

DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE UNA METODOLOGIA DE
SUMINISTRO DE CO₂ A CULTIVOS DE *BOTRYOCOCCUS BRAUNII*
EVALUANDO SUS VARIABLES Y LA OBTENCION DE MATERIA PRIMA PARA
LA PRODUCCION DE BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA GENERACION.

NESTOR ANDRES JAIMES VILLARREAL

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
PROGRAMA DE MAESTRIA EN INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA

2015

DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE UNA METODOLOGIA DE
SUMINISTRO DE CO₂ A CULTIVOS DE *BOTRYOCOCCUS BRAUNII*
EVALUANDO SUS VARIABLES Y LA OBTENCION DE MATERIA PRIMA PARA
LA PRODUCCION DE BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA GENERACION.

NESTOR ANDRES JAIMES VILLARREAL

Trabajo de Grado presentado como requisito para Optar al título de
Maestría en Ingeniería Química

Director

PhD. Viatcheslav Kafarov

Director Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y
Energía, CIDES.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
PROGRAMA DE MAESTRIA EN INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA

2015

Dedicatoria

Especialmente a mis padres y hermana, por creer, confiar y apoyarme en el fascinante camino hacia mi realización personal y profesional. Todo por ustedes. A Catalina por siempre estar. A nuestra hermosa naturaleza, que con su esplendor y magia nos invita a explorarla, estudiarla y cuidarla.

Agradecimientos

El autor expresa sus agradecimientos;

Para el Doctor Viatcheslav Kafarov y el centro de investigación para el desarrollo sostenible en industria y energía (CIDES) por brindarme la oportunidad y el apoyo en mi formación profesional.

A la Universidad Industrial de Santander y la Escuela de Ingeniería Química, por sus programas de posgrado y apoyo a la investigación mediante diversas herramientas como becas y laboratorios.

Para el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), por su apoyo técnico y financiero, y su continua dinámica de investigación y desarrollo.

Por último, a Eduardo y a Wilson, directores del laboratorio de procesos de la escuela de Ingeniería Química, por su apoyo técnico, por el espacio y por su amistad.

CONTENIDO

INTRODUCCION	14
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
1.1 JUSTIFICACION.....	19
1.2 OBJETIVOS.....	22
1.2.1 <i>Hipótesis</i>	22
1.2.2 <i>Objetivo General</i>	23
1.2.3 <i>Objetivos Específicos</i>	23
2. MARCO TEORICO	24
2.1 MICROALGAS.....	24
2.1.1 <i>Usos</i>	25
2.1.2 <i>Botryococcus braunii</i>	26
2.1.2.1 <i>Crecimiento (Biomasa)</i>	28
2.1.2.2 <i>Botriococenos e Hidrocarburos</i>	29
2.1.2.3 <i>Lípidos</i>	30
2.2 CULTIVO.....	31
2.2.1 <i>Sistemas de Cultivo</i>	32
2.2.2 <i>Suministro de Nitrógeno</i>	34
2.2.3 <i>Suministro de Carbono</i>	36
2.2.3.1 <i>Dióxido de Carbono</i>	36
2.2.3.2 <i>Fijación de CO₂</i>	38
3. METODOLOGIA	41
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	42
3.1.1 <i>Etapa 1 (Parámetros de Diseño)</i>	43
3.1.2 <i>Etapa 2 (Parámetros de Proceso)</i>	45
3.1.3 <i>Etapa 3 (Parámetros de Suministro)</i>	46

3.2	MONTAJE Y CONDICIONES EXPERIMENTALES	47
3.3	METODOS DE CUANTIFICACION DE RESULTADOS	49
3.3.1	<i>Cuantificación de CO₂</i>	50
3.3.2	<i>Cuantificación de Biomasa</i>	50
3.3.3	<i>Cuantificación de Hidrocarburos</i>	50
3.3.4	<i>Cuantificación de Lípidos</i>	51
4.	RESULTADOS	53
4.1	ETAPA 1 (PARAMETROS DE DISEÑO).....	53
4.1.1	<i>Análisis Estadístico</i>	55
4.2	ETAPA 2 (PARAMETROS DE PROCESO).....	59
4.2.1	<i>Análisis Estadístico</i>	60
4.2.2	<i>Resultados de Productividad</i>	66
4.3	ETAPA 3 (PARAMETROS DE SUMINISTRO)	70
4.3.1	<i>Análisis Estadístico</i>	71
4.3.2	<i>Resultados de Productividad</i>	77
5.	ANALISIS DE RESULTADOS	82
6.	CONCLUSIONES.....	87
7.	RECOMENDACIONES.....	88
8.	BIBLIOGRAFIA.....	89

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. INDICADORES ENERGÉTICOS CLAVE.....	14
TABLA 2. PROS Y CONTRAS DEL USO DE LA BIOMASA COMO FUENTE DE ENERGÍA.	16
TABLA 3. USOS COMERCIALES DE LAS MICROALGAS.	25
TABLA 4. PARÁMETROS Y VARIABLES DE RESPUESTA ETAPA 1.....	43
TABLA 5. MATRIZ DEL DISEÑO EXPERIMENTAL ETAPA 1	45
TABLA 6. PARÁMETROS Y VARIABLES DE RESPUESTA ETAPA 2.....	45
TABLA 7. MATRIZ DEL DISEÑO EXPERIMENTAL ETAPA 2.	46
TABLA 8. CRONOGRAMA DE SUMINISTRO DE CO ₂ POR PULSOS.....	47
TABLA 9. MONITOREO DE PH EN ETAPA 1.	53
TABLA 10. RESULTADOS EXPERIMENTALES ETAPA 1.....	55
TABLA 11. RESULTADOS ANOVA PARÁMETROS DE DISEÑO.....	56
TABLA 12. EFECTOS ESTIMADOS PARÁMETROS DE DISEÑO.....	57
TABLA 13. RESULTADOS EXPERIMENTALES ETAPA 2.....	59
TABLA 14. RESULTADOS ANOVA PARÁMETROS DE PROCESO.....	60
TABLA 15. EFECTOS ESTIMADOS PARÁMETROS DE PROCESO.	62
TABLA 16. RESULTADOS PRODUCCION DE METABOLITOS EN EL TIEMPO ETAPA 2.....	66
TABLA 17. RESULTADOS DE PRODUCTIVIDAD ETAPA 2.	68
TABLA 18. RESULTADOS EXPERIMENTALES ETAPA 3.....	70
TABLA 19. RESULTADOS ANOVA PARÁMETROS DE SUMINISTRO.....	71
TABLA 20. EFECTOS ESTIMADOS PARÁMETROS DE PROCESO.	73
TABLA 21. RESULTADOS PRODUCCIÓN DE METABOLITOS EN EL TIEMPO ETAPA 3.....	77
TABLA 22. RESULTADOS DE PRODUCTIVIDAD ETAPA 3.	79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. BOTRYOCOCCUS BRAUNII	27
FIGURA 2. TIPOS DE HIDROCARBUROS PRODUCIDOS POR B. BRAUNII.	28
FIGURA 3. SISTEMAS DE CULTIVO.....	33
FIGURA 4. SISTEMA CONCEPTUAL DE PRODUCCIÓN Y BIOMITIGACION DE CO ₂	40
FIGURA 5. ESQUEMA DEL DESARROLLO METODOLÓGICO.....	41
FIGURA 6. CEPA EXPERIMENTAL USADA DE <i>B. BRAUNII</i>	48
FIGURA 7. MONTAJE EXPERIMENTAL PARA LOS CULTIVOS DE B. BRAUNII.	48
FIGURA 8. METODO EXPERIMENTAL DE SUMINISTRO DE GASES A CULTIVOS DE B. BRAUNII.	49
FIGURA 9. HERRAMIENTAS DE MEDICIÓN DE CO ₂ EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	50
FIGURA 10. ESPECTROFOTÓMETRO PARA CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS.	51

LISTA DE GRAFICAS

GRAFICA 1. EMISIONES GLOBALES DE CO2 POR COMBUSTIBLE.	18
GRAFICA 2. CONSUMO MUNDIAL DE ENERGÍA POR TIPO DE COMBUSTIBLE.	20
GRAFICA 3. EVOLUCIÓN DEL PH EN EL TIEMPO.	54
GRAFICA 4. DIAGRAMAS DE PARETO PARÁMETROS DE DISEÑO.	56
GRAFICA 5. SUPERFICIE DE RESPUESTA PARÁMETROS DE DISEÑO.	58
GRAFICA 6. DIAGRAMAS DE PARETO PARÁMETROS DE PROCESO.	61
GRAFICA 7. SUPERFICIE DE RESPUESTA PARÁMETROS DE PROCESO.	64
GRAFICA 8. COMPORTAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN EN EL TIEMPO PARÁMETROS DE PROCESO.	67
GRAFICA 9. DIAGRAMAS DE PARETO PARÁMETROS DE SUMINISTRO.	72
GRAFICA 10. SUPERFICIE DE RESPUESTA PARÁMETROS DE SUMINISTRO.	75
GRAFICA 11. COMPORTAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN EN EL TIEMPO PARÁMETROS DE SUMINISTRO.	78

RESUMEN

TITULO:

DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE UNA METODOLOGIA DE SUMINISTRO DE CO₂ A CULTIVOS DE *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* EVALUANDO SUS VARIABLES Y LA OBTENCION DE MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCION DE BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA GENERACION¹

AUTOR:

NESTOR ANDRES JAIMES VILLARREAL²

PALABRAS CLAVE:

Botryococcus braunii, Fotobiorreactor, CO₂, Biomasa, Lípidos, Hidrocarburos.

CONTENIDO:

En el presente trabajo se analizó la influencia de diferentes parámetros referentes al suministro de dióxido de carbono (CO₂) en cultivos de una cepa colombiana de la especie de microalga *Botryococcus braunii*. Para ello se plantearon diseños experimentales factoriales (Central Compuesto 2²), con el fin de analizar la influencia estadística de parámetros técnicos (geometría del reactor y tipo de difusor), parámetros de proceso (concentración de CO₂) y parámetros de suministro (continuo o por pulsos) sobre la dilución de CO₂ en el cultivo y la producción de Biomasa, Lípidos e Hidrocarburos para esta especie de microalga. Se encontró que la altura del fotobiorreactor y el tipo de difusor tuvieron una influencia significativa sobre la dilución de CO₂ en el medio de cultivo; a mayores alturas (>35 cm) y pequeños tamaños de burbuja se obtuvieron diluciones más altas. También se encontró que el cambio en los niveles de concentración de CO₂ tuvo una influencia significativa sobre la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos. Altas concentraciones (>0,06 v/vm) favorecieron la producción de biomasa; medias concentraciones (0,02- 0,04 v/vm) favorecieron la producción de lípidos; y bajas concentraciones de CO₂ (<0,02 v/vm) favorecieron la producción de hidrocarburos. Se observó además que la variación en el método de suministro (Pulsos y Continuo) afectó directamente la magnitud y el efecto que tuvo el CO₂ sobre la producción de metabolitos. Se validó el potencial de la cepa de *B. braunii* colombiana para la producción de biodiesel gracias a sus altas tasas de síntesis de lípidos.

¹ Trabajo de posgrado.

² Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Grupo de Investigación para el Desarrollo Sostenible de Industria y Energía - CIDES. Director: Viatcheslav Kafarov, PhD.

ABSTRACT

TITLE:

DEVELOPMENT AND IMPLEMENTATION OF A METHODOLOGY FOR THE SUPPLY OF CO₂ TO A CROP OF *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* EVALUATING ITS VARIABLES AND THE OBTAINING OF RAW MATERIAL FOR THE PRODUCTION OF THIRD GENERATION BIOFUELS¹

AUTHOR:

NESTOR ANDRES JAIMES VILLARREAL²

KEYWORDS:

Botryococcus braunii, Photobioreactor, CO₂, Biomass, Lipids, Hydrocarbons.

CONTENT:

In this work was studied the influence of different parameters for the supply of carbon dioxide (CO₂) in cultures of a Colombian crop of the species of microalgae *Botryococcus braunii*. For this, factorial experimental designs were proposed (Central Compound 2²) to analyze the statistical influence of technical parameters (geometry of the reactor and type of diffuser), process parameters (concentration of CO₂) and supply parameters (continuous or pulses) over the dilution of CO₂ in the culture media and the production of biomass, lipids and hydrocarbons for this species of microalgae. It was found that the height of the photobioreactor and type of diffuser had a significant influence on the dilution of CO₂ in the culture medium; at higher altitudes (> 35 cm) and small bubble sizes were obtained higher dilutions. It was also found that the change in the CO₂ concentration levels had a significant influence on the production of biomass, lipids and hydrocarbons. High concentrations (> 0,06 v/vm) favored the production of biomass; medium concentrations (0,02-0,06 v/vm) favored the production of lipids; and low concentrations of CO₂ (<0,02 v/vm) favored the production of hydrocarbons. It was also observed that the variation in the supply method (Pulse and Continuous) directly affected the magnitude and effect of CO₂ over the production of metabolites. The potential of the Colombian *B. braunii* strain for biodiesel production was validated thanks to its high lipid synthesis.

¹ Graduate Work

² Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Research Group for Sustainable Development of Industry and Energy - CIDES. Directed by Viatcheslav Kafarov, PhD.

INTRODUCCION

El mundo ha cambiado significativamente durante los últimos 20 años, en los cuales la tecnología y sus avances se han convertido en el principal motor del desarrollo económico y social [101]. Teniendo en cuenta que prácticamente la totalidad de las tecnologías funcionan con energía, esta dependencia tecnológica ha originado una demanda considerable en el consumo energético a nivel global, con aumentos en la producción de hasta 550 Twh por año (tabla 1.), mientras la explotación de fuentes primarias de energía (STEP) crece porcentualmente menos que la demanda. Y se espera además, que este consumo aumente hasta niveles significativamente mayores a causa de un creciente desarrollo económico de los países actualmente subdesarrollados [5].

Tabla 1. Indicadores energéticos clave.

	1993	2011	2020	% Crecimiento 1993 - 2011
<i>Población, billones</i>	5.5	7	8.1	27%
<i>PIB, Trillones USD</i>	25	70	65	180%
<i>STEP, Mtep</i>	9532	14092	17208	48%
<i>Carbón, Mt</i>	4474	7520	10108	68%
<i>Petróleo, Mt</i>	3179	3973	4594	25%
<i>Gas Natural, bmc</i>	2176	3518	4049	62%
<i>Nuclear, TWh</i>	2106	2386	3761	13%
<i>Hidráulica, TWh</i>	2286	2767	3826	21%
<i>Biomasa, Mtep</i>	1036	1277	1323	23%
<i>Otras Renovables, TWh</i>	44	515	1999	n/a
<i>Producción Electricidad/Año</i>				
<i>Total TWh</i>	12607	22202	23000	76%
<i>Per cápita MWh</i>	2	3	3	52%
<i>Emisiones CO₂ / Año</i>				
<i>Total de CO₂ Gt</i>	21	30	42	44%
<i>Tonelada CO₂ Per cápita</i>	4	4	n/a	11%

Fuente: World Energy Resource Survey 2013

El consumo de energía y el desarrollo de nuevas economías está sustentado por los combustibles fósiles, principales materias primas energéticas, los cuales no son renovables y liberan dióxido de carbono (CO₂) a la atmosfera durante su quema, contribuyendo así al calentamiento global [36]. Debido a este escenario aparecen alternativas nuevas y sostenibles como las energías renovables; fotovoltaica, eólica, geotérmica, mareomotriz, y la energía de los océanos, que pueden generar electricidad y calor, pero no pueden producir directamente productos químicos o combustibles líquidos. Entre 1990 y 2010 la oferta de estas fuentes de bioenergía aumentó de 38 a 52 EJ como resultado de la creciente demanda energética. Además la aparición de nuevas políticas para aumentar la cuota de energías renovables y los recursos energéticos autóctonos también está impulsando la demanda [101].

Dentro de los recursos energéticos renovables, la biomasa es la única fuente de carbono que se puede convertir en biocombustibles y productos bioquímicos útiles a través de tecnologías de valorización y bio-refinería [30], [43]. Las condiciones para considerar la biomasa, como la derivada de microalgas, como un recurso técnica y económicamente viable para producir biocombustibles son: debe ser competitivo o costar menos que los combustibles derivados del petróleo; debe requerir bajo a ningún uso adicional de la tierra; debe no contaminar y/o permitir la mejora de la calidad del aire (por ejemplo captura de CO₂), y debe exigir el uso mínimo de agua [95].

Como todas las fuentes de energía, la biomasa tiene sus beneficios e inconvenientes (tabla 2.). Sin embargo, y teniendo en cuenta los incrementos en las emisiones de CO₂ a la atmosfera en los últimos años (tabla 1.), la biomasa se considera como una fuente de energía sostenible opcional y sin emisiones de CO₂ a largo plazo [36].

Tabla 2. Pros y contras del uso de la biomasa como fuente de energía.

BENEFICIOS	INCONVENIENTES
<i>Recursos naturales domésticos</i>	<i>Implicaciones de Transporte y Procesamiento</i>
<i>Tecnologías de combustión simples probadas</i>	<i>Las emisiones de NOx y SOx</i>
<i>Los biocombustibles como alternativa para el transporte</i>	<i>Aspectos de Agua/Alimento versus Energía</i>

Fuente: World Energy Resource Survey 2013

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde principios del siglo 20, la humanidad ha consumido grandes cantidades de petróleo, no sólo como fuente de energía, sino también como materia prima utilizada por la industria química para enriquecer la vida. Aunque el consumo de estos recursos ha impulsado el crecimiento económico del mundo, hay preocupación por el agotamiento de los combustibles fósiles, siendo crucial que reduzcamos nuestra dependencia de estos [49].

Los combustibles de hidrocarburos son actualmente la fuente más importante de energía debido a su fácil disponibilidad, estabilidad y alta densidad energética [2]. Ventajas como ser proporcionados libremente por la naturaleza, su alto contenido energético, y facilidad de transporte y almacenamiento siguen impulsando nuestra dependencia. Por desgracia, la quema de estos combustibles conlleva la desventaja significativa de la contaminación ambiental [52]. Dentro de estos impactos, el calentamiento global asociado al aumento del efecto invernadero representa un problema importante en todo el mundo y se debe en gran parte al extenso consumo de estos combustibles [44]. El calentamiento global (GLW) se da como consecuencia del aumento de las concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono (CO₂), óxidos de nitrógeno y azufre, metano y otros gases de efecto invernadero [13], que de continuar aumentando, se prevé incrementaran la temperatura media de la superficie del planeta hasta 6 °C durante el siglo 21 [45].

