

**EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA INYECCION CONTINUA DE CO₂ EN
LA PRODUCCIÓN DE HIDROCARBUROS Y LÍPIDOS EN *Botryococcus
braunii***

MICHAEL DUVÁN GONZÁLEZ CASTRO

RAMIRO ALBINO RIVERA VELASCO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICO QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2015

**EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA INYECCION CONTINUA DE CO₂ EN
LA PRODUCCIÓN DE HIDROCARBUROS Y LÍPIDOS EN *Botryococcus
braunii***

MICHAEL DUVÁN GONZÁLEZ CASTRO

RAMIRO ALBINO RIVERA VELASCO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:

Ingeniero Químico

Director

CRISOSTOMO BARAJAS FERRERIRA

Ingeniero Químico M.Sc

Codirector

Andrés Fernando Barajas Solano

Biólogo

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2015

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	12
1. DESCRIPCIÓN METODOLOGICA	16
1.1 MICROORGANISMO.....	16
1.2 RELACIÓN CARBONO-NITRÓGENO.....	16
1.3 INYECCIÓN CONTINUA DE CO ₂	17
1.4 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS.	17
1.4.1 Crecimiento celular (peso seco).....	17
1.4.2 Cuantificación exopolisacaridos (Dubois et al., 1956).....	18
1.4.3 Cuantificación de Lípidos totales (Blight & Dyer, 1959).	18
1.4.4 Cuantificación de hidrocarburos (Eroglu & Melis, 2010)	18
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	20
2.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA.....	20
2.2 PRODUCCIÓN DE CARBOHIDRATOS	23
2.3 PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS	26
2.4 PRODUCCIÓN DE HIDROCARBUROS.....	29
3. CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación C/N.....	17
Tabla 2.. Concentraciones óptimas de Carbono/Nitrógeno para la producción de biomasa	21
Tabla 3 Concentraciones óptimas de C/N para la producción de Exopolisacáridos	24
Tabla 4 Concentraciones óptimas de C/N para la producción de Lípidos.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción de biomasa variando los flujos de CO ₂	20
Figura 2. Producción de biomasa real respecto al CO ₂ y KNO ₃ añadidos al cultivo	22
Figura 3. Significancia estadística de la adición de CO ₂ y KNO ₃ en la producción de biomasa	23
Figura 4. Relación entre la producción de exopolisacáridos y el CO ₂ y KNO ₃ añadidos al cultivo	25
Figura 5. Significancia estadística del CO ₂ y KNO ₃ en la producción de carbohidratos	26
Figura 6. Variación en la producción de lípidos totales con inyección de CO ₂ continúo	27
Figura 7. Relación entre la producción de lípidos totales, CO ₂ y KNO ₃	28
Figura 8. Significancia estadística de la variación del flujo de CO ₂ y lípidos totales.	29
Figura 9. Producción de hidrocarburos respecto a la variación de CO ₂ y KNO ₃	30
Figura 10. Significancia estadística de la producción de carbohidratos respecto al flujo de CO ₂	31
Figura 11. Producción de hidrocarburos respecto a la variación del flujo de CO ₂ .	31

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA INYECCION CONTINUA DE CO₂ EN LA PRODUCCIÓN DE HIDROCARBUROS Y LÍPIDOS EN *Botryococcus braunii*¹

AUTORES: MICHAEL DUVÁN GONZÁLEZ CASTRO, RAMIRO RIVERA ALBINO²

PALABRAS CLAVE: Microalga, Botryococcus Braunni, biomasa, hidrocarburos, lípidos, carbohidratos.

Se evaluó la influencia de la concentración de CO₂ y de nitrógeno (KNO₃) en la producción de biomasa y deposición de lípidos (principalmente hidrocarburos) de *Botryococcus braunii* UIS 003, como alternativa para remediar el impacto generado por los actuales métodos de producción de combustibles y de esta manera determinar la viabilidad de su uso.

En concordancia con los datos obtenidos por la caracterización de los cultivos en las pruebas realizadas, se determinó su factibilidad para el fin mencionado anteriormente, con un óptimo en las condiciones de operación estudiadas correspondiente a: la mayor concentración en la producción de biomasa (1,82 g/L) cuando el flujo de CO₂ fue 30 mL/min y con una concentración de KNO₃ de 1,5 g/L, la menor concentración en la producción de Exopolisacáridos (0,05 mg/L) cuando el flujo de CO₂ fue 90 mL/min y KNO₃ de 0,38 g/L, el mejor rendimiento en la producción de Lípidos (60,3 % p/p) utilizando el flujo de CO₂ fue 30 mL/min y KNO₃ de 0,38 g/L y la mayor concentración en la producción de Hidrocarburos (20 % p/p) cuando el flujo de CO₂ fue 30 mL/min y KNO₃ de 0,38 g/L

ABSTRACT

¹ Proyecto de grado

² Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director. M. Sc. Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirector. Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano.

TITLE: EVALUATION OF THE INFLUENCE OF INJECTION CO₂ CONTINUOUS PRODUCTION OF OIL AND LIPID IN *Botryococcus braunii*³

AUTORS: MICHAEL DUVÁN GONZÁLEZ CASTRO, RAMIRO RIVERA ALBINO⁴

KEY WORDS: Microalga, Botryococcus Braunni, biomasa, hidrocarburos, lípidos, carbohidratos.

The influence of the concentration of CO₂ and KNO₃ was evaluated in biomass production and deposition of lipids (mainly hydrocarbons) from *Botryococcus Braunii* UIS 003, like an alternative for remedy the impact generated by current methods of producing fuels and thus determine the viability of use.

Consistent with the data obtained by the characterization of the culture in the test realized, it feasibility for the objective purposed above was determined, with an optimum operating conditions corresponding to:

The highest concentration in the production of biomass (1,82 g/L) when the CO₂ flow was 30 ml/min and the KNO₃ concentration was 1,5 g/L, the lowest concentration in the production of Exopolysaccharides (0,05 mg/L) when the CO₂ flow was 90 ml/min and the KNO₃ concentration was 0,38, the highest concentration in the production of lipids (60,3 %w/w) when the CO₂ flow was 30 ml/min and the KNO₃ concentration was 0,38, and the highest concentration in the production of hydrocarbons (20 %P/P) when the flow of CO₂ was 30 ml / min and the KNO₃ concentration was 0,38 g/L.

