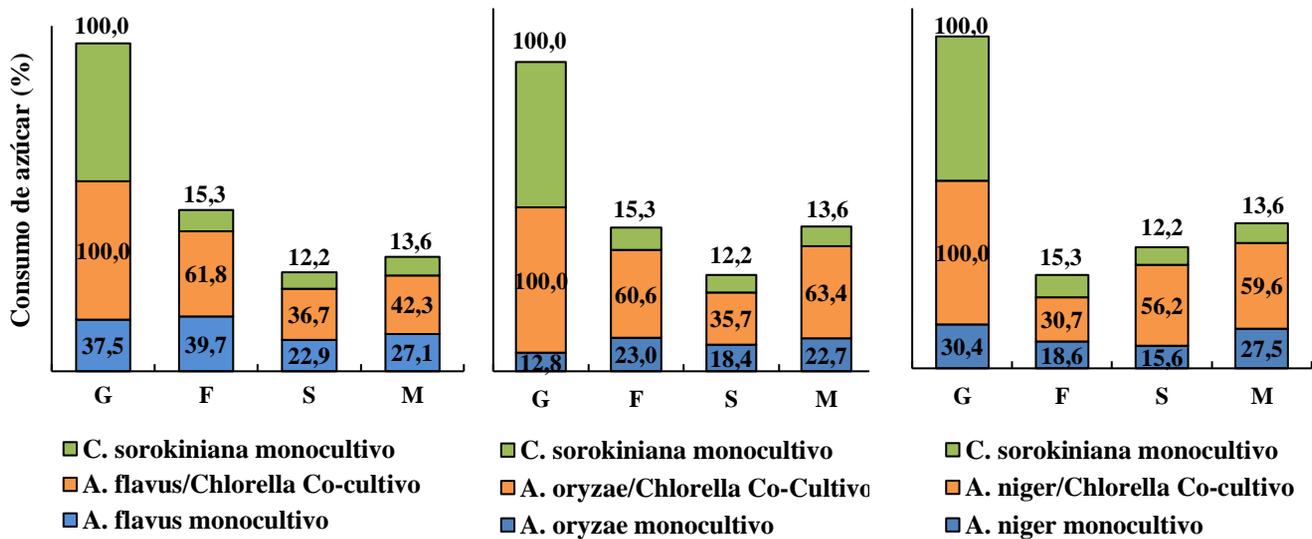


### 3.8 Consumo de azúcares

Se encontró que la formación completa de los agregados micelio/microalga en condiciones de agitación mixotrófica era a las 48 h, pH 5.0-5.5. El porcentaje de consumo de azúcares de los co-cultivos fue diferente según el tipo de azúcar y de la especie fúngica. Los cultivos puros de la microalga *C. sorokiniana* mostraron un mayor consumo de glucosa comparado con las otras 3 fuentes de carbono (fructosa, sacarosa y maltosa), esto también explica la mayor producción de biomasa de algas cuando se agregó glucosa como única fuente de carbono bajo condiciones de agitación mixotrófica. Similares resultados se observaron en el perfil de consumo de glucosa de los co-cultivos de algas / hongos (Gráfico 2.5), lo que indica una competencia por la glucosa entre las esporas de hongos y las células de la microalga, agotando toda la glucosa ( $5 \text{ gL}^{-1}$ ) en menos de 48 h.

El resto de los azúcares estaban presentes en un porcentaje mayor después de 24 h, por lo que las esporas de hongos germinados tenían suficiente suministro de carbono para la producción de micelio y la formación de agregado micelial. A partir de cultivos de hongos puros que crecieron en las mismas condiciones, se mostró un porcentaje diferente de consumo de azúcar en un rango de 12.8 a 37.5% después de un cultivo de 48 h. *A. flavus* y *A. oryzae* presentaron un mayor porcentaje de consumo de azúcar en fructosa (39.7 y 23%, respectivamente), mientras que *A. niger* mostró una mayor preferencia por la glucosa (30.4%). Todas las cepas fúngicas mostraron un porcentaje relativamente alto de consumo de azúcar en comparación con la maltosa (22,7 - 27,5%).