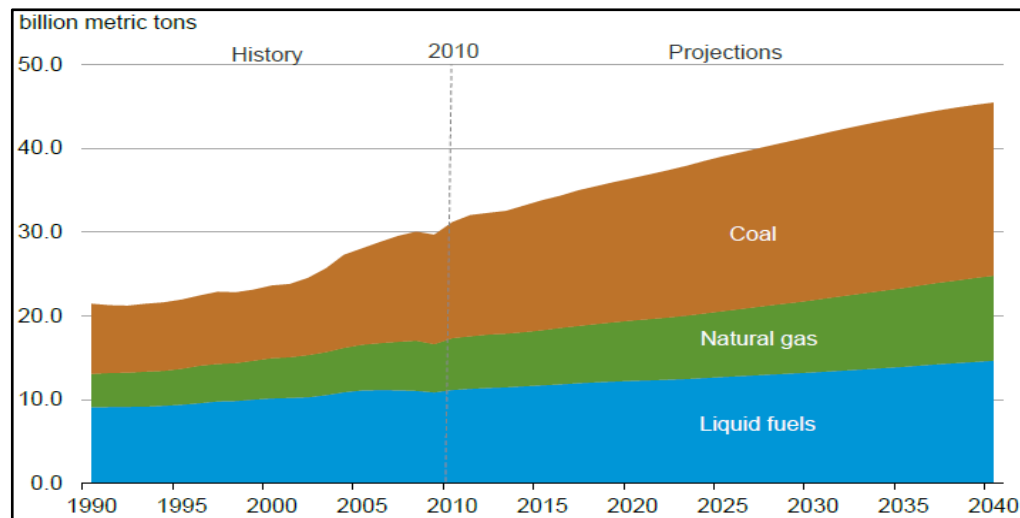
El CO₂ emitido a la atmósfera es considerado el principal Gas de Efecto Invernadero y el principal subproducto de la combustión de combustibles fósiles [13]. Por ejemplo, un vehículo que usa 8 litros de gasolina cada 100 km dispersa 344 kg de CO₂ a lo largo de 1800 km de viaje; las centrales eléctricas que queman combustibles fósiles emiten entre 344-941 kg de CO₂ por cada MW/h de capacidad y se encuentran entre los mayores fuentes estacionarias de CO₂ [99];

una pequeña planta de energía de carbón de 50 MW produce aproximadamente 1.140 toneladas métricas (TM) CO₂/día [31].

Esta excedida producción de CO₂ refleja que entre 2000 y 2007 la concentración atmosférica de CO₂ creció a una tasa promedio de 1,8 ppm por año. Solo para el 2006 varió entre 360 y 390 ppm por volumen (ppmv) durante el año, y viene presentando un incremento constante año tras año [74]. Incluso si las emisiones de CO₂ son instantáneamente detenidas, la concentración de CO₂ seguiría subiendo, al doble de los niveles preindustriales, dentro de los próximos 30-40 años [13].

Teniendo en cuenta las políticas y regulaciones actuales, se prevé que las emisiones mundiales de dióxido de carbono (CO₂) relacionadas con la energía aumentaran un 46% en 2040, alcanzando las 45 mil millones de toneladas métricas para ese año. El rápido crecimiento del consumo de carbón en China y el aporte de este combustible a las emisiones de CO₂ (grafica 1.) es la principal causa de este escenario [3].

Gráfica 1. Emisiones globales de CO₂ por combustible.



Fuente: *International Energy Outlook 2013*

Considerando que concentraciones de CO₂ en la atmósfera superiores a 450 ppm tendrán impactos severos en el nivel de los océanos, patrones climáticos globales y supervivencia de diversas especies y organismos [45], es válido pensar que el uso de combustibles fósiles como fuente de energía es insostenible [5].

1.1 JUSTIFICACION

Tal vez, la única forma realista para afrontar este problema es encontrar fuentes de energía renovables que cubran la demanda mundial mientras limitan la emisión de CO₂. Existen diferentes candidatos que pueden desplazar a los combustibles fósiles con la intención de eliminar la actual vulnerabilidad del sector energético [85]. En los últimos años se han hecho muchos intentos respecto a la mitigación biológica de CO₂, un proceso que puede ser llevado a cabo por plantas y microorganismos fotosintéticos [95]. Esta fijación biológica ha recibido considerable atención ya que permite la producción de energía de biomasa a través del proceso de fijación de CO₂ mediante la fotosíntesis [51], [29].

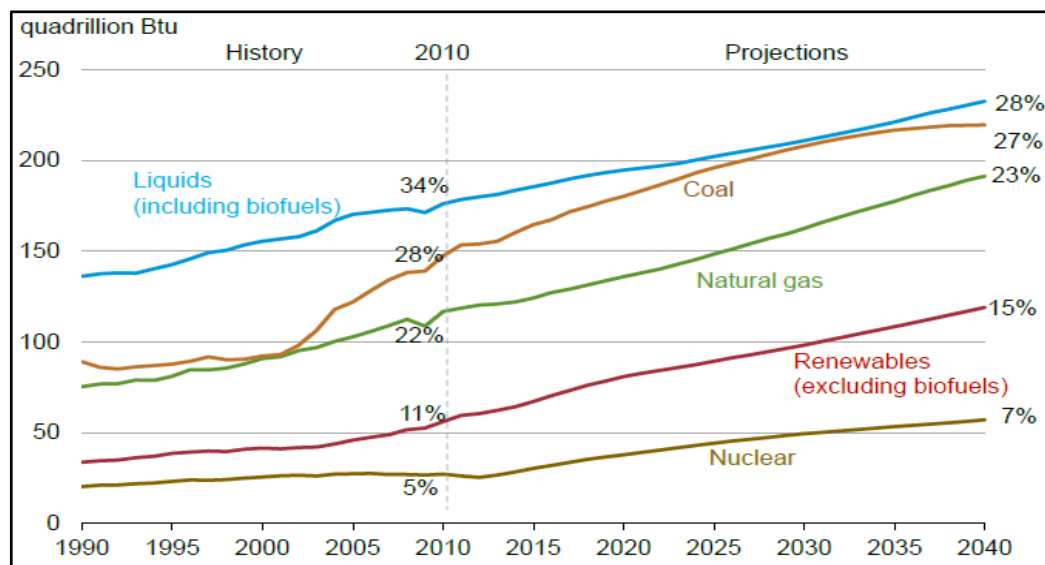
Se ha estimado que el potencial de captura de CO₂ en plantas mayores únicamente contribuye con sólo un 3-6% de las emisiones de combustibles fósiles [87]. Por otro lado, las microalgas, un grupo de microorganismos unicelulares o multicelulares simples de crecimiento rápido, tienen la capacidad de fijar el CO₂ mientras capturan energía solar con una eficacia 10 a 50 veces mayor que la de las plantas terrestres [95]. Estos microorganismos utilizan carbono inorgánico (CO₂) para su crecimiento. Además, la biomasa de microalgas cultivadas ha sido utilizada para diversas aplicaciones tales como biofertilizante, acondicionador de suelos, como alimento para animales y producción de biocombustibles [9].

Las microalgas por ser fuente de alto valor de diversos metabolitos, son de gran interés en diferentes áreas de la biotecnología como: nutrición, acuicultura, farmacéuticos y biocombustibles. Enlazar este tipo de cultivos con la bio-fijación

de dióxido de carbono, tiene el potencial no sólo para reducir los costos en la obtención de productos de valor agregado (Biocombustibles y otros), sino también para compensar las emisiones de carbono y lograr un proceso ambientalmente sostenible [11], [29].

Los combustibles líquidos, incluyendo los biocombustibles derivados de Biomasa naturales, dominan actualmente y se proyecta que a futuro, el consumo mundial de energía (grafica 2). Su gran demanda es apenas comparable con el creciente consumo de carbón jalonado por China.

Gráfica 2. Consumo mundial de energía por tipo de combustible.



Fuente: *International Energy Outlook 2013*

Esta demanda de combustibles líquidos y la necesidad de disminuir los impactos ambientales generados por las fuentes tradicionales, resaltan la importancia del alga verde *Botryococcus braunii*, especie utilizada en el presente estudio, como una prometedora fuente renovable sustituto del petróleo, ya que esta produce hidrocarburos fijando CO₂ fotosintéticamente [8]. Esta microalga se caracteriza por

una capacidad notable para sintetizar y acumular una variedad de lípidos. Estas sustancias lipídicas incluyen numerosos hidrocarburos y éteres lipídicos específicos [68]. Además esta especie es conocida por su inusual contenido elevado de hidrocarburos (20-40% de biomasa seca), los cuales al ser extraídos de las células de *B. braunii* pueden ser convertidos a combustibles líquidos como gasolina y jet fuel después de un crackeo catalítico [102].

Las cepas de *B. braunii* cultivadas en laboratorios y en poblaciones silvestres difieren en el tipo de hidrocarburos que sintetizan, y en consecuencia, se subclasifican en tres familias químicas; A, B y L [68]. La familia B de la especie *B. braunii* ha recibido significativa atención puesto que posee un contenido inusualmente alto de hidrocarburos del tipo botriococenos, el cual varía entre el 15 y 75 % de su peso seco; gracias a esto, esta alga se perfila como una fuente renovable de biocombustibles [54], [19], [100].

Un estudio de las interacciones entre las variables de suministro y captura de CO₂, determinantes en el crecimiento y producción de botriococenos en el alga *B. braunii*, puede ser de gran valor para el desarrollo de un sistema viable de producción de biocombustibles a partir de esta especie. Más aun, para hacer sostenible técnica y económicamente el proceso de producción de hidrocarburos, es necesario realizar diferentes estudios enfocados en la optimización de las variables de cultivo y de la productividad de los mismos mediante el uso de CO₂, ya que estimados indican que el costo de la producción de biocombustibles es en general 2,3 veces más alto que aquellos derivados de combustibles fósiles [51].

Trabajos recientes desarrollados en el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP-ECOPETROL) han demostrado que gracias a su composición, *B. braunii* produce altos rendimientos de bio-oil; además, las propiedades calóricas también son mejores que muchos otros materiales biológicos como los lignocelulósicos. Por su parte, el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación,

Colciencias, también ha apoyado la temática con recursos para proyectos de Bioprospección nacional de especies de microalgas con potenciales para la producción de biocombustibles. Con este panorama, y aunque el desarrollo comercial de las microalgas como fuente de biomasa para biocombustibles se encuentra lejos aún, la investigación en este campo, apoyada por instituciones público/privadas como Colciencias y el ICP, es prometedora y está bien sustentada.

Mediante el presente estudio se pretende evaluar el suministro y la fijación de CO₂ como fuente de carbono en cultivos de una cepa de *Botryococcus braunii* Colombiana, con el fin de obtener las mejores condiciones del cultivo y así validar esta especie como una potencial fuente de materia prima para producir biodiesel y biocombustibles. Se seleccionan como variables de respuesta la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos sintetizados como botriococenos. La novedad respecto a estudios realizados previamente, consiste en evaluar para cultivos de *B. braunii* parámetros tecnológicos (difusores, dimensiones de fotobiorreactor) y de proceso (concentración de CO₂ y fuente de nitrógeno) que influyen en la fijación del CO₂, además de elaborar ensayos variando los métodos de suministro (inyección por pulsos y continua) para determinar una metodología global de suministro que además de maximizar la producción de biomasa, lípidos y botriococenos, minimice las pérdidas de CO₂ no fijado en el cultivo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Hipótesis. A partir del estudio y evaluación de variables claves en la transferencia y fijación de CO₂, puntualmente parámetros de diseño, de proceso y de suministro, en el cultivo a escala de laboratorio de una cepa de alga nativa colombiana de la especie *Botryococcus braunii*, es posible desarrollar e implementar una metodología de suministro de CO₂ a cultivos de esta especie que

minimice pérdidas en su captura y maximice la producción de biomasa, lípidos y botriococenos (hidrocarburos).

1.2.2 Objetivo General. Desarrollar e implementar una metodología de suministro de CO₂ a cultivos de *Botryococcus braunii* evaluando su fijación y la producción de biomasa y botriococenos.

1.2.3 Objetivos Específicos. Determinar la influencia de parámetros de diseño (Tipo de difusor, Altura de columna, Diámetro de columna) respecto a la dilución de CO₂ en un medio de cultivo específico para *B. braunii*.

Establecer el efecto de parámetros de proceso (concentración de CO₂, concentración de Nitrógeno) respecto a la producción de biomasa, lípidos y síntesis de hidrocarburos.

Evaluar la influencia de parámetros de suministro de CO₂ (inyección en pulsos y continua) respecto a la velocidad de crecimiento celular y deposición de lípidos e hidrocarburos (botriococenos).

Plantear una metodología de suministro de CO₂ a cultivos de la especie de microalga *Botryococcus braunii* que minimice pérdidas en su captura y maximice la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos.

2. MARCO TEORICO

2.1 MICROALGAS

Reconocidas como una de las formas de vida más antigua, son un grupo de microorganismos fotosintéticos unicelulares o multicelulares simples, que pueden crecer rápidamente y viven en condiciones muy duras debido a su estructura celular [34], [58], [59]. Son plantas primitivas que carecen de raíces, tallos y hojas, tienen clorofila *a* como su pigmento fotosintético primario y sus estructuras biológicas son principalmente para la conversión de energía, esta configuración sencilla les permite adaptarse para prevalecer a las condiciones ambientales y prosperar en el largo plazo [34], [57].

Las microalgas están presentes en todos los ecosistemas existentes de la tierra, no sólo acuático sino también terrestre, lo que representa una gran variedad de especies que viven en una amplia gama de condiciones ambientales. Se estima que existen más de 50.000 especies, pero sólo un número limitado, de alrededor de 30.000, se han estudiado y analizado [80]. Estos microorganismos representan alrededor del 0,5% de la biomasa global, sin embargo producen alrededor del 70% del oxígeno neto en la tierra [25].

Para su crecimiento las microalgas necesitan dos cosas fundamentales, una es la fuente de carbono (normalmente en forma de CO₂), y la otra es una fuente de energía, en este caso la luz [26], [55]. Estos microorganismos se reproducen mediante la fotosíntesis para convertir esta energía solar (luz) en energía química, completando un ciclo entero de crecimiento en unos pocos días [84]. Poseen una alta tasa de crecimiento, siendo entre 10 a 50 veces más eficientes en fijación de CO₂ que las plantas terrestres [25], además de requerir menor energía para la elaboración de biomasa [73], [13]. Bajo condiciones climáticas adecuadas y suficientes nutrientes, las microalgas pueden crecer profusamente. Comúnmente

duplican su biomasa dentro de 24 horas o hasta 3,5 horas durante la fase de crecimiento exponencial [22].

Entre la variedad de especies de microalgas, existen microorganismos autótrofos, heterótrofos y mixotróficos; los primeros requieren sólo compuestos inorgánicos tales como CO₂, sales y una fuente de energía (luz) para el crecimiento; los segundos son no-fotosintéticos y por lo tanto requieren una fuente externa de compuestos orgánicos, así como nutrientes y una fuente de energía; por su parte los últimos tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis como también de adquirir nutrientes orgánicos exógenos [57].

2.1.1 Usos. Algunas especies de microalgas han sido explotadas desde hace milenios. Existen diversas especies que a nivel industrial y comercial tienen varias aplicaciones, desde la nutrición humana y animal a los cosméticos y la producción de moléculas de alto valor, como por ejemplo; ácidos grasos, pigmentos, productos bioquímicos de isótopos estables, entre otros (tabla 3.) [88].

Tabla 3. Usos comerciales de las microalgas.

Alga	Producción Anual	País Productor	Aplicación y Productos
<i>Arthrospira</i>	3000 ton peso seco	China, India, USA, Myanmar, Japón	Nutrición humana y animal, cosméticos, ficobiliproteínas.
<i>Chlorella</i>	2000 ton peso seco	Taiwan, Alemania, Japón	Nutrición humana, acuicultura, cosméticos.
<i>Dunaliella salina</i>	1200 ton peso seco	Australia, Israel, USA, China.	Nutrición humana, cosméticos, β-carotenos.
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500 ton peso seco	USA	Nutrición humana.
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 ton peso seco	USA, India, Israel	Acuicultura, astaxantina.
<i>Cryptocodiniu cohnii</i>	240 ton de aceite DHA	USA	Aceite DHA
<i>Shizochytrium</i>	10 ton de aceite DHA	USA	Aceite DHA

Fuente: Spolaore y colaboradores, 2006 [88]

Los cultivos en masa de microalgas tienen potencial de utilización en la producción de biocombustibles y productos químicos, alimentos, fertilizantes, y para la fijación de CO₂ y la purificación del agua [12], [47], [95]. Estas múltiples aplicaciones admiten la sostenibilidad (principio clave en la gestión de los recursos naturales) y la economía del proceso.

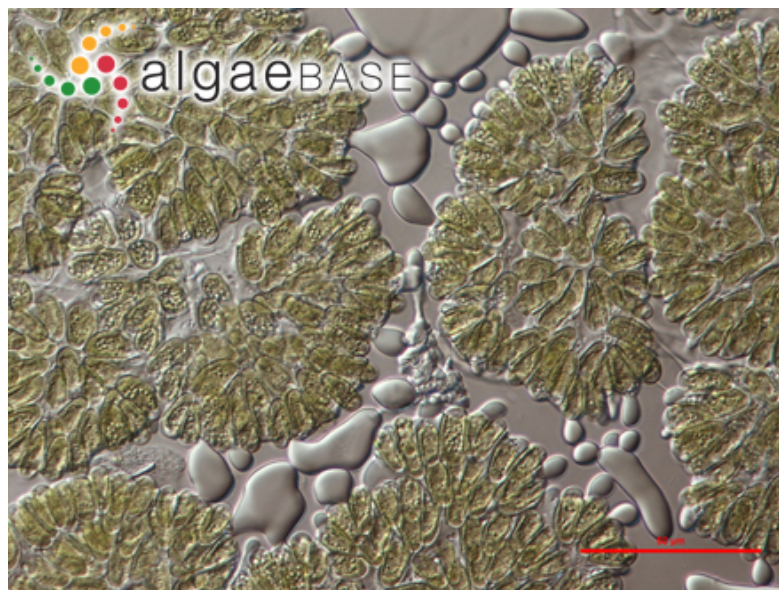
Muchos informes y artículos de investigación describen muchas ventajas de usar las microalgas para la producción de biocombustibles en comparación con otras materias primas disponibles. Desde un punto de vista práctico, son fáciles de cultivar, pueden crecer con poca o ninguna atención, utilizando agua no apta para el consumo humano y nutrientes fáciles de obtener [61]. Las microalgas pueden proporcionar materia prima para diversos tipos de combustibles renovables como el biodiesel, metano, hidrógeno, etanol, entre otros. Ellas tienen tasas más altas de crecimiento y productividad cuando se compara con la silvicultura convencional, los cultivos agrícolas, y otras plantas acuáticas, requiriendo así mucha menos superficie de tierra en comparación con otras materias primas de origen agrícola para biocombustibles [22].

2.1.2 Botryococcus braunii. (Chlorophyta, Botryococcaceae) es una microalga verde formadora de colonias que produce grandes cantidades de hidrocarburos líquidos, que se pueden transformar en combustibles para el transporte [97]. Pertenece al género *Botryococcus*, miembro colonial de la familia Trebouxiophyceae la cual compila una gran variedad de microalgas verdes acumuladoras de hidrocarburos que pueden ser encontradas en lagos, reservorios y pozos [19]. El contenido de hidrocarburos en *B. braunii* varía entre 15-80% del peso celular seco, lo que es mucho mayor que en otros microorganismos [8]. Debido a su riqueza de aceite y a su capacidad para formar floraciones, a veces perdurables durante muchos años [94], esta microalga se propone como una fuente de combustibles líquidos renovables [19].

La síntesis de hidrocarburos de alta energía es un proceso que consume gran cantidad de energía en las células, lo que se evidencia en tasas de crecimiento bajas para *B. braunii*. El tiempo de duplicación de *B. braunii* es normalmente de 6-7 días en condiciones naturales y alrededor de 3-5 días en condiciones de agitación controlada, lo que es más largo que en otras especies [106].

Esta alga crece como una colonia de células individuales adheridas por una matriz compuesta por hidrocarburos y lípidos inusuales (figura 1). Estas colonias poseen estructuras amorfas, asemejando un ramillete de uvas [54].