INTRODUCCIÓN

³ Graduation Project

⁴ Physical- chemical engineering faculty. Chemical Engineering department. Director. M. Sc. Crisóstomo Barajas Ferreira. Co-director. Biologist. Andrés Fernando Barajas Solano.

En la búsqueda de una solución definitiva, o una mitigación, del obvio impacto negativo producido por la extracción y consumo de las fuentes actuales de energía a base de combustibles fósiles, se han propuesto diferentes alternativas para la producción de lo que se conoce como biocombustibles, que son extraídos de las reservas grasas (lípidos) de distintos tipos de plantas y animales.

Muchas miradas se han fijado en el cultivo de micro algas de diversas cepas, debido su capacidad de almacenar cantidades considerables de lípidos, en forma de triglicéridos saturados y poliinsaturados durante su período de crecimiento (Knote 2007).

Botryococcus Braunii generalmente se encuentra distribuido en ambientes de agua densa dulce, en floraciones de lagos, embalses y estanques ubicados en las regiones tropicales y subtropicales (Wake & Hillen, 1980; Aaronson et al., 1983; Baldwin et al., 2003; Chiang et al., 2004); este tipo de alga crece como una colonia de células individuales adheridas por una matriz compuesta de lípidos e hidrocarburos del tipo botriococenos, que comprende alrededor del 75% de su peso seco (Kützing, F.T. 1849), al igual que no se puede despreciar su potencial como organismo almacenador de CO₂, así como su capacidad de fijación en el sistema micro alga-fotobioreactor (Valdés et al., 2012). Esta alga se ha perfilado como una posible fuente renovable para la extracción de hidrocarburos y como una oportunidad para la bioremediación del impacto ambiental causado por las diferentes emisiones de CO₂ a la atmósfera. (Chisti, 2007)

Al interior de esta especie se pueden reconocer tres diferentes tipos de hidrocarburos (Metzger & Largeau, 2005): El tipo A produce n-alcadienos C23-C33 (principalmente hidrocarburos dienos y trienos), el tipo B produce hidrocarburos triterpenos C30-C37 (mejor conocidos como botriococenos y escualenos metilados C31-C34), y las de tipo L producen licopadienos, los cuales son tetraterpenoides simples (Metzger & Largeau, 2005).

Se ha demostrado que gracias a su composición, el tipo B produce un alto rendimiento en la producción de bioaceite; además, las propiedades caloríficas también son mejores que en muchos otros materiales biológicos, como los lignocelulósicos (Guzmán ,2012). Entre los tres tipos, la raza B parece ser la más adecuada para la producción de bio-combustible, ya que el contenido de hidrocarburos es relativamente alto y se separa fácilmente a partir de la biomasa (Eroglu et al, 2011.); también se conoce que derivados de los hidrocarburos del tipo B se encuentran como componentes de ciertas clases de crudo, a partir de las cuales se generan estos mismos (Moldowan y Seifert, 1980).

En el cultivo de un organismo fotosintético es fundamental el control y la optimización de la luz (Ugwu et al., 2008). El índice de crecimiento de la cepa *B. Braunii* disminuye ante radiaciones de baja intensidad (Zhang y Kojima, 1998) y se ve afectado por los cambios de intensidad de luz en el rango de 3-10 klx, pero esto no altera la producción de hidrocarburos (Zhang y Kojima, 1998). La cepa se ve beneficiada con altas intensidades de luz ($200-538 \mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en lo que respecta a la formación de lípidos (Ruang Somboon, 2013).

Otro de los parámetros influyentes en el crecimiento de la micro alga es el pH, específico para cada cepa de *B. Braunii* (habitualmente se ajusta a pH entre 6,6 y 7,5). Es importante destacar que el pH varía en este rango, a lo largo del periodo de crecimiento, incluso con una aireación constante de CO_2 (Casadevall et al., 1985). El pH está estrechamente relacionado con la concentración de CO_2 (Ge et al, 2011) esto fue reportado por primera vez por Wolf et al (1985) quien demostró que una aireación con 0,3% de CO_2 promueve significativamente el crecimiento de *B. Braunii* (aumentando su concentración hasta en un 20%), y un máximo rendimiento de biomasa e hidrocarburos (obteniendo cadenas carbonadas de C30-C32), sin mostrar ningún efecto inhibitor sobre la cepa bajo las condiciones de inyección de CO_2 (120, 60, 30 y 12 mL/min) usadas en el estudio llevado a cabo por (Ge et al., 2011). Con el fin de obtener los mejores resultados se evaluó

le inyección continua de CO₂ a diferentes concentraciones, modificando en cada experimento el medio de cultivo de la cepa usada.

1. DESCRIPCIÓN METODOLOGICA

1.1 MICROORGANISMO

Se utilizó la microalga *B. 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 nueva cepa se mantuvo en el medio de cultivo Bold Basal modificado (MBBM), donde cada litro de medio de cultivo está compuesto por: macronutrientes NaNO_3 (1,5 g/L), (Moles) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,04 \times 10^{-4}$) NaCl ($4,28 \times 10^{-4}$), K_2HPO_4 ($4,31 \times 10^{-4}$), KH_2PO_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) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,07 \times 10^{-5}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($7,28 \times 10^{-6}$), MoO_3 ($4,93 \times 10^{-6}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,29 \times 10^{-6}$), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,68 \times 10^{-6}$), H_3BO_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 14 cm y 35 cm 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 y una inyección de CO_2 de 10 mL/min.

1.2 RELACIÓN CARBONO-NITRÓGENO

Con la intención de comprobar el efecto de la relación entre la cantidad de Nitrógeno presente y la cantidad de CO_2 en el sistema, se desarrolló un diseño de experimentos 2^3 , para esto se tuvo en cuenta las cantidades de CO_2 (mL/min) reportadas por Yoo *et al* (2010), Ge *et al* (2012) y Honda *et al* (2012); para la concentración de la fuente de nitrógeno se utilizaron los resultados previamente obtenidos en la Laboratorio de Biomasa para la cepa de *B. braunii* (Tabla 1).