**Gráfico 2.5** Porcentaje de consumo de azúcares con respecto a la concentración inicial (5 gL<sup>-1</sup>) de monocultivos y co-cultivos hongo / microalga después de 48 h en condiciones de crecimiento mixotrófico con agitación rotatoria



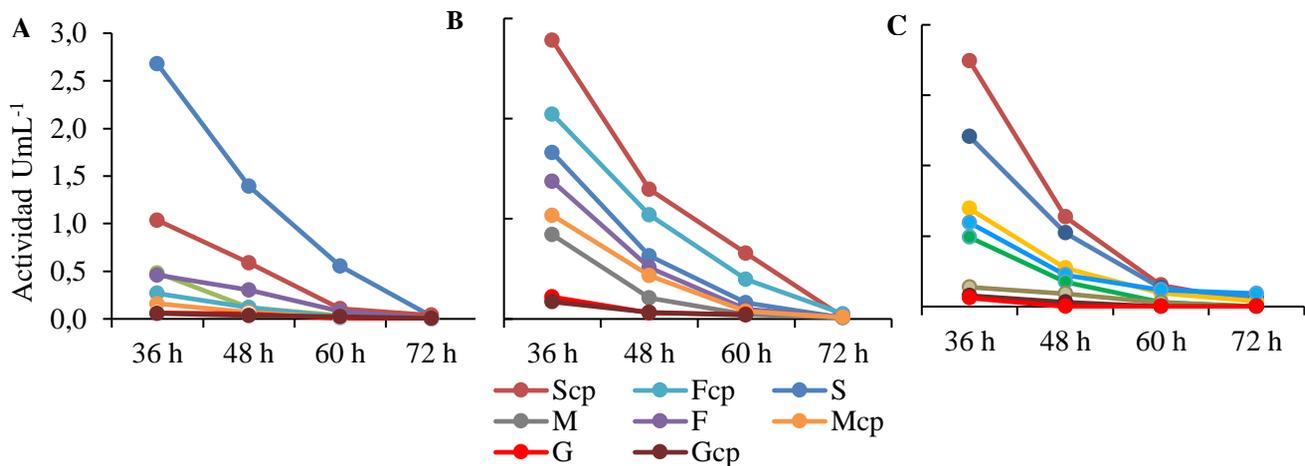
Fuente: Elaboración Propia

### 3.9 Análisis de la actividad enzimática de la lipasa extracelular en co-cultivos de hongo / microalga

La degradación enzimática de la pared celular se ha investigado como un método importante de ruptura de células algales en la extracción y recuperación de componentes intracelulares como los lípidos, debido a la selectividad de degradación de las enzimas. Entre las enzimas utilizadas en la degradación de las paredes celulares de microalgas, se encuentran las celulasas y las lipasas (Sander, & Murthy, 2009). La presencia de estos sistemas enzimáticos en la recolección de algas puede aumentar la susceptibilidad de la celulosa algal a la hidrólisis enzimática y al tratamiento previo de la biomasa a partir de las microalgas para una mayor extracción de lípidos. Muchos investigadores confirmaron que algunas cepas de hongos filamentosos pueden producir diferentes enzimas de degradación durante su crecimiento celular y la enzima se excreta en el medio de cultivo para degradar el polisacárido para apoyar el crecimiento celular (Colla, et al., 2015; Mellon, et al., 2007; Treichel, et al., 2010). En nuestro estudio, suspensión de esporas de las especies *A. flavus*, *A. niger* y *A. oryzae* cultivados en co-cultivos con *C. sorokiniana* en crecimiento mixotrófico condujeron a la producción de agregados o flóculos de hongos / microalga que mostraron rendimientos altos de captura de microalgas en 48 h. La actividad de celulasa extracelular en el sobrenadante de cultivos de co-floculación se detectó para la mayoría de los cultivos. La actividad de la celulasa fue mayor en la etapa de agregación temprana (dentro de las 36 h), tal vez debido a la degradación fúngica de la fracción de la pared celular de la celulosa, y / o la descomposición de material algal y su uso como fuente de carbono y energía (Fraga, et al., 2008).

La aplicación de paja de trigo en la floculación algal asistida por hongos mostró un aumento inducido en las actividades de celulasa, lo que podría ser un factor positivo para reducir la formación de compuestos químicos anti-algales (Wrede, et al., 2014). El Gráfico 2.6 muestra los perfiles de actividad enzimática de celulasa de co-cultivos de algas / hongos para diferentes fuentes de carbono. En general, los co-cultivos suplementados con paja de trigo presentaron mayor actividad de celulasa que los que no lo tenían. Entre las fuentes de carbono utilizadas, la sacarosa parece inducir una mayor producción de celulasa, mientras que la glucosa mostró poca o ninguna producción, principalmente porque no se produjeron agregados miceliales en los co-cultivos.