Figura 1. *Botryococcus braunii*

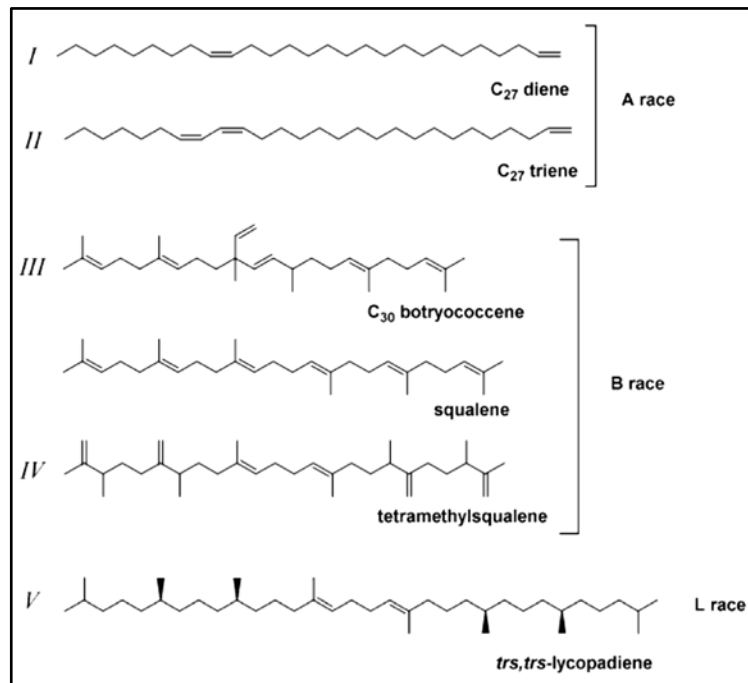


Fuente: *Algalbase.com*

Dentro de esta misma especie se pueden reconocer 3 diferentes tipos o "familias" (figura 2), cada una de estas se diferencia por el tipo de hidrocarburos que produce [68]. El tipo A produce n-alcadienos (C_{23} - C_{33} , principalmente hidrocarburos dienos y trienos), el tipo B produce hidrocarburos triterpenos C_{30} - C_{37} mejor

conocidos como botriococenos, y escualenos metilados C_{31} - C_{34} , en cambio, las tipo L produce lycopadienos, los cuales son tetraterpenoides simples [68].

Figura 2. Tipos de hidrocarburos producidos por *B. braunii*.



Fuente: Metzger y Largeau, 2005 [68]

2.1.2.1 *Crecimiento (Biomasa)*. A pesar de la investigación sobre los requisitos químicos y ecológicos para el cultivo de *B. braunii*, el cultivo a gran escala para producir hidrocarburos renovables aún no ha demostrado ser financieramente viable [76]. La tasa de crecimiento lento de esta alga no es consecuencia de una oferta limitada de nutrientes; al parecer el alto contenido de hidrocarburos y una tasa rápida de crecimiento se excluyen mutuamente. La acumulación de hidrocarburos puede retardar la tasa de crecimiento en *B. braunii* [76]. Sin embargo, Tanoi et al., informó que el lento crecimiento de *Botryococcus* se ha mejorado dramáticamente por la adición de bajas concentraciones de glucosa al medio de cultivo [6].

Las distintas especies y cepas de microalgas tienen condiciones óptimas de crecimiento y diferente tolerancia a factores ambientales. Los factores que tienen que ser dilucidados deben incluir la temperatura, irradiación, CO₂ y salinidad del medio entre otros. Un sistema de cultivo de biomasa para *B. braunii* debe ser establecido y controlado basado en las respuestas del crecimiento a las variaciones ambientales [105]. En este contexto, diversos estudios realizados han reportado cambios en el crecimiento de distintas cepas de *B. braunii* debido a rangos de temperatura [60], diferentes intensidades de irradiación [82], concentraciones de CO₂ [37] [78], y salinidad [79]. Por ende, los datos detallados sobre la respuesta del crecimiento de *B. braunii* a los medios de cultivo y las condiciones ambientales básicas son necesarios antes de la construcción de un cultivo para la producción de biomasa [105].

2.1.2.2 *Botriococenos e Hidrocarburos.* Los hidrocarburos denominados botriococenos son triterpenos modificados con la fórmula química C_nH_{2n-10} [8], estos pueden llegar a ser entre el 30 y 40% de la biomasa seca [68]. Los altos niveles de botriococenos y la habilidad de estas microalgas coloniales de formar *blooms* naturales han elevado la posibilidad de explotar comercialmente este organismo, con la intención de producir biocombustibles y otros productos [19]. En primera instancia, los botriococenos son secuestrados en vesículas entre las células, donde tanto la biosíntesis como la segregación de estas moléculas toman lugar. Los hidrocarburos intracelulares son solo una pequeña fracción del contenido total de hidrocarburos de la micro-colonia [54], [100].

Trabajos previos [54] demuestran que en la especie *B. braunii* los hidrocarburos se acumulan en dos sitios distintos: inclusiones citoplasmáticas y paredes celulares exteriores. Además de una pared de polisacárido, las células de *B. braunii* están rodeadas por varias paredes exteriores en las que la acumulación de la mayoría de los hidrocarburos (95%), resulta en la formación de glóbulos a veces más grandes que las propias células. Por otra parte, al parecer no se lleva a cabo

ninguna transferencia de hidrocarburos desde la piscina interna a la externa; en consecuencia, la mayor parte de hidrocarburos en *B. braunii* no sólo es almacenada sino que también es producida dentro de las paredes celulares exteriores [53].

B. braunii es un recurso renovable prometedor para la producción de hidrocarburos, y se ha informado de que del hidrocrqueo de la biomasa en el destilado se obtiene 67% de gasolina, 15% de combustible para turbinas de aviación, 15% combustible diesel y 3% de aceite residual [42]. La recuperación de estos hidrocarburos puede ser llevada a cabo mediante la extracción de la biomasa seca utilizando solventes [68]; sin embargo, el desaguar y secar la biomasa no se perfila actualmente un método para su aplicación a escala industrial. Otro acercamiento es la pirolisis de la biomasa producida; sin embargo, no existe mucha información sobre pirolisis rápida de microalgas a escala de laboratorio.

2.1.2.3 *Lípidos.* La producción de lípidos por organismos fotoautotróficos es un proceso importante en el ecosistema acuático. Los lípidos son productos de almacenamiento con un alto valor nutricional, y su síntesis y acumulación por parte de las algas es una fuente principal de energía para los invertebrados y los peces, ya que suministran ácidos grasos poliinsaturados esenciales. Además, los lípidos de algas se han sugerido como un posible sustituto de los combustibles diesel con un énfasis en los lípidos neutros debido a su menor grado de insaturación y su acumulación en las células de algas en el final de la etapa de crecimiento [19] [64].

La microalga verde *Botryococcus braunii*, es una rica fuente de lípidos convencionales y no-clásicos [67]. Esta especie se conoce, además de por su alta producción de hidrocarburos, también por la gran cantidad de ácidos grasos (lípidos) que sintetiza, cuya cantidad y composición varía de acuerdo con la especie y también entre razas [38]. En la fracción lipídica extraída de *B. braunii* se

encontraron entre otros; lípidos polares (hasta más del 50% de lípidos totales), di- y triacilgliceroles, esteroides y sus ésteres y ácidos grasos libres [48].

Hay pruebas de que la síntesis de hidrocarburos está estrechamente relacionada con el patrón de ácidos grasos del alga [54] [90]. Cabe señalar que los datos relativos a los ácidos grasos del alga son contradictorios [92] [66] y que las investigaciones de *B. braunii* se refieren principalmente a la estructura de sus hidrocarburos y lípidos. Al mismo tiempo, los datos sobre la influencia de los factores ambientales y el estado fisiológico de *B. braunii* en el metabolismo de sus lípidos son prácticamente nulos, a pesar de que son muy importantes para la comprensión del mecanismo de la síntesis de hidrocarburos en el alga y la optimización de su producción [48].

2.2 CULTIVO

Existen varios factores que influyen en el crecimiento general de las algas: factores abióticos como la luz (calidad, cantidad), la temperatura, la concentración de nutrientes, O₂, CO₂, pH, salinidad, y productos químicos tóxicos; factores bióticos, tales como agentes patógenos (bacterias, hongos, virus) y la competencia con otras algas; factores operativos tales como la cizalladura producida por la mezcla, la velocidad de dilución, la profundidad, la frecuencia de la cosecha, y la adición de bicarbonato [61].

Para la implementación de una unidad de cultivo de algas se deben tener en cuenta varios criterios [62];

- (i) El suministro de agua (demanda, salinidad y propiedades fisicoquímicas)
- (ii) La topografía del terreno, geología y costos de propiedad
- (iii) Las condiciones climáticas, temperatura, luz, aislamiento, evaporación, y precipitación.

- (iv) El fácil acceso a los nutrientes y a las fuentes de abastecimiento de carbono.

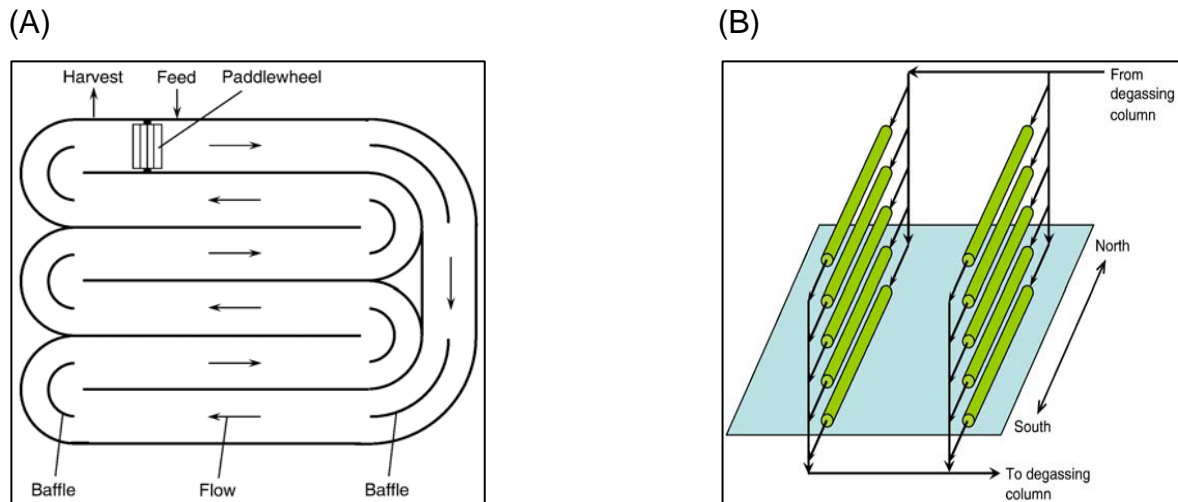
También es necesario decidir si el cultivo estará operando en modo continuo o discontinuo, y si las unidades de producción serán sistemas abiertos o cerrados. Esto dependerá de las especies de microalgas seleccionadas, las condiciones ambientales previstas y la disponibilidad de nutrientes. Además del equipo necesario para el cultivo, es importante prestar especial atención a la selección de las cepas y especies, teniendo en cuenta los productos deseados y las condiciones de cultivo con las que se cuenta [61].

Diversos trabajos se enfocan en establecer los requerimientos nutricionales y las condiciones de cultivo óptimas para la producción de *B. braunii*. Al igual que otras especies de microalgas, *B. braunii* requiere agua, luz, CO₂ y nutrientes inorgánicos. La productividad del cultivo se ve afectada por factores tales como el pH, concentración de CO₂, irradiancia, salinidad y temperatura [8].

Un medio de cultivo Chu-13 modificado se utiliza a menudo a los cultivos de *B. braunii* con un crecimiento satisfactorio. Este medio tiene la siguiente composición (g / L): KNO₃ (0,2), K₂HPO₄ (0,04), MgSO₄ · 7H₂O (0,1), CaCl₂ · 6H₂O (0,08), citrato férrico (0,01), ácido cítrico (0,1), boro (0,5 ppm), manganeso (0,5 ppm), cobre (0,02 ppm), cobalto (0,02 ppm) y molibdeno (0,02 ppm) [54].

2.2.1 Sistemas de Cultivo. Actualmente, la producción fotoautotrofica es el único método técnica y económicamente viable para la producción a gran escala de biomasa de microalgas [16]. Dos sistemas se han implementado y se basan en estanques abiertos (figura 3-A) y tecnologías de fotobiorreactores cerrados (figura 3-B) [17]. La viabilidad técnica de cada sistema está influenciada por las propiedades intrínsecas de la cepa de alga seleccionada, así como las condiciones climáticas y los costos de la tierra y del agua [15].

Figura 3. Sistemas de cultivo.



(A) Open pound. (B) Fotobiorreactor.

Fuente: Chisti, 2007 [22]

Muchos tipos de fotobiorreactores están disponibles para el cultivo de microalgas, y la mayoría de ellos han sido evaluados para el cultivo de *B. braunii*. Esquemas de operación por lotes y continuos han sido probados en biorreactores abiertos y cerrados (axénicos). Debido a la factibilidad económica, únicamente el cultivo continuo es viable en la práctica para la producción a gran escala de biomasa de microalgas [8].

El cultivo continuo en fotobiorreactores de levantamiento con aire [1] [69] se utiliza con frecuencia en especial para la producción de *B. braunii* a pequeña escala [19] [7]. Se informa que la máxima fijación de CO₂ y mayor producción de hidrocarburos por *B. braunii* se obtiene en fotobiorreactores de columna de burbujas. Este tipo de biorreactores se implementan para someter las células a un estrés hidrodinámico menor que en fotobiorreactores de levantamiento con aire de configuración similar [50], pero esto es discutible. En la ausencia de agitación mecánica, los fotobiorreactores de columna sufren de la necesidad contradictoria de grandes burbujas para mantener así el cultivo celular suspendido, este problema puede ser

tratado mediante la utilización de 2 tipos de difusores, separando así la inyección de CO₂ y de aire, lo cual mejora la transferencia del CO₂ en el medio acuoso y permite un buen mezclado mediante la gasificación del medio [32]. Diversas ventajas se obtienen mediante la variación de los tipos de rociadores para el burbujeo de CO₂ en el fotobiorreactor. La disminución del tamaño de burbuja desde el difusor aumenta el coeficiente de transferencia de masa entre el medio de cultivo y la corriente de CO₂, aumentando la eficiencia de transferencia hasta en un 500% [32].

En comparación con los fotobiorreactores asépticos cerrados, los reactores de estanques abiertos pueden significar costos de producción muchos más bajos [98]. Sin embargo, las condiciones de cultivo en sistemas abiertos están menos controladas que en sistemas cerrados y, en consecuencia, la productividad de la biomasa es baja en comparación con los fotobiorreactores cerrados. Además, los sistemas de cultivo abiertos incluyen inevitablemente poblaciones mixtas y no sólo el alga deseada. A pesar de estos problemas, los sistemas de cultivo abiertos como los estanques de "rodadura" pueden ser la opción más realista para la producción de grandes cantidades de hidrocarburos de *B. braunii*. Más aún si se encuentra una fuente barata de CO₂ para eludir la relativamente baja eficiencia de utilización de CO₂ en canales abiertos y estanques [8].

2.2.2 Suministro de Nitrógeno. De acuerdo con experiencias previas en el monitoreo de lotes de cultivos de microalgas para la fijación de CO₂ [39], la fuente de nitrógeno, por lo general nitrato (NO₃⁻), se consume un poco más rápidamente que los otros componentes del medio. Por lo tanto, la fuente de nitrógeno se convierte en un factor limitante en una etapa temprana del cultivo. Yang y colaboradores [103] usan nitrito como fuente de nitrógeno en reemplazo del nitrato para el cultivo de *B. braunii*, encontrando tiempos de duplicación de la biomasa similares para menores concentraciones de nitrito. Por su parte, Dayananda y colaboradores [27] comparan la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno tales

como nitrato de sodio, nitrato de potasio, nitrato de amonio, nitrato de calcio y urea en el crecimiento y la producción de hidrocarburos, encontrando al Nitrato de Potasio (KNO_3) como la mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento y producción de metabolitos en cultivos de *B. braunii*.

Aunque una deficiencia de nitrógeno favorece la acumulación de lípidos [10], se requiere nitrógeno para el crecimiento. Los datos publicados disponibles en la actualidad sobre el efecto de la limitación de nitrógeno en la síntesis de hidrocarburos en cultivos de *B. braunii* son aun contradictorios; se demuestra que una concentración inicial mayor de nitrato en el medio causa rendimientos superiores [4], sin embargo, resultados opuestos obtenidos más adelante demuestran que la limitación de nitrógeno estimula la síntesis de hidrocarburos [86].

Los estudios con nitrógeno suministrado como NO_3^- , NO_2^- y NH_3 revelan que el principal factor que regula el metabolismo del nitrógeno en *B. braunii* es el sistema de captación de nitrato. El nitrógeno se suministra generalmente en forma de sales de nitrato. Una concentración inicial de $\text{NO}_3^- \geq 0.2$ (kg/m^3) favorece la producción de hidrocarburos [20]. Con 1 (kg/m^3) KNO_3 , la concentración de hidrocarburos después de 30 días fue de 4,8 (kg/m^3). Sobre la misma cantidad de hidrocarburos 4,5 (kg/m^3) se obtuvo cuando la concentración inicial de KNO_3 fue de (3 kg/m^3). Esto es debido a que altas concentraciones de nitrato interfieren con la producción de hidrocarburos [18].

Por otro lado, Thomas y colaboradores [91] estudian el efecto del estrés de nitrógeno en la fracción de lípidos de diversas especies de algas, concluyendo que el cultivo bajo condiciones deficientes de nitrógeno efectivamente aumenta el contenido de lípidos neutros, pero esto no se puede declarar como una sola tendencia. Se realizó esta observación para las especies *Botryococcus*, *Isochrysis* y *Dunaliella* cultivadas bajo estrés de nitrógeno. En *Botryococcus* los lípidos neutros comprendían una proporción importante del total de lípidos. Esto se puede

evidenciar en otros estudios, en los cuales se demuestra que cuando la concentración de la fuente de nitrógeno disminuye en los medios fotoautotróficos y las células están limitadas en nitrógeno, la tasa de crecimiento de *B. braunii* disminuye, pero el contenido de lípidos en las células aumenta significativamente [86], [107].

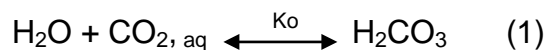
2.2.3 Suministro de Carbono. Además del suministro y transferencia de la luz, la tarea más importante en el cultivo de microalgas es alimentar a las células con una fuente de carbono y eliminar del medio de cultivo el oxígeno producido [75]. Los cultivos fotoautotróficos que utilizan una fuente inorgánica de carbono, principalmente Dióxido de Carbono (CO₂), son ampliamente estudiados y pretendidos, esto porque las microalgas fijan de manera eficiente carbono inorgánico a través de la fotosíntesis a tasas mucho más altas por unidad de biomasa que las plantas superiores [40]. Visto entonces desde un enfoque biológico, el CO₂ es convertido en productos de valor agregado tales como proteínas, vitaminas, alimento, combustibles, entre otros [70].

Por otro lado, la capacidad de las microalgas para utilizar carbono orgánico como fuente de energía es importante, ya que puede reducir al mínimo los efectos inhibitorios de la limitación de luz diurna y estacional en el crecimiento en cultivos al aire libre. Weetall [96] encontró que unas pocas fuentes de carbono orgánico, incluyendo fructosa, glucosa, manosa, galactosa y ácido láctico, pueden aumentar el crecimiento de *B. braunii* cultivada en recipientes estáticos, demostrando así que *B. braunii* podría crecer en modo mixotrófico. Zhang y colaboradores [106] también reportaron que la densidad celular en cultivos mixotróficos de *B. braunii* es obviamente mayor que en modo fotoautotrófico y heterotrófico, siendo la glucosa la fuente óptima de carbono.

