

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO-NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN  
DE BIOMASA, HIDROCARBUROS Y LÍPIDOS EN  
*Botryococcus braunii* UIS 003**

**VICTOR ALBERTO CASTELLANOS ANGARITA  
MARIA DEL PILAR TORRES LUNA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2014**

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO-NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN  
DE BIOMASA, HIDROCARBUROS Y LÍPIDOS EN  
*Botryococcus braunii* UIS 003**

**VICTOR ALBERTO CASTELLANOS ANGARITA  
MARIA DEL PILAR TORRES LUNA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:  
Ingeniero Químico**

**Director**

**CRISOSTOMO BARAJAS FERREIRA  
Ingeniero Químico M.Sc**

**Codirector**

**Andrés Fernando Barajas Solano  
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por sus infinitas bendiciones, por permitirme culminar una etapa importante en mi vida, a mis padres Luis Alberto y Cecilia por sus sabios consejos y su apoyo constante, a mis hijos Juan Andrés y David Santiago quienes son el motor de mi vida y amo profundamente.

Al Ingeniero Crisóstomo Barajas Ferreira por la oportunidad de trabajar en el grupo de investigación y por su apoyo como director del proyecto.

Al Biólogo Andrés Fernando Barajas Solano por su incondicional ayuda, guía y paciencia en cada uno de los días de extenso trabajo. Por enseñarme que todo buen resultado se da por la perseverancia y la disciplina. A el infinitas gracias por compartir su conocimiento.

A la ingenieras Ana María Ardila, Paola Sanguino y Bibiana García por acogerme y por hacer de cada momento vivido en el laboratorio de biomasa una experiencia invaluable en mi vida.

*MARIA DEL PILAR TORRES LUNA*

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	13
1. DESCRIPCIÓN METODOLOGICA	16
1.1 MICROORGANISMO.	16
1.2 FUENTE DE NITRÓGENO Y CARBONO.	16
1.3 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS.	17
1.3.1 Crecimiento celular (peso seco)	17
1.3.2 Cuantificación exopolisacaridos (Dubois et al., 1956).	17
1.3.3 Cuantificación de Lípidos totales (Blight & Dyer, 1959).	18
1.3.4 Cuantificación de hidrocarburos (Eroglu & Melis, 2010)	18
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS	20
2.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA VARIANDO LA FUENTE DE NITRÓGENO	20
2.2 PRODUCCIÓN DE BIOMASA VARIANDO LA FUENTE DE CARBONO	23
2.3 MEJORAMIENTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO	27
3. CONCLUSIONES	33
4. RECOMENDACIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Concentraciones de Nitrógeno.	17
Tabla 2. Concentraciones de Carbono.	17
Tabla 3. Mejores concentraciones de Nitrógeno para la producción de biomasa	22
Tabla 4. Producción de Carbohidratos e Hidrocarburos según la fuente de nitrógeno	23
Tabla 5. Producción final de biomasa al día 15	25
Tabla 6. Producción de Carbohidratos e Hidrocarburos según la fuente de carbono	26
Tabla 7. Lista de precios fuentes de Carbono y Nitrógeno en Bucaramanga	27
Tabla 8. Diseño de experimentos	27

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Producción de biomasa variando la fuente de Nitrógeno	20
Figura 2. Concentración de biomasa variando la fuente de Nitrógeno	21
Figura 3. Producción de biomasa variando las fuentes de carbono	24
Figura 4. Producción de biomasa siguiendo la metodología de la relación carbono/ nitrógeno	28
Figura 5. Superficie de respuesta para la producción de hidrocarburos	29
Figura 6. Superficie de respuesta para la producción de Carbohidratos	30
Figura 7. Producción de Lípidos	31

## RESUMEN

**TÍTULO:** EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO-NITRÓGENO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA, HIDROCARBUROS Y LÍPIDOS A PARTIR DE *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* UIS 003

**AUTORES:** VICTOR ALBERTO CASTELLANOS ANGARITA,  
MARIA DEL PILAR TORRES LUNA.\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Microalga, *Botryococcus braunii*, biomasa, hidrocarburos, lípidos.

El género *Botryococcus* compila una gran variedad de microalgas verdes acumuladoras de hidrocarburos. Estas se clasifican en 3 tipos o razas basadas en la estructura química de los hidrocarburos producidos identificados en 3 tipos de razas fitoquímicas (A, B y L) donde el tipo B produce hidrocarburos triterpenos  $C_{30}$ - $C_{37}$  mejor conocidos como botriococenos y escualenos metilados  $C_{31}$ - $C_{34}$  por lo cual son consideradas como candidatas para la producción de biocombustibles sin embargo uno de los principales problemas es la producción continua tanto de lípidos como de hidrocarburos, por lo cual es necesario encontrar la fuente de carbono que maximice la producción tanto de biomasa mientras se mejora la obtención e los metabolitos anteriormente mencionados.

En el presente estudio se evaluó la viabilidad de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, teniendo como variables de respuesta la producción de biomasa y la concentración final de hidrocarburos y lípidos.

Se encontró que la fuente de carbono fue  $Na_2CO_3$  permitiendo obtener concentraciones de biomasa de 0.75 g/L en 15 días con un contenido lipídico de 27% e hidrocarburos de 2317.58  $\mu\text{g/g}$  de biomasa; de igual forma la mejor fuente de nitrógeno fue  $KNO_3$  permitiendo obtener concentraciones de biomasa de 0.64 g/L en 15 días con un contenido de hidrocarburos de 8.70  $\mu\text{g/g}$  de biomasa; por otra parte la implementación de un diseño de experimentos para mejorar la relación carbono/nitrógeno permitió optimizar los resultados, permitiendo obtener concentraciones de biomasa de 1 g/L en 15 días con un contenido lipídico de 42% e hidrocarburos de 3000  $\mu\text{g/g}$  de biomasa.

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director. M. Sc Crisostomo Barajas Ferreira. Codirector: Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano

## ABSTRACT

**TITLE:** EFFECT OF CARBON-NITROGEN RATIO FOR THE BIOMASS PRODUCTION, HYDROCARBONS AND LIPIDS ON BOTRYOCOCCUS BRAUNII UIS 003.

**AUTORS:** VICTOR ALBERTO CASTELLANOS ANGARITA,  
MARIA DEL PILAR TORRES LUNA.\*\*

**KEY WORDS:** Microalgae, botryococcus braunni, biomass, hydrocarbons, lipids.

The genus Botryococcus compiles a huge variety of green microalgae which pile up hydrocarbons. These ones are classified in three types or breeds based on chemical structure of hydrocarbons, identification in three types of breeds phytochemicals ( A, B & L), where B type produce triterpene hydrocarbons C30-C37 best known as botriococenos and methylated squalene C31-C34 whereby are considerate as candidates for production of biofuels, however one of the principal problems is the continuous production both lipids as hydrocarbons, for that is necessary find the source of carbon that maximized biomass production, while obtaining the above mentioned metabolites is improved.