**Gráfico 2.6** Perfil de actividades enzimáticas de celulasa extracelular a partir de co-cultivos hongo/microalga; (A) *A. flavus/Chlorella*, (B) *A. niger/Chlorella*, y (C) *A. oryzae/Chlorella*. F, G, M, S, y cp. significan fructosa, glucosa, maltosa, sacarosa y con paja de trigo, respectivamente. Los valores son promedios de tres mediciones independientes con una  $P < 0.05$  de significancia



Fuente: Elaboración Propia

### 3.10 Producción de lípidos en pellets de hongos / microalgas y análisis de perfil de ácidos grasos

Los agregados fúngicos de monocultivo con diferentes fuentes de carbono en condiciones de crecimiento mixotrófico mostraron un rango de contenido de lípidos de 2.1 - 3.8% en peso seco con un rango de rendimiento de lípidos de 18 - 83 mg L<sup>-1</sup> después de 60 h de fermentación sumergida en medio gastado BG11 (Tabla 2.3).

Aunque, el rango de contenido de lípidos de los monocultivos de hongos es bastante estrecho, su rango de rendimiento de lípidos es todo lo contrario. Esto se debe a su alto contenido de contenido de biomasa (Figura 8). *A. flavus* y *A. oryzae* mostraron valores de biomasa en base seca más altos y, por lo tanto, valores de rendimiento de lípidos más altos en comparación con monocultivos de *A. niger*.

La cepa *C. sorokiniana* como monocultivo mostró una concentración de lípidos promedio de 15% bajo crecimiento autótrofo, y hasta un contenido de lípidos de 19% cuando se cambia a crecimiento mixotrófico por la adición de una fuente de carbono orgánico en período 12 h /12 h de luz y oscuridad. El contenido de lípidos de los agregados de biomasa hongo/microalga mostró perfiles complejos que dependen de: 1) producción de biomasa, 2) contenido de lípidos en monocultivos y co-cultivos de hongos y algas, y 3) las eficiencias de cosecha de las células de la microalga por los agregados miceliales.

Después de 60 h de co-cultivo de cepas de los hongos seleccionadas con la microalga, la concentración de lípidos en los co-flóculos mostró ser más baja que en los monocultivos algales, pero más alta que los valores de concentración de lípidos en monocultivos de hongos.

Se encontró que los rendimientos totales de lípidos (mg L<sup>-1</sup>) en la mayoría de los agregados de hongos / algas de *C. sorokiniana* con *A. flavus* y *A. oryzae* son similares a la suma de los contenidos de lípidos en los monocultivos de la microalga y de los hongos separados. Los rendimientos de lípidos (mg L<sup>-1</sup>) después de co-cultivar *Chlorella* con *A. niger*, fueron los más bajos de todos los co-cultivos (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3** Producción y rendimiento de lípidos en monocultivos de *Chlorella sorokiniana*, hongos filamentosos seleccionados y en agregados microalga/micelio de co-cultivos de *C. sorokiniana* y hongos