2.2.3.1 *Dióxido de Carbono.* El dióxido de carbono es un importante gas que regula el calentamiento global de la superficie del planeta, además de ser la

primera fuente de carbono para la vida en la Tierra. Este se produce como residuo metabólico de la respiración de seres vivos, como gas de combustión de combustibles fósiles y se emite en fuentes volcánicas y geiseres [35].

El CO₂ puede servir como fuente de carbono para los cultivos de células fotosintéticas, pero debe residir en la fase acuosa para la captación. El CO₂ es un gas a temperatura y presión ambiente, y su solubilidad en agua es muy baja. Reside en la fase acuosa como 4 especies diferentes; dióxido de carbono (CO₂), ácido carbónico (H₂CO₃), ion bicarbonato (HCO₃⁻), y ion carbonato (CO₃⁼), cuyas concentraciones en el equilibrio dependen del pH. Para su disolución en agua, el CO₂ sufre tres reacciones químicas que involucran cuatro especies químicas (dióxido de carbono CO₂, ácido carbónico H₂CO₃, bicarbonato ion HCO₃⁻, y carbonato ion CO₃⁼) según Hill y colaboradores [41]:



Debido a que las conversiones de las reacciones 2 y 3 son mucho más rápidas que las de la reacción 1, el CO₂ disuelto y el H₂CO₃ en especies neutras son considerados como un solo componente y llamado ácido carbónico, H₂CO₃.

Además de ser una fuente de carbono, el CO₂ contribuye al control del pH dentro del cultivo, ya que durante la inyección de CO₂ se puede observar alguno, o los dos, fenómenos siguientes: (1) existe inhibición cuando se usan fracciones molares altas de CO₂ y/o (2) bajas fracciones molares de CO₂ generan pequeñas

variaciones de pH en el cultivo [63]. De esta manera el pH puede ser un parámetro de control que se puede manejar para ver el estado del cultivo, la producción de metabolitos específicos, si existe inhibición y si se está presentando una buena fijación de nutrientes.

2.2.3.2 Fijación de CO₂. De acuerdo con la literatura, el suministro de carbono para el cultivo masivo de microalgas representa la principal limitante [11], [72], [89], ya que se debe tener en cuenta al usar CO₂ que grandes concentraciones de este pueden inhibir el crecimiento mientras bajas concentraciones pueden limitarlo [77]. Estas concentraciones varían de especie en especie, por lo cual la concentración de CO₂ suministrado debe ser tal que satisfaga la necesidad de carbono del alga, pero que no exceda sus requerimientos, derivando en un exceso que no puede ser utilizado por el alga y es liberado por el cultivo produciendo así una polución innecesaria [21].

Las actuales tecnologías para la transferencia del CO₂ en cultivos microalgales sufren de ineficiencias en la transferencia de masa del CO₂ desde la fase gaseosa a la líquida [11], [63], [89], además, la eficiencia de captura o fijación del CO₂ en sistemas de cultivo cerrado depende principalmente de la especie de microalga, la concentración del CO₂ y del fotobioreactor [21], [70]. En estudios realizados en cultivos de la cepa de *B. braunii* LB-572, se encontró que una concentración del 2,0% v/v de CO₂ favorece el crecimiento rápido, resultando en la acumulación de biomasa y aumento en la producción de hidrocarburos en el final del período experimental. Más aun, esta cepa fue capaz de crecer en todas las concentraciones ensayadas de CO₂ en 0.5, 1, y 2% [78]. Por su parte, Ge y colaboradores [37] trabajaron con cultivos de la cepa *B. braunii* 765, a los cuales se inyectaron altas concentraciones de CO₂ del 2%, 5%, 10% y 20% v/v en una corriente de gases mezclada con aire a una tasa de 600 ml/min, obteniendo tasas de crecimiento similares para concentraciones del 2% y del 20%.

Existen diferentes parámetros matemáticos para medir la fijación de CO₂ en los cultivos [70] y su productividad [83]:

La fijación de dióxido de carbono acumulada (FA, g CO₂);

$$F_A = \frac{(X_t - X_0) * m_{cbm} * V_{VTP}}{\left(\frac{m_{CO_2}}{m_C}\right)}$$

Donde;

- X_t = Concentración de biomasa en (g / L) en cualquier tiempo t.
- X_0 = Concentración de biomasa (g / L) en t_0
- m_{cbm} = Fracción másica de carbono en gramos de carbono por gramos de biomasa (g / g).
- V_{VTP} = Volumen de trabajo (L) en el fotobiorreactor.
- m_{CO_2} = Masa molar de CO₂ (g / mol).
- m_C = Masa molar del carbono (g / mol).

La fijación diaria de dióxido de carbono (FD) en gramos de CO₂ fijado por gramos de CO₂ inyectado por día (g / g.d);

$$F_D = \frac{(F_{A(t+1)} - F_{A(t)})}{m_{id}}$$

Donde;

- $F_{A(t+1)}$ = Acumulación de CO₂ (g CO₂) fijado durante (t + 1) días.
- $F_{A(t)}$ = Acumulación de CO₂ (g CO₂) fijado durante (t) días.
- m_{id} = Masa (g CO₂) inyectados cada día.

La Productividad (P) es calculada como máxima productividad (g / L.d);

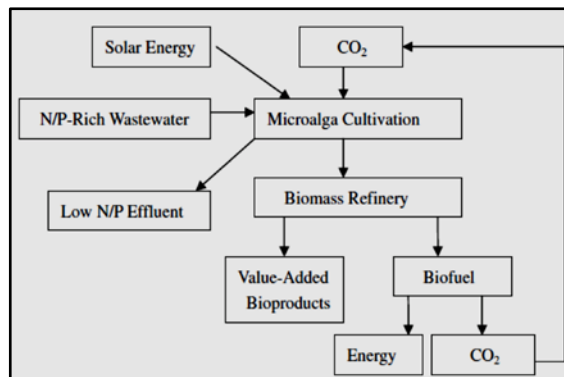
$$P = \frac{(X_t - X_0)}{(t - t_0)}$$

Donde;

- X_0 = Concentración inicial de biomasa (g / L) en t_0
- X_t = Concentración de biomasa en (g / L) en cualquier tiempo t subsecuente.

El acoplamiento del cultivo de microorganismos fotosintéticos con la biofijación de dióxido de carbono (figura 4.) tiene el potencial no sólo para reducir los costos de medios de cultivo para el crecimiento de estos organismos a escala industrial, sino también para compensar las emisiones de CO_2 y generar productos de alto valor [11].

Figura 4. Sistema conceptual de producción y biomitigación de CO_2 .

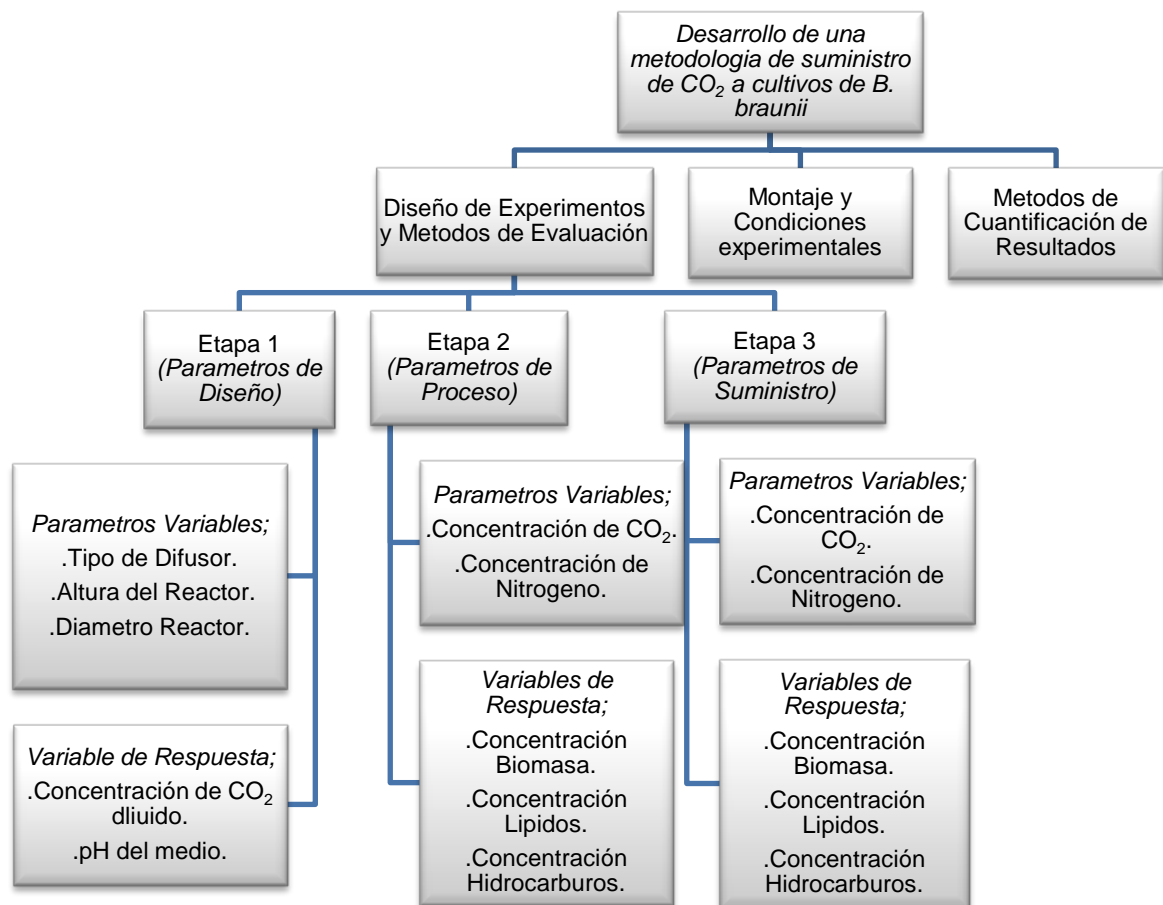


Fuente: Wang y colaboradores, 2008 [95].

3. METODOLOGIA

Con el fin de validar la hipótesis propuesta y alcanzar los objetivos planteados, se programó un desarrollo experimental dividido en 3 etapas; Etapa 1 (Parámetros de Diseño); Etapa 2 (Parámetros de Proceso); Etapa 3 (Parámetros de Suministro). En cada etapa se evaluó la influencia de diversas variables referentes al cultivo de *B. braunii* sobre variables de respuesta respecto a la productividad del cultivo y la dilución de CO₂. En el siguiente esquema (figura 5.) se expone de manera global la metodología planteada para el desarrollo del trabajo.

Figura 5. Esquema del desarrollo metodológico.



Fuente: Autor

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar los efectos de los parámetros seleccionados sobre las diferentes variables de respuesta, se utilizó un diseño de experimentos tipo factorial ampliado a DCC (Diseño Central Compuesto). Este diseño consiste en un factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, el cual es ampliamente aceptado para experimentos de optimización, porque se ajusta a modelos de segundo orden y a la metodología de Superficie de Respuesta, y lo más importante correlaciona eficientemente los factores con las respuestas usando un menor número de tratamientos, lo que implica ahorro en costos y tiempo.

Se utilizó la metodología estadística del Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar la influencia de los parámetros variables sobre las variables de respuesta. La finalidad del método es determinar si existen cambios significativos en las variables de respuesta cuando se varían los niveles de los diferentes parámetros que se están estudiando, mediante el análisis del cambio de la varianza. Para determinar estos efectos el método usa un valor de significación (p), el cual es la medida que indica si los parámetros variables y sus interacciones son significativos sobre la variable de respuesta (rechaza la hipótesis de que todas las medias son iguales) o no son estadísticamente significativos sobre la variable de respuesta (acepta la hipótesis de que todas las medias son iguales). Para considerar los efectos de los parámetros y de sus interacciones se trabajó con un nivel de confiabilidad de 95% con un valor de $p < 0.05$. Dentro del Análisis de Varianza se utilizaron los diagramas de Pareto como herramienta estadística. Estos permiten detectar los efectos de los parámetros y de sus interacciones que son más importantes y como influyen la variable de respuesta.

Una vez identificados los parámetros variables e interacciones que influyen en la variable de respuesta, se recurrió a la metodología de la Superficie de Respuesta, una herramienta estadística cuyo objetivo es optimizar la variable de interés, determinando las condiciones óptimas de operación del sistema. Para identificar

los puntos críticos (mínimo, máximo, ensilladura) se utilizaron modelos lineal-cuadráticos para correlacionar las variables, teniendo en cuenta que estos le dan rotabilidad al modelo generando superficies con curvatura que permiten llegar a la cercanía del óptimo.

Para plantear los diseños experimentales y determinar los resultados estadísticos (Anova, Diagramas de Pareto, Efectos Estimados y Superficies de Respuesta) se utilizó como herramienta el software STATISTICA 7.0.

3.1.1 Etapa 1 (Parámetros de Diseño). Se utilizó un Diseño Central Compuesto 2^2 , con 2 bloques, 10 corridas y 2 réplicas, evidenciado en la tabla 5. Este con el fin de determinar la influencia de parámetros de diseño referentes a la geometría del reactor y al tamaño de burbuja sobre la dilución de CO_2 en un medio de cultivo seleccionado para la cepa, representados en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros y variables de respuesta etapa 1.

Parámetros de Diseño	Etiquetas	Niveles			Unidades
		-1	0	1	
Altura de Medio de Cultivo	H	20	30	40	cm
Diámetro de Medio de Cultivo	D	6	8	10	cm
Difusor de CO_2	B	Burbujeo		Piedra difusora	

Variable de Respuesta	Unidades
[] CO_2 en Medio de Cultivo	mg / L

Se inyectó CO_2 puro a una concentración de 0,04 ($\text{mLCO}_2/\text{mL.min}$) [v/vm] de manera continua a cada una de las unidades experimentales durante máximo 20 minutos, o hasta que el pH del medio acuoso alcanzó un valor mínimo de 5, estas condiciones basadas en estudios previos que demuestran que cepas de *B. braunii* pueden crecer en rangos óptimos de pH entre 6 – 8,5 [27]. Para esto se realizaron

mediciones de pH a cada tratamiento experimental en intervalos de 5 minutos durante los 20 minutos de inyección de CO₂.

Debido a que al variar los parámetros de diseño (alturas y diámetros), varía el volumen de trabajo, para estimar la cantidad de CO₂ inyectado en cada tratamiento experimental se usó la ecuación 1;

$$(1) \quad CO_{2,in} = 0,04 \left[\frac{mlCO_2}{ml * min} \right] * V_t * t_{in} * \rho_{CO_2}$$

Donde;

- CO_{2,in} = Total CO₂ inyectado al medio [g]
- t_{in} = Tiempo de inyección de CO₂ en cada experimento [min]
- ρ_{CO₂} = Densidad de CO₂ a condiciones normales = 0,00196 [g / mL]
- V_t = Volumen de trabajo de cada experimento [mL]

Para encontrar el porcentaje de CO₂ disuelto en el medio de cultivo respecto al CO₂ inyectado, se usó la ecuación 2;

$$(2) \quad \%CO_{2,dis} = \frac{[]CO_{2,exp} * V_t}{CO_{2,in}} * 0,0001$$

Donde;

- %CO_{2,dis} = Porcentaje de CO₂ disuelto en el medio [%]
- [] CO_{2,exp} = Concentración de CO₂ encontrada experimentalmente [mg/L]
- V_t = Volumen de trabajo de cada experimento [mL]
- CO_{2,in} = Total CO₂ inyectado al medio [g]

Tabla 5. Matriz del diseño experimental etapa 1

DIFUSOR: Burbujeo / Piedra difusora

Tratamiento	Bloque	Altura (H)	Diámetro (D)
1	1	20	6
2	1	20	10
3	1	40	6
4	1	40	10
5 (C)	1	30	8
6	2	15,8	8
7	2	44,1	8
8	2	30	5,2
9	2	30	10,8
10 (C)	2	30	8

Para evaluar el parámetro de Difusión de CO₂ (tamaño de burbuja), que es una variable cualitativa, se ejecutó el diseño experimental planteado para cada tecnología de difusor (Burbuja y Piedra difusora). Cada uno de los experimentos anteriores se realizó por triplicado y para cada uno de los 2 tipos de difusores planteados, para un total de 60 experimentos.

3.1.2 Etapa 2 (Parámetros de Proceso). Se utilizó un Diseño Central Compuesto 2², con 2 bloques, 10 corridas y 2 réplicas, evidenciado en la tabla 7. Este con el fin de determinar la influencia de parámetros de proceso referentes a las cantidades de CO₂ (Fuente de Carbono) y KNO₃ (Fuente de Nitrógeno) suministrados al cultivo de *B. braunii*, sobre la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos, representados en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros y variables de respuesta etapa 2.

Factores (Parámetros de Proceso)	Etiquetas	Niveles			Unidades
		-1	0	1	
Concentración de CO ₂ (Flujo)	CO ₂	30	60	90	mL CO ₂ /min
Concentración de Nitrógeno	KNO ₃	0,38	0,75	1,5	g / L

Variable de Respuesta	Unidades
[] Biomasa	g / L cultivo
[] Lípidos	g / g biomasa
[] Hidrocarburos	µg / g biomasa

Se inyectó el CO₂ puro de manera continua a cada una de las unidades experimentales por 10 horas diarias durante 15 días. Paralelamente se inyectó de manera continua aire que aportó a la agitación y homogenización del cultivo. Los cultivos se mantuvieron bajo un ciclo de iluminación de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad

Tabla 7. Matriz del diseño experimental etapa 2.

Tratamiento	Bloque	CO₂	KNO₃
1	1	30	0,38
2	1	30	1,5
3	1	90	0,38
4	1	90	1,5
5 (C)	1	60	0,75
6	2	17	0,75
7	2	102	0,75
8	2	60	0
9	2	60	1,54
10 (C)	2	60	0,75

Cada uno de los experimentos anteriores se realizó por triplicado para un total de 30 experimentos.

3.1.3 Etapa 3 (Parámetros de Suministro). Se utilizó el mismo diseño de experimentos planteado en la etapa 2 (tabla 7.), donde los parámetros y las variables de respuesta, referenciadas en la tabla 6, también se mantuvieron exactas a los de la etapa anterior.

La condición diferenciadora que se evaluó en esta etapa fue el *Método de Suministro de CO₂*, con el fin de comparar la influencia de la inyección por Pulsos y Continua en la producción de biomasa y metabolitos en cultivos de *B. braunii*. En

la Etapa 2, se suministró CO₂ a los cultivos de manera Continua. En esta etapa, se suministró CO₂ a manera de Pulsos durante 10 horas en corridas de 15 días. Se plantearon pulsos de inyección de 20 minutos, además se definió una etapa de asimilación (sin suministro) de 1 hora entre cada pulso de inyección de CO₂, para permitir buena solubilización en el medio y fijación por parte del cultivo, como se plasma en la tabla 8.

Tabla 8. Cronograma de suministro de CO₂ por pulsos.