In the present study was evaluated the viability of different carbon and nitrogen sources, taking in response biomass production and final concentration of hydrocarbons and lipids.

It was found that the carbon source was  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , allowing to obtain biomass concentrations 0.75 g/L in 15 days, with a lipid content of 27%, and hydrocarbons of 2317.58  $\mu\text{g/g}$  of biomass; likewise the best nitrogen source was  $\text{KNO}_3$ , allowing to obtain biomass concentrations 0.64 g/L in 15 days, with a content of hydrocarbons of 8.70  $\mu\text{g/g}$  of biomass. Moreover, implementing a design of experiments to improve the carbon/nitrogen ratio, allowed to optimize the results, allowing to obtain biomass concentrations of 1 g / L in 15 days with a lipid content of 42% and hydrocarbon of 3000 mg / g biomass.

---

\* Graduation Project

\*\* Physical- Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering . Departament. Director: M. Sc. Crisostomo Barajas Ferreira. Co-director: Biologist. Andres Fernando Barajas Solano.

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas son un grupo de microorganismos unicelulares o multicelulares simples, para su crecimiento las microalgas necesitan dos cosas: una es la fuente de carbono (normalmente en forma de CO<sub>2</sub>), otra es la fuente de energía, en este caso la luz, pero no cualquier luz, sino aquella conocida como la radiación fotosintéticamente activa (o PAR de sus siglas en inglés) (Lee 1999, Csogor *et al.*, 2001); este tipo de microorganismos son considerados como una de las fuentes renovables más prometedoras para la producción de diversos productos para las industrias farmacéuticas, alimentarias y para la producción de biocombustibles, ya que posee grandes ventajas como: rápido crecimiento, alta eficiencia en la fijación de CO<sub>2</sub>, no compiten por tierras cultivables y agua potable (Chen *et al.*, 2013).

*Botryococcus braunii* Kützing, F.T. (1849) posee un contenido inusualmente alto de lípidos al igual que hidrocarburos mejor conocidos como botriococenos, el cual varía entre el 15 y 75 % de su peso seco; gracias a esto, esta alga se ha perfilado como una fuente renovable de biocombustibles (Largeau *et al.*, 1980; Casadevall *et al.*, 1985; Wolf *et al.*, 1985; Kojima & Zhang, 1999) en especial en procesos térmicos de producción de biocombustibles, en los que una composición tan particular como la de esta alga puede tener grandes beneficios y ventajas frente a otras fuentes de biomasa que están en desarrollo para este fin como son los residuos agroindustriales lignocelulósicos.

El género *Botryococcus* compila una gran variedad de microalgas verdes acumuladoras de hidrocarburos. Estas se clasifican en 3 tipos o razas basadas en la estructura química de los hidrocarburos producidos. el tipo A produce n-alkadienos (C<sub>23</sub>-C<sub>33</sub>, principalmente hidrocarburos dienos y trienos), el tipo B produce hidrocarburos triterpenos C<sub>30</sub>-C<sub>37</sub> mejor conocidos como botriococenos y escualenos metilados C<sub>31</sub>-C<sub>34</sub>, mientras que las tipo L producen licopadienos, los

cuales son tetraterpenoides simples (Metzger & Largeau, 2005). Debido a estas composiciones las algas son consideradas como fuentes de cierto tipo de crudos en su biogénesis (Moldowan & Seifert, 1980).

Aunque mucho ha sido estudiado desde el Bloom en el río Darwin en Australia en 1979, existen diferentes barreras que impiden el cultivo masivo de esta microalga. En primera instancia, esta microalga posee un tiempo de crecimiento muy lento, por lo cual, un cultivo abierto puede ser colonizado por bacterias, cianobacterias e incluso otras microalgas (Metzger & Casadevall, 1992).

Estudios como los adelantados por Dayananda *et al.*, (2005, 2006 y 2007) y Ranga Rao (2007, 2010), dan luces sobre cómo se puede obtener un cultivo saludable de esta especie en reactores abiertos utilizando una especie de la raza A.

Existen diferentes estudios sobre el mejoramiento del medio de cultivo, los cuales van desde la mejor fuente de carbono (Linh *et al.*, 2010; Tanoi *et al.*, 2011; Bazaes *et al.*, 2012; Rao & Sarada, 2012), nitrógeno (Dayananda *et al.*, 2007) y fósforo (An *et al.*, 2003) y otros componentes menores, hasta del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en la deposición de botriococenos (Ge *et al.*, 2011).

Otros estudios más completos como el de Ruangsomboon (2011), evalúan una gran cantidad de nutrientes (nitrógeno, fósforo y hierro), intensidades lumínicas y ciclos luz/oscuridad, encontrando que al igual que en otras algas, al disminuir la concentración inicial de nitrógeno, es posible aumentar la deposición de lípidos, además de aumentar la productividad de botriococenos. No obstante, cada una de estas variables fue evaluada por separado lo que no permite visualizar un sistema integral de cultivo de *B. braunii*, ya que aunque se conozcan cada una de estas variables por separado, se desconoce por completo el efecto de su interacción en la producción de botriococenos, debido a que en organismos fotosintéticos hasta el 50% del carbono fijado (en forma de CO<sub>2</sub>) se destina para la fijación del

nitrógeno (Huppe & Turpin, 1994), por lo cual la optimización de las condiciones de cultivo *B. braunii* es esencial para el desarrollo comercial y rentable en la producción de biocombustible. Sin embargo, muchos investigadores que abordan este tema han utilizado diferentes cepas, lo que dificulta proponer las mejores condiciones de cultivo para todas las cepas de *B. braunii*. Sin lugar a dudas, las condiciones de cultivo óptimas son propias de cada cepa específica.

Trabajos recientes desarrollados en el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP-ECOPETROL) han demostrado que gracias a su composición, esta cepa de *B. braunii* produce altos rendimientos de bio-aceite.

Por lo cual aunque se tenga mucho en contra por lo lejos que puede estar el desarrollo comercial de las algas como fuente de biomasa para biocombustibles es posible defender la investigación en este campo (Guzmán, Comunicación personal, 2012).

El presente trabajo tiene como objetivo obtener la mayor cantidad de biomasa hidrocarburos y lípidos producidos por *B. braunii* evaluando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno y diferentes concentraciones de estos; una vez obtenidos la mejor fuente de carbono y nitrógeno se procederá a evaluar el efecto de sus concentraciones en la producción final de biomasa y la concentración de lípidos e hidrocarburos.