El CO_2 se inyectó en cada uno de los tratamientos durante 12 horas diarias en un intervalo de tiempo de 15 días; el pH en cada uno de los reactores no fue ajustado, permitiendo un cambio libre en cada uno de los experimentos.

Tabla 1. Relación C/N.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
KNO₃ (g/L)	0.75	1.50	0.75	0.38	0.38	0.75	0	1.50	1.54
CO₂ (mL/min)	102.43	30.00	60.00	90.00	30.00	17.57	60.00	90.00	60.00

1.3 INYECCIÓN CONTINUA DE CO₂.

La inyección de CO₂ estuvo controlada a partir del cambio de pH en el medio, para cada una de las concentraciones a evaluar el flujo fue constante hasta alcanzar un pH entre 5.5 y 6; una vez alcanzo el pH, el flujo de CO₂ se detenía hasta alcanzar nuevamente un pH cercano a 7. Esta metodología se repitió durante 12 horas diarias a lo largo de 15 días.

1.4 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).

1.4.1 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.

1.4.2 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 485 nm (para la cuantificación de glucosa) en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

1.4.3 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.

1.4.4 Cuantificación de hidrocarburos (Eroglu & 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

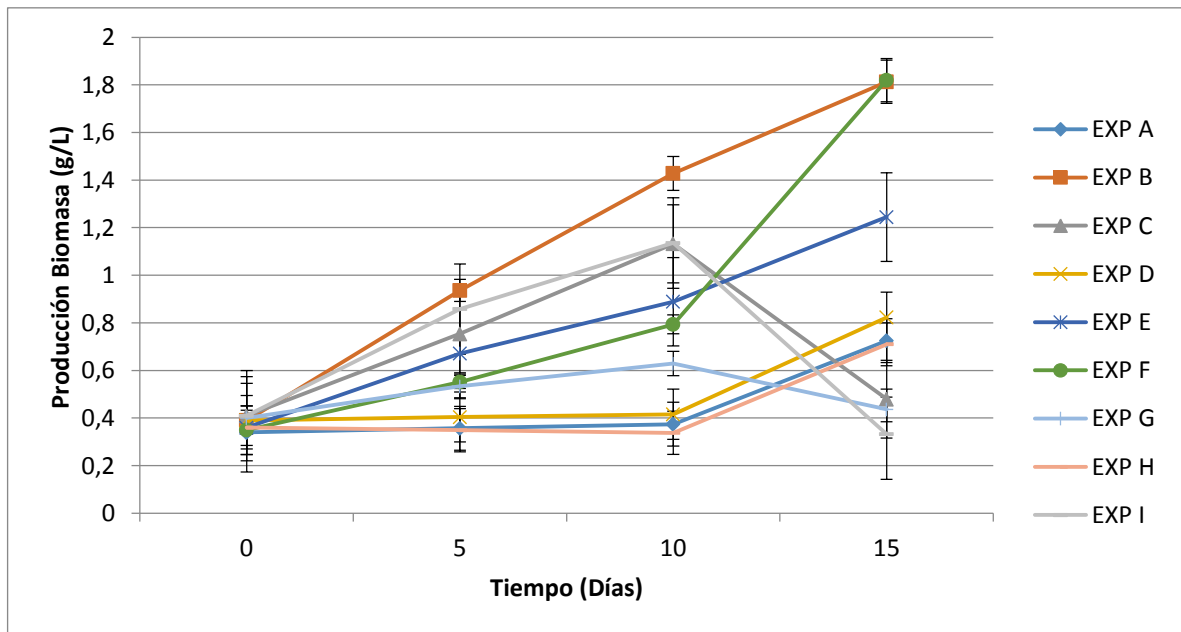
agregaron 10 mL de agua destilada para separar la biomasa del extracto de hidrocarburos. Finalmente, cada una de las muestras fue transferida a las celdas de cuarzo y se midió la absorbancia a 190 nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

2.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA

La producción de biomasa obtenida a partir de *B. braunii* se muestra en la Figura 1; la variación de CO₂, inyectado continuamente, para cada ensayo está basada en la relación Carbono/Nitrógeno que se usó en el medio de cultivo.

Figura 1. Producción de biomasa variando los flujos de CO₂



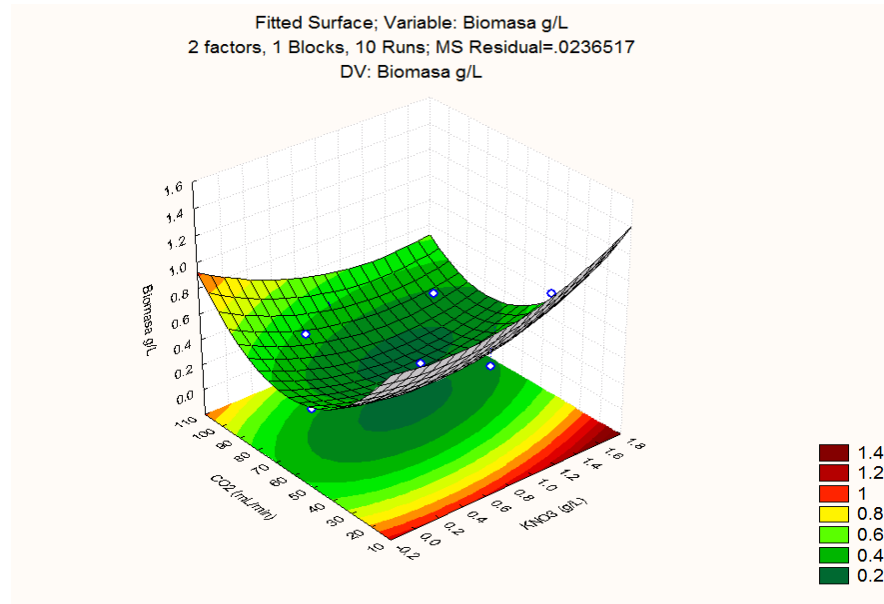
En la Tabla 2 se observa que el mejor rendimiento en la producción de biomasa resultó de los experimentos B y F (1,82 g/L), con flujos de CO₂ correspondientes de 30, y 17,5 mL/min. Este reporte fue superior a lo reportado por Ranga *et al.*, (2006), cuya producción obtenida por la cepa CFTRI-Bb-1 fue 0,83 g/L, y mayor a lo obtenido por Ge *et al* (2012) quien reportó una producción máxima de 0,72 g/L.