Tiempo de Suministro (Día)														
A.M								P.M						
07:00	07:20	08:20	08:40	09:40	10:00	11:00	11:20	12:20	12:40	01:40	02:00	03:00	03:20	04:20
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
07:20	08:20	08:40	09:40	10:00	11:00	11:20	12:20	12:40	01:40	02:00	03:00	03:20	04:20	04:40
Pul*	As*	Pul	As	Pul	As	Pul	As	Pul	As	Pul	As	Pul	As	Pul

*Pul. (Pulso de inyección CO₂). *As. (Tiempo de asimilación)

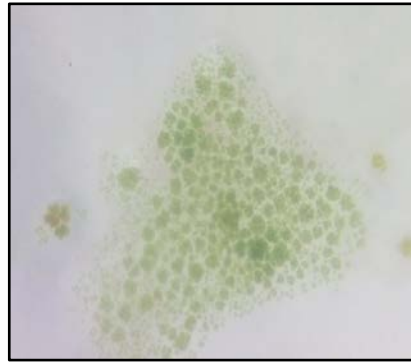
En total se inyectaron 8 pulsos diarios por experimento. Cada experimento se corrió por triplicado siguiendo las condiciones de la matriz planteada (tabla 7.) para un total de 30 experimentos.

3.2 MONTAJE Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

En el presente trabajo se utilizó la microalga *Botryococcus braunii* ICP 0001 que se observa en la figura 6, recolectada de un lago ubicado en el municipio de Porce Antioquia en la hacienda Vegas de la Clara de la Universidad de Antioquia - UDEA "San José del Nus" y aislada en el Laboratorio de Transformación de Biomasa del grupo de investigación CIDES de la Universidad Industrial de Santander. La microalga se mantuvo en un medio de cultivo Bold Basal modificado (MBBM). Cada litro de medio de cultivo estaba compuesto por: macronutrientes (Molar) NaNO₃ (2.94 X 10⁻³), MgSO₄.7H₂O (3.04 X10⁻⁴) NaCl

(4.28×10^{-4}), K_2HPO_4 (4.31×10^{-4}), KH_2PO_4 (1.29×10^{-3}), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1.70×10^{-4}) y micronutrientes (g/L) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (3.07×10^{-5}), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (7.28×10^{-6}), MoO_3 (4.93×10^{-6}), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (6.29×10^{-6}), $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (1.68×10^{-6}), H_3BO_3 (1.85×10^{-4}), EDTA (1.71×10^{-4}), KOH (5.53×10^{-4}), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1.79×10^{-5}).

Figura 6. Cepa experimental usada de *B. braunii*.



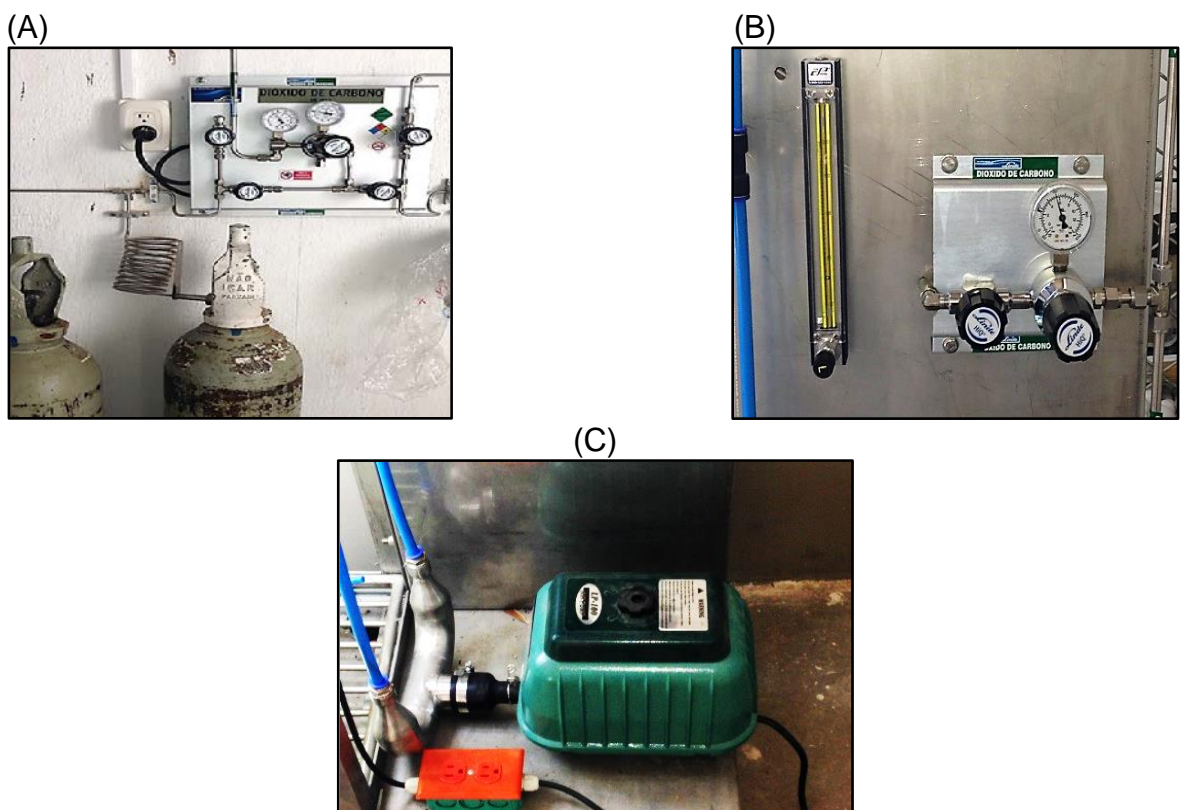
Los cultivos se corrieron en fotobiorreactores translucidos de vidrio templado, como se ven en la figura 7-A, con volúmenes fijos y con entradas para líneas de aire y CO_2 y salida para escape de gases. Los cultivos se mantuvieron bajo un ciclo de iluminación de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad utilizando lámparas fluorescentes de 12 w como se ve en la figura 7-B.

Figura 7. Montaje experimental para los cultivos de *B. braunii*.



Para el suministro de gases, se inyectó CO₂ puro a los cultivos desde balas de 10 Kg de capacidad en las cuales se fijó la presión con reguladores y se controló el flujo con rotámetros, como se observa en la figura 8-A y 8-B. Con el fin de airear y agitar, se suministró aire a los cultivos a razón constante desde bombas de aire como la que se ven en la figura 8-C.

Figura 8. Método experimental de suministro de gases a cultivos de *B. braunii*.

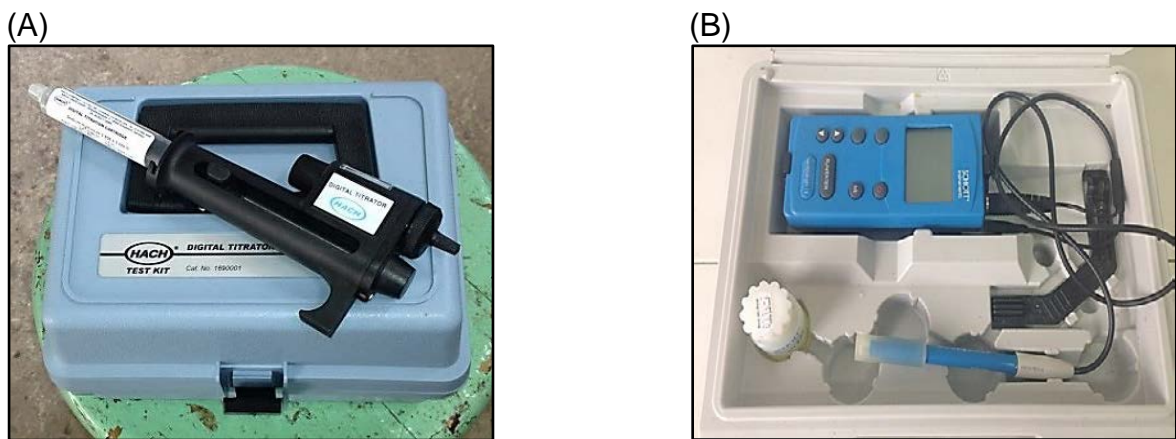


3.3 METODOS DE CUANTIFICACION DE RESULTADOS

Para cuantificar los resultados obtenidos en los diferentes ensayos experimentales, se plantearon diferentes métodos analíticos de cuantificación.

3.3.1 Cuantificación de CO₂. Para cuantificar la concentración de CO₂ en el medio de cultivo, se utilizó un equipo de titulación digital marca HACH Modelo 16900 con cartuchos específicos para CO₂, que se observa en la figura 9-A. El pH del medio de cultivo, que es un indicador del CO₂ diluido, se determinó usando un pH-metro digital marca SCHOTT Instruments que se ve en la figura 9-B.

Figura 9. Herramientas de medición de CO₂ en el medio de cultivo.



3.3.2 Cuantificación de Biomasa. Se utilizó la metodología de 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 de filtrado, los filtros fueron llevados al horno durante 1 hora a 100°C seguido por 12 horas en desecador hasta alcanzar peso constante. Se determinó la cantidad de biomasa mediante la diferencia de pesos.

3.3.3 Cuantificación de Hidrocarburos. Se utilizó la metodología descrita por Eroglu y Melis [33]. Al final de la experimentación se tomaron 20 mL de medio de cultivo, 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 (cuantificación de hidrocarburos) usando un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 de Merck que se observa en la figura 10.

Figura 10. Espectrofotómetro para cuantificación de hidrocarburos.



3.3.4 Cuantificación de Lípidos.

Se utilizó la metodología descrita por Blight y Dyer [14]. Al final de la experimentación se tomaron 20 mL de medio de cultivo, los cuales se centrifugaron a 3400 rpm durante 20 minutos. Al pellet se le agregaron 5.7 mL de solución de Blight 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 (Figura 18); 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.

4. RESULTADOS

4.1 ETAPA 1 (PARAMETROS DE DISEÑO)

En las tablas 9-A y 9-B se exponen los resultados referentes al monitoreo del pH realizado a cada uno de los tratamientos experimentales para cada tipo de difusor.

Tabla 9. Monitoreo de pH en etapa 1.

(A)

Tratamiento	H (cm)	D (cm)	pH (0 min.)	pH (5 min.)	pH (10 min.)	pH (15 min.)	pH (20 min.)
1	20	6	7,09	6,95	6,80	6,65	6,57
2	20	10	7,20	7,12	6,92	6,72	6,60
3	40	6	7,18	6,98	6,75	6,33	6,13
4	40	10	7,17	6,95	6,80	6,35	6,09
5 (C)	30	8	7,08	6,92	6,79	6,55	6,20
6	15,8	8	7,08	6,99	6,89	6,70	6,50
7	44,1	8	7,10	6,95	6,75	6,40	6,05
8	30	5,2	7,15	7,03	6,86	6,59	6,30
9	30	10,8	7,09	6,90	6,80	6,68	6,45
10 (C)	30	8	7,10	7,0	6,72	6,45	6,15
<i>Total Promedio</i>			7,12	6,98	6,81	6,54	6,30

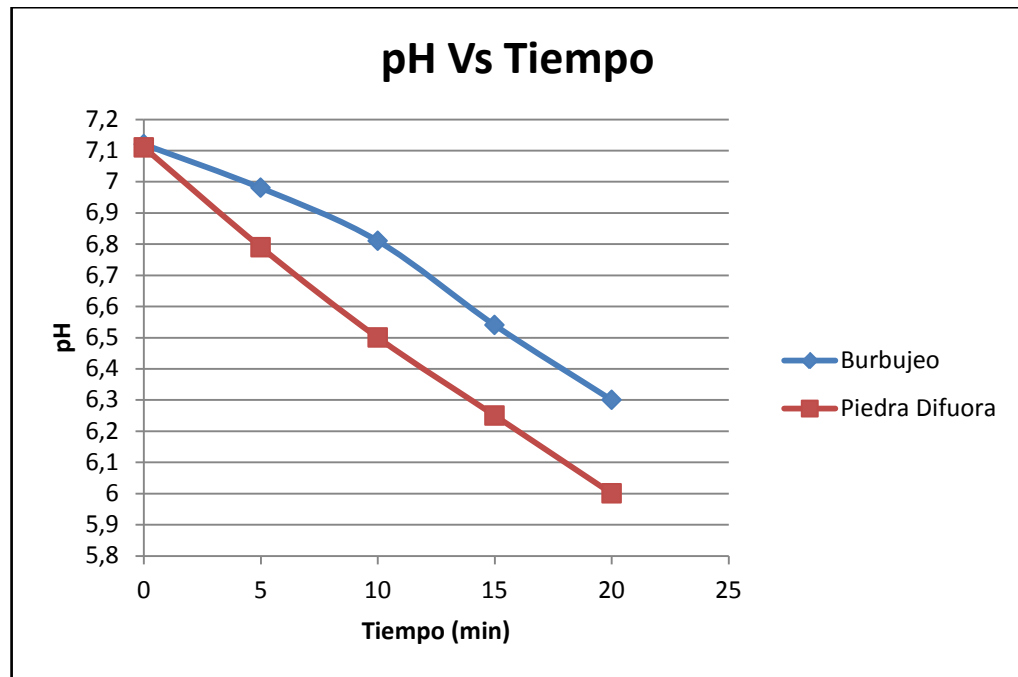
(B)

Tratamiento	H (cm)	D (cm)	pH (0 min.)	pH (5 min.)	pH (10 min.)	pH (15 min.)	pH (20 min.)
1	20	6	7,10	6,82	6,60	6,34	6,15
2	20	10	7,08	6,80	6,62	6,28	6,10
3	40	6	7,08	6,68	6,35	6,13	5,73
4	40	10	7,07	6,71	6,40	6,15	5,79
5 (C)	30	8	7,18	6,79	6,49	6,25	6,0
6	15,8	8	7,15	6,84	6,59	6,36	6,20
7	44,1	8	7,10	6,75	6,35	6,0	5,85
8	30	5,2	7,05	6,83	6,56	6,39	6,10
9	30	10,8	7,19	6,90	6,69	6,38	6,18
10 (C)	30	8	7,09	6,80	6,42	6,25	5,90
<i>Total Promedio</i>			7,11	6,79	6,50	6,25	6,0

(A) Difusor Burbujeo. (B) Difusor Piedra Difusora

A partir de los resultados obtenidos se construyó la gráfica 3 donde se observa el comportamiento del pH en el tiempo para cada tipo de difusor.

Gráfica 3. Evolución del pH en el tiempo



Los resultados y la gráfica revelan que en todos los tratamientos ocurrió un descenso en el pH del medio debido al suministro continuo de CO₂. También se puede observar que el descenso fue mayor conforme aumentó la altura (H) del reactor y se usó como difusor la piedra difusora, esto debido al aumento del tiempo de residencia del CO₂ en el medio y la mayor área de contacto entre el gas y el líquido gracias al difusor. Estas caídas implican que aumentó la concentración de CO₂ en el medio de cultivo, sin embargo, los rangos de pH observados para los tiempos de inyección estuvieron dentro de las condiciones viable para el cultivo de *B. braunii* [27], más si se tiene en cuenta que los experimentos fueron sin microorganismos los cuales aprovechan la fuente de carbono y mantienen balanceado el pH.

En las tablas 10-A y 10-B se registran los resultados obtenidos respecto a la dilución de CO₂ en el medio de cultivo para cada uno de los tratamientos experimentales planteados, y para cada tipo de difusor.

Tabla 10. Resultados experimentales etapa 1.

(A)

Tratamiento	H (cm)	D (cm)	CO _{2,in} (g)	CO _{2,dis} (%)	[]CO ₂ en Medio de Cultivo (mg/L)		
					Original	Replica 1	Replica 2
1	20	6	0,88	18	280	288	276
2	20	10	2,46	14,9	235	240	227
3	40	6	1,77	28,4	444	440	450
4	40	10	4,92	24,7	384	390	388
5 (C)	30	8	2,36	29,5	455	465	466
6	15,8	8	1,24	26	400	408	410
7	44,1	8	3,47	31,6	500	490	495
8	30	5,2	0,99	30,4	470	480	470
9	30	10,8	4,3	27,6	426	430	440
10 (C)	30	8	2,36	29,2	450	463	457

(B)

Tratamiento	H (cm)	D (cm)	CO _{2,in} (g)	CO _{2,dis} (%)	[]CO ₂ en Medio de Cultivo (mg/L)		
					Original	Replica 1	Replica 2
1	20	6	0,88	45,9	725	715	706
2	20	10	2,46	37,3	590	578	586
3	40	6	1,77	50,9	805	785	800
4	40	10	4,92	45,3	720	704	708
5 (C)	30	8	2,36	53	830	835	825
6	15,8	8	1,24	44,7	705	697	692
7	44,1	8	3,47	57,5	895	900	905
8	30	5,2	0,99	54,7	844	860	846
9	30	10,8	4,3	48	740	756	754
10 (C)	30	8	2,36	53,2	840	826	830

(A) Difusor Burbujeo. (B) Difusor Piedra Difusora

4.1.1 Análisis Estadístico. A partir de los resultados experimentales, se construyó la tabla 11 (A y B) y la gráfica 4 (A y B) para determinar la influencia de la altura, el diámetro y el difusor sobre la dilución de CO₂.

Tabla 11. Resultados ANOVA parámetros de diseño.

(A)

Factor	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor p
Altura (L) (cm)	73437,9	1	73437,86	18,71700	0,000230
Altura (Q) (cm)	15029,3	1	15029,29	3,83049	0,062057
Diámetro (L) (cm)	9978,2	1	9978,15	2,54312	0,123862
Diámetro (Q) (cm)	14061,7	1	14061,72	3,58389	0,070462
Altura : Diámetro	75,0	1	75,00	0,01912	0,891190
Error	94166,2	24	3923,59		
Total Suma Cuadrados	198029,4	29			

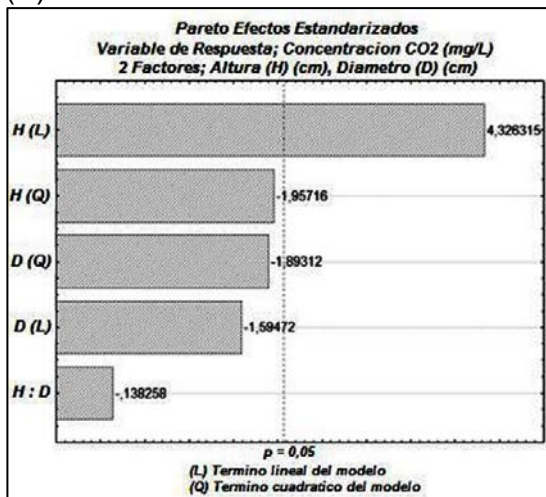
(B)

Factor	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor p
Altura (L) (cm)	91145,0	1	91145,03	12,81433	0,001512
Altura (Q) (cm)	22402,4	1	22402,38	3,14961	0,088632
Diámetro (L) (cm)	48085,1	1	48085,14	6,76042	0,015702
Diámetro (Q) (cm)	21851,5	1	21851,52	3,07217	0,092411
Altura : Diámetro	1496,3	1	1496,33	0,21037	0,650601
Error	170705,8	24	7112,74		
Total Suma Cuadrados	342411,9	29			

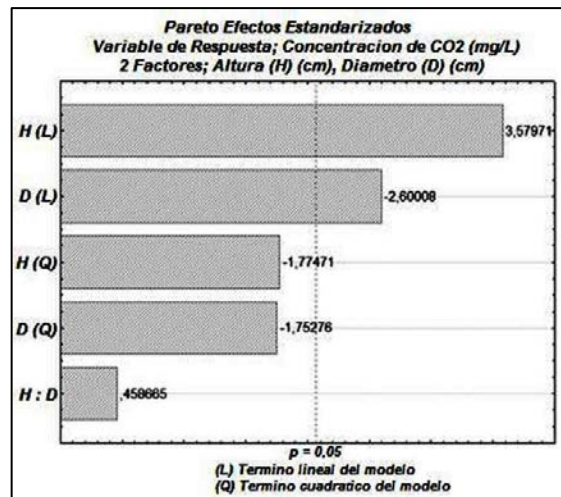
(A) Difusor Burbujeo. (B) Difusor Piedra Difusora

Gráfica 4. Diagramas de Pareto parámetros de diseño.

