

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CLORURO DE ALUMINIO ( $AlCl_3$ ) EN LA  
RECUPERACIÓN DE BIOMASA E HIDROCARBUROS DE *Botryococcus*  
*braunii***

**IVONNE NATHALIA ARENAS CARRILLO  
LINA MARÍA PEÑA PEÑA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2015**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CLORURO DE ALUMINIO ( $AlCl_3$ ) EN LA  
RECUPERACIÓN DE BIOMASA E HIDROCARBUROS DE *Botryococcus braunii***

**IVONNE NATHALIA ARENAS CARRILLO  
LINA MARÍA PEÑA PEÑA**

**Trabajo de grado para optar al título de  
Ingeniero Químico**

**Director:**

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

**Codirector:**

**ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO  
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Dios por la vida, las oportunidades y los retos alcanzados, por brindarnos salud, sabiduría y entendimiento, permitiéndonos alcanzar los objetivos propuestos.

A nuestros padres fuente de apoyo constante e incondicional pues día a día nos inculcaron valores de respeto, responsabilidad, honestidad y disciplina. A nuestros familiares por su compañía, gratas experiencias y enseñanzas, encaminándonos a ser excelentes personas y profesionales.

A la Universidad Industrial de Santander, en especial a la Escuela de Ingeniería Química y los docentes pertenecientes a esta, por aportarnos sus conocimientos, disciplina y enseñanzas que ayudaron a nuestro crecimiento académico en busca de nuestra formación profesional.

A nuestro director y codirector de proyecto, Crisóstomo Barajas Ferreira y Andrés Fernando Barajas Solano, por ser guías en el desarrollo del presente estudio y otorgarnos la oportunidad, confianza, tiempo y dedicación.

Al Laboratorio de Biomasa del Centro de Investigaciones para el Desarrollo Sostenible en la Industria y la Energía (CIDES) por su acompañamiento, disposición de los equipos y materiales requeridos en la experimentación. A las Ingenieras Ana María Ardila y Bibiana García por su apoyo, enseñanzas y consejos brindados.

A nuestros amigos por cada uno de los momentos vividos, por ser un apoyo en situaciones difíciles y llenar esta etapa de gratas experiencias.

***Ivonne Nathalia Arenas Carillo***

***Lina María Peña Peña***

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA</b> .....	14
1.1 MICROORGANISMO .....	14
1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL FLOCULACIÓN.....	14
1.3 METODOLOGÍA FLOCULACIÓN. ....	15
1.4 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA, METABOLITOS Y CENIZAS. ....	17
1.4.1 Cuantificación de biomasa.....	17
1.4.2 Cuantificación exo-polisacaridos.....	17
1.4.3 Cuantificación de hidrocarburos en la biomasa.. ....	17
1.4.4 Cuantificación de lípidos totales.....	18
1.4.5 Cuantificación de Cenizas.....	19
<b>2. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	20
2.1 EFICIENCIA DE FLOCULACIÓN.....	20
2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	22
2.2.1 Eficiencia de floculación.....	22
2.3 CONTENIDO DE EXO-POLISACÁRIDOS.....	24
2.4 CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS EN LA BIOMASA .....	25
2.5 CONTENIDO DE CENIZAS .....	28
<b>3. CONCLUSIONES</b> .....	30
<b>4. RECOMENDACIONES</b> .....	31
<b>CITAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	32
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	35

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Parámetros para la Experimentación.....	15
<b>Tabla 2.</b> Diseño de Experimentos.....	15

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Diagrama del proceso.....	16
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de Eficiencia de <i>B.braunii</i> en la etapa de floculación para el diseño experimental.....	20
<b>Figura 3.</b> Experimento D (pH=4 y concentración de floculante = 1,5 (g/L).....	21
<b>Figura 4.</b> Superficie de respuesta para la eficiencia de floculación de Biomasa...22	
<b>Figura 5.</b> Diagrama de Pareto para la biomasa recuperada. ....	23
<b>Figura 6.</b> Comportamiento de Exo-polisacáridos (g/L) en el medio a través del tiempo. ....	25
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de hidrocarburos antes de la floculación.....	26
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de hidrocarburos después de floculación.....	27
<b>Figura 9.</b> Experimento sometido a condiciones óptimas. ....	28
<b>Figura 10.</b> % p/p de cenizas y metabolitos presentes en la biomasa inicial y final. ....	29

## RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CLORURO DE ALUMINIO (AlCl<sub>3</sub>) EN LA RECUPERACIÓN DE BIOMASA E HIDROCARBUROS DE *BOTRYOCOCCUS BRAUNII*\*

**AUTORES:** IVONNE NATHALIA ARENAS CARRILLO  
LINA MARÍA PEÑA PEÑA\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Microalgas, *Botryococcus braunii*, lípidos, hidrocarburos, centrifugación, sedimentación por gravedad, filtración, autofloculación, floculación, pH, eficiencia de floculación.

### CONTENIDO:

Actualmente, las microalgas son fuente primordial para la producción de biocombustibles, debido a su alto contenido de lípidos e hidrocarburos. *Botryococcus braunii* (Kützing) es una microalga de agua dulce que posee una cantidad significativa de hidrocarburos. Existen varias técnicas de recuperación y separación de células como: centrifugación, sedimentación por gravedad, filtración, autofloculación y floculación. La floculación es un proceso mediante el cual se adicionan sustancias denominadas floculantes, las cuales pueden ser orgánicas o poliméricas, con el fin de agrupar las células y separarlas del medio.

Para el desarrollo de este proyecto, se evaluó el método de floculación para la recuperación de biomasa e hidrocarburos, variando el pH y la concentración de cloruro de aluminio (floculante). Se realizaron nueve experimentos con las diferentes condiciones mencionadas anteriormente, durante cuatro horas y se determinó la cantidad de biomasa recuperada, el contenido de lípidos, exopolisacáridos e hidrocarburos presentes en el medio y el floculado final. Finalmente, se encontró que a un pH ácido (4-6) y una concentración de floculante entre 0,8 y 1,5 g/L se obtiene la mayor eficiencia de floculación (60%).

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingeniería Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: M.Sc. Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirector: Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano.

## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF THE EFFECT OF ALUMINUM CHLORIDE (AlCl<sub>3</sub>) IN RECOVERY OF BIOMASS AND HYDROCARBONS OF BOTRYOCOCCUS BRAUNII\*.

**AUTHORS:** IVONNE NATHALIA ARENAS CARRILLO  
LINA MARÍA PEÑA PEÑA\*\*

**KEYWORDS:** Microalgae, Botryococcus braunii, lipids, hydrocarbons, centrifugation, gravity settling, filtration, autoflocculation, flocculation, pH, flocculation efficiency.

### CONTENT:

Currently, microalgae are the primary source for the production of biofuels, due to its high content of lipids and hydrocarbons. Botryococcus braunii (Kützinger) is a freshwater microalga that has a significant amount of hydrocarbons. There are several techniques of separation and recovery of cells, such as centrifugation, gravity settling, filtration, autoflocculation and flocculation. Flocculation is a process by which substances called flocculants are added, these may be organic or polymeric, in order to group the cells and separate them from the medium.

For the development of this project, the flocculation method for the recovery of biomass and hydrocarbons was evaluated by varying the pH and the concentration of aluminum chloride (flocculant). Nine experiments with the different conditions listed above were carried out for four hours and the amount of recovered biomass and lipid, exopolysaccharides, and hydrocarbons content present in the medium and the final flocculated were determined. Finally, it was found that at acidic pH (4-6) and a flocculant concentration between 0.8 and 1.5 g / L the flocculation greater efficiency (60%) is obtained.

---

\*Thesis Degree.

\*\* Physicochemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Director: M.Sc. Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirector: Biologist. Andrés Fernando Barajas Solano.