Tabla 2. Concentraciones óptimas de Carbono/Nitrógeno para la producción de biomasa

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
KNO₃									
(g/L)	0.75	1.50	0.75	0.38	0.38	0.75	0	1.50	1.54
CO₂									
(mL/min)	102.43	30.00	60.00	90.00	30.00	17.57	60.00	90.00	60.00
Biomasa									
(g/L)	0,72	1,82	0,43	0,82	1,2	1,82	0,43	0,71	0,33

Por otra parte el gráfico de superficie de respuesta (Figura 2) establece una correlación óptima entre CO₂ inyectado, KNO₃ añadido y biomasa real producida por el cultivo correspondiente a 10 mL/min, 1,8 g/L y 1,4 g/L, respectivamente.

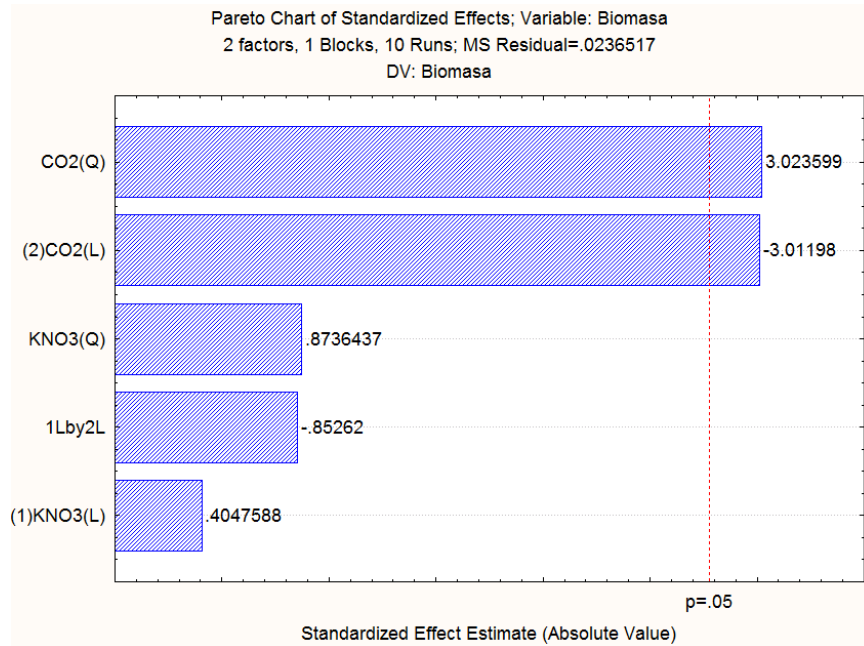
Figura 2. Producción de biomasa real respecto al CO₂ y KNO₃ añadidos al cultivo



La Figura 3 corresponde al diagrama de correlación estadística de Pareto, mediante el cual se evalúa la significancia que tienen los parámetros estudiados (Inyección de CO₂ y KNO₃ añadido) en la producción de biomasa.

De su análisis puede concluirse que existe una correlación significativa entre el CO₂ y KNO₃ respecto a la producción de biomasa del cultivo, tanto directa como inversamente. Esto corresponde a una producción máxima de biomasa usando bajos y altos flujos de CO₂, y es congruente con los resultados expuestos en la Figura 2 y la Tabla 2.

Figura 3. Significancia estadística de la adición de CO₂ y KNO₃ en la producción de biomasa



2.2 PRODUCCIÓN DE CARBOHIDRATOS

Es característico de este tipo de micro algas su habilidad para fijar CO₂ con el fin de producir no sólo hidrocarburos y lípidos, sino también algunos bioproductos a través de su biomasa (Yoo et al. 2010), entre los que se destacan los exopolisacáridos sulfatados, por la posibilidad de ser aprovechados a nivel industrial y por ser una posible causa de contaminación en las micro algas debido a su capacidad de proveer carbono a otros microorganismos como hongos y levaduras. De igual manera es trascendental conocer y, de ser posible, controlar su crecimiento, debido a la relación conocida entre la producción de hidrocarburos y carbohidratos, en donde se busca favorecer el crecimiento de hidrocarburos, y mantener los carbohidratos en una mínima producción.

La Tabla 3 muestra el comportamiento de la cepa de micro algas, en la producción de exopolisacáridos, bajo distintas condiciones de inyección de CO₂ y de KNO₃. Se puede apreciar que se obtiene la producción más baja (0,05 mg/L) cuando el

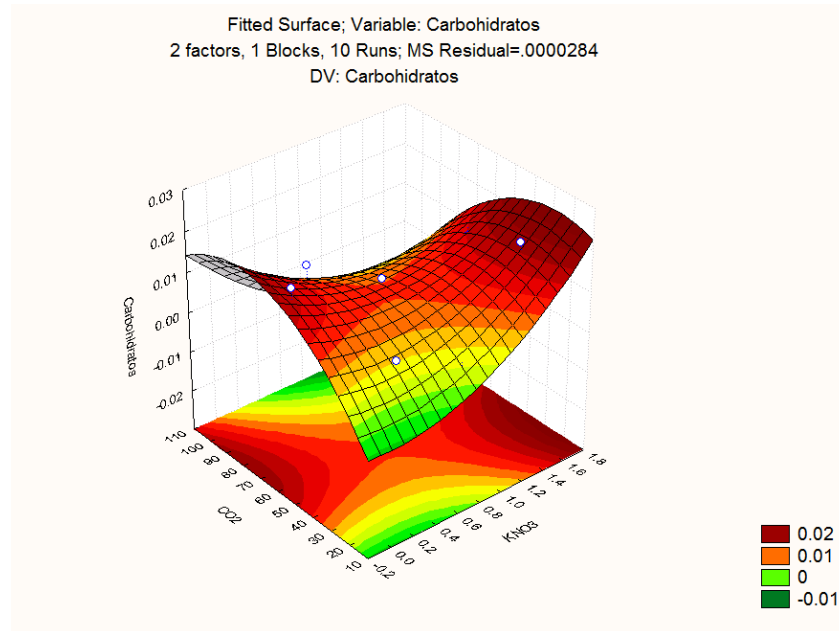
flujo de CO₂ fue establecido en 90 mL/min y KNO₃ de 0,38 g/L y la producción más alta (17,4 mg/L) cuando el flujo de CO₂ fue 60 mL/min.