(A)



(B)



(A) Difusor Burbujeo. (B) Difusor Piedra Difusora

De la tabla 11 se puede deducir que para un valor de significación $p < 0,05$ el único factor relevante sobre la respuesta en el caso de usar como difusor el burbujeo fue la altura. Para los experimentos con piedra difusora, tanto la altura como el diámetro tuvieron relevancia sobre la variable de respuesta.

En la gráfica 4-A se observa que en los experimentos donde se usó burbujeo como tipo de difusor, únicamente la altura (H) fue significativa y tuvo un efecto positivo sobre los resultados de dilución de CO_2 en el medio de cultivo, es decir, a mayor altura mayor dilución de CO_2 . Por otra parte, en la Gráfica 4-B se observa que en los experimentos donde se usó piedra difusora como tipo de difusor, ambas variables, tanto la altura (H) como el diámetro (D), fueron significativas. En este caso, la altura tuvo un mayor grado de significancia y un efecto positivo sobre la dilución de CO_2 , es decir, a mayor altura mayor dilución. Por el contrario el diámetro tuvo un efecto negativo sobre la dilución de CO_2 , es decir a mayor diámetro menor dilución.

A partir de la tabla 12 se determinó la magnitud del efecto de los parámetros significativos sobre la variable de respuesta.

Tabla 12. Efectos estimados parámetros de diseño.

(A)

Factor	Efecto	Error estándar	Valor-p	-95% Limite confiabilidad	+95% Limite confiabilidad
<i>Interacción Medias</i>	459,3333	25,57209	0,000000	406,555	512,1115
<i>Altura (L) (cm)</i>	110,6329	25,57209	0,000230	57,855	163,4111
<i>Altura (Q) (cm)</i>	-66,2083	33,82870	0,062057	-136,027	3,6107
<i>Diámetro (L) (cm)</i>	-40,7802	25,57209	0,123862	-93,558	11,9980
<i>Diámetro (Q) (cm)</i>	-64,0417	33,82870	0,070462	-133,861	5,7773
<i>Altura : Diámetro</i>	-5,00000	36,16440	0,891190	-79,640	69,6397

(B)

Factor	Efecto	Error estándar	Valor-p	-95% Limite confiabilidad	+95% Limite confiabilidad
<i>Interacción Medias</i>	831,0000	34,43047	0,000000	759,939	902,0610
<i>Altura (L) (cm)</i>	123,2511	34,43047	0,001512	52,190	194,3121
<i>Altura (Q) (cm)</i>	-80,8333	45,54723	0,088632	-174,838	13,1715

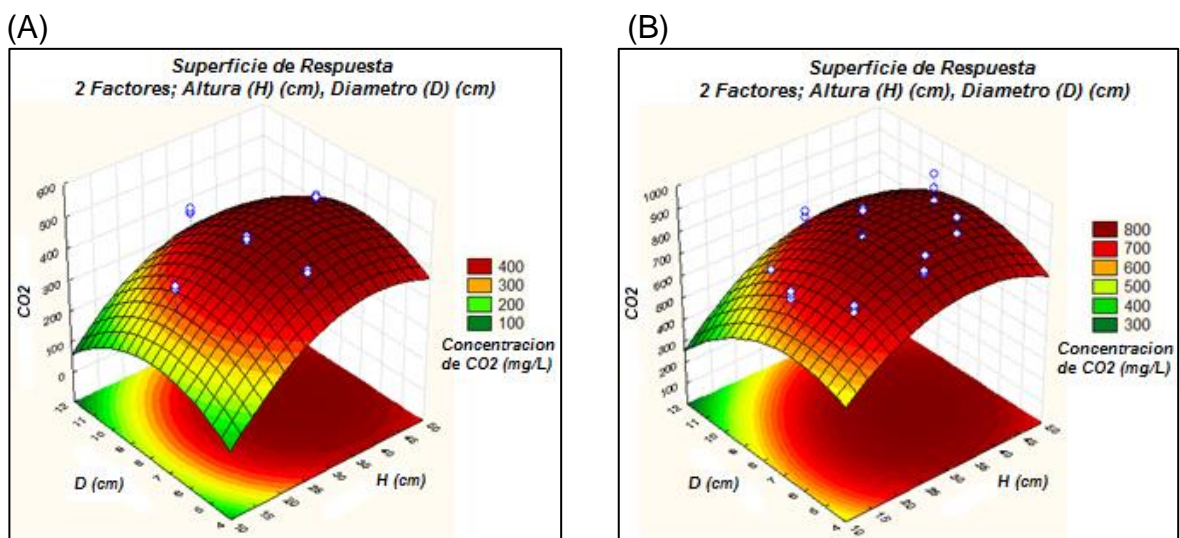
Diámetro (L) (cm)	-89,5220	34,43047	0,015702	-160,583	-18,4610
Diámetro (Q) (cm)	-79,8333	45,54723	0,092411	-173,838	14,1715
Altura : Diámetro	22,3333	48,69204	0,650601	-78,162	122,8288

(A) Difusor Burbujeo. (B) Difusor Piedra Difusora

En el caso de difusor burbujeo, el efecto para el factor altura fue positivo, entonces la dilución de CO₂ puede aumentar hasta en 163,11 mg/L al pasar de un nivel bajo (20 cm) a un nivel alto (40 cm) de la altura. Para el caso de difusor piedra difusora, el efecto para la altura también fue positivo, entonces la dilución de CO₂ puede aumentar hasta en 194,3 mg/L al pasar de un nivel bajo (20 cm) a un nivel alto (40 cm) de la altura. Por otra parte el coeficiente para el diámetro fue negativo, entonces la dilución de CO₂ puede disminuir hasta en 160,6 mg/L al pasar de un nivel bajo (6 cm) a un nivel alto (10 cm) del diámetro, o aumenta hasta 160,6 mg/L al pasar de un nivel alto (10 cm) a un nivel bajo (6 cm) del diámetro.

Con el fin de optimizar la dilución de CO₂ en medio de cultivo, se construyó la gráfica 5 con las Superficies de Respuesta para los experimentos corridos con cada tipo de difusor

Gráfica 5. Superficie de respuesta parámetros de diseño.



(A) Difusor Burbujeo. (B) Difusor Piedra Difusora

La grafica 5-A muestra un valor máximo predicho de dilución (486,4 mg CO₂/L) que se obtuvo con un valor crítico de Altura de 38,5 cm y un valor crítico de Diámetro de 7,3 cm. Por otra parte, la gráfica 5-B muestra un valor máximo predicho de dilución (862,9 mg CO₂/L) que se obtuvo con un valor crítico de Altura de 36,9 cm y un valor crítico de Diámetro de 7,0 cm. Se puede observar que el aumento de los valores máximos de dilución estuvo principalmente influenciado por cambios de altura y tamaño de partícula (Difusor), mientras la influencia del diámetro no fue tan significativa.

4.2 ETAPA 2 (PARAMETROS DE PROCESO)

En las tablas 13-A, 13-B y 13-C se registran los resultados obtenidos respecto a la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos de la cepa de *B. braunii* para cada uno de los tratamientos experimentales planteados.

Tabla 13. Resultados experimentales etapa 2.

(A)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Biomasa (g/L)		
			Original	Replica 1	Replica 2
1	30	0,38	0,6	0,78	0,72
2	30	1,5	0,75	0,86	0,88
3	90	0,38	1,52	1,37	1,4
4	90	1,5	1,86	1,7	1,78
5 (C)	60	0,75	0,45	0,33	0,36
6	17	0,75	1,05	0,91	0,98
7	102	0,75	1,67	1,6	1,53
8	60	0	0,4	0,25	0,25
9	60	1,54	0,13	0,29	0,18
10 (C)	60	0,75	0,38	0,4	0,48

(B)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Lípidos (g/g)		
			Original	Replica 1	Replica 2
1	30	0,38	0,57	0,549	0,555
2	30	1,5	0,56	0,57	0,565
3	90	0,38	0,448	0,464	0,45
4	90	1,5	0,296	0,31	0,3
5 (C)	60	0,75	0,76	0,776	0,765

6	17	0,75	0,4	0,57	0,44
7	102	0,75	0,225	0,242	0,233
8	60	0	0,847	0,834	0,836
9	60	1,54	0,503	0,518	0,512
10 (C)	60	0,75	0,78	0,777	0,765

(C)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Hidrocarburos (µg / g)		
			Original	Replica 1	Replica 2
1	30	0,38	46510,3	46550	46533
2	30	1,5	22810	22838,3	22840,8
3	90	0,38	19749,5	19740,3	19778,7
4	90	1,5	25848,4	25880,3	25855
5 (C)	60	0,75	14920,5	14959,6	14938,2
6	17	0,75	30258	30289,4	30266,2
7	102	0,75	22007,2	21983	21994,4
8	60	0	16282,3	16300,4	16275
9	60	1,54	24946,7	24980,4	24965
10 (C)	60	0,75	15800,3	15775	15764,6

(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

4.2.1 Análisis Estadístico. Con el fin de determinar que parámetros (Concentración de CO₂, Concentración de Nitrógeno) tuvieron influencia sobre las variables de respuesta en el cultivo, se realizó la tabla 14 y la gráfica 6.

Tabla 14. Resultados ANOVA parámetros de proceso.

(A)

Factor	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor p
CO ₂ (L) (cm)	2,537453	1	2,537453	45,50742	0,000001
CO ₂ (Q) (cm)	4,379732	1	4,379732	78,54741	0,000000
KNO ₃ (L) (cm)	0,190315	1	0,190315	3,41317	0,077042
KNO ₃ (Q) (cm)	0,053567	1	0,053567	0,96069	0,336791
CO ₂ : KNO ₃	0,090008	1	0,090008	1,61422	0,216078
Error	1,338218	24	0,055759		
Total Suma Cuadrados	8,912280	29			

(B)

Factor	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor p
CO ₂ (L) (cm)	0,202439	1	0,202439	57,0989	0,000000
CO ₂ (Q) (cm)	0,572175	1	0,572175	161,3847	0,000000
KNO ₃ (L) (cm)	0,165802	1	0,165802	46,7652	0,000000
KNO ₃ (Q) (cm)	0,009103	1	0,009103	2,5676	0,122152
CO ₂ : KNO ₃	0,019186	1	0,019186	5,4115	0,028774

Error	0,085090	24	0,003545		
Total Suma Cuadrados	1,096725	29			

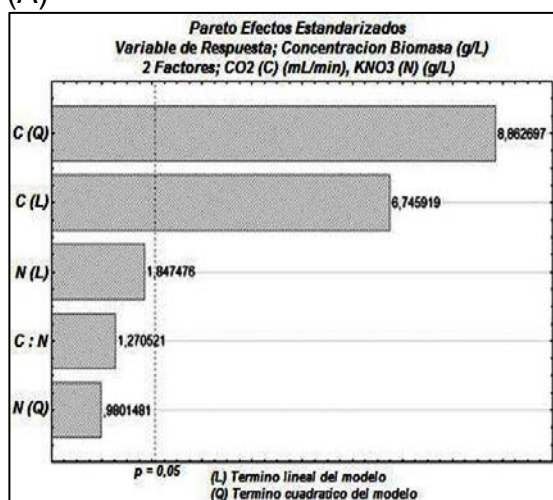
(C)

Factor	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor p
CO ₂ (L) (cm)	2,5051E+08	1	2,5051E+08	6,87803	0,014921
CO ₂ (Q) (cm)	4,5146E+08	1	4,5146E+08	12,39500	0,001751
KNO ₃ (L) (cm)	3,7308E+06	1	3,7308E+06	0,10243	0,751701
KNO ₃ (Q) (cm)	3,5420E+07	1	3,5420E+07	0,97249	0,333898
CO ₂ : KNO ₃	5,4667E+08	1	5,4667E+08	15,00905	0,000724
Error	8,7414E+08	24	36422778		
Total Suma Cuadrados	2,3516E+09	29			

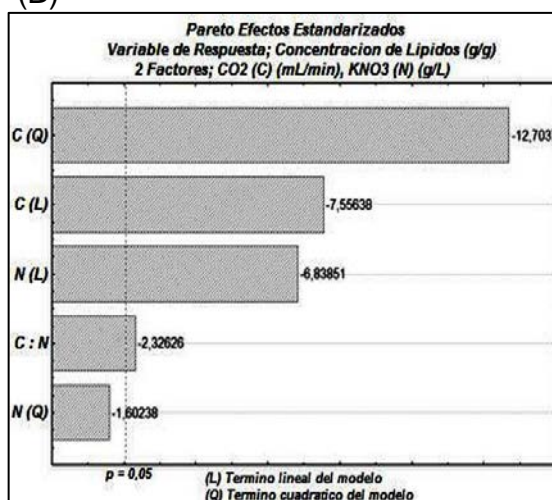
(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

Gráfica 6. Diagramas de Pareto parámetros de proceso.

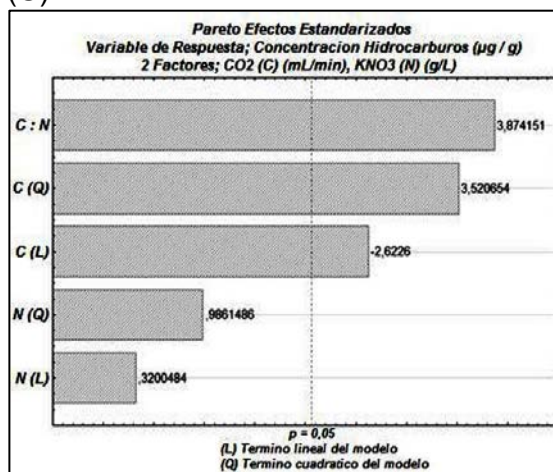
(A)



(B)



(C)



(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

De la tabla 14 se observa que únicamente la concentración de CO₂ influyó significativamente sobre la producción de biomasa, ya que tanto su término lineal como cuadrático cumplen con la significancia estadística de $p < 0,05$. Por otro lado, tanto la concentración de CO₂ como la concentración de nitrógeno influyeron significativamente sobre la producción de lípidos, además la interacción entre las dos variables vista como un factor también influyó estadísticamente en la respuesta. Finalmente, se puede observar que el único parámetro principal que influyó significativamente sobre la producción de hidrocarburos fue la concentración de CO₂, y la interacción entre las dos variables también tuvo significancia estadística.

En la gráfica 6-A se observa que la concentración de CO₂ tuvo un efecto positivo sobre la producción de biomasa, es decir, a mayor concentración de CO₂ mayor producción de biomasa. Para la producción de lípidos (gráfica 6-B) todos los parámetros significativos; concentración de CO₂, nitrógeno e interacción entre factores, tuvieron un efecto negativo sobre la producción de lípidos, es decir, a menor valor de los factores mayor producción de lípidos. En el caso de los hidrocarburos, se observó que el efecto de la interacción entre las variables presentó el mayor grado de significancia, es decir, la presencia de ambos parámetros influyó significativamente sobre la producción de hidrocarburos. El efecto de este factor fue positivo, entonces a mayor nivel de las variables, mayor producción. Además, el efecto de la concentración de CO₂ también fue significativo, convirtiéndolo en un parámetro determinante en la producción de hidrocarburos.

A partir de la tabla 15 se determinó la magnitud del efecto de los parámetros significativos sobre cada variable de respuesta (biomasa, lípidos e hidrocarburos).

Tabla 15. Efectos estimados parámetros de proceso.

(A)

Factor	Efecto	Error estándar	Valor-p	-95% Limite confiabilidad	+95% Limite confiabilidad
<i>Interacción Medias</i>	0,385453	0,092942	0,000363	0,193629	0,577276
<i>CO₂ (L) (cm)</i>	0,667777	0,098990	0,000001	0,463472	0,872081
<i>CO₂ (Q) (cm)</i>	1,114664	0,125770	0,000000	0,855087	1,374241
<i>KNO₃ (L) (cm)</i>	0,186202	0,100787	0,077042	-0,021813	0,394217
<i>KNO₃ (Q) (cm)</i>	0,114225	0,116538	0,336791	-0,126298	0,354748
<i>CO₂ : KNO₃</i>	0,168433	0,132570	0,216078	-0,105178	0,442044

(B)

Factor	Efecto	Error estándar	Valor-p	-95% Limite confiabilidad	+95% Limite confiabilidad
<i>Interacción Medias</i>	0,711260	0,023436	0,000000	0,662890	0,759630
<i>CO₂ (L) (cm)</i>	-0,188616	0,024961	0,000000	-0,240134	-0,137099
<i>CO₂ (Q) (cm)</i>	-0,402888	0,031714	0,000000	-0,468343	-0,337433
<i>KNO₃ (L) (cm)</i>	-0,173797	0,025415	0,000000	-0,226250	-0,121344
<i>KNO₃ (Q) (cm)</i>	-0,047088	0,029386	0,122152	-0,107738	0,013562
<i>CO₂ : KNO₃</i>	-0,077764	0,033429	0,028774	-0,146758	-0,008770

(C)

Factor	Efecto	Error estándar	Valor-p	-95% Limite confiabilidad	+95% Limite confiabilidad
<i>Interacción Medias</i>	18202,15	2375,429	0,000000	13299,5	23104,80
<i>CO₂ (L) (cm)</i>	-6635,15	2529,990	0,014921	-11856,8	-1413,51
<i>CO₂ (Q) (cm)</i>	11316,97	3214,450	0,001751	4682,7	17951,27
<i>KNO₃ (L) (cm)</i>	824,42	2575,936	0,751701	-4492,0	6140,89
<i>KNO₃ (Q) (cm)</i>	2937,24	2978,499	0,333989	-3210,1	9084,56
<i>CO₂ : KNO₃</i>	13126,55	3388,238	0,000724	6133,6	20119,53