## 1. DESCRIPCIÓN METODOLOGICA

### 1.1 MICROORGANISMO.

Se utilizó la microalga *Botryococcus braunii* obtenida de un lago ubicado en el municipio de Porce, Antioquia y aislada en el Laboratorio de Transformación de Biomasa del grupo de investigación CIDES de la Universidad Industrial de Santander; la cepa se mantuvo en el medio de cultivo Bold Basal modificado (MBBM). Cada litro de medio de cultivo está compuesto por: macronutrientes  $\text{NaNO}_3$  (1,5 g/L), (Moles)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $3,04 \times 10^{-4}$ )  $\text{NaCl}$  ( $4,28 \times 10^{-4}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $4,31 \times 10^{-4}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1,29 \times 10^{-3}$ ),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $1,70 \times 10^{-4}$ ) y micronutrientes (g/L)  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $3,07 \times 10^{-5}$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $7,28 \times 10^{-6}$ ),  $\text{MoO}_3$  ( $4,93 \times 10^{-6}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $6,29 \times 10^{-6}$ ),  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $1,68 \times 10^{-6}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $1,85 \times 10^{-4}$ ), EDTA ( $1,71 \times 10^{-4}$ ), KOH ( $5,53 \times 10^{-4}$ ),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1,79 \times 10^{-5}$ ) y utilizando reactores cilíndricos de diámetro interno de 14cm y 35cm altura con un volumen del cultivo de 2 L. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 0,6 L/min.

### 1.2 FUENTE DE NITRÓGENO Y CARBONO.

Se probaron 3 formas diferentes de nitrógeno ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ), dividido en 4 fuentes ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  y  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ), además se probaron 3 diferentes concentración de los anteriores fuentes (Tabla 1). Las concentraciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  y  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  fueron ajustadas teniendo en cuenta la cantidad de N en las diferentes concentraciones de  $\text{KNO}_3$ ; Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

**Tabla 1. Concentraciones de Nitrógeno.**

<b>KNO<sub>3</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>NaNO<sub>3</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O</b> <b>(g/L)</b>
1,50	1,26	0,45	0,71
0,75	0,63	0,22	0,36
0,38	0,32	0,11	0,18

Para la fuente de carbono se utilizaron 3 fuentes, 2 inorgánicas (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaHCO<sub>3</sub>) y una fuente orgánica (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) y evaluando 3 concentraciones, teniendo en cuenta la concentración de NaHCO<sub>3</sub> utilizadas por Rao et al., (2012); Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

**Tabla 2. Concentraciones de Carbono.**

<b>NaHCO<sub>3</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub></b> <b>(g/L)</b>
2,00	2,52	0,98
1,00	1,26	0,49
0,50	0,63	0,24

### **1.3 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS.**

Crecimiento celular (peso seco), lípidos totales, hidrocarburos y carbohidratos fueron determinados utilizando los métodos descritos en Moheimani *et al.* (2013).

**1.3.1 Crecimiento celular (peso seco)** Una vez cada 5 días durante 15 días se tomaron 20 mL de medio de cultivo, los cuales se filtraron utilizando filtros Whatman GF/C pre-combustionados durante 1 hora a 100°C. Una vez terminado el proceso los filtros fueron llevados a horno durante 1 hora a 100°C seguido por 12 horas en desecador hasta alcanzar peso constante.

**1.3.2 Cuantificación exopolisacaridos (Dubois et al., 1956).** Se tomó 1 mL del medio libre de células (obtenido a partir del medio residual de la filtración para

peso seco) y se le agregaron 0,5 mL de fenol al 5% (p/v) y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado; la mezcla se homogenizó utilizando un vortex durante 2 minutos a velocidad media (según especificaciones del equipo). Finalmente, cada una de estas muestras fue transferida a las celdas colorimétricas y se midió la absorbancia a 485nm (para la cuantificación de glucosa) en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

**1.3.3 Cuantificación de Lípidos totales (Blight & Dyer, 1959).** Al final de la experimentación se tomaron 20 mL, los cuales se centrifugaron a 3400 rpm durante 20 minutos, al pellet se le agregaron 5.7 mL de solución de Bligh y Dyer y 5 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro; la mezcla se homogenizó con vortex a velocidad máxima durante 15 minutos; transcurrido el tiempo la mezcla se llevó a centrifuga a 3400 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se guardó en tubos de vidrio de 50 mL; el pellet restante se llevó a una segunda extracción con 5.7 mL de solución y homogenización en vortex por 5 minutos y luego se lleva de nuevo a centrifuga.

Los dos sobrenadantes se mezclaron en los tubos de vidrio y se agregaron 3 mL de cloroformo analítico. La mezcla se dejó en nevera durante 24 horas para separar las fases (agua y cloroformo con los lípidos).

Una vez transcurridas las 24 horas se retiró la capa de agua, los lípidos se traspasaron a cajas de Petri previamente pesadas y llevadas a horno a 38°C hasta evaporar el cloroformo; las cajas de Petri con los lípidos se llevaron a desecador hasta alcanzar peso constante.

**1.3.4 Cuantificación de hidrocarburos (Erogul & Melis, 2010)** Al final de la experimentación se tomaron 20 mL, los cuales se centrifugaron a 3400 rpm durante 20 minutos, al pellet se le agregaron 5 mL de Heptano grado analítico y 5 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro; la mezcla se homogenizó con

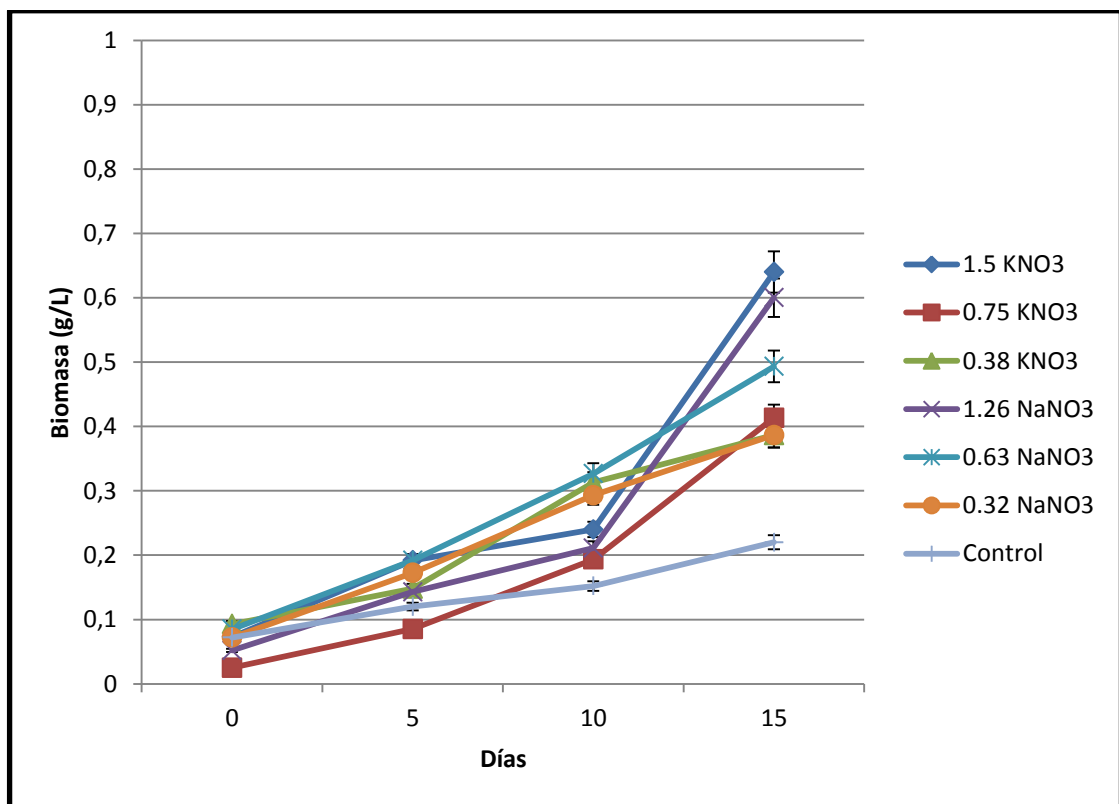
vortex a velocidad máxima durante 15 minutos; transcurrido el tiempo se agregaron 10 mL de agua destilada para separar la biomasa del extracto de hidrocarburos. Finalmente, cada una de las muestras fue transferida a las celdas de cuarzo y se midió la absorbancia a 190nm (para la cuantificación de escualeno) en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