## INTRODUCCIÓN

*Botryococcus braunii* (Kützing) es una microalga de agua dulce que posee una cantidad significativa de hidrocarburos (15-75% en peso seco) [1]; *B. braunii* se clasifica según el hidrocarburo sintetizado en tres razas fitoquímicas (A,B y L); el subgrupo A produce n-alcadieno y/o n-trienos obteniendo números de carbonos impares (C<sub>23</sub>-C<sub>33</sub>) [2] el subgrupo L sintetiza un solo hidrocarburo tetraterpenoide denominado licopadieno [2] y el subgrupo B produce hidrocarburos triterpenoides llamados botriococenos (C<sub>30</sub>-C<sub>37</sub>) e hidrocarburos escualenos metilados (C<sub>31</sub>-C<sub>34</sub>) [2], y El Subgrupo A presenta un contenido de hidrocarburos que va desde el 0,4 al 61% de su peso seco [3], el subgrupo L contiene alrededor de 0,1 al 8% de hidrocarburos en su peso seco [3], por otro lado el subgrupo B posee un contenido de hidrocarburos del 30 al 40% de su peso seco; y un valor térmico que varía entre 30,000 a 42,000 kJ kg<sup>-1</sup> [4]; [5]; [6]; [7]; [8], Además de hidrocarburos esta microalga produce lípidos (principalmente ácidos grasos, triglicéridos y esteroides) con valores que varían entre 20 y 50% de su peso seco, lo cual las hace una fuente promisoría para la obtención de biocombustibles de tercera generación [9]; sin embargo antes de poder aprovechar la biomasa producida es necesario concentrarla y retirarla del medio líquido.

Existen varias técnicas de recuperación y separación de células como: centrifugación, sedimentación por gravedad, filtración, floculación y autofloculación; aun teniendo diferentes métodos para concentrar la biomasa, muchos de estos pueden llegar a representar entre el 20 y 30% del costo total de producción [1]. La centrifugación requiere grandes cantidades de energía para su funcionamiento, convirtiéndola en un proceso con baja rentabilidad económica a pesar de la eficiencia que presenta. La sedimentación por gravedad depende de la rapidez con la que se lleve a cabo, siendo generalmente un proceso lento y no controlable, lo que se ve reflejado en los altos costos de producción sin importar que tenga un bajo requerimiento energético. La filtración es un método efectivo siempre y cuando se

utilicen los filtros, el bombeo apropiado, y el tamaño de la microalga ( $> 70\mu\text{m}$ ), estas características generan un incremento en el costo del proceso [10].

La floculación es un proceso mediante el cual se adicionan sustancias denominadas floculantes, las cuales pueden ser inorgánicas o poliméricas con el fin de agrupar las células y separarlas del medio. La pared celular de las microalgas posee una carga negativa que impide la auto agregación dentro de la suspensión [10], para contrarrestar este proceso se añade una sustancia positiva con iones polivalentes (floculante), favoreciendo la extracción por precipitación y permitiendo así la unión de unas moléculas con otras [11]. Los floculantes se clasifican en dos clases: poliméricos e inorgánicos; la primera clase incluye polímeros iónicos, no iónicos, naturales y sintéticos; su funcionamiento se basa en la interacción iónica de los polielectrólitos y las células generando la suspensión de las mismas y favoreciendo la formación de flóculos. La eficiencia de este tipo de floculación se encuentra relacionada directamente con el peso molecular y la carga del polímero [12].

La segunda clase de floculante corresponde a iones metálicos polivalentes ( $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ) que dan origen a complejos poli-hidroxilados en función del pH, algunos de los floculantes inorgánicos más usados son: sulfato de aluminio, cloruro férrico, sulfato ferroso y sustancias multivalentes, donde su eficiencia es directamente proporcional a la carga iónica. Existen factores que pueden afectar este tipo de floculación como la concentración del floculante, pH y la microalga a tratar (condiciones fisiológicas, composición y propiedades de la pared celular) [12]. Según Lee *et al* (1998) [1] se ha demostrado que la variable más influyente a la hora de realizar el proceso de floculación es el pH, ya que permite recuperar eficazmente la cantidad de lípidos presentes en la biomasa y disminuye las alteraciones presentes debidas a la adición del floculante. En pH ácidos es preferible el uso de sales metálicas de hierro o aluminio y según Uduman *et al* (2010) [13] el pH óptimo de floculación con aluminio para las microalgas oscila entre 5,3 y 5,6.

Una propiedad especial de las microalgas es que tienen la capacidad de autofloculación la cual ocurre cuando el suministro de aire es interrumpido en el transcurso de la fotosíntesis, originando la precipitación de sales de carbonato, fosfato, calcio, magnesio y las células de las microalgas [10], Lee et al (1998) [1] evaluaron tres condiciones para la recuperación de *B. braunii*, ajustando el pH, utilizando un floculante inorgánico (sulfato de aluminio) y un biofloculante (Pestan), concluyendo que la variable más significativa en el proceso de floculación es el pH, adicionalmente, dicha variable permite disminuir las variaciones causadas por los floculantes en el medio de cultivo. Por otro lado Kim et al (2013) [14] evaluaron las condiciones óptimas para la floculación de *B. braunii* a través de la metodología de la superficie de respuesta (RSM), teniendo en cuenta factores como: concentración de FeCl<sub>3</sub>, de biofloculantes y el tiempo de mezclado, concluyendo que el tiempo de mezclado lento favorece el proceso de floculación.

Con base en lo anterior para la ejecución del presente estudio y con ayuda del grupo de Investigación CIDES de la Universidad Industrial de Santander (UIS), se tomó como técnica la floculación con cloruro de aluminio (floculante orgánico) en una cepa de *Botryococcus braunii*, evaluando los efectos que éste tiene en la recuperación de biomasa, lípidos e hidrocarburos, variando el pH y la concentración de floculante.

# 1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

## 1.1 MICROORGANISMO

*Botryococcus braunii* fue 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 contenía: 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 ( $5,53 \times 10^{-4}$ ),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1,79 \times 10^{-5}$ ) [15], se emplearon reactores cilíndricos con una capacidad volumétrica de 2 L, altura de 35cm y diámetro interno de 14cm. El cultivo se mantuvo en agitación mediante la inyección de aire comprimido (filtrado) a 0,6 L/min y  $\text{CO}_2$  a un flujo de 0,05L/min.

## 1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL FLOCULACIÓN

Teniendo en cuenta trabajos realizados anteriormente en el grupo de Investigación CIDES en floculación de biomasa de microalgas, se realizó un diseño de experimentos utilizando el software STATISTICA 7, donde se evaluó el efecto del pH y la concentración de floculante ( $\text{AlCl}_3$ ) en la eficiencia de concentración de biomasa de *B. braunii* y su efecto en los exo-metabolitos (exo-polisacáridos) en un tiempo específico.