Fuente de carbono	Monocultivos, 60 h fermentación								Fungi/Microalgae co-cultures, 60 h fermentation							
	<i>A. flavus</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. oryzae</i>		<i>C. sorokiniana</i>		<i>A. flavus</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. oryzae</i>			
	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)		
G	3.10 ± 0.2	73.8 ± 3.0	3.60 ± 0.2	42.0 ± 1.4	3.70 ± 0.3	76.2 ± 3.1	19.12 ± 1.0	688.1 ± 25	-	-	-	-	-	-		
F	2.06 ± 0.1	49.9 ± 1.5	2.42 ± 0.2	20.5 ± 0.6	3.06 ± 0.2	65.5 ± 2.2	19.03 ± 1.0	359.4 ± 15	10.71 ± 0.5	353.0 ± 15	12.30 ± 0.5	188.8 ± 5	11.44 ± 0.4	323.9 ± 13		
S	2.45 ± 0.2	60.6 ± 2.0	2.51 ± 0.1	18.1 ± 0.5	2.55 ± 0.1	52.1 ± 1.5	18.64 ± 1.0	334.9 ± 10	10.17 ± 0.4	366.2 ± 18	11.12 ± 0.3	140.7 ± 4	10.71 ± 0.3	340.3 ± 15		
M	2.47 ± 0.3	57.5 ± 1.5	2.39 ± 0.2	23.8 ± 0.7	3.81 ± 0.2	83.7 ± 3.0	18.21 ± 1.0	320.3 ± 12	10.82 ± 0.6	361.2 ± 15	12.18 ± 0.4	158.9 ± 4	10.08 ± 0.3	378.6 ± 17		
Gcp	2.75 ± 0.2	66.4 ± 2.0	2.55 ± 0.2	29.4 ± 1.0	3.75 ± 0.3	82.1 ± 3.6	17.30 ± 1.0	538.8 ± 22	-	-	-	-	-	-		
Fcp	2.10 ± 0.1	46.5 ± 1.5	2.10 ± 0.1	20.8 ± 0.6	3.12 ± 0.2	67.1 ± 2.5	16.71 ± 1.0	269.3 ± 10	9.33 ± 0.4	300.5 ± 13	12.03 ± 0.4	197.5 ± 6	10.19 ± 0.4	293.1 ± 10		
Scp	2.25 ± 0.1	56.6 ± 1.5	2.33 ± 0.1	18.7 ± 0.5	2.77 ± 0.1	55.5 ± 2.0	15.43 ± 1.0	244.5 ± 9	9.59 ± 0.5	290.6 ± 10	11.53 ± 0.3	143.6 ± 3	9.65 ± 0.5	290.3 ± 11		
Mcp	2.48 ± 0.3	59.6 ± 2.0	2.41 ± 0.2	26.9 ± 0.8	3.61 ± 0.3	81.9 ± 3.2	16.70 ± 1.0	250.5 ± 11	9.09 ± 0.3	297.3 ± 12	11.48 ± 0.4	185.4 ± 5	8.26 ± 0.3	299.9 ± 12		
CO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	*14.93 ± 1.0	*284.7 ± 13	-	-	-	-	-	-		

Fuente de carbono	Monocultivos, 60 h fermentación								Co-cultivo hongo/ <i>Chlorella</i> , 60 h fermentación							
	<i>A. flavus</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. oryzae</i>		<i>C. sorokiniana</i>		<i>A. flavus</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. oryzae</i>			
	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)	Lípidos (%)	Rendimiento (mg/L)		
G	3.10 ± 0.2	73.8 ± 3.0	3.60 ± 0.2	42.0 ± 1.4	3.70 ± 0.3	76.2 ± 3.1	19.12 ± 1.0	688.1 ± 25	-	-	-	-	-	-		
F	2.06 ± 0.1	49.9 ± 1.5	2.42 ± 0.2	20.5 ± 0.6	3.06 ± 0.2	65.5 ± 2.2	19.03 ± 1.0	359.4 ± 15	10.71 ± 0.5	353.0 ± 15	12.30 ± 0.5	188.8 ± 5	11.44 ± 0.4	323.9 ± 13		
S	2.45 ± 0.2	60.6 ± 2.0	2.51 ± 0.1	18.1 ± 0.5	2.55 ± 0.1	52.1 ± 1.5	18.64 ± 1.0	334.9 ± 10	10.17 ± 0.4	366.2 ± 18	11.12 ± 0.3	140.7 ± 4	10.71 ± 0.3	340.3 ± 15		
M	2.47 ± 0.3	57.5 ± 1.5	2.39 ± 0.2	23.8 ± 0.7	3.81 ± 0.2	83.7 ± 3.0	18.21 ± 1.0	320.3 ± 12	10.82 ± 0.6	361.2 ± 15	12.18 ± 0.4	158.9 ± 4	10.08 ± 0.3	378.6 ± 17		
Gcp	2.75 ± 0.2	66.4 ± 2.0	2.55 ± 0.2	29.4 ± 1.0	3.75 ± 0.3	82.1 ± 3.6	17.30 ± 1.0	538.8 ± 22	-	-	-	-	-	-		
Fcp	2.10 ± 0.1	46.5 ± 1.5	2.10 ± 0.1	20.8 ± 0.6	3.12 ± 0.2	67.1 ± 2.5	16.71 ± 1.0	269.3 ± 10	9.33 ± 0.4	300.5 ± 13	12.03 ± 0.4	197.5 ± 6	10.19 ± 0.4	293.1 ± 10		
Scp	2.25 ± 0.1	56.6 ± 1.5	2.33 ± 0.1	18.7 ± 0.5	2.77 ± 0.1	55.5 ± 2.0	15.43 ± 1.0	244.5 ± 9	9.59 ± 0.5	290.6 ± 10	11.53 ± 0.3	143.6 ± 3	9.65 ± 0.5	290.3 ± 11		
Mcp	2.48 ± 0.3	59.6 ± 2.0	2.41 ± 0.2	26.9 ± 0.8	3.61 ± 0.3	81.9 ± 3.2	16.70 ± 1.0	250.5 ± 11	9.09 ± 0.3	297.3 ± 12	11.48 ± 0.4	185.4 ± 5	8.26 ± 0.3	299.9 ± 12		
CO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	*14.93 ± 1.0	*284.7 ± 13	-	-	-	-	-	-		