## 2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 2.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA VARIANDO LA FUENTE DE NITRÓGENO

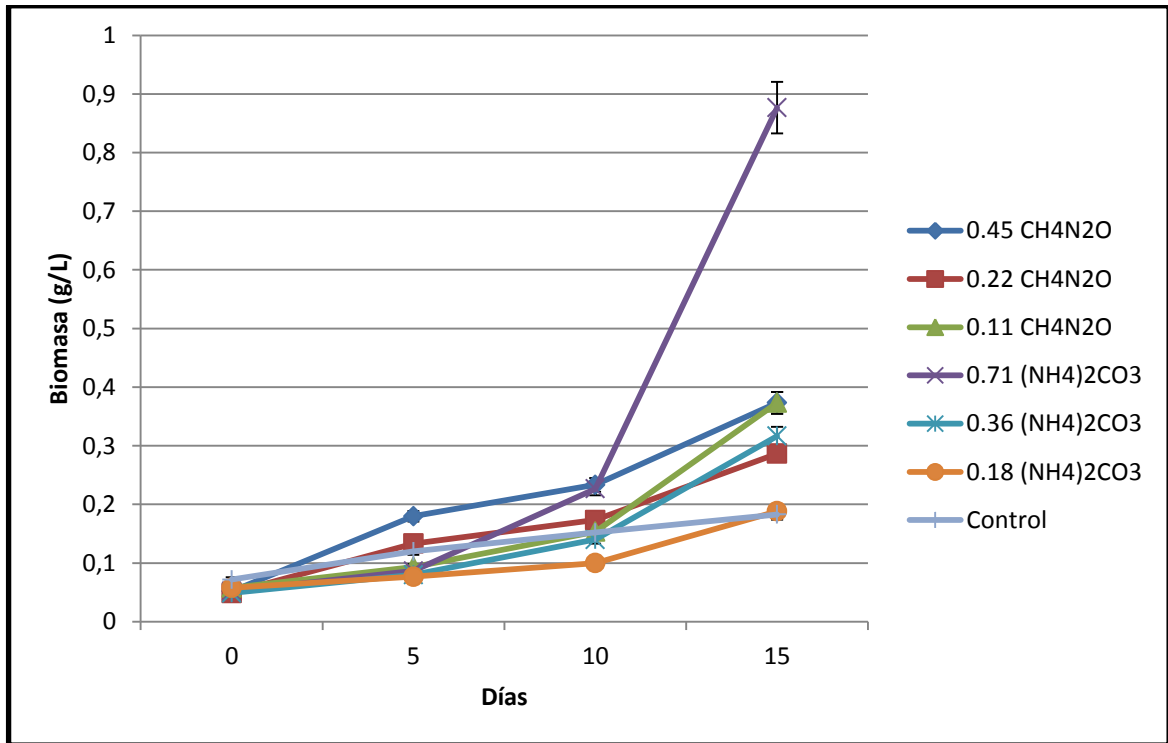
Las producciones de biomasa para la cepa de *B. braunii* variando la fuente de nitrógeno se muestran en las figuras 1 y 2; para el caso de la fuente de nitrato, se encontró que a mayores concentraciones de esta (1, 5 g/L  $\text{KNO}_3$  y 1,26 g/L  $\text{NaNO}_3$ ) se obtienen las mayores concentraciones de biomasa en un tiempo de 15 días, estos resultados son congruentes por los reportados por Dayananda *et al* (2006), donde obtienen las mayores productividades de biomasa con la mayor concentración de nitrato (1.5 g/L de  $\text{NaNO}_3$ )

Figura 1. Producción de biomasa variando la fuente de Nitrógeno



Por otro lado, al utilizar otras formas de nitrógeno ( $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ) se obtienen menores concentraciones de biomasa, esto está acorde a lo reportado por Dayananda *et al* (2006).

**Figura 2. Concentración de biomasa variando la fuente de Nitrógeno**



Al ser un alga fotosintética *B. braunii* requiere de fuentes de nitrógeno, fósforo y metales para su crecimiento; de las 3 bases inorgánicas *B. braunii* prefiere  $\text{NO}_3^-$  (Yang *et al.*, 2004), de igual forma Dayananda *et al.*, (2006) demostraron que  $\text{KNO}_3$  es ligeramente mejor que  $\text{NaNO}_3$ , lo cual se evidencia en este estudio (Tabla 3); sin embargo el resultado que no encaja dentro lo reportado con anterioridad es el valor de producción de biomasa utilizando carbonato de amonio; según Ohmori *et al.*, (1984) altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  afectan negativamente la producción de biomasa, sin embargo en el presente estudio se obtiene la productividad más alta; esta diferencia en los resultados se debe principalmente a la diferencia en las fuentes utilizadas, Ohmori *et al.*, (1984) utilizaron  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,

mientras que en este trabajo se utilizó  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , gracias al exceso de  $\text{CO}_3$  es posible obtener la concentración más alta de biomasa (Tabla 3).

**Tabla 3. Mejores concentraciones de Nitrógeno para la producción de biomasa**

<b>KNO<sub>3</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>Biomasa</b> <b>(g/L)</b>	<b>NaNO<sub>3</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>Biomasa</b> <b>(g/L)</b>
<b>1.50</b>	0.64	<b>1.26</b>	0.60
<b>0.75</b>	0.41	<b>0.63</b>	0.49
<b>0.38</b>	0.39	<b>0.32</b>	0.39
<b>CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O</b> <b>(g/L)</b>		<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> <b>(g/L)</b>	
<b>0.45</b>	0.37	<b>0.71</b>	0.88
<b>0.22</b>	0.29	<b>0.36</b>	0.32
<b>0.11</b>	0.37	<b>0.18</b>	0.19
<b>CONTROL (g/L)</b>			
0.22			

La tabla 4 muestra que para la producción de hidrocarburos la mejor fuente de nitrógeno es el carbonato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , ya que además de proveer nitrógeno en forma de amonio posee una cantidad significativa del ion  $\text{CO}_3^-$ .