Tabla 3 Concentraciones óptimas de C/N para la producción de exopolisacáridos

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
KNO₃ (g/L)	0.75	1.50	0.75	0.38	0.38	0.75	0	1.50	1.54
CO₂ (mL/min)	102.4	30.0	60.0	90.0	30.0	17.5	60.0	90.0	60.0
	3	0	0	0	0	7	0	0	0
Exopolisacáridos (mg/L)	1,58	10,7	8,54	0,05	1,57	0,50	17,4	0,10	5,7

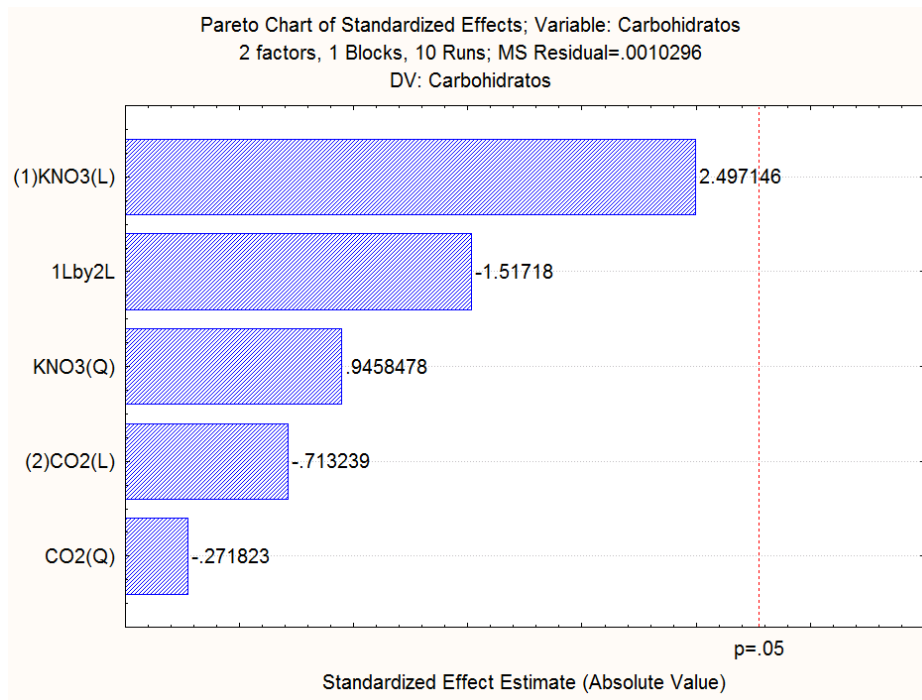
La Figura 4 muestra esencialmente dos puntos de producción óptima de carbohidratos, tanto en mayor como en menor cantidad, de los cuales, con los flujos de CO₂ correspondientes a 80 mL/min y 30 ml/min se obtiene la producción más alta y con un flujo de CO₂ de 110 mL/min se obtiene la producción más baja, adjunto a esto las concentraciones más óptimas para disminuir el rendimiento en la producción de hidrocarburos está en (0,2 g/L) y (1,8 g/L).

Figura 4. Relación entre la producción de exopolisacáridos y el CO₂ y KNO₃ añadidos al cultivo



De igual forma en el análisis de Pareto para la producción de exopolisacaridos (Figura 5) soporta los resultados anteriores, donde no existe una variable significativa que permita aumentar considerablemente la producción de estos metabolitos, por lo cual, al implementar un sistema de inyección continua de CO₂, es posible evitar el desvío de la fuente de carbono hacia otros metabolitos como los exopolisacaridos y re-dirigir el carbono hacia la formación de biomasa, lípidos e hidrocarburos. Esto puede observarse en los resultados obtenidos en la Figura 4 y, en consecuencia, en la Tabla 3, en donde no se observa una tendencia clara de aumento o disminución en la producción de hidrocarburos frente a la variación de los flujos de CO₂ estudiados.

Figura 5. Significancia estadística del CO2 y KNO3 en la producción de carbohidratos



2.3 PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS

La característica más influyente para llevar a cabo el cultivo de las diferentes cepas de micro algas verdes *B. Braunii* es su capacidad de almacenamiento de hidrocarburos respecto a otras micro algas (Ge et al 2011).

Una de las maneras de obtener hidrocarburos de los bioproductos generados con el cultivo de micro algas es por medio del almacenamiento de lípidos que se lleva a cabo con el fin, primordialmente, de proveer una reserva energética para la colonia.

Figura 6. Variación en la producción de lípidos totales con inyección de CO₂ continuo