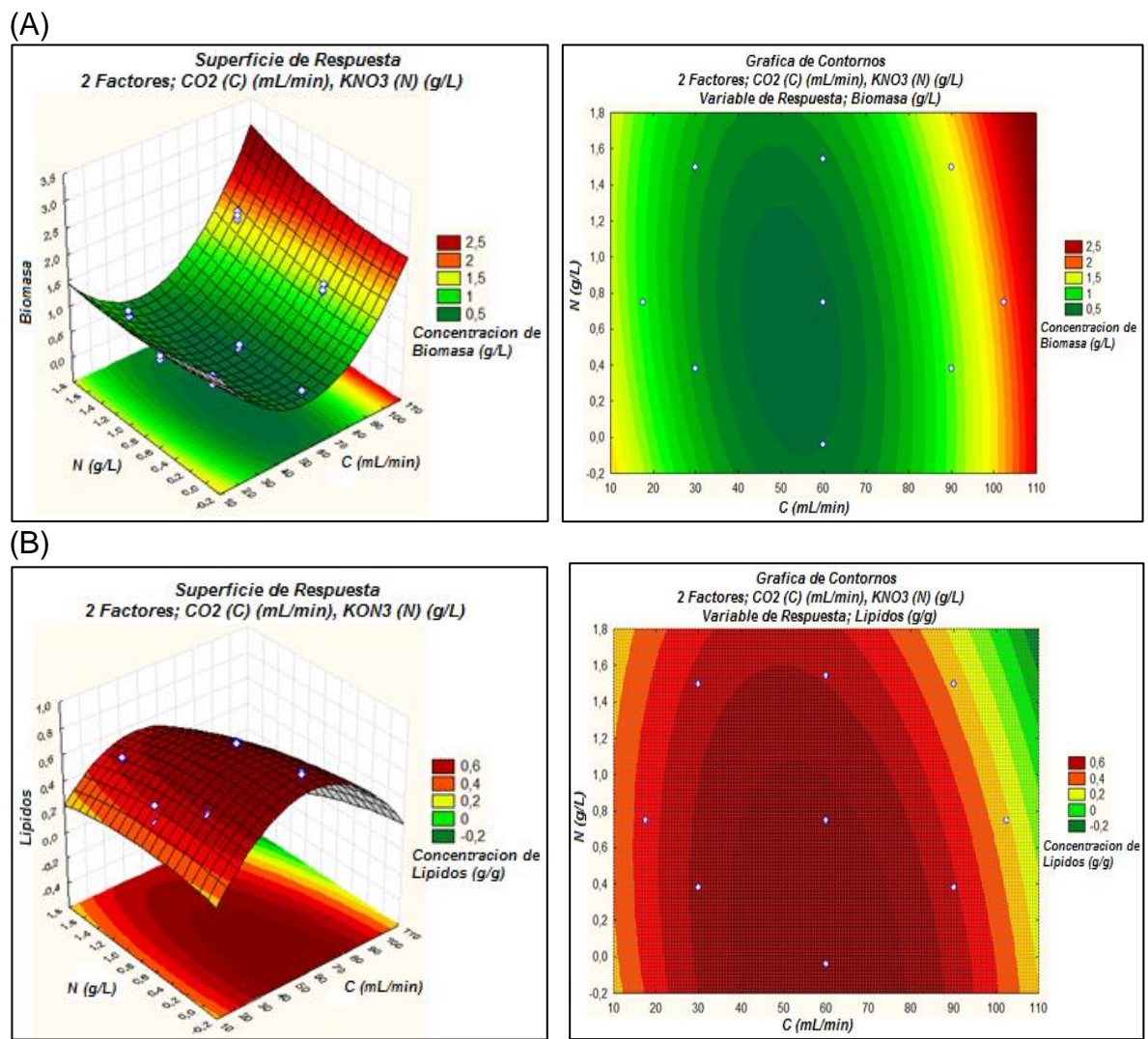
(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

Según los resultados anteriores, el efecto para el parámetro concentración de CO₂ fue positivo, entonces la producción de biomasa puede aumentar hasta en 0,87 g/L al pasar de un nivel bajo (30 mLCO₂/min) a un nivel alto (90 mLCO₂/min) de suministro de CO₂. En cuanto a los lípidos, el efecto de la concentración de CO₂ fue negativo, entonces la producción puede disminuir en promedio 0,29 g/g al pasar de un nivel bajo a un nivel alto de suministro de CO₂. Asimismo el efecto de la concentración de nitrógeno fue negativo, entonces la producción de lípidos puede disminuir hasta en 0,22 g/g al pasar de un nivel bajo (0,38 g/L) a un nivel alto (1,5 g/L) de suministro de nitrógeno. La interacción entre las variables fue negativa, entonces al aumentar los niveles de ambos factores de manera equilibrada la producción de lípidos puede disminuir de manera progresiva hasta

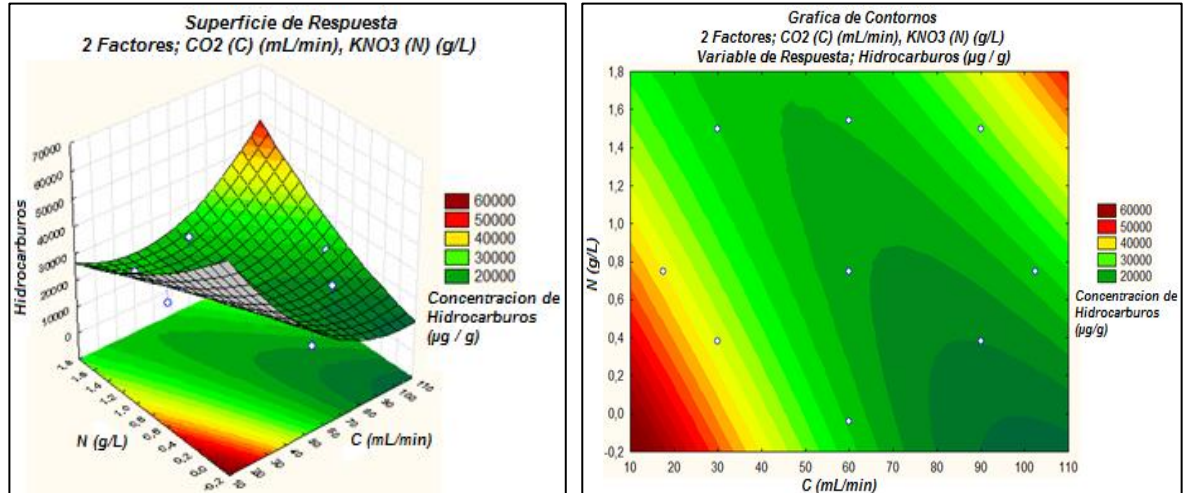
en 0,07 g/L. El efecto de la interacción entre variables fue positivo sobre la producción de hidrocarburos, aumentando hasta en 20119,3 $\mu\text{g/g}$ al aumentar los niveles en ambos factores, principalmente la concentración de CO_2 , la cual tuvo efectos positivos y negativos debido a un efecto ensilladura.

Con el fin de optimizar la producción de Biomasa, Lípidos e Hidrocarburos en el cultivo de *B. braunii*, se construyó la gráfica 7 con las Superficies de Respuesta y Diagramas de Contorno de los experimentos corridos.

Gráfica 7. Superficie de respuesta parámetros de proceso.



(C)



(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

En la gráfica 7-A se puede observar que los valores máximos de producción de biomasa se obtuvieron con las concentraciones más elevadas de CO₂, además, el aumento o disminución de los valores de producción estuvo principalmente influenciado por los cambios en la concentración de CO₂, mientras los cambios debido a la concentración de nitrógeno no fueron evidentes. La superficie de respuesta para la producción de Lípidos (grafica 7-B) muestra un valor máximo predicho (0,792 g/g) que se obtuvo con un valor crítico de concentración de CO₂ de 58,17 mL/min y un valor crítico de concentración de nitrógeno de 0,0 g/L. Los cambios en los niveles de CO₂ fueron los que generaron los contrastes más notorios en las productividades, notándose que el suministro de concentraciones medias de CO₂ fue ideal para la producción de lípidos. Por otra parte, aunque a menores concentraciones de nitrógeno también se notó un pequeño aumento de la productividad, el efecto fue mucho menor comparado con el CO₂. Finalmente, en la gráfica 7-C se observa que la producción de hidrocarburos aumentó con el aumento de la concentración de CO₂, pero también aumentó a medida que disminuyó la concentración de CO₂, esta condición se dio por un punto de ensilladura que une los máximos de la función. Es evidente que los máximos valores de producción de hidrocarburos se consiguieron con altas concentraciones

de CO₂ y de nitrógeno, o bajas concentraciones de ambos nutrientes, ratificando la importancia de la interacción y el suministro de ambas variables sobre la productividad.

4.2.2 Resultados de Productividad. En la tabla 16 se registra la producción de los diferentes metabolitos (Biomasa, Lípidos e Hidrocarburos) en los días 5, 10 y 15 de la experimentación.

Tabla 16. Resultados producción de metabolitos en el tiempo etapa 2.

(A)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Biomasa (g/L)		
			Día 5	Día 10	Día 15
1	30	0,38	0,20	0,50	0,70
2	30	1,5	0,18	0,65	0,83
3	90	0,38	0,68	0,72	1,43
4	90	1,5	0,90	0,85	1,78
5 (C)	60	0,75	0,33	0,90	0,38
6	17	0,75	0,19	0,43	0,98
7	102	0,75	0,75	0,83	1,60
8	60	0	0,28	0,43	0,30
9	60	1,54	0,25	0,69	0,20
10 (C)	60	0,75	0,38	0,79	0,42
Blanco	0	0	0,06	0,12	0,15

(B)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Lípidos (g/g)		
			Día 5	Día 10	Día 15
1	30	0,38	0,11	0,26	0,56
2	30	1,5	0,79	0,77	0,57
3	90	0,38	0,40	0,42	0,45
4	90	1,5	0,40	0,34	0,30
5 (C)	60	0,75	0,66	0,27	0,77
6	17	0,75	0,48	0,69	0,47
7	102	0,75	0,66	0,44	0,23
8	60	0	0,52	0,72	0,84
9	60	1,54	0,52	0,50	0,51
10 (C)	60	0,75	0,70	0,38	0,78
Blanco	0	0	0,05	0,14	0,10

(C)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Hidrocarburos (µg / g)		
			Día 5	Día 10	Día 15
1	30	0,38	9133,3	3945,6	46531,1
2	30	1,5	9947,0	2671,5	22829,2
3	90	0,38	740,8	389,3	19756,8

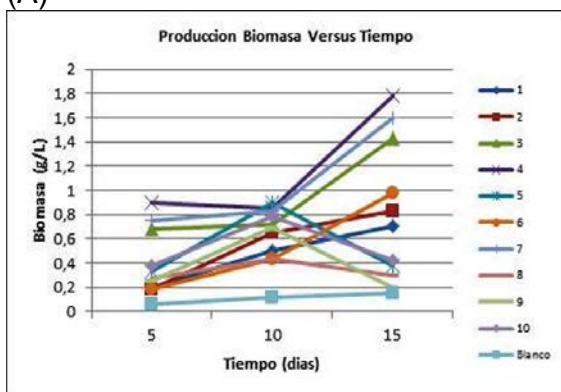
4	90	1,5	666,6	291,2	25861,2
5 (C)	60	0,75	1737,1	315,5	14939,3
6	17	0,75	8603,6	2961,7	30271,7
7	102	0,75	781,7	409,6	21994,9
8	60	0	2808,5	551,7	16285,9
9	60	1,54	2367,8	356,9	24964,4
10 (C)	60	0,75	1950,3	500,8	15764,6
Blanco	0	0	360,4	110,5	1090,5

(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

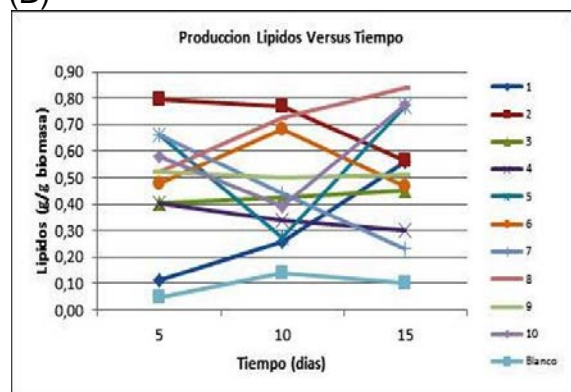
A partir de los resultados anteriores, se realizó la gráfica 8 sobre el avance de la producción en el tiempo y la tabla 17 con los datos de productividad para cada metabolito de interés.

Gráfica 8. Comportamiento de la producción en el tiempo parámetros de proceso.

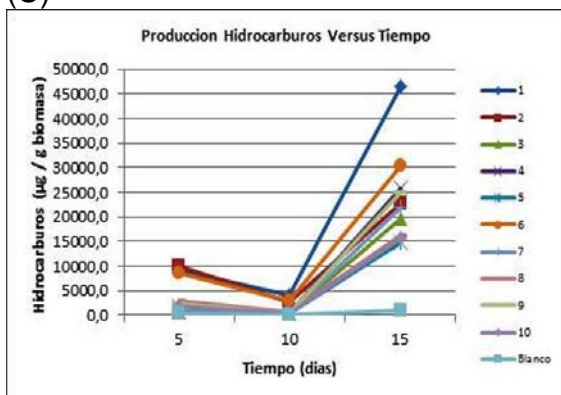
(A)



(B)



(C)



(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

Tabla 17. Resultados de productividad etapa 2.

(A)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Productividad (g/L.día)	
			Día 10	Día 15
1	30	0,38	0,0595	0,04
2	30	1,5	0,0945	0,035
3	90	0,38	0,009	0,141
4	90	1,5	-0,011	0,186
5 (C)	60	0,75	0,1145	-0,1035
6	17	0,75	0,0475	0,11
7	102	0,75	0,015	0,155
8	60	0	0,0315	-0,0265
9	60	1,54	0,0885	-0,098
10 (C)	60	0,75	0,082	-0,037
Blanco	0	0	0,012	0,006

(B)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Productividad (g/g.día)	
			Día 10	Día 15
1	30	0,38	0,029	0,060
2	30	1,5	-0,005	-0,041
3	90	0,38	0,004	0,006
4	90	1,5	-0,012	-0,008
5 (C)	60	0,75	-0,077	0,098
6	17	0,75	0,041	-0,043
7	102	0,75	-0,044	-0,042
8	60	0	0,041	0,023
9	60	1,54	-0,004	0,002
10 (C)	60	0,75	-0,038	0,077
Blanco	0	0	0,018	-0,008

(C)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Productividad (µg/g.día)	
			Día 10	Día 15
1	30	0,38	-1037,5	4258,5
2	30	1,5	-1455,1	2015,8
3	90	0,38	-70,3	1936,8
4	90	1,5	-75,1	2557,0
5 (C)	60	0,75	-284,3	1462,4
6	17	0,75	-1128,4	2731,0
7	102	0,75	-74,4	2158,5
8	60	0	-451,4	1573,4
9	60	1,54	-402,2	2460,8
10 (C)	60	0,75	-272,1	1531,1
Blanco	0	0	-49,98	196

(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

En la gráfica 8 se observa que todos los tratamientos presentaron valores finales superiores al blanco, lo que significa que el suministro de ambos nutrientes, en mayor o menor medida, tuvo efectos sobre la producción de los metabolitos. Los tratamientos con las concentraciones más altas de CO₂ (tratamientos 3,4,7) presentaron las mayores producciones de biomasa. Por el contrario, la concentración de nitrógeno no fue relevante ya que las producciones más altas de biomasa se consiguieron tanto con concentraciones altas como bajas del nutriente. Se alcanzaron valores máximos de producción de biomasa (tabla 17-A) para el día 15 de 1,78 g/L (tratamiento 4) y 1,60 g/L (tratamiento 7). La mayor productividad hasta el día 10 fue de 0,1145 g/L.día (tratamiento 5) y para el día 15 fue de 0,186 g/L.día (tratamiento 4). En la gráfica 8-B se observa que el comportamiento de los tratamientos en la producción de lípidos fue bastante disperso; para el día 10 las mayores producciones se dieron con concentraciones bajas de CO₂, sin embargo para el día 15 estas productividades cayeron y aumentó la importancia del CO₂, consiguiendo las mayores producciones de lípidos con concentraciones medias (60 mL/min). Las concentraciones bajas a nulas de nitrógeno fueron favorables para la producción de lípidos, como lo refleja el tratamiento 8 cuya producción fue la más alta y la adición de nitrógeno fue cero. Se alcanzó el valor máximo de producción de lípidos para el día 15 de 0,84 g/g (tratamiento 8). La mayor productividad hasta el día 10 fue de 0,041 g/L.día (tratamiento 8) y para el día 15 fue de 0,098 g/L.día (tratamiento 5). Para el caso de los hidrocarburos, en la gráfica 8-C es claro que la productividad más alta se obtuvo a bajas concentraciones de CO₂ y bajas concentraciones de nitrógeno. En todos los tratamientos hubo un comportamiento similar a través del tiempo; para el día 10 la productividad venía en caída, seguramente porque existen para este periodo otras prioridades metabólicas por parte de la microalga y los nutrientes no son esenciales o puede que inhiban el cultivo, sin embargo a partir del día 10 hasta el día 15 la productividad fue significativamente positiva para todos, lo que implica una necesidad metabólica de los nutrientes en este periodo. La mayor producción de hidrocarburos en el día 15 fue de 46531,1 µg/g.día (tratamiento 1).

La productividad hasta el día 10 fue en caída (negativa) para todos los experimentos. Ya para el día 15 fue de 4258,5 µg/g.día (tratamiento 1).

4.3 ETAPA 3 (PARAMETROS DE SUMINISTRO)

En las tablas 18-A, 18-B y 18-C se registran los resultados obtenidos respecto a la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos de la cepa de *B. braunii* para cada uno de los tratamientos experimentales planteados.

Tabla 18. Resultados experimentales etapa 3.

(A)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Biomasa (g/L)		
			Original	Replica 1	Replica 2
1	30	0,38	0,13	0,3	0,2
2	30	1,5	0,13	0,04	0,16
3	90	0,38	0,72	0,89	0,79
4	90	1,5	0,67	0,78	0,59
5 (C)	60	0,75	0,87	0,75	0,9
6	17	0,75	0,16	0,32	0,27
7	102	0,75	0,96	0,84	0,9
8	60	0	0,9	0,85	0,74
9	60	1,54	0,7	0,77	0,72
10 (C)	60	0,75	0,81	0,71	0,85

(B)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Lípidos (g/g)		
			Original	Replica 1	Replica 2
1	30	0,38	0,52	0,4	0,43
2	30	1,5	0,69	0,53	0,58
3	90	0,38	0,34	0,19	0,25
4	90	1,5	0,32	0,37	0,24
5 (C)	60	0,75	0,2	0,27	0,16
6	17	0,75	0,81	0,66	0,72
7	102	0,75	0,32	0,21	0,19
8	60	0	0,4	0,32	0,33
9	60	1,54	0,39	0,24	0,3
10 (C)	60	0,75	0,21	0,3	0,27

(C)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Hidrocarburos (µg / g)		
			Original	Replica 1	Replica 2
1	30	0,38	6377,3	6390,7	6395,5
2	30	1,5	13664	13696,4	13691,2
3	90	0,38	3839,4	3876,1	3857,2

4	90	1,5	6590,3	6618,5	6610
5 (C)	60	0,75	389,8	422,5	415
6	17	0,75	6493,2	6485	6459,7
7	102	0,75	3563,2	3580,5	3588,8
8	60	0	407,5	429,2	416,3
9	60	1,54	520,2	543,7	539,9
10 (C)	60	0,75	400,3	426,6	419,3

(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

4.3.1 Análisis Estadístico. Con el fin de determinar que parámetros (Concentración de CO₂, Concentración de Nitrógeno) tuvieron influencia sobre las variables de respuesta en el cultivo con un suministro de CO₂ semi-continuo o por pulsos, se construyeron la tabla 19 y la gráfica 9.

Tabla 19. Resultados ANOVA parámetros de suministro.