**Tabla 1.** Parámetros para la Experimentación.

pH	Concentración de floculante (g/L)
4	0,5
6	1
8	1,5

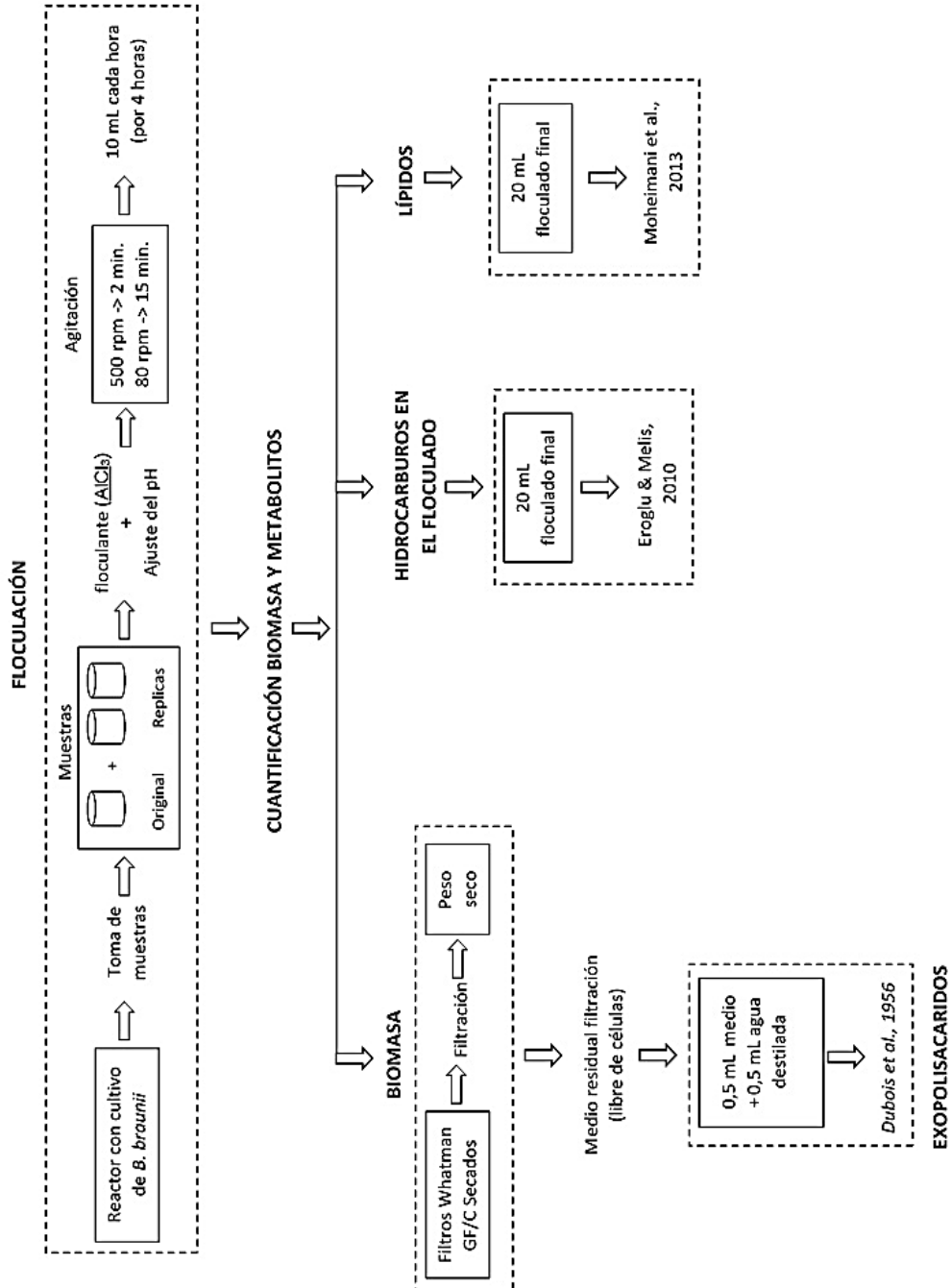
**Tabla 2.** Diseño de Experimentos.

Experimento	pH	Concentración de floculante (g/L)
A	3,17	1,00
B	6	0,29
C	8,83	1,00
D	4	1,50
E	6	1,71
F	8	0,50
G	6	1,00
H	8	1,50
I	4	0,50

### 1.3 METODOLOGÍA FLOCULACIÓN.

Para la floculación se utilizaron reactores plásticos de 150 mL con 100 mL de muestra correspondiente a un cultivo de 30 días. A cada uno de los experimentos se le adicionó la concentración requerida de floculante seguido por el ajuste de pH establecido anteriormente. Una vez se alcanzó el pH deseado, el experimento se homogenizó según la metodología descrita por [16], la cual consiste en una agitación de 500 rpm durante 2 minutos, seguido por 15 minutos a 80 rpm.

Figura 1. Diagrama del proceso.



## 1.4 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA, METABOLITOS Y CENIZAS.

Para evaluar la eficiencia de la floculación en el tiempo se tomaron muestras cada hora durante 4 horas donde se cuantificó biomasa, exo-polisacáridos, hidrocarburos y lípidos totales con base en los métodos descritos por Moheimani *et al.* (2013).

### 1.4.1 Cuantificación de biomasa

Cada hora, 10 mL de muestra se filtraron utilizando filtros Whatman GF/C previamente pesados (100°C durante 1 hora); la muestra se llevó a horno durante 1 hora a 100°C y se mantuvo en un desecador durante 12 horas hasta alcanzar peso constante. Para determinar la eficiencia de recuperación de biomasa se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de recuperación [\%]} = \frac{\text{Biomasa}_{\text{Hora } i}}{\text{Biomasa}_{\text{floculada}}}$$

### 1.4.2 Cuantificación exo-polisacáridos

Del medio residual de la filtración se tomó 1 mL del medio (libre de células), luego se 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 1 minuto a velocidad media (según especificaciones del equipo). Por último, se midió la absorbancia a 485 nm (para la cuantificación de glucosa) en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

### 1.4.3 Cuantificación de hidrocarburos en la biomasa.

Al inicio de la experimentación se tomaron 20 mL del reactor (sin floculante ni ajuste de pH) y una vez transcurridas 4 horas se tomaron 20 mL del floculado final, los cuales fueron centrifugados durante 20 minutos a 3400 rpm, se adicionaron 3 mL de Heptano grado analítico y 5 mg de perlas de vidrio con un diámetro de 0,5 mm a la pasta de biomasa concentrada (pellet) [17], a continuación la mezcla fue homogenizada con vortex durante 15 minutos a velocidad máxima y se agregaron

5 mL de agua destilada para separar la biomasa del extracto de hidrocarburos. Finalmente, con celdas de cuarzo se midió la absorbancia a 190 nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck). Para determinar la cantidad de hidrocarburos en el medio (Exo-Hidrocarburos) y en la biomasa se utilizó la siguiente ecuación [17]:

$$\text{Cantidad de hidrocarburos } \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{\left( \frac{A_{190}}{\varepsilon_{190}} * \bar{M}_{Btc} * V \right)}{B_{Ext}}$$

Donde,

$A_{190}$  = Absorbancia medida a 190 nm.

$\varepsilon_{190}$  = Coeficiente de extinción molar para Botryococcene (90)

$\bar{M}_{Btc}$  = Peso molecular del Botryococcene (411 g/mol)

$V$  = Volumen de heptano utilizado para la extracción (3 mL)

$B_{Ext}$  = Cantidad de Biomasa sometida a extracción.

### **Cuantificación de lípidos totales**

Al inicio de la experimentación se tomaron 20 mL del reactor (sin floculante ni ajuste de pH) y una vez culminada la hora 4 se tomaron 20 mL del floculado final. Cada muestra fue centrifugada durante 20 minutos a 3400 rpm, a la pasta de biomasa concentrada (pallet) se le adicionó 5,7 mL de solución *Bligh & Dyer* y 5 mg de perlas de vidrio con diámetro de 0,5 mm, durante 15 minutos la mezcla se homogenizó con vortex a velocidad máxima, nuevamente durante 20 minutos fue centrifugada a 3400 rpm. En tubos de vidrio de fondo plano de 50 mL se adicionó el sobrenadante; a la pasta restante de biomasa concentrada (pellet) se le adicionaron 5,7 mL de solución *Bligh & Dyer*, se homogenizó 5 minutos en vortex y fue llevada a centrifuga a las mismas condiciones.

Los sobrenadantes de la última centrifugación se adicionaron a los tubos de vidrio de fondo plano mencionados anteriormente y se agregaron 3 mL de cloroformo analítico. La mezcla fue llevada durante 24 horas a nevera con el fin de separar las

fases, agua y cloroformo con los lípidos. Pasadas las 24 horas se retiró el exceso de agua, el extracto de lípidos fue llevado a cajas de Petri previamente pesadas, luego fueron llevadas al horno durante 30 minutos a 100°C y al desecador 8 horas, finalmente se registró su peso.