\**C. sorokiniana* en crecimiento autótrofo

Fuente: Elaboración Propia

La composición de los ácidos grasos medidos como metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) en los lípidos extraídos de monocultivos de biomasa seca y co-cultivos de agregados microalga / hongo secos se muestra en la Tabla 2.4. Los ácidos grasos de lípidos fúngicos se representaron principalmente por ácido palmítico (C16: 0), ácido esteárico (C18: 0), ácido oleico (C18: 1), ácido linoleico (C18: 2), que concuerdan con otros estudios (Fraga, et al., 2008; Suutari, 1995; Nemeč, Jernejc & Cimerman, 1997).

Los lípidos de microalgas puros mostraron diferentes perfiles de ácidos grasos que los monocultivos de hongos. La composición de ácidos grasos de los lípidos de los agregados microalga / hongo se reporta por la mezcla de los ácidos grasos presentes tanto en hongos como en la microalga *Chlorella*. En todos los casos, tanto *Chlorella sorokiniana* como las cepas de hongos contribuyeron a la concentración de ácido linoleico (C18: 2). *A. oryzae* fue un contribuyente principal del ácido linoleico (C18: 2) junto con la microalga *C. sorokiniana* bajo crecimiento mixotrófico.

**Table 2.4** Perfil de ácidos grasos de *Chlorella sorokiniana*, *A. flavus*, *A. niger*, and *A. oryzae*. Los lípidos se extrajeron de biomasa separada de monocultivos y co-cultivos

Especie	Crecimiento	Tiempo (h)	Composición relativa de ácidos grasos (%) en peso						
			16:0	16:1	16:2	18:0	18:1	18:2	18:3
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Fotoautotrófico	240	22.10	5.77	4.51	3.25	4.62	27.51	32.24
	Mixotrófico		25.81	2.46	5.47	2.71	14.76	32.25	16.54
<i>Aspergillus flavus</i>	Mixotrófico-Monocultivo	120	16.80	0.80	0.00	10.66	15.29	52.05	4.40
	Mixotrófico-Co-cultivo		28.19	1.59	1.38	3.56	12.49	37.96	14.83
<i>Aspergillus niger</i>	Mixotrófico-Monocultivo	120	18.59	0.91	0.00	13.27	21.16	41.51	4.56
	Mixotrófico-Co-cultivo		26.07	2.14	4.12	2.56	14.20	34.19	16.72
<i>Aspergillus oryzae</i>	Mixotrófico-Monocultivo	120	17.41	0.91	0.00	4.90	12.80	56.67	7.31
	Mixotrófico-Co-cultivo		25.49	1.55	4.09	1.63	13.01	37.70	16.53

C16:0 palmítico; C16:1 palmitoleico; C16:2 7,10-hexadecadienoico; C18:0 esteárico; C18:1 oleico; C18:2 linoleico; C18:3 linolénico.

Fuente: Elaboración Propia

### 3.11 Co-floculación agitada con aire contra co-floculación con agitación rotatoria

Para explorar más a fondo el potencial de aplicación de la co-floculación, se probó la co-floculación de hongos / algas utilizando burbujas de aire como proveedor de oxígeno y agitador del co-cultivo. Para encontrar la técnica de inoculación de hongos más adecuada, se investigaron dos alternativas:

- Inoculación directa de las esporas fúngicas a los frascos con cultivo algal maduro
- Inoculación con pre-cultivo fúngico de esporas germinadas a los frascos con cultivo algal maduro