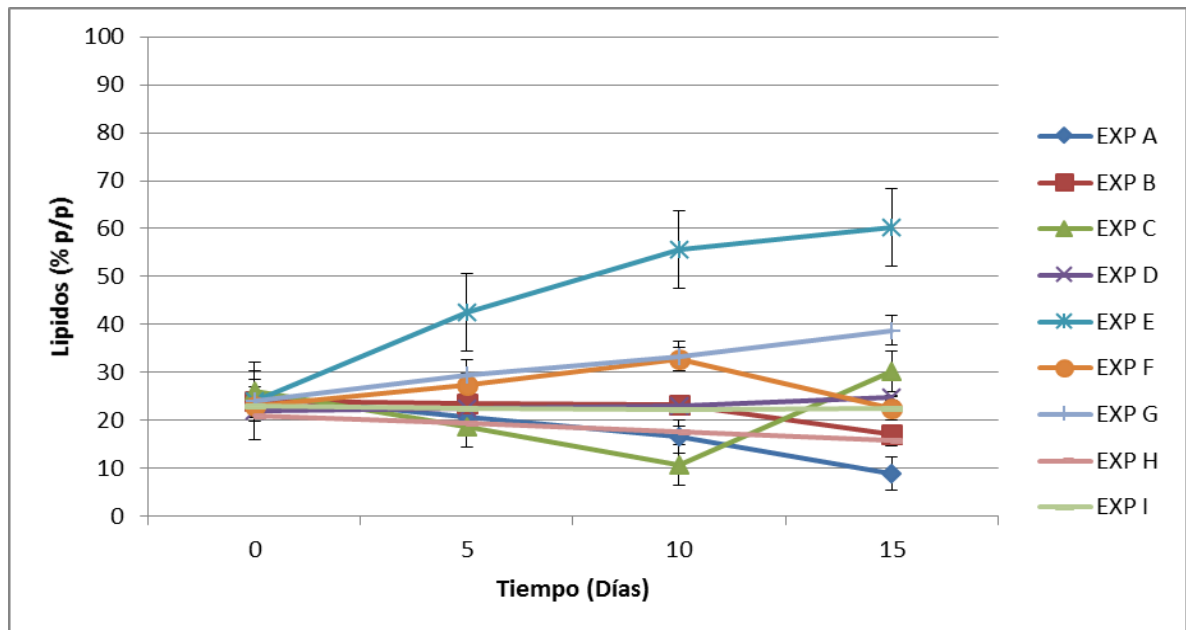


Tabla 4 Concentraciones óptimas de C/N para la producción de Lípidos

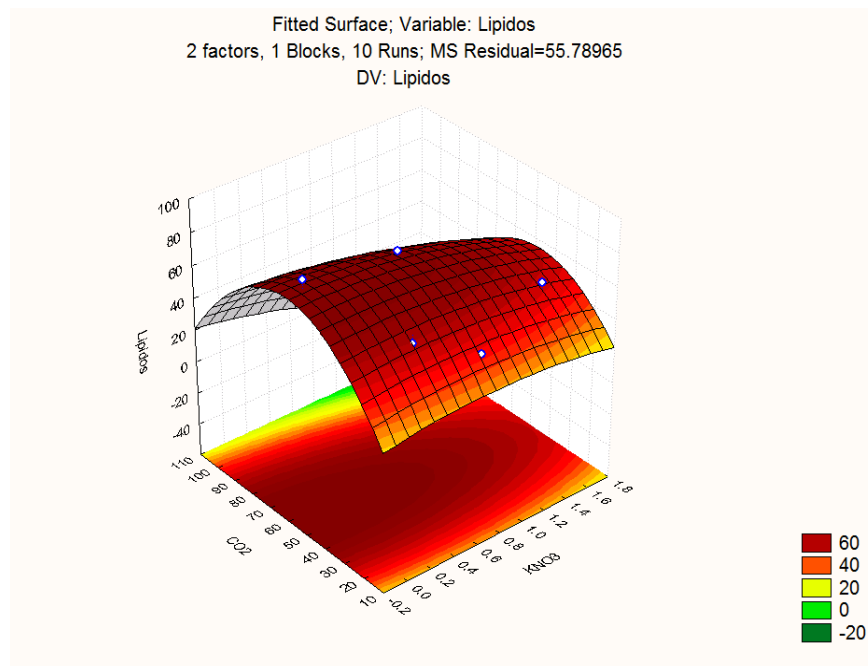
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
KNO₃									
(g/L)	0.75	1.50	0.75	0.38	0.38	0.75	0	1.50	1.54
CO₂									
(mL/min)	102.43	30.00	60.00	90.00	30.00	17.57	60.00	90.00	60.00
Lípidos									
(% p/p)	8,8	17,1	30,1	24,7	60,3	22,49	38,7	15,7	22,6

En la Figura 6 y la Tabla 4 se muestran los cambios en la producción de lípidos, que tuvieron lugar debido a las variaciones en el flujo de CO₂ entre cada lote de microalgas estudiado. Los resultados concluyen que la mejor producción de lípidos

correspondió a 60,3 (% P/P), obtenida cuando el flujo de CO₂ en el cultivo fue de 30 mL/min y KNO₃ de 0,38 g/L, lo cual supera a lo obtenido por Ge et al (2010) quien reportó un máximo en su producción de 12,71 %P/P con un flujo de CO₂ de 120 mL/min y Ranga et al (2010) quien reportó una producción máxima de 33,48 %P/P.

La Figura 7 muestra un panorama favorable en la producción lípidos totales llevada a cabo por la cepa de microalgas estudiada, teniendo en cuenta la amplia región correspondiente a una producción de lípidos significativa respecto a los diversos flujos de CO₂ estudiados. De esta manera es notable que el cenit en la producción de lípidos totales se establece cuando el flujo de CO₂ es de 60 ml/min y KNO₃ de 0,6 g/L.

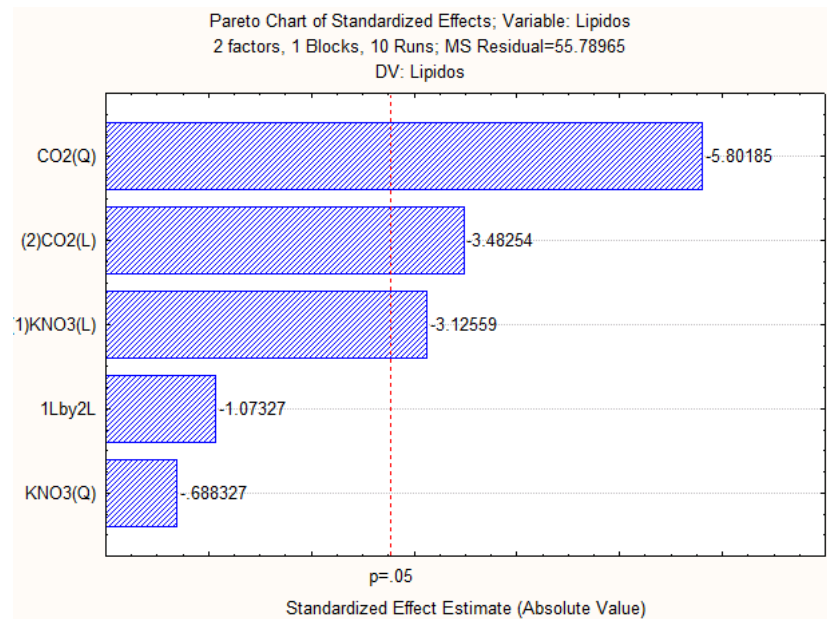
Figura 7. Relación entre la producción de lípidos totales, CO₂ y KNO₃.