#### **1.4.5 Cuantificación de Cenizas**

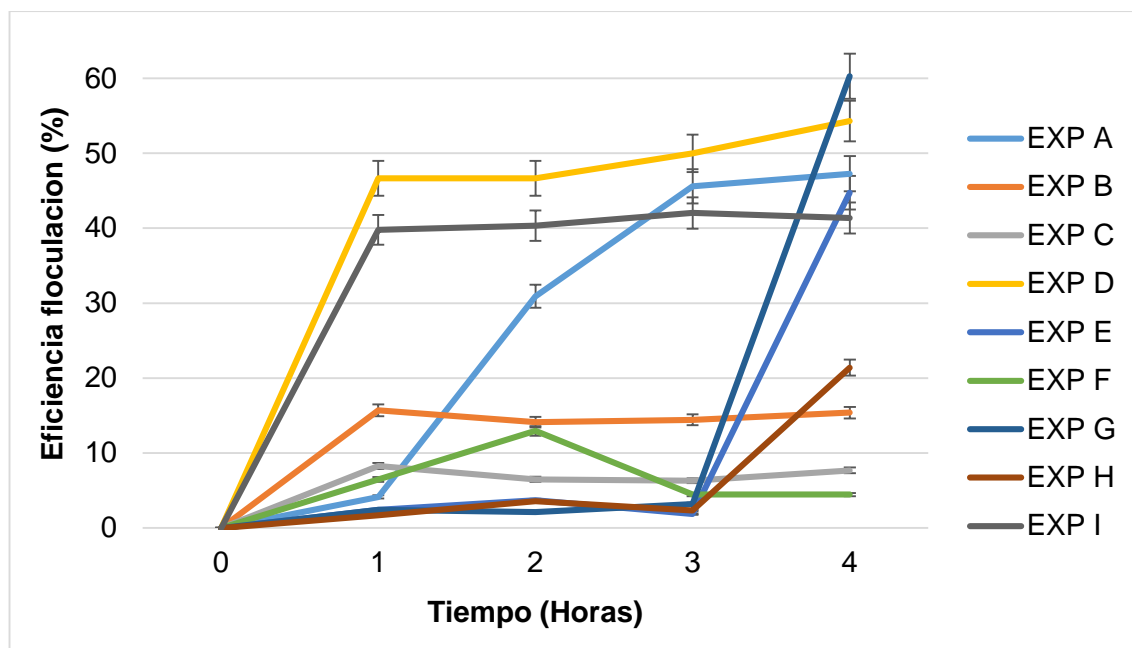
Se utilizaron Crisoles de 50 mL previamente tratados (100°C, 24 hr; desecador 12 hr). Al inicio de la experimentación se tomaron 10 mL del reactor (sin floculante ni ajuste de pH) y una vez culminada la hora 4 se tomaron 10 mL del medio y 10 mL del floculado final. Estas muestras fueron depositadas en los crisoles mencionados anteriormente, se registró el nuevo peso y se depositaron en el horno durante 12 horas a 100°C, posteriormente fueron trasladados a una mufla con rampas de: 1) 20 minutos para alcanzar una temperatura de 105°C y 12 minutos para mantenerla, 2) 15 minutos para alcanzar una temperatura de 250°C y 30 minutos para mantenerla, 3) 17 minutos para alcanzar una temperatura de 575°C y 180 minutos para mantenerla. Finalmente los crisoles fueron pesados.

## 2. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 2.1 EFICIENCIA DE FLOCULACIÓN

En la Figura 2 se muestra el comportamiento de la eficiencia de floculación (%) durante cuatro horas, se infiere que los experimentos B, C, F y H presentaron una baja recuperación de biomasa (15,38; 7,68; 4,45 y 21,40 % respectivamente), Por el contrario E y G inicialmente mostraron bajas eficiencias, pero a partir de la hora tres tuvieron un cambio drástico, alcanzando eficiencias del 44,73 - 60,27% respectivamente. El experimento A se comportó de manera creciente y favorable (47,27%); mientras que, D e I durante la primera hora de la experimentación crecieron significativamente para luego mantener un comportamiento constante y sobresaliente (41,36 y 54,29% respectivamente).

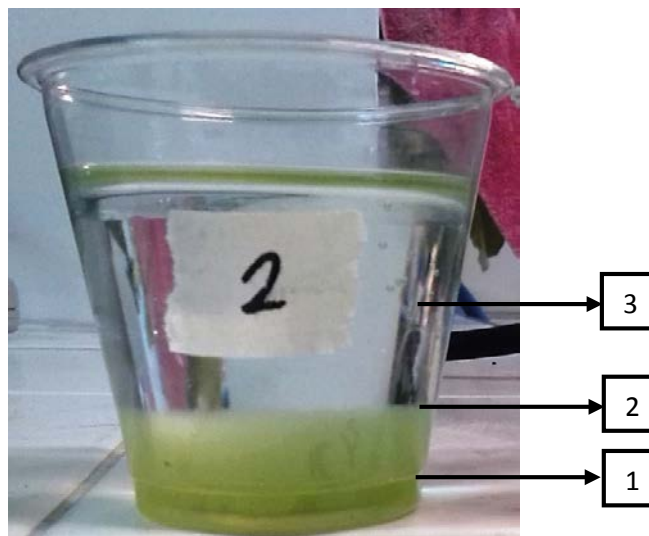
**Figura 2.** Porcentaje de Eficiencia de *B.braunii* en la etapa de floculación para el diseño experimental.



A diferencia de otras microalgas, *B. Braunii* puede sintetizar hidrocarburos, los cuales tienen un efecto directo en la eficiencia de floculación. La Figura 3 representa el experimento D a una concentración de floculante de 1,5 (g/L) y un ajuste de pH de 4, se puede observar que la biomasa no se sedimenta totalmente debido a que las colonias floculadas contienen una cantidad de hidrocarburos externos, los cuales tienen una densidad inferior a la del agua y son insolubles en esta, actuando como flotadores que impiden a las colonias concentrarse y asentarse en el fondo del reactor. Adicionalmente, se puede apreciar la formación de una capa (2) de hidrocarburos intermedia entre el medio de cultivo y la biomasa floculada, la cual se forma gracias al equilibrio de fuerzas entre ellos, bloqueando la transferencia de agua y el floculante.

**Figura 3.** Experimento D (pH=4 y concentración de floculante = 1,5 (g/L).

1) Biomasa floculada, se observa que no se encuentra totalmente sedimentada. 2) Capa intermedia entre el medio y la biomasa floculada, contiene hidrocarburos que interrumpen la floculación. 3) Medio de cultivo, el cual contiene agua, exo-polisacáridos, hidrocarburos, floculante.