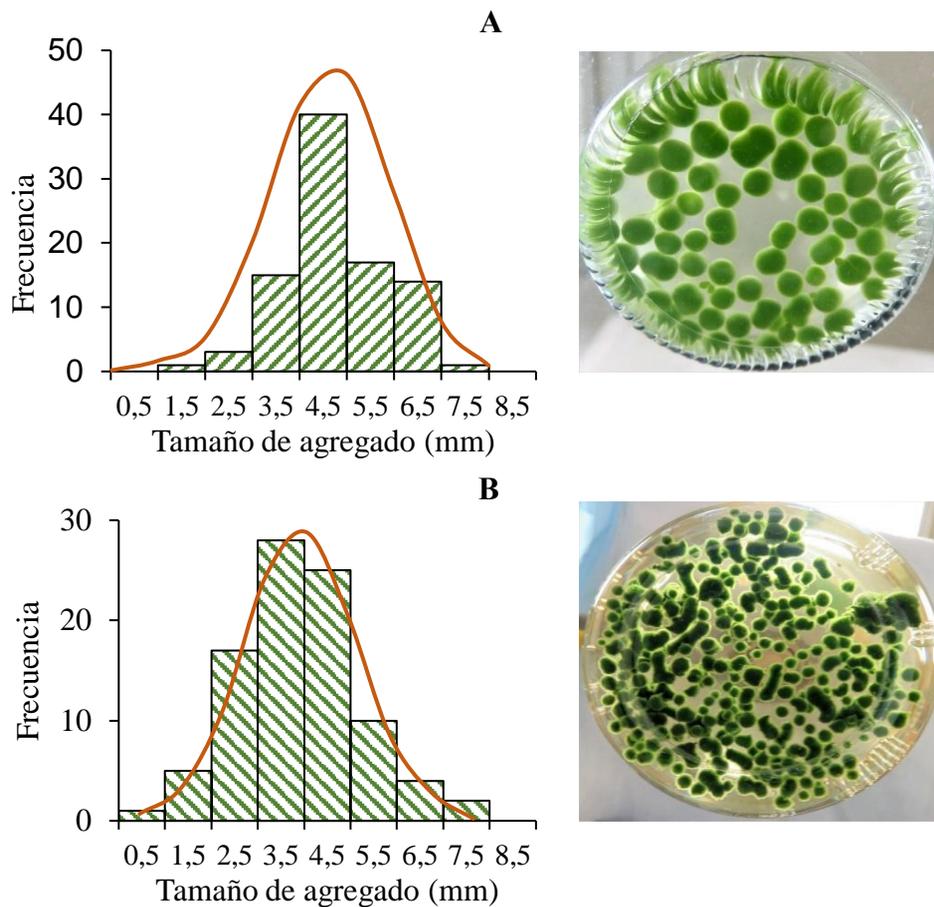
Ambas alternativas, se probaron con las tres cepas de hongos seleccionados (*A. flavus*, *A. niger* y *A. oryzae*) y las mismas condiciones que en el cultivo mixotrófico. La inoculación con esporas directas en los matraces de cultivo fracasó debido a la fuerte tendencia de las esporas a flotar en la superficie del caldo. Creemos que esta tendencia fue incrementada por la formación de espuma y la baja intensidad de agitación por el burbujeo de aire en los co-cultivos, lo que hace que los resultados de un experimento como este no tengan sentido.

La inoculación de cultivos de la microalga con pre-cultivo de esporas mixotróficas que consisten en esporas de hongos germinados en matraces con agitación rotatoria y otro co-cultivo de burbujeo de aire, resultó para los tres co-cultivos de hongos y de *Chlorella* en la formación de flóculos esféricos verdes suspendidos por la aireación. El burbujeo de aire se ajustó a una velocidad de aireación de 2.5 vvm (volumen aire / volumen medio / min.).

La temperatura y el pH se mantuvieron a  $29 \pm 1.0$  °C y  $5.5 \pm 0.05$ , respectivamente, durante el co-cultivo (72 h) y las muestras se colectaron cada 12 h. En comparación con los co-cultivos con agitación rotatoria, no se observaron diferencias significativas en función de la eficiencia de cosecha ni en la biomasa de los agregados microalga / micelio finales.

Los diámetros promedio de los agregados microalga / micelio en los co-cultivos con agitación rotatoria y con burbujeo de aire fueron de  $5.19 \pm 1.27$  mm y  $4.38 \pm 1.35$  mm, respectivamente (Figura 2.5). Sin embargo, se observó una reducción más rápida de los azúcares (fructosa 100%, sacarosa 60% y maltosa 70% después de 48 h de co-cultivo) en el burbujeo de aire, en comparación con los co-cultivos con agitación rotatoria.

**Figura 2.5** Distribución de tamaño de flóculos *Chlorella*/micelio formados por co-cultivos después de 60 h y apariencia de agregados microalga / micelio en (A) co-floculación con agitación rotatoria y (B) co-floculación por agitación con borboteo de aire.