Un análisis profundo de la Figura 8 muestra que, en efecto, existe una relación significativa entre la variación del flujo de CO₂ y la capacidad de producción de

lípidos totales, dicha relación se establece de manera inversa (ante un disminución en el flujo de CO₂ se aumenta la producción de lípidos). Esto es congruente con lo expuesto por Ge et al (2010), y se puede evidenciar en los resultados de la Tabla 4.

Figura 8. Significancia estadística de la variación del flujo de CO₂ y lípidos totales.



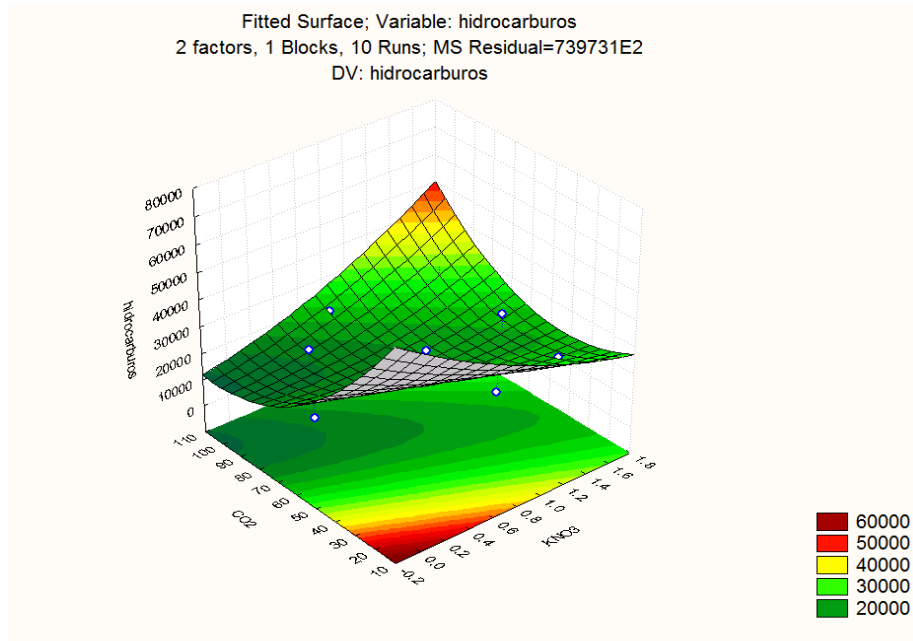
2.4 PRODUCCIÓN DE HIDROCARBUROS

Es realmente importante conocer en qué fase del crecimiento se acumulan hidrocarburos como lípidos (Kalacheva *et al.*, 2002), también se espera saber si existe una relación en la producción de hidrocarburos y biomasa así como de lípidos y biomasa, tal como lo reportan Kojima & Zhang (1999), ya que estas producciones se ven altamente influenciadas por las relaciones de nutrientes requeridos (Richmond, 1986).

La Figura 9 evidencia un máximo en la producción de hidrocarburos cuando los flujos de CO₂ fueron de 10 ml/min y 110 ml/min y KNO₃ de 0,1 g/L y 1,6 g/L, sin

embargo bajo las condiciones de operación evaluadas no se puede establecer una relación estrecha entre el flujo de CO_2 inyectado, el KNO_3 añadido y la producción de hidrocarburos.

Figura 9. Producción de hidrocarburos respecto a la variación de CO_2 y KNO_3



La Figura 10 determina una relación débil entre la variación de la cantidad de hidrocarburos y la cantidad de CO_2 inyectado, corroborando así lo concluido en el análisis de la Figura 9. Esto deja en el aire el establecimiento de una condición óptima de operación para maximizar la eficiencia en la producción de hidrocarburos.

Figura 10. Significancia estadística de la producción de carbohidratos respecto al flujo de CO₂

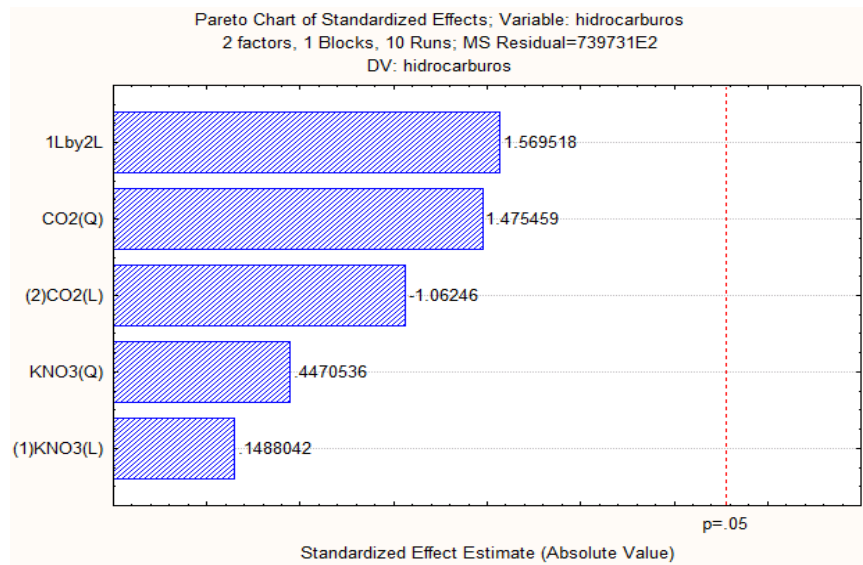
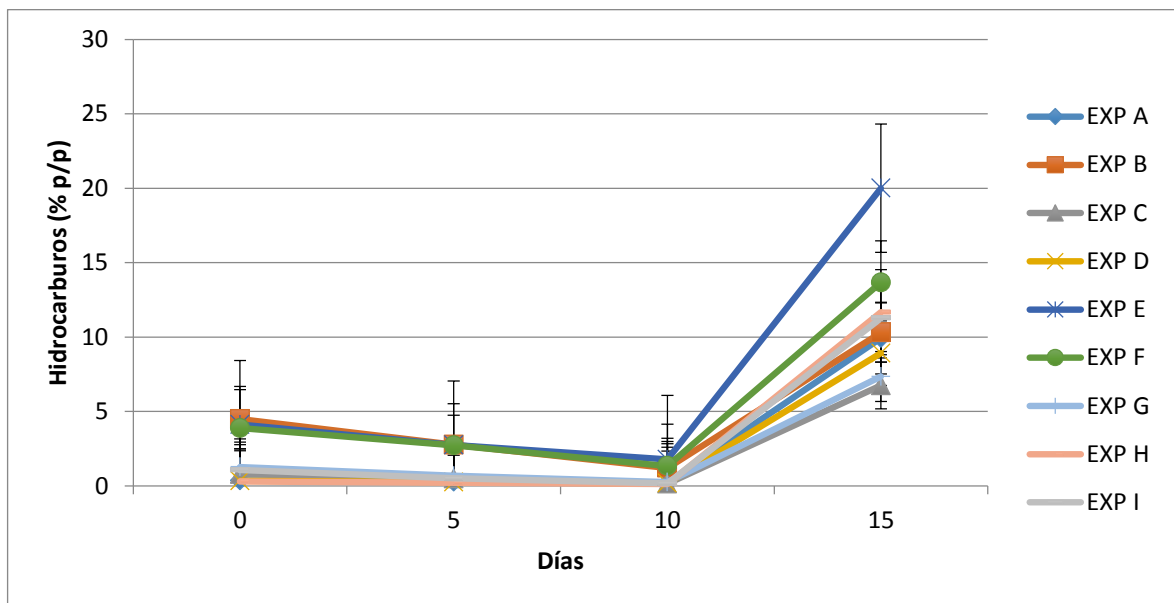