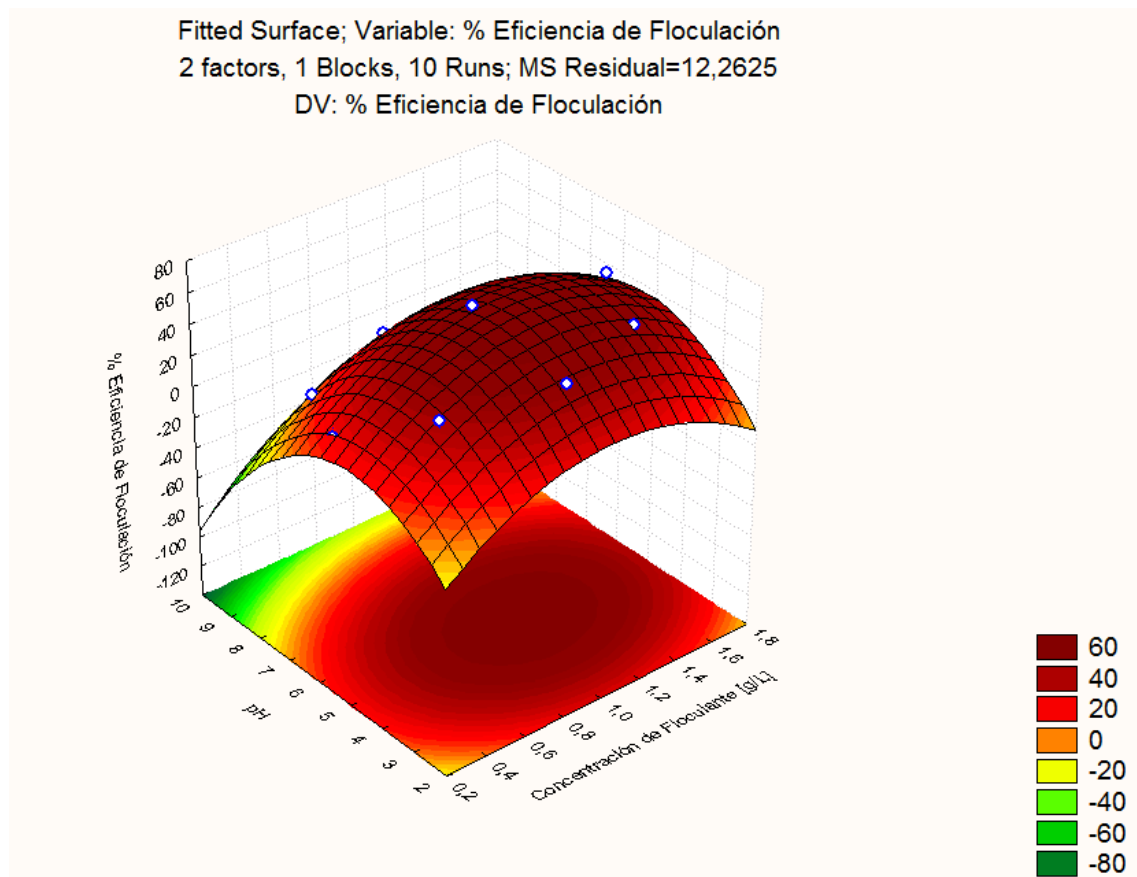


## 2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 2.2.1 Eficiencia de floculación.

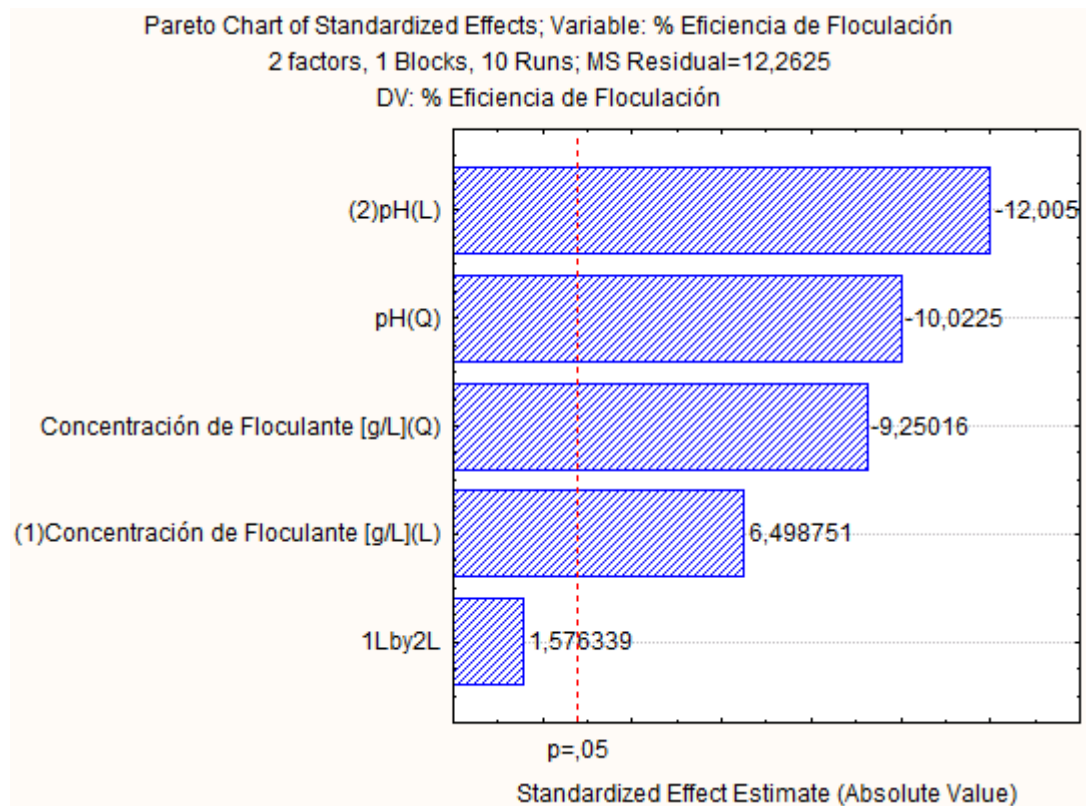
En la figura 4 se presenta el efecto del pH y la concentración del floculante (g/L) en la eficiencia de floculación (%), en el cual se observa la influencia negativa que tiene el pH básico en la eficiencia y que a valores de pH entre 4-6 (pH ácido) y una concentración de floculante de 0,8 a 1,5 g/L se obtiene una recuperación de biomasa superior, alrededor del 60%. En estas últimas condiciones el floculante bloquea la carga superficial de las células permitiendo que estas se adhieran entre sí, facilitando la sedimentación de grandes partículas.

**Figura 4.** Superficie de respuesta para la eficiencia de floculación de Biomasa.



El diagrama de Pareto (Figura 5) demuestra que las 2 variables utilizadas (pH y concentración de floculante) son significativas ( $p \geq 0,05$ ). Para el caso del pH el signo negativo indica que su influencia es inversamente proporcional respecto a la eficiencia de floculación, es decir, a altos valores de pH ( $> 6$ ) la eficiencia será menor; por otro lado la concentración de floculante no presenta una relación directa o indirecta, por lo que las tasas de eficiencia más altas (60%) se obtienen en un rango específico de floculante agregado como se observa en la Figura 4. La relación entre las dos variables mencionadas anteriormente no es significativa, aunque de forma independiente esta variable si lo son.