Fuente: Elaboración Propia

#### 4. Conclusiones

En este estudio, los co-cultivos mixotróficos de *C. sorokiniana* con hongos filamentosos para la separación de microalgas por formación de agregados de hongos mostraron las mejores eficiencias de cosecha cuando se usó la cepa de *Aspergillus flavus* en comparación con las cepas de *A. oryzae* y *A. niger*, 98.6, 93.2, y 88.3% después de 60 h de co-cultivo, respectivamente.

La fructosa y la maltosa demostraron ser las mejores fuentes de carbono orgánico para la co-floculación eficiente de hongos / microalga cuando los cultivos se complementaron con fuentes de nitrógeno y fosfato inorgánicos (5 y 10 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). También se encontró que la co-floculación de algas y hongos en el crecimiento de burbujas de aire condujo a una utilización eficiente de azúcares y agregados densos más verdes.

El rango de pH de 5.5 a 6.0 mostró ser un pH adecuado para la formación de agregados de hongos / microalga sin comprometer la integridad de las células algales. Esto indica la viabilidad del uso de co-cultivos mixotróficos de hongos / algas que crecen a 30 °C como método económico de cosecha de la microalga *C. sorokiniana*.

El tamaño del flóculo formado por agitación rotatoria fue mayor que el flóculo formado por agitación por borboteo de aire y así se incrementa también el contenido de biomasa algal atrapada. La utilización de fuentes alternativas de carbono como la paja de trigo en el co-cultivo hongo/microalga tuvo como beneficio un incremento en la producción de enzimas celulasas sintetizadas por el crecimiento del hongo filamentoso. Por lo tanto, este trabajo proporciona una perspectiva económica y eficiente para explorar la cosecha de microalgas.

Se recomienda hacer estudios de optimización de los parámetros físicos y nutricionales utilizados en el desarrollo de los co-cultivos de las cepas *Aspergillus flavus* y *Chlorella sorokiniana* para su co-floculación.

## 5. Agradecimientos

La autora Lydia Toscano Palomar agradece al Consejo de Ciencia y Tecnología de México por el soporte otorgado y a todas las personas que colaboraron académica y económicamente en la realización del presente trabajo Posdoctoral.

## 6. Referencias

- Ahmad, A. L., Yasin, N. M., Derek, C. J. C., & Lim, J. K. (2011). Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *15*(1), 584-593.
- Almakarem, A. S. A., Heilman, K. L., Conger, H. L., Shtarkman, Y. M., & Rogers, S. O. (2012). Extraction of DNA from plant and fungus tissues in situ. *BMC research notes*, *5*(1), 266.
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *41*, 1489-1500.
- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology* (Vol. 10). Cambridge University Press.
- Colla, L.M., et al., (2015). Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. *BioMed research international*, 2015.
- Ferreira, J. A., Mahboubi, A., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2016). Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. *Bioresource technology*, *215*, 334-345.
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., ... & Balzer, C. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, *478*(7369), 337-342.
- Fraga, M.E., et al., (2008). Characterization of *Aspergillus* species based on fatty acid profiles. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *103*(6), 540-544.
- Gibbs, P. A., Seviour, R. J., & Schmid, F. (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Critical reviews in biotechnology*, *20*(1), 17-48.
- Gomez, J.A., Höffner, K. and Barton P.I. (2016). From sugars to biodiesel using microalgae and yeast. *Green Chemistry*, *18*(2), 461-475.
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C., & Simões, M. (2013). Green fuel production: processes applied to microalgae. *Environmental chemistry letters*, *11*(4), 315-324.
- Gong, Y., & Jiang, M. (2011). Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnology letters*, *33*(7), 1269-1284.
- Gregory, J. (2005). *Particles in water: properties and processes*. CRC Press.
- Guerrero, J., Yagüe, E., & Estevez, M. P. (1992). Cellulase production by lichens. *Journal of plant physiology*, *140*(4), 508-510.
- Gultom, S., & Hu, B. (2013). Review of microalgae harvesting via co-pelletization with filamentous fungus. *Energies*, *6*(11), 5921-5939.
- Gultom, S.O., C. Zamalloa, and B. Hu. (2014). Microalgae harvest through fungal pelletization—co-culture of *Chlorella vulgaris* and *Aspergillus niger*. *Energies*, *7*(7), 4417-4429.