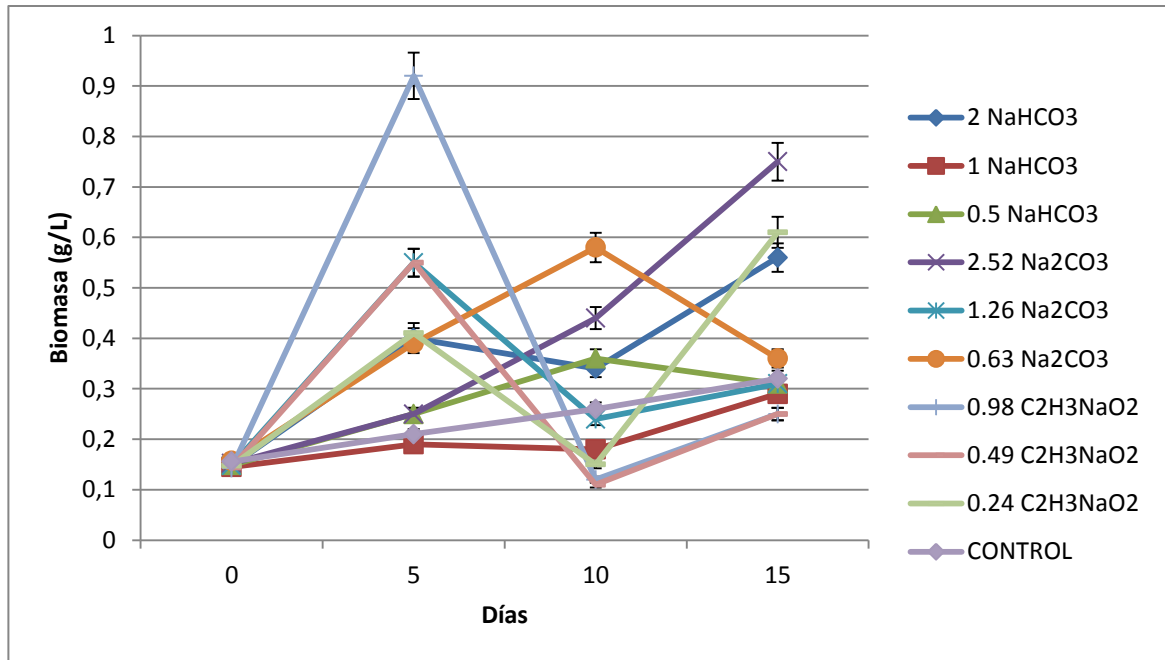
**Tabla 4. Producción de Carbohidratos e Hidrocarburos según la fuente de nitrógeno**

	<b>KNO<sub>3</sub></b>			<b>NaNO<sub>3</sub></b>			
<b>g/L</b>	<b>1.5</b>	<b>0.75</b>	<b>0.38</b>	<b>1.26</b>	<b>0.63</b>	<b>0.32</b>	<b>CONTROL</b>
<b>Carbohidratos (g/L)</b>	0.0626	0.027	0.0088	0.0469	0.0212	0.0034	0.0024
<b>Hidrocarburos (ug/g)</b>	6.21	8.51	8.70	6.95	7.50	5.31	7.78
	<b>CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O</b>			<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>			
<b>g/L</b>	<b>0.45</b>	<b>0.22</b>	<b>0.11</b>	<b>0.71</b>	<b>0.36</b>	<b>0.18</b>	<b>CONTROL</b>
<b>Carbohidratos (g/L)</b>	0.0071	0.0089	0.0095	0.0076	0.0008	0.0073	0.0024
<b>Hidrocarburos (ug/g)</b>	140.01	182.13	134.32	907.69	244.37	284.03	7.78

## **2.2 PRODUCCIÓN DE BIOMASA VARIANDO LA FUENTE DE CARBONO**

La influencia de la fuente de carbono en la producción de biomasa se muestran en la figura 3, donde se resalta que las mayores producciones (0,92 g/L) se alcanzan en solo cinco días de cultivo utilizando acetato de sodio (0,98 g/L), esto se debe a la habilidad de *B. braunii* a crecer de forma mixotrófica (Weetall, 1985), de igual forma Nomomura (2011) patentó un método para cultivar el género *Botryococcus* utilizando 2 formas de acetato (sodio y potasio); sin embargo, después del quinto día las concentraciones de biomasa decrecen rápidamente; a diferencia del acetato, las fuentes inorgánicas (carbonato y bicarbonato) requieren de un tiempo más largo de producción de hasta 15 días.

**Figura 3. Producción de biomasa variando las fuentes de carbono**



En la tabla 5 se presenta un resumen de la producción final de biomasa a los 15 días, donde se evidencia que la producción de biomasa utilizando fuentes inorgánica de carbono posee un tiempo más largo de producción (15 días); para el caso del  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2.52 g/L) a los 15 días se obtienen 0,75 g/L de biomasa, seguido por el  $\text{NaHCO}_3$  (2 g/L) con 0.56 g/L.

Rao y Sarada (2012) encontraron que una concentración de 0.1% (p/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  incrementa sustancialmente la producción de biomasa en un tiempo de 25 días; en el presente estudio se encontró que la cepa reportada puede tolerar hasta 0.2% p/v (o 2 g/L) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  con una producción de biomasa de hasta 0.75 días en 15 días

**Tabla 5. Producción final de biomasa al día 15**

<b>NaHCO<sub>3</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>Biomasa</b> <b>(g/L)</b>	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>Biomasa</b> <b>(g/L)</b>	<b>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>Biomasa</b> <b>(g/L)</b>
<b>2</b>	0.56	<b>2.52</b>	0.75	<b>0.98</b>	0.25
<b>1</b>	0.29	<b>1.26</b>	0.31	<b>0.49</b>	0.25
<b>0.5</b>	0.31	<b>0.63</b>	0.36	<b>0.24</b>	0.61
<b>0</b>	0.32	<b>0</b>	0.32	<b>0</b>	0.32
<b>(CONTROL)</b>					

La producción final de hidrocarburos para las diferentes fuentes de carbono se presenta en la tabla 6, donde se identifica que el acetato es la fuente que más promueve la biosíntesis de hidrocarburos (4734.72 µg/g), seguido por el NaHCO<sub>3</sub> con una producción de 2569.93 µg/g; por otro lado el mayor porcentaje de lípidos se logra utilizando la mayor concentración de acetato, con un valor de 37% de lípidos, seguido por 29% obtenido utilizando 2 g/L de NaHCO<sub>3</sub> y 27% utilizando 1.26 g/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

**Tabla 6. Producción de Carbohidratos e Hidrocarburos según la fuente de carbono**

<b>NaHCO<sub>3</sub></b>				<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>		
<b>g/L</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.5</b>	<b>2.52</b>	<b>1.26</b>	<b>0.63</b>
<b>Carbohidratos (g/L)</b>	0.0329	0.0286	0.0262	0.0253	0.0301	0.0324
<b>Hidrocarburos (ug/g)</b>	1008.42	2569.93	2050.58	999.19	1736.81	2317.58
<b>Lípidos (% p/p)</b>	29	12	27	3	27	19
<b>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub></b>				<b>CONTROL</b>		
<b>g/L</b>	<b>0.98</b>	<b>0.49</b>	<b>0.24</b>	<b>0</b>		
<b>Carbohidratos (g/L)</b>	0.0985	0.0762	0.0351	0.0236		
<b>Hidrocarburos (ug/g)</b>	2279.68	4734.72	1136.43	177.44		
<b>Lípidos (% p/p)</b>	37	16	15	1		

Los resultados obtenidos hasta ahora demuestran la capacidad de la cepa de *B. braunii* de producir una considerable cantidad de biomasa con unos niveles deseables tanto de hidrocarburos como lípidos, sin embargo el costo del kilogramo de acetato de sodio en Santander oscila entre los 100 - 120.000 \$ COP, por lo cual la convierte en una fuente relativamente costosa para la obtención de materia prima con miras a la obtención de biocombustibles.