**Figura 5.** Diagrama de Pareto para la biomasa recuperada.



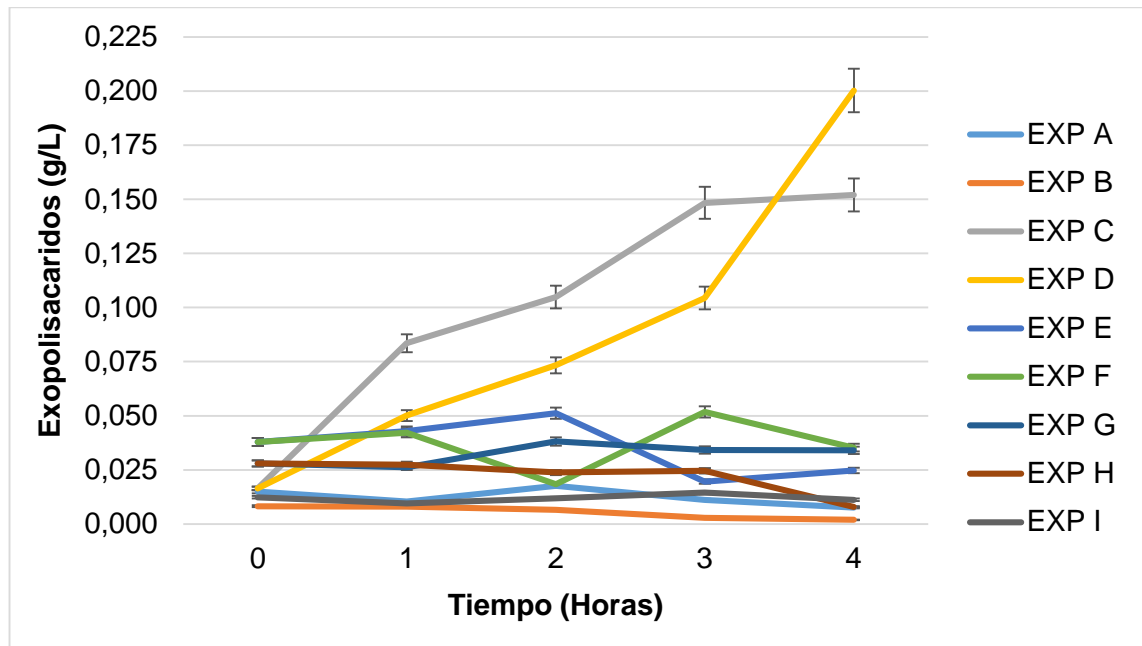
Actualmente no se ha reportado ninguna otra investigación acerca de floculación de *B. Braunii* empleando cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) y el ajuste de pH conjuntamente, sin embargo, Lee y colaboradores [1] estudiaron el comportamiento de la

recuperación de biomasa por medio de floculación al adicionar independientemente a cada muestra sulfato de aluminio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ), floculante microbiano (PESTAN) y ajustando el pH, donde encontraron que se pueden alcanzar eficiencias alrededor del 90% a un valor de pH de 11, lo que corrobora la importancia que tiene esta variable en el proceso. Sin embargo este valor de pH difiere al alcanzado en el presente estudio pues aquí se evaluó la interacción de las dos variables (concentración de floculante y ajuste de pH) y no el comportamiento de cada una de ellas por separado, adicionalmente no se cuenta con la misma procedencia de la cepa, medio de cultivo y el mismo tipo de floculante.

### **2.3 CONTENIDO DE EXO-POLISACÁRIDOS**

Los exo-polisacáridos son carbohidratos adheridos a la superficie de la colonia microalgal que otorgan el aspecto mucoso de la célula, y generan una barrera protectora contra la deshidratación [18]. En la Figura 6, se puede apreciar el comportamiento de los exo-polisacáridos en el medio a través del tiempo en relación gramos de carbohidratos por litro de solución. La cantidad de exo-polisacáridos en los experimentos abarcó un rango de 0,002 y 0,2 g/L. Los experimentos A, B, E, F, G, H e I no presentaron variaciones significativas durante las cuatro horas, es decir, los exo-polisacáridos se mantuvieron adheridos a la superficie sin desprenderse hacia el medio acuoso, por otro lado en los experimentos C y D la presencia de exo-polisacáridos en el medio incrementó significativamente, donde C se encuentra entre 0,016 - 0,152 g/L y D entre 0,016 – 0,200 g/L, lo que indica que los carbohidratos son segregados por las células al medio, permitiendo la adhesión de estas y favoreciendo la floculación, esto se verifica en los resultados obtenidos en la Figura 2.

**Figura 6.** Comportamiento de Exo-polisacáridos (g/L) en el medio a través del tiempo.

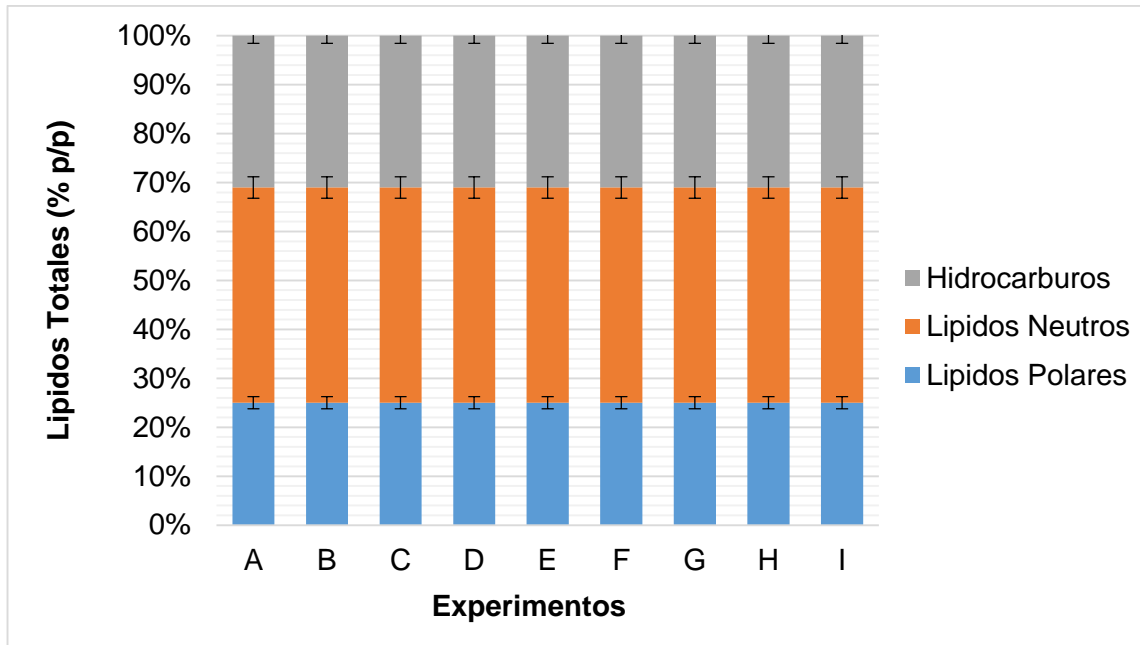


## 2.4 CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS EN LA BIOMASA

La fracción lipídica está compuesta por lípidos polares (fosfolípidos, glicolípidos, pigmentos lipídicos y esteroides) y lípidos neutros como acilglicerol, pigmentos de hidrocarburos e hidrocarburos. *B. Braunii* posee un alto contenido de hidrocarburos, los cuales permiten la unión de las colonias entre sí y brindan protección ante agentes externos a través de una capa de defensa [3], se encuentran en el interior de la célula, siendo parte fundamental para la obtención de biocombustibles.

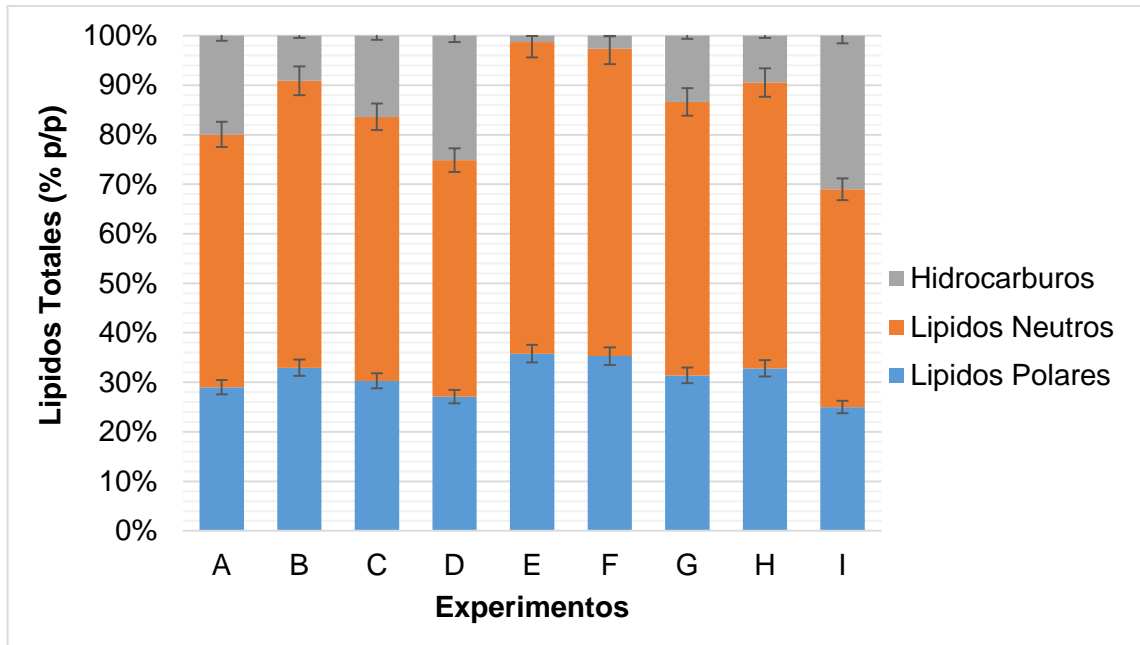
La Figura 7 representa el porcentaje inicial de lípidos totales, con su respectiva fracción de lipídica: lípidos polares (25%), lípidos neutros (44%) e hidrocarburos (31%). Inicialmente (hora cero) no se ajustó el pH ni la concentración de floculante lo que conllevó a la invariabilidad de las fracciones para todos los experimentos.