- Kim, G., Mujtaba, G., & Lee, K. (2016). Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production. *Algae*, *31*(3), 257-266.
- Lacap, D. C., Hyde, K. D., & Liew, E. C. Y. (2003). An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*.
- Lammers, P.J., et al., (2017). Review of the cultivation program within the National Alliance for Advanced Biofuels and Bioproducts. *Algal research*, *22*, 166-186.
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2014). Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, *66*, 204-213.
- Liu, J., et al. (2010). Production potential of *Chlorella zofingienensis* as a feedstock for biodiesel. *Bioresource technology*, *101*(22), 8658-8663.
- Mackay, S., Gomes, E., Holliger, C., Bauer, R., & Schwitzguébel, J. P. (2015). Harvesting of *Chlorella sorokiniana* by co-culture with the filamentous fungus *Isaria fumosorosea*: A potential sustainable feedstock for hydrothermal gasification. *Bioresource technology*, *185*, 353-361.
- Mellon, J. E., Cotty, P. J., & Dowd, M. K. (2007). *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Applied microbiology and biotechnology*, *77*(3), 497-504.
- Milledge, J. J., & Heaven, S. (2013). A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *12*(2), 165-178.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, *31*(3), 426-428.
- Muradov, N., et al., (2015). Fungal-assisted algal flocculation: application in wastewater treatment and biofuel production. *Biotechnology for biofuels*, *8*(1), 24.
- Nair, R. B., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2016). Mycelial pellet formation by edible ascomycete filamentous fungi, *Neurospora intermedia*. *AMB Express*, *6*(1), 31.
- Nemec, T., Jernejc, K., & Cimerman, A. (1997). Sterols and fatty acids of different *Aspergillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, *149*(2), 201-205.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, *45*(1), 11-36.
- Prajapati, S. K., Kumar, P., Malik, A., & Choudhary, P. (2014). Exploring pellet forming filamentous fungi as tool for harvesting non-flocculating unicellular microalgae. *BioEnergy Research*, *7*(4), 1430-1440.
- Prasher, I.B., Chandel, V.C. & Chauhan, R. (2014). Effect of carbon and nitrogen sources on growth and luminescence of *Panellus stipticus* (Bull.) P. Karst. *Journal of Advanced Botany and Zoology*, *1*(4), 4.
- Qiao, H. and Wang, G. (2009). Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. *27*(4), 762-768.
- Sander, K. B., & Murthy, G. S. (2009). Enzymatic degradation of microalgal cell walls. In *2009 Reno, Nevada, June 21-June 24, 2009* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Shin, W. S., Lee, D., Kim, S., Jeong, Y. S., & Chun, G. T. (2017). Development of Miniaturized Culture Systems for Large Screening of Mycelial Fungal Cells of *Aspergillus terreus* Producing Itaconic Acid. *Journal of microbiology and biotechnology*, *27*(1), 101-111.

- Suutari, M. (1995). Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*). *Archives of microbiology*, *164*(3), 212-216.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and bioprocess technology*, *3*(2), 182-196.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M., & Hoadley, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of renewable and sustainable energy*, *2*(1), 012701.
- Ummalyma, S.B., et al., (2017). Bioflocculation: an alternative strategy for harvesting of microalgae—an overview. *Bioresource technology*, *242*, 227-235.
- Vandamme, D., Foubert, I., & Muylaert, K. (2013). Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in biotechnology*, *31*(4), 233-239.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, *18*(1), 315-322.
- Wrede, D., et al., (2014). Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. *PLoS One*, *9*(11), e113497.
- Zamalloa, C., Gultom, S. O., Rajendran, A., & Hu, B. (2017). Ionic effects on microalgae harvest via microalgae-fungi co-pelletization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *9*, 145-155.
- Zhang, J. and J. Zhang, (2016). The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. *Critical reviews in biotechnology*, *36*(6), 1066-1077.
- Zhang, J., & Hu, B. (2012). A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. *Bioresource Technology*, *114*, 529-535.
- Zhang, Y. P., Hong, J., & Ye, X. (2009). Cellulase assays. In *Biofuels* (pp. 213-231). Humana Press, Totowa, NJ.
- Zhou, W., et al., (2013). Filamentous fungi assisted bio-flocculation: a novel alternative technique for harvesting heterotrophic and autotrophic microalgal cells. *Separation and Purification Technology*, *107*, 158-165.
- Zou, Y., Luo, S., & Li, W. (2016, April). Effects of glucose and yeast cream content on the Pelletization Behavior of Fungi-*Chlorella* Sp. Symbiosis System. In 2015 4th International Conference on Sustainable Energy and Environmental Engineering. Atlantis Press.