El mejoramiento de las condiciones del cultivo de *B. braunii* es un proceso esencial para el desarrollo de biocombustibles con un costo-beneficio aceptable, ya que el principal problema con esta especie radica en la especificidad para cada una de las cepas, por lo cual teniendo en cuenta el costo de la fuente de carbono y la viabilidad de obtención de los diferentes metabolitos, se decide mejorar la relación carbono/nitrógeno utilizando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y KNO<sub>3</sub>.

**Tabla 7. Lista de precios fuentes de Carbono y Nitrógeno en Bucaramanga**

Producto	Precio en pesos
<b>Fuentes de Nitrógeno</b>	
Carbonato de Amonio (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	No lo hay
Nitrato de Sodio NaNO <sub>3</sub>	\$10000 Kg
Nitrato de Potasio KNO <sub>3</sub>	\$12000 Kg
Urea CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	\$3000 Kg
<b>Fuentes de Carbono</b>	
Bicarbonato de Sodio NaHCO <sub>3</sub>	\$2000 Kg
Carbonato de Sodio NaCO <sub>3</sub>	\$ 6400 Kg
Acetato de Sodio C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	\$ 100000 Kg

Fuente. Suquin Ltda.

### 2.3 MEJORAMIENTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO

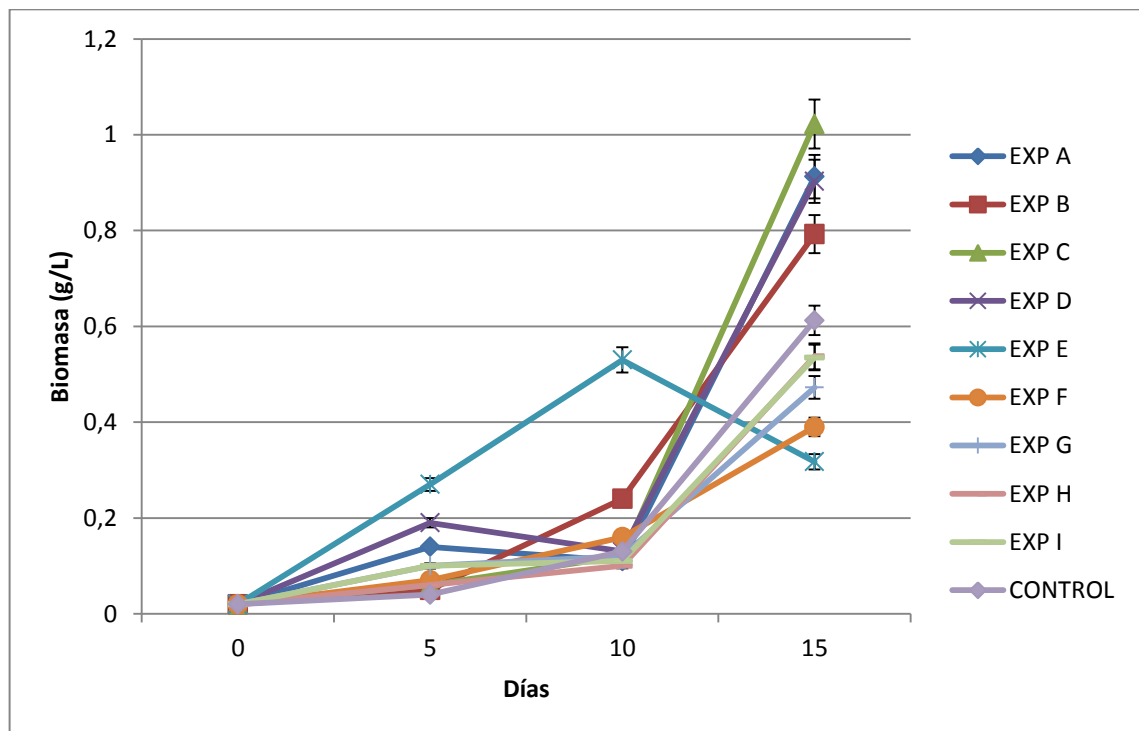
Para el mejoramiento en la concentración tanto de carbono como de nitrógeno y de su efecto en la deposición de hidrocarburos y lípidos en *B. braunii* se implementó un diseño de experimentos con composición central no factorial de 2<sup>3</sup> y 9 experimentos utilizando STATISTICA 7.0 (Tabla 7).

**Tabla 8. Diseño de experimentos**

Exp	KNO <sub>3</sub> (g/L)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (g/L)
A	0	0.945
B	0.75	0.499
C	0.38	0.63
D	1.54	0.945
E	0.75	0.945
F	1.5	1.26
G	0.38	1.26
H	1.5	0.63
I	0.75	1.39

La producción de biomasa siguiendo la metodología de la relación carbono/nitrogeno se presenta en la figura 4. En todos los experimentos presentan un incremento significativo a partir del día 10, sin embargo el experimento E logra su mayor producción al día 10 pero decrece ahí en adelante en comparación con los otros experimentos. Al día 15 los mejores resultados para la producción de biomasa fueron el C, A y D que presentan relaciones de carbono y nitrogeno (4:3; 1:0; 1:2.) alcanzando cerca 1 g/L permitiendo demostrar que al ajustar la relación molecular entre estos dos compuestos es posible mejorar desde 0,75 g/L hasta cerca de 1 g/L.