**Figura 7.** Porcentaje de hidrocarburos antes de la floculación.



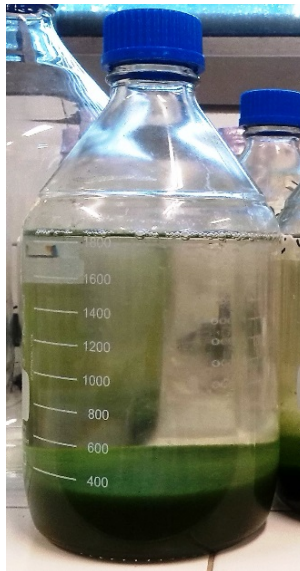
En la Figura 8 se representa el comportamiento lipídico (%) en la biomasa floculada transcurridas las cuatro horas de experimentación, se observa que en todos los experimentos a excepción de I los hidrocarburos se están liberando al medio, lo que indica que estos abandonan la colonia microalgal. Se evidencia que en los experimentos B, E, F y H los hidrocarburos presentaron una disminución significativa, alcanzando porcentajes de 6,91; 0,88; 1,86 y 7,20% respectivamente, esta tendencia no es adecuada pues se espera que los hidrocarburos permanezcan en la biomasa. Sin embargo, cabe resaltar que este proceso fue sometido a agitación, la cual probablemente facilitó la separación de los hidrocarburos hacia el medio, debido a que estos hacen parte de la matriz extra-celular [19] por ello Moheimani et al., (2013) proponen un proceso de recuperación de hidrocarburos presentes en el medio denominado Milking por fraccionamiento.

**Figura 8.** Porcentaje de hidrocarburos después de floculación.



En la Figura 9 se muestra el comportamiento de una nueva prueba realizada de acuerdo a los mejores resultados obtenidos en la experimentación (ajuste de pH 4, concentración de floculante 1,5 g/L) adaptados a un volumen de 1800 mL, con el fin de observar el comportamiento de la técnica de floculación transcurridas 24 horas, donde se evidenció una eficiente separación del medio y la biomasa. Se apreció la semejanza de este experimento con el expuesto en la Figura 3, pues aquí tampoco se logra asentar por completo la biomasa floculada debido a la presencia de hidrocarburos en el floculado.

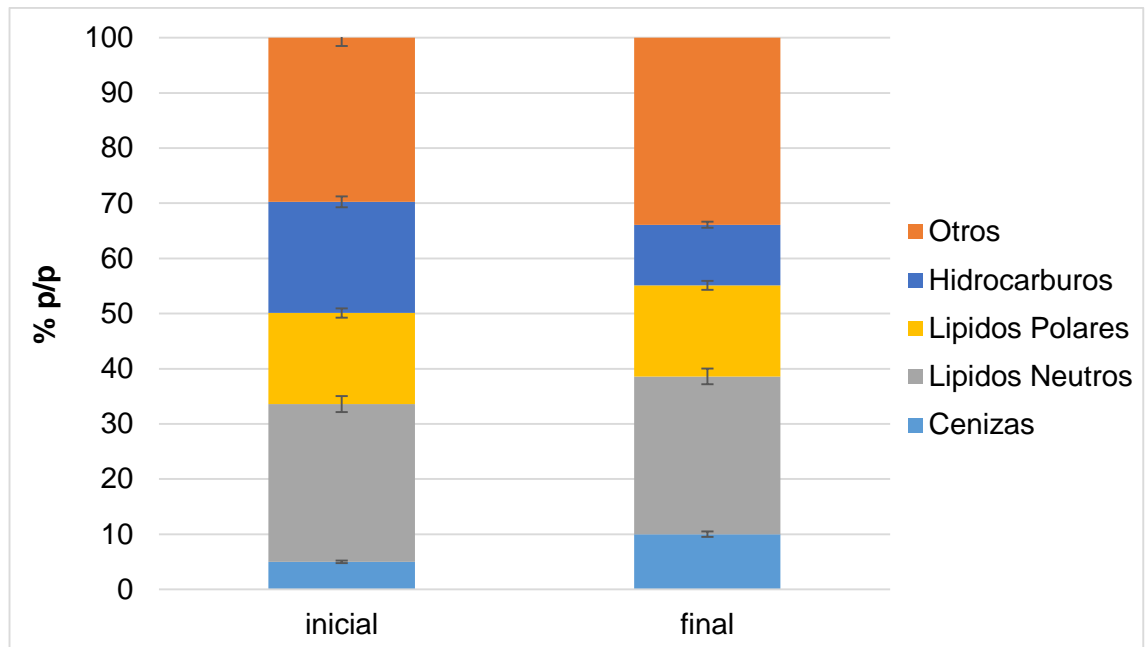
**Figura 9.** Experimento sometido a condiciones óptimas.



## **2.5 CONTENIDO DE CENIZAS**

De acuerdo a las condiciones establecidas en el experimento D se determinó el porcentaje de cenizas, hidrocarburos, lípidos totales (neutros y polares) y otros (carbohidratos, proteínas, ADN, ARN y demás) presentes en la biomasa al inicio y fin de la experimentación como se observa en la Figura 10. Se puede apreciar que el porcentaje de cenizas incremento de un 5 a un 10%, lo cual indica que la técnica de floculación afecta la composición de la biomasa final, y así mismo disminuye la cantidad de hidrocarburos presentes en esta. La cantidad de lípidos (polares y neutros) no presentan variaciones pues estos se encuentran al interior de las células y no se ven afectados durante el proceso de floculación.

**Figura 10.** % p/p de cenizas y metabolitos presentes en la biomasa inicial y final.



### 3. CONCLUSIONES

- A partir de los resultados obtenidos se puede inferir que el uso de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) como floculante y el ajuste de pH en la microalga *B. Braunii* son significativos para la recuperación de biomasa, pues se logran alcanzar eficiencias de floculación alrededor del 60%, cuando se efectúan ajustes de pH ácidos (entre 4 - 6), y una concentración de floculante entre 0,8 y 1,5 g/L.
- La eficiencia de floculación se ve afectada por el alto contenido de hidrocarburos presentes en este tipo de microalga, pues estos impiden a las colonias asentarse hasta el fondo del reactor.
- En la técnica de floculación se emplea agitación para inducir la agrupación de partículas entre sí y formar flóculos, dicho proceso influye en la separación de los hidrocarburos hacia el medio, impidiendo que se obtenga una alta recuperación de hidrocarburos presentes en la biomasa floculada.