Figura 11. Producción de hidrocarburos respecto a la variación del flujo de CO₂



Los resultados obtenidos en la Figura 11 muestran la capacidad de producción y almacenamiento de hidrocarburos de la cepa estudiada, mostrando la mejor condición con un valor de 20 (%P/P), esto es congruente con los resultados propuestos por Ge *et al* (2011) (quien reportó un máximo en la producción de 24,45 (%P/P) con un flujo de CO₂ de 120 g/L) y (Ranga Rao *et al.* 2009) (con una producción máxima de 19 %P/P). De igual manera se corrobora que a diferentes concentraciones se mejora su producción como lo expresó Chiu *et al* (2008). Así como la importancia del carbono es notable, la concentración inicial de nitrógeno es vital, pues favorece el crecimiento de hidrocarburos Casadevall *et al* (1983).

3. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos demuestran la buena capacidad de la cepa *B. braunii* para producir una cantidad considerable de biomasa, además de su gran poder para almacenar lípidos e hidrocarburos. En todos los casos estudiados se ve un aumento en la producción de los bioproductos deseados a los 10 días de cultivo.
- Se evidenció que una fluctuación en la composición de CO₂ inyectado no afecta a la producción de hidrocarburos (debido a que la microalga realiza su deposición independiente), no obstante sí lo hace con la producción tanto de lípidos como de biomasa, que están estrechamente ligada a las condiciones de CO₂ y KNO₃.
- Los mejores resultados se obtuvieron a bajas condiciones de KNO₃ y CO₂,
- Se demostró que bajo las condiciones estudiadas en la inyección continua de CO₂ y KNO₃ añadido, no es posible obtener un valor específico que determine una condición óptima para la producción de hidrocarburos.
- El análisis de los resultados concluyó que la relación entre la producción de carbohidratos e hidrocarburos es inversamente proporcional.

BIBLIOGRAFÍA

Aaronson, S., Berner, T., Gold, K., Kushner, L., Patni, N.J., Repak, A. & Rubin, D. (1983) Some observations on the green planktonic alga, *Botryococcus braunii* and its bloom form. *J. Plank. Res.* 5: 693–700.

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.

Baldwin, D.S., Whittington, J. & Oliver, R. (2003) temporal variability of dissolved P speciation in a eutrophic reservoir – implications for predicting algal growth. *Water Res.* 37: 4595–4598.

Borowitzka MA. Commercial production of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes and Fermenters. *Journ Biotech.* 1999; 70: 313-321.

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.

Chae SR, Hwang EJ, Shin HS. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. *Bioresour Technol.* 2006; 97:322–9.

Chiang, I.-Z., Huang, W.-Y. & Wu, J.-T. (2004) Allelochemicals of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 49: 474–480.

Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294–306.

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

Fan L, Zhang Y, Cheng L, Zhang L, Tang D, Chen H. Optimization of carbon dioxide fixation by *Chlorella vulgaris* cultivated in a membrane photobioreactor. *Chem Eng Technol.* 2007; 8:1094–9.

Ge Y, Liu J, Tian G. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. *Bioresource Technology* 2011; 102:130–134

Kalacheva GS, Zhila NO, Volova TG, Gladyshev MI. The effect of temperature on the lipid composition of the green alga *Botryococcus*. *Microbiology.* 2002; 71: 286–293.

Knothe, G. (2007) Some aspects of biodiesel oxidative stability. *Fuel Process. Technol.* 88: 669–677.

Kützing, F.T. (1849) *Species Algarum*. 922 pp. FA Brockhaus, Leipzig, Germany.

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

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

Maeda K, Owada M, Kimura N, Omata K, Karube I. CO₂ fixation from flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Convs. Mgmt.* 1995; 36, 693–696.

Metzger P and Casadevall E. Ether lipids from *Botryococcus braunii* and their biosynthesis. *Phytochem* 1992; 7: 2341–234

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.

Rao, R., Sarada R. (2016). Influence of growth and Hydrocarbon Production in *Botryococcus braunii*. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2006; 17(3), 414-419.

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

Ugwu, C.U., Aoyagi, H. & Uchiyama, H. (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol.* 99:4021–4028.

Wake LV, Hillen LW. Study of a “bloom” of the oil-rich alga *Botryococcus braunii* in the Darwin river reservoir. *Biotechnol. Bioeng.* 1980; 22:1637–56.

Watanabe, Y., Ohmura, N., Saiki, H., 1992. Isolation and determination of cultural characteristics of microalgae which Cuncions under CO₂ enriched atmosphere. *Energy Conversion Management.* 1992; 33 (5-S):545-52.

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

Yoo C, Jun SY, Lee JY, Ahn CY, Oh HM. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresour. Technol.* 2010; 101, 71–74.