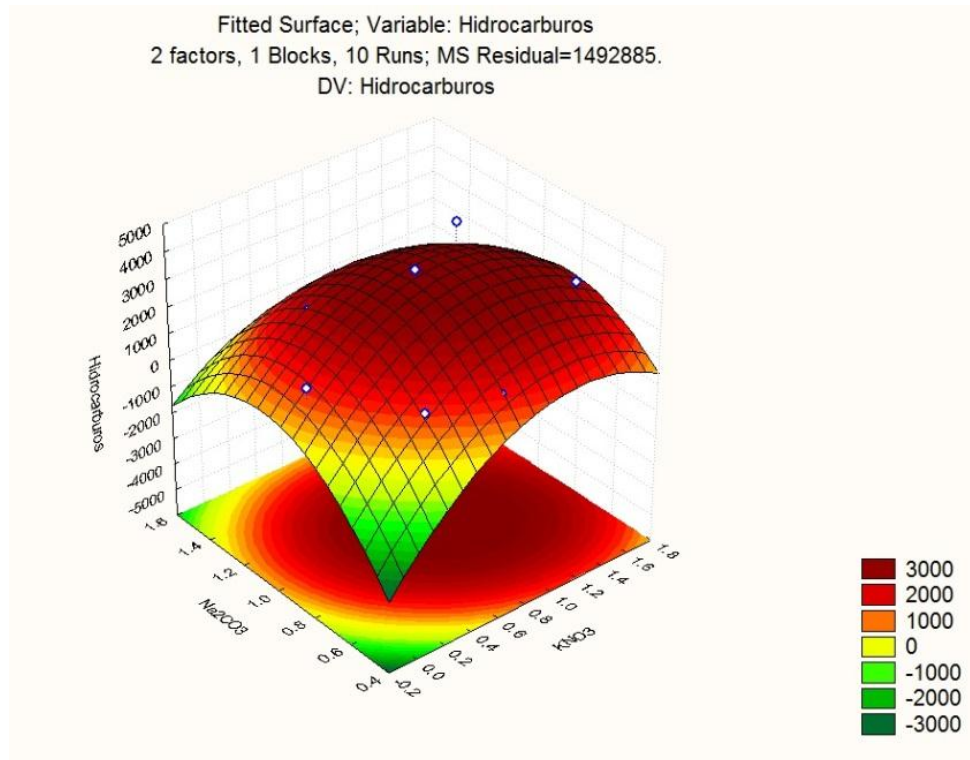
**Figura 4. Producción de biomasa siguiendo la metodología de la relación carbono/ nitrógeno**



Otro de los parámetros que se logra mejorar es la deposición de hidrocarburos, lo cual se evidencia en la figura 5, donde concentraciones cercanas a 1 g/L de

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 1 g/L de  $\text{KNO}_3$  permiten obtener cerca de 3000  $\mu\text{g/g}$  de hidrocarburos, esto representa un aumento de hasta 2 veces en comparación con los resultados anteriores (de 1700 a 3000  $\mu\text{g/g}$  de hidrocarburos)

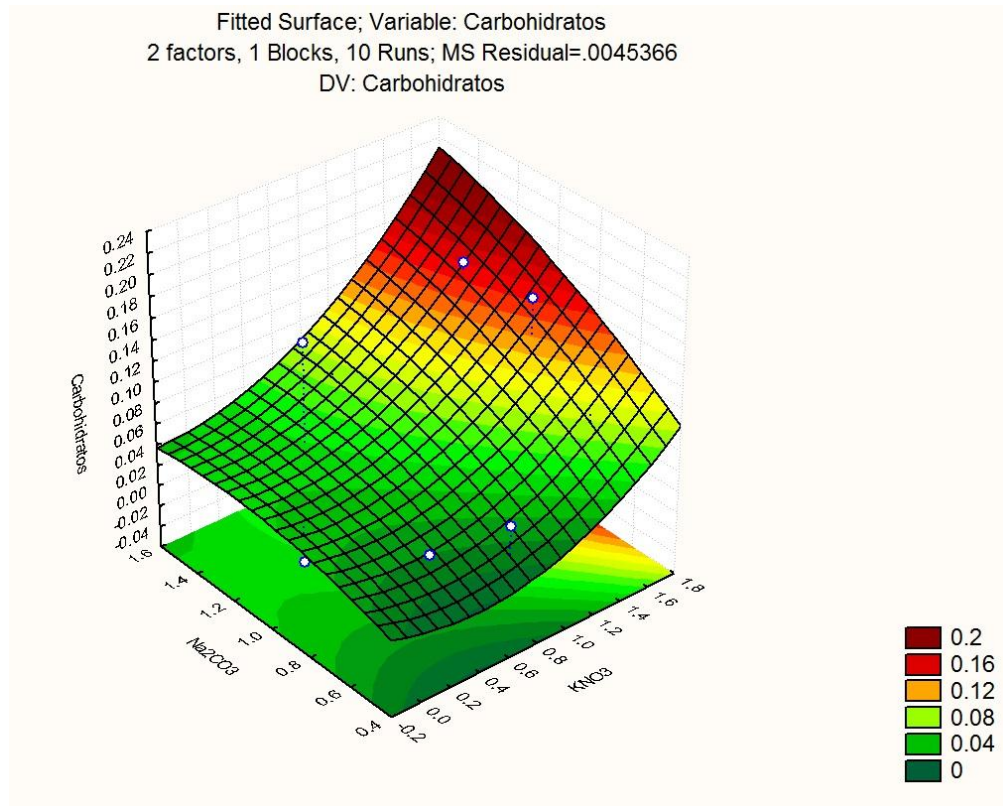
**Figura 5. Superficie de respuesta para la producción de hidrocarburos**



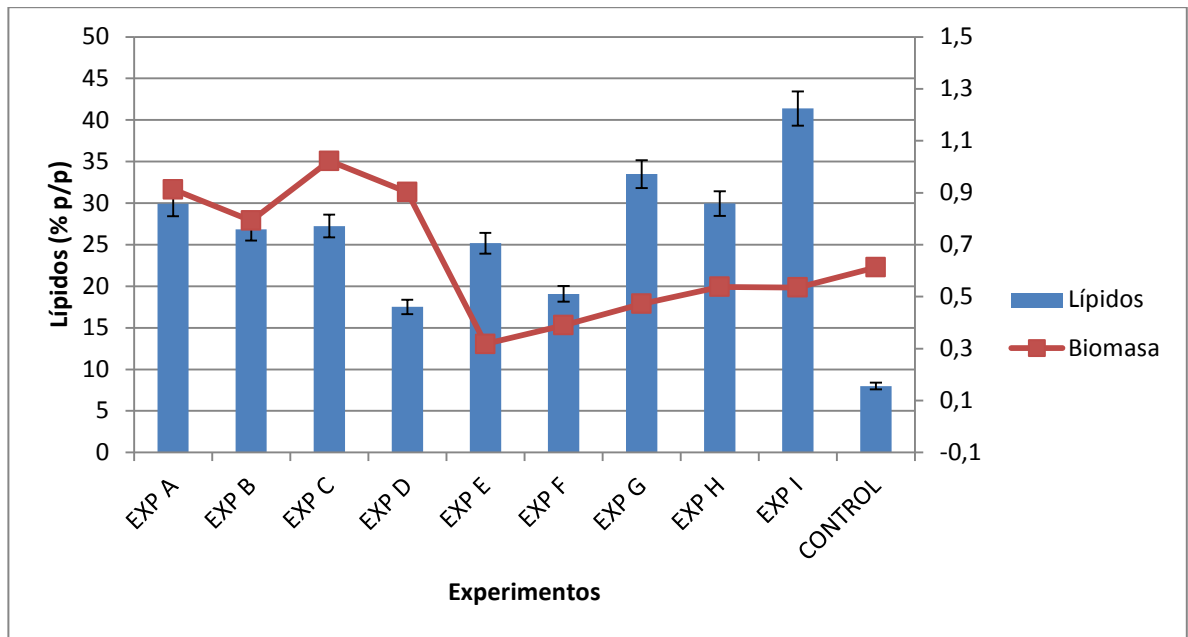
Una de las habilidades de este género es la producción de exopolisacáridos sulfatados (Watanabe y Tanabe, 2013), los cuales pueden ser aprovechados para la obtención de diferentes subproductos como bioplásticos; sin embargo este tipo de subproducto puede ser aprovechado por hongos, levaduras y otras microalgas como fuente de carbono, aumentando la probabilidad de contaminación, por lo cual se hace necesario reducir sustancialmente la cantidad de exopolisacáridos presentes en el medio; según la figura 6, es posible reducir la cantidad de exopolisacáridos en menos de 0.06 g/L bajo las condiciones donde se obtienen las mayores concentraciones posibles de hidrocarburos, esto permite inferir que mediante el ajuste de la relación carbono/nitrógeno es posible dirigir el metabolismo celular hacia la producción de largas cadenas de carbono como los