#### 4. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar la influencia del tiempo y la velocidad de agitación en el proceso de floculación, asegurando que el floculante se diluya adecuadamente en busca de obtener mayores eficiencias de recuperación de biomasa e hidrocarburos
- Se sugiere implementar floculantes de tipo orgánicos, microbianos y poliméricos ya que el uso del cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) como floculante eleva el contenido de cenizas en la biomasa floculada.
- Se recomienda implementar otra técnica como método de recuperación de *B. Braunii*, donde se alcancen eficiencias superiores y se evite la pérdida de hidrocarburos hacia el medio.

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lee, S., Kim, S., Kwon, G., Kim, J., & Yoon, B. (1998). Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 14-18.
- [2] Kawachi, M., Tanoi, T., Mikihide, D., Kaya, K., & Watanabe, M. M. (2012). Relationship between hydrocarbons and molecular phylogeny of *Botryococcus braunii*. *Algal Research*, 1(2), 114-119.
- [3] Metzger, P., & Largeau, C. (2005). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(5), 486-496.
- [4] Banerjee , A., Sharma , R., Chisti , Y., & Banerjee, U. (2002). *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit Rev Biotechnol*, 22(3), 245-279.
- [5] Chisti, Y. (1980). An unusual hydrocarbon. *Jorunal of the Ramsay Society*, 27-28, 24–26.
- [6] Gudín , C., Bernard , A., Chaumont, D., Thepnier, C., & Hardy, T. (1984). Direct conversion of solar energy into organic chemicals. *World Biotech Rep*, 1, 541.
- [7] Held , W., Peters , M., Buhs, C., Oelert , H., Reifensahl , G., & Wagner, F. (1985). Production of hydrocarbon from biomass. *Comm Eur Communities*.

- [8] Sawayama , S., Minowa , T., & Yokoyama , S. (1999). Possibility of renewable energy production and carbon dioxide mitigation by thermochemical liquefaction of microalgae. *Biomass Bioenerg*, 17, 33–39.
- [9] Arias, M., Martínez, A., & Cañizares, R. (2013). Producción De Biodiesel A Partir De Microalgas: Parámetros Del Cultivo Que Afectan La Producción De Lípidos. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 43-68.
- [10] Salim, S., Bosma, R., Vermuë, M., & Wijffels, R. (2011). Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of Applied Phycology*, 23, 849-855.
- [11] Pahl, S., Lee, A., Kalaitzidis, T., Ashman, P. J., Sathe, S., & Lewis, D. M. (2013). Harvesting, Thickening and Dewatering Microalgae Biomass. *Algae for Biofuels and Energy*, 5, 165-185.
- [12] Gouveia, L. (2011). *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. Portugal: Springer Science & Business Media.
- [13] Metzger, P., & Largeau, C. (2005). Botryococcus braunii: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(5), 486-496.
- [14] Kim, D., Oh, H.M., Park, Y.H., Kim, H.S., Lee, H.G., & Ahn, C.-Y. (2013). Optimization of flocculation conditions for Botryococcus braunii using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology*, 25, 875-882.

- [15] Wu, Z., Zhu, Y., Huang, W., Zhang, C., Li, T., Zhang, Y., & Li, A. (2012). Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource Technology*, 110, 496–502.
- [16] Downes, C., & Hu, Q. (2013). First Principles of Techno-Economic Analysis of Algal Mass Culture. En A. Richmond , Emeritus, & Q. Hu, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition* (págs. 311-326). John Wiley & Sons, Ltd.
- [17] Eroglu, E., & Melis, A. (2010). Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae *Botryococcus braunii* var. *Showa*. *Bioresource Technology*, 10 (7), 2359-2366.
- [18] Wang, S.-K., Wang, F., Stiles, A., Guo, C., & Liu, C.-Z. (2014). *Botryococcus braunii* cells: Ultrasound-intensified outdoor cultivation integrated with in situ magnetic separation. *Bioresource Technology*, 167, 376–382.
- [19] 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

## BIBLIOGRAFÍA

- Arias, M., Martínez, A., & Cañizares, R. (2013). Producción De Biodiesel A Partir De Microalgas: Parámetros Del Cultivo Que Afectan La Producción De Lípidos. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 43-68.
- Banerjee , A., Sharma , R., Chisti , Y., & Banerjee, U. (2002). Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit Rev Biotechnol*, 22(3), 245-279.
- Chisti, Y. (1980). An unusual hydrocarbon. *Jorunal of the Ramsay Society*, 27-28, 24–26.
- Downes, C., & Hu, Q. (2013). First Principles of Techno-Economic Analysis of Algal Mass Culture. En A. Richmond , Emeritus, & Q. Hu, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition* (págs. 311-326). John Wiley & Sons, Ltd.
- Eroglu, E., & Melis, A. (2010). Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae Botryococcus braunii var. Showa. *Bioresource Technology*, 10 (7), 2359-2366.
- Gouveia, L. (2011). *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. Portugal: Springer Science & Business Media.
- Gudin , C., Bernard , A., Chaumont, D., Thepnier, C., & Hardy, T. (1984). Direct conversion of solar energy into organic chemicals. *World Biotech Rep*, 1, 541.

- Held , W., Peters , M., Buhs, C., Oelert , H., Reifensahl , G., & Wagner, F. (1985). Production of hydrocarbon from biomass. *Comm Eur Communities*.
- Kawachi, M., Tanoi, T., Mikihide, D., Kaya, K., & Watanabe, M. M. (2012). Relationship between hydrocarbons and molecular phylogeny of *Botryococcus braunii*. *Algal Research*, 1(2), 114-119.
- Kim, D., Oh, H.M., Park, Y.H., Kim, H.S., Lee, H.G., & Ahn, C.-Y. (2013). Optimization of flocculation conditions for *Botryococcus braunii* using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology*, 25, 875-882.
- Lee, S., Kim, S., Kwon, G., Kim, J., & Yoon, B. (1998). Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 14-18.
- Li, Y., Moore, R., Qin, J., Scott, A., & Ball, A. (2013). Extractable liquid, its energy and hydrocarbon content in the green alga *Botryococcus braunii*. *Biomass and energy*, 52, 103-112.
- Metzger, P., & Largeau, C. (2005). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(5), 486-496.
- Pahl, S., Lee, A., Kalaitzidis, T., Ashman, P. J., Sathe, S., & Lewis, D. M. (2013). Harvesting, Thickening and Dewatering Microalgae Biomass. *Algae for Biofuels and Energy*, 5, 165-185.
- Salim, S., Bosma, R., Vermuë, M., & Wijffels, R. (2011). Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of Applied Phycology*, 23, 849-855.

- Sawayama , S., Minowa , T., & Yokoyama , S. (1999). Possibility of renewable energy production and carbon dioxide mitigation by thermochemical liquefaction of microalgae. *Biomass Bioenergy*, 17, 33–39.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M., Gareth M. , F., & Hoadley, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of renewable and sustainable energy*, 2, 012701- 012701-15.
- Wang, S.-K., Wang, F., Stiles, A., Guo, C., & Liu, C.-Z. (2014). *Botryococcus braunii* cells: Ultrasound-intensified outdoor cultivation integrated with in situ magnetic separation. *Bioresource Technology*, 167, 376–382.
- Watanabe, H., Li, D., Nakagawa, Y., Tomishige, K., Kaya, K., & Watanabe, M. (2014). Characterization of oil-extracted residue biomass of *Botryococcus braunii*. *Applied Energy*, 132, 475- 484.
- Watanabe, M., & Tanabe, Y. (2013). Biology and Industrial Potential of *Botryococcus braunii*. En A. Richmond, Emeritus, & Q. Hu, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition* (págs. 370-387). John Wiley & Sons, Ltd.
- Wu, Z., Zhu, Y., Huang, W., Zhang, C., Li, T., Zhang, Y., & Li, A. (2012). Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource Technology*, 110, 496–502.