hidrocarburos mientras se reduce la producción de otros compuestos como los exopolisacáridos.

**Figura 6. Superficie de respuesta para la producción de Carbohidratos**



**Figura 7. Producción de Lípidos**



Se observa en la figura 7 que la producción de lípidos que se obtuvo fue mayor al 40% mostrando un incremento respecto a experimentos anteriores cuando la mayor producción era del 27%, lo cual muestra que la optimización de la relación carbono-nitrógeno en el mejoramiento del experimento fue acertada.

Los experimentos se hicieron variando las concentraciones de nitrógeno y carbono, el mejor resultado para la producción de lípidos fue el experimento I, el cual tiene la mayor concentración de las dos fuentes ( $\text{KNO}_3$  [0.75g/L],  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ [1.390477 g/L]).

Aunque una deficiencia de nitrógeno favorezca la acumulación de lípidos (Ben-Amotz et al. 1985), el nitrógeno se requiere para el crecimiento. Estudios con nitrógeno suministrado como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_4^+$  revelan que el factor primario que regula el metabolismo de nitrógeno en *B. braunii* es la asimilación del nitrato en el sistema. El nitrógeno generalmente se suministra como sales de nitrato. La

concentración inicial de  $\text{NO}^3$  es de 0.2 kilogramo/m<sup>3</sup> favorece la producción de hidrocarburos (Casadevall et al. 1983).

### 3. CONCLUSIONES

- Al realizar el mejoramiento de la relación carbono/nitrógeno (1:1.27) se direccionó la producción celular logrando la formación de largas cadenas de carbono (hidrocarburos) y reduciendo la formación de cadenas cortas (carbohidratos), obteniendo las producciones deseadas.
- La producción de hidrocarburos aproximadamente se duplicó, pasando de 1700 µg/g de biomasa a 3000 µg/g de biomasa.
- Los resultados demostraron que la capacidad de producción de biomasa, hidrocarburos y lípidos de *botryococcus braunii* la convierten en una opción viable para la producción de biocombustibles.

#### **4. RECOMENDACIONES**

- Para la producción a gran escala se recomienda usar como fuente de carbono el carbonato de sodio, pues se obtienen buenos resultados, es de fácil comercialización y bajo costo comparado con otras fuentes.

## BIBLIOGRAFÍA

An J, Sim S, Lee J, Kim B. Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. Jour App Phycol. 2003; 15: 185–191.

Casadevall E, Dif D, Largeau C, Gudin C, Chaumont D, Desanti O. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition. Biotechnol. Bioeng. 1985; 27, 286–295.

Dayananda C, Sarada R, Bhattacharya S, Ravishankar G. Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. Process Biochem. 2005; 40: 3125–3131

Dayananda C, Sarada R, Ranib U, Shamala T, Ravishankar G. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. Biomass Bioen. 2007; 31: 87–93

Dayananda C, Sarada R, Srinivas B, Shamala T, Ravishankar G. Presence of methyl branched fatty acids and saturated hydrocarbons in botryococcene producing strain of *Botryococcus braunii*. Acta Physiol Plantarum. 2006; 28(3): 251-56

Ge Y, Liu J, Tian G. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO<sub>2</sub> concentration in photobioreactor. Bioresource Technology 2011; 102:130–134.

Huppe HC, & Turpin DH. Integration of Carbon and Nitrogen Metabolism in Plant and Algal Cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1994 ; 45: 577-607.

Kojima E, Zhang K. Growth and Hydrocarbon Production of Microalga *Botryococcus braunii* in Bubble Column Photobioreactors. *Jour Biosci Bioeng.* 1999; 87(6):811-5.

Kuan-Chen C, Ming R , Kimberly L. O. Statistical optimization of culture media for growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* UTEX 250. *Bioresource Technology.* 2013;128: 44-48.

Largeau C, Caradevall E, Berkaloff C, Dhamliencourt P. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochem.* 1980; 19:1043–51.

Lee CG. Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 1999; 4, 78-81.

Metzger P and Casadevall E. Ether lipids from *Botryococcus braunii* and their biosynthesis. *Phytochem* 1992; 7: 2341–2349

Metzger P, Largeau C. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005; 66, 486–496.

Moheimani NR, Borowitzka MA, Isdepsky A, Fon Sing S (2013) Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, pp 265–284.

Moldowan JM, Seifert WK. First discovery of botryococcene in petroleum. *JCS Chem. Comm.* 1980; 19: 912–914.

Nomomura, A. (2012) METHODS AND COMPOSITIONS FOR GROWTH OF HYDROCARBONS IN *BOTRYOCOCCUS* SP. US PATENT US007923228B2

Rao R, Dayananda A, Sarada, C Shamala R, Ravishankar TR. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. Bioresour. Technol. 2007; 98:560-564.

Rao, R., Sarada R. (2012). Cultivation of green alga *Botryococcus braunii* in raceway, circular ponds under outdoor conditions and its growth, hydrocarbon production. Bioresour Technol. 123:528-33.

Rao RA, Reddy RL, Baskaran V, SARADA R, Ravishankar RV. Characterization of Microalgal Carotenoids by Mass Spectrometry and Their Bioavailability and Antioxidant Properties Elucidated in Rat Model. J. Agric. Food Chem. 2010; 58: 8553–59.

Ruangsomboon S. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. 2011. in press

Tanoi, T. Kawachi, M. Watanabe, M. (2011). Effects of carbon source on growth and morphology of *Botryococcus braunii*, J Appl Phycol.

Watanabe, M., Tanabe, Y. (2013). Biology and Industrial Potential of *Botryococcus braunii*. In Richmond, A., Hu, Q WB (Eds) Handbook of Microalgal Culture, Wiley, pp 369-387

Wolf FR, Nanomura AM, Bassham JA. Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii*. J. Phycol. 1985; 21: 388–396.