(A)

Factor	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor p
CO ₂ (L) (cm)	1,547438	1	1,547438	91,35681	0,000000
CO ₂ (Q) (cm)	0,401054	1	0,401054	23,67719	0,000058
KNO ₃ (L) (cm)	0,155401	1	0,155401	9,17450	0,005793
KNO ₃ (Q) (cm)	0,063764	1	0,063764	3,76446	0,064190
CO ₂ : KNO ₃	0,000308	1	0,000308	0,01819	0,893840
Error	0,406522	24	0,016938		
Total Suma Cuadrados	2,552720	29			

(B)

Factor	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor p
CO ₂ (L) (cm)	0,506557	1	0,506557	101,8746	0,000000
CO ₂ (Q) (cm)	0,225539	1	0,225539	45,3585	0,000001
KNO ₃ (L) (cm)	0,026966	1	0,026966	5,4232	0,028618
KNO ₃ (Q) (cm)	0,047315	1	0,047315	9,5157	0,005070
CO ₂ : KNO ₃	0,002893	1	0,002893	0,5819	0,453018
Error	0,119337	24	0,004972		
Total Suma Cuadrados	0,877480	29			

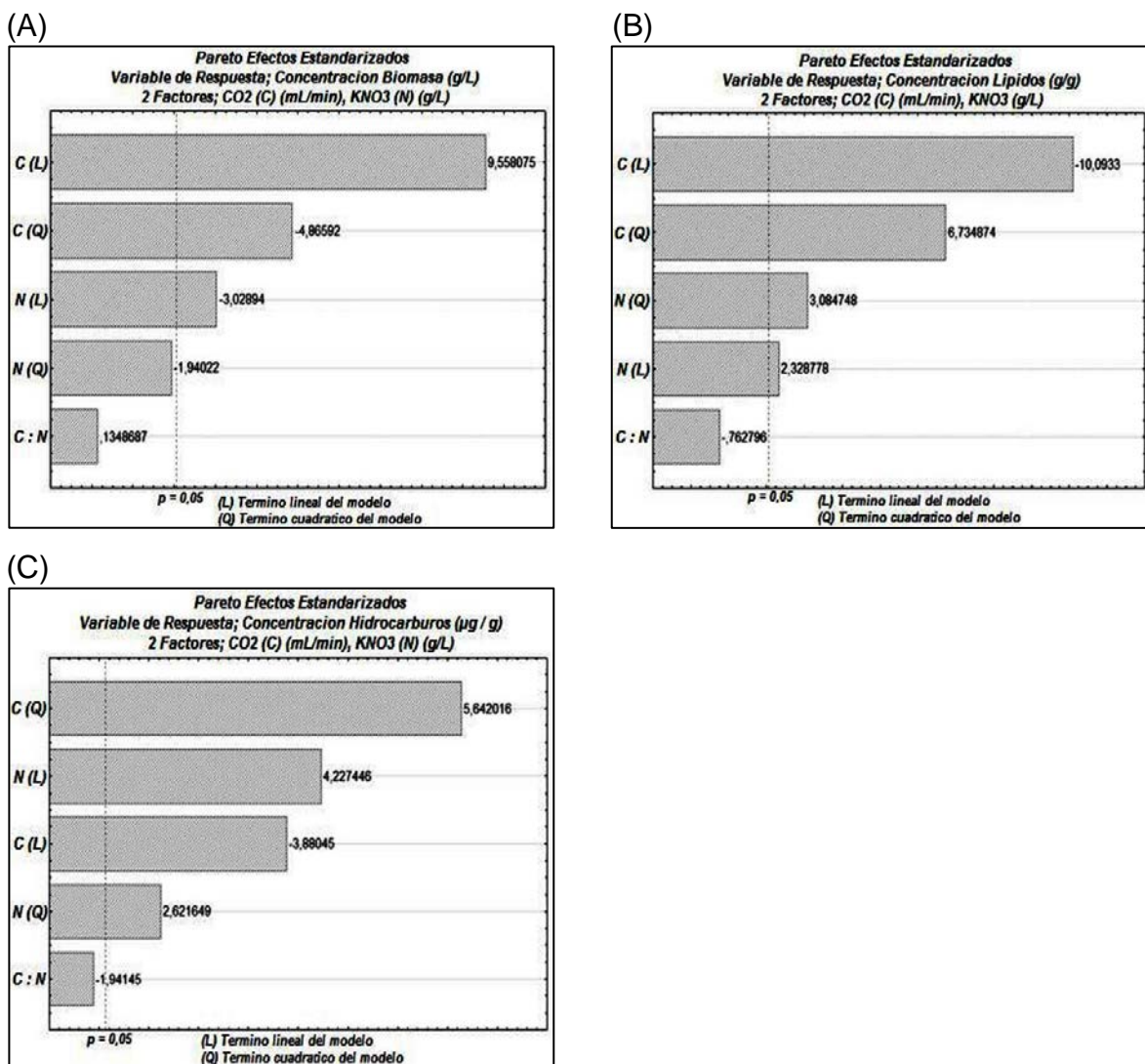
(C)

Factor	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor p
CO ₂ (L) (cm)	85113816	1	85113816	15,05786	0,000712
CO ₂ (Q) (cm)	179930780	1	179930780	31,83234	0,000008
KNO ₃ (L) (cm)	101016648	1	101016648	17,87130	0,000296
KNO ₃ (Q) (cm)	38849552	1	38849552	6,87304	0,014953
CO ₂ : KNO ₃	21305278	1	21305278	3,76921	0,064034
Error	135658834	24	5652451		

Total Suma Cuadrados	487930745	29			
----------------------	-----------	----	--	--	--

(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

Gráfica 9. Diagramas de Pareto parámetros de suministro.



(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

En la tabla 19-A se observa que ambos factores, tanto la concentración de CO₂ como la concentración de nitrógeno, influyeron significativamente sobre la producción de biomasa, ya que tanto sus término lineales como el termino cuadrático en el caso del CO₂ cumplieron con la significancia estadística de

$p < 0,05$. Igualmente, tanto la concentración de CO_2 como la concentración de nitrógeno, influyeron significativamente sobre la producción de lípidos según los resultados obtenidos en la tabla 19-B. Para la producción de hidrocarburos (tabla 19-C), ambos factores, tanto la concentración de CO_2 como la concentración de nitrógeno, influyeron significativamente en la producción de este metabolito.

En la gráfica 9-A se observa que el efecto de la concentración de CO_2 presentó el mayor grado de significancia sobre la producción de biomasa. Se observa además que los términos lineal y cuadrático para la concentración de CO_2 tuvieron diferentes signos, esto quiere decir que el modelo presenta ensilladura. La concentración de nitrógeno influyó en menor grado con efecto negativo, es decir, que al pasar de niveles bajos a niveles altos de nitrógeno, la producción de biomasa tendió a disminuir y viceversa. En la gráfica 9-B se observa que al igual que para la biomasa, el efecto de la concentración de CO_2 presentó el mayor grado de significancia sobre la producción de lípidos, y el modelo también presentó ensilladura. La concentración de nitrógeno influyó tanto su término lineal como cuadrático, aunque en menor grado que para el CO_2 . El signo positivo para los efectos del nitrógeno quiere decir que al pasar de niveles bajos a niveles altos de la variable, la producción de lípidos tendió a aumentar. Por otra parte, la producción de hidrocarburos (gráfica 9-C) tuvo un comportamiento similar a la producción de lípidos; la concentración de CO_2 presentó el mayor grado de significancia con un modelo que presentó ensilladura, y la concentración de nitrógeno tuvo un efecto positivo, es decir, al pasar de niveles bajos a niveles altos de la concentración de nitrógeno, la producción de hidrocarburos tendió a aumentar.

A partir de la tabla 20 se determinó la magnitud del efecto de los parámetros significativos sobre cada variable de respuesta (biomasa, lípidos e hidrocarburos).

Tabla 20. Efectos estimados parámetros de proceso.

(A)

Factor	Efecto	Error estándar	Valor-p	-95% Limite confiabilidad	+95% Limite confiabilidad
<i>Interacción Medias</i>	0,785948	0,051226	0,000000	0,680223	0,891674
<i>CO₂ (L) (cm)</i>	0,521481	0,054559	0,000000	0,408877	0,634086
<i>CO₂ (Q) (cm)</i>	-0,337304	0,069320	0,000058	-0,480373	-0,194235
<i>KNO₃ (L) (cm)</i>	-0,168258	0,055550	0,005793	-0,282908	-0,053608
<i>KNO₃ (Q) (cm)</i>	-0,124623	0,064231	0,064190	-0,257190	0,007944
<i>CO₂ : KNO₃</i>	0,009855	0,073067	0,893840	-0,140949	0,160658

(B)

Factor	Efecto	Error estándar	Valor-p	-95% Limite confiabilidad	+95% Limite confiabilidad
<i>Interacción Medias</i>	0,231307	0,027755	0,000000	0,174024	0,288590
<i>CO₂ (L) (cm)</i>	-0,298364	0,029561	0,000000	-0,359374	-0,237354
<i>CO₂ (Q) (cm)</i>	0,252948	0,037558	0,000001	0,175432	0,330464
<i>KNO₃ (L) (cm)</i>	0,070090	0,030097	0,028618	0,007972	0,132208
<i>KNO₃ (Q) (cm)</i>	0,107352	0,034801	0,005070	0,035527	0,179178
<i>CO₂ : KNO₃</i>	-0,030198	0,039588	0,453018	-0,111904	0,051509

(C)

Factor	Efecto	Error estándar	Valor-p	-95% Limite confiabilidad	+95% Limite confiabilidad
<i>Interacción Medias</i>	479,07	935,780	0,613368	-1452,29	2410,42
<i>CO₂ (L) (cm)</i>	-3867,52	996,668	0,000712	-5924,54	-1810,49
<i>CO₂ (Q) (cm)</i>	7144,52	1266,306	0,000008	4530,99	9758,04
<i>KNO₃ (L) (cm)</i>	4289,88	1014,768	0,000296	2195,50	6384,26
<i>KNO₃ (Q) (cm)</i>	3076,13	1173,355	0,014953	654,44	5497,81
<i>CO₂ : KNO₃</i>	-2591,38	1334,768	0,064034	-5346,21	163,45

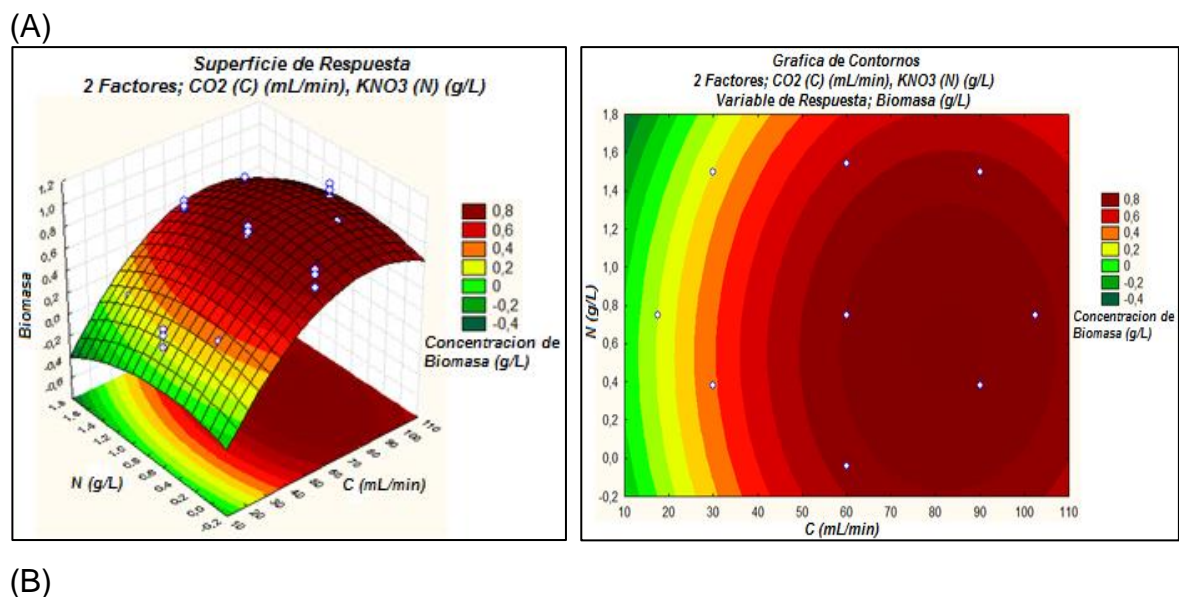
(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

En la tabla 20-A se observa que la concentración de CO₂ tuvo efectos positivos y negativos sobre la producción de biomasa debido a un efecto ensilladura. Sin embargo el efecto total de la variable concentración de CO₂ fue positivo, es decir, la producción de biomasa tendió a aumentar conforme aumenta el valor de la variable. La concentración de nitrógeno tuvo un efecto negativo sobre la producción de biomasa, así al pasar de un nivel bajo (0,38 g/L) a un nivel alto (1,5 g/L) la producción puede decrecer hasta 0,28 g/L. En cuanto a la producción de lípidos (tabla 20-B), la concentración de CO₂ también presentó efectos positivos y negativos debido a un efecto ensilladura, teniendo un efecto total negativo, es decir, la producción de lípidos tendió a aumentar conforme disminuye la concentración de CO₂. La concentración de nitrógeno tuvo un efecto positivo, es

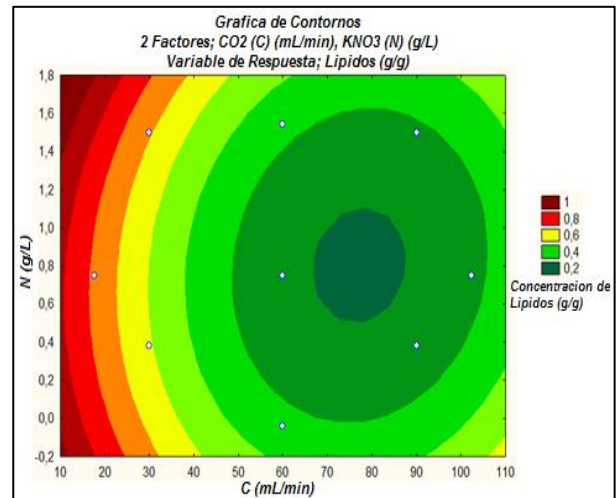
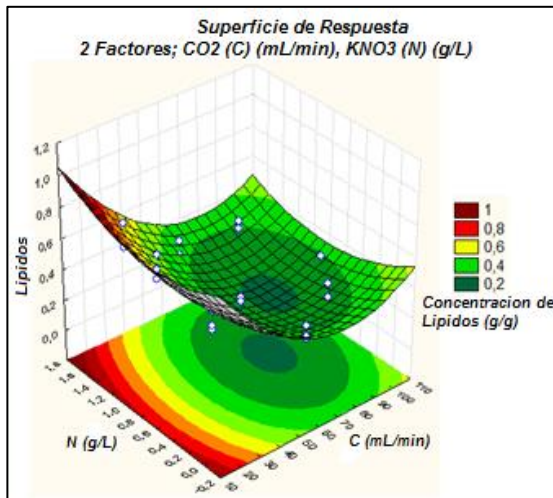
decir, a medida que aumentó su nivel, aumentó la producción de lípidos. Así pues al pasar de un nivel bajo (0,38 g/L) a un nivel alto (1,5 g/L) la producción puede crecer hasta en 0,17 g/L. Finalmente, en la tabla 20-C se aprecia que la concentración de CO₂ tuvo efectos positivos y negativos sobre la producción de hidrocarburos debido a un efecto ensilladura. Sin embargo el efecto total de la variable concentración de CO₂ fue positivo, es decir, la producción de hidrocarburos tendió a aumentar conforme aumenta el valor de la variable. La concentración de nitrógeno tuvo un efecto positivo, es decir, a medida que aumentó su nivel, aumentó la producción de hidrocarburos. Así pues al pasar de un nivel bajo (0,38 g/L) a un nivel alto (1,5 g/L) la producción puede crecer hasta en 6384,26 µg / g.

Con el fin de optimizar la producción de Biomasa, Lípidos e Hidrocarburos en el cultivo de *B. braunii* con suministro por pulsos, se construyó la gráfica 10 con las Superficies de Respuesta y Diagramas de Contorno de los experimentos corridos.

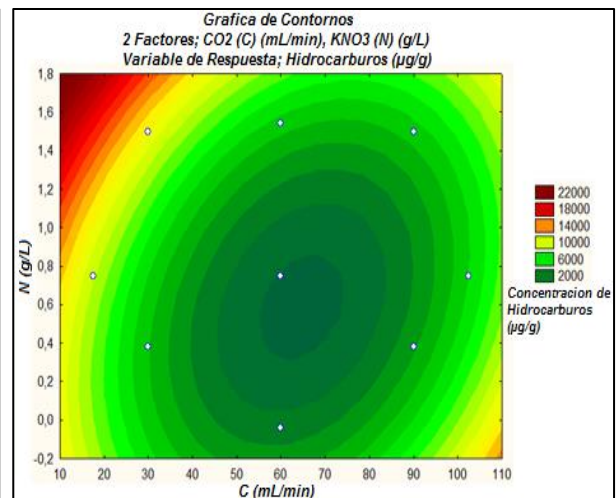
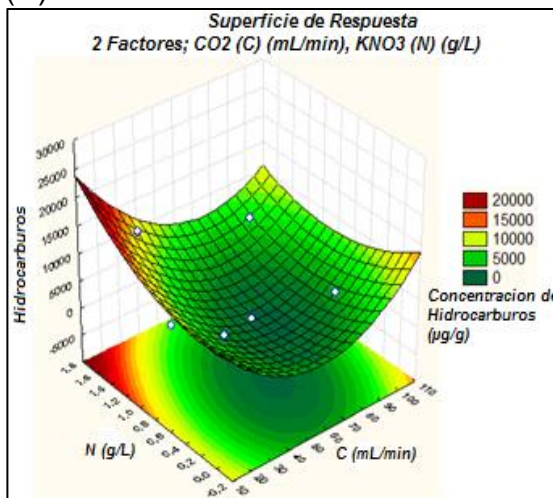
Gráfica 10. Superficie de respuesta parámetros de suministro.



(B)



(C)



(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

La grafica 10-A muestra un valor máximo predicho de producción de biomasa (0,912 g/L) que se obtuvo con un valor crítico de concentración de CO₂ de 82,9 mL/min y un valor crítico de concentración de nitrógeno de 0,57 g/L. Se puede observar también que el principal parámetro que provoco una variación en la producción de biomasa fue la concentración de CO₂, la cual a mayores niveles favoreció la productividad. Además se evidencia que aunque el efecto de la concentración de nitrógeno fue menor sobre la variación de la biomasa, a niveles más bajos se favoreció la producción. La grafica 10-B muestra un valor mínimo predicho de producción de lípidos (0,184 g/g) que se obtuvo con un valor crítico de

concentración de CO₂ de 77,2 mL/min y un valor crítico de concentración de nitrógeno de 0,80 g/L. Se observa entonces que el principal parámetro de variación fue la concentración de CO₂, la cual a menores niveles favorece la producción de lípidos. El efecto de la concentración de nitrógeno, aunque presentó un punto mínimo en un nivel medio y fue menos significativo que el CO₂, a medida que aumentó su nivel se favoreció la producción de lípidos. La grafica 10-C muestra un comportamiento bastante similar el expuesto por los Lípidos; se evidencio un mínimo predicho de producción de hidrocarburos para valores medios de los parámetros (CO₂; 64,6 mL/min y nitrógeno; 0,58 g/L). Estos resultados muestran que tanto la concentración de CO₂ como la concentración de nitrógeno influyeron casi con la misma significancia sobre la respuesta. Respecto al CO₂, altos y bajos niveles favorecieron una alta producción de hidrocarburos. Por su parte respecto al nitrógeno, aunque presentó un punto mínimo en un nivel medio, a medida que aumentó el nivel del factor se favoreció la producción de hidrocarburos.

4.3.2 Resultados de Productividad. En la tabla 21 se registra la producción de los diferentes metabolitos (Biomasa, Lípidos e Hidrocarburos) en los días 5, 10 y 15 de la experimentación usando suministro de CO₂ por pulsos.

Tabla 21. Resultados producción de metabolitos en el tiempo etapa 3.

(A)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Biomasa (g/L)		
			Día 5	Día 10	Día 15
1	30	0,38	0,58	0,47	0,21
2	30	1,5	0,18	0,42	0,11
3	90	0,38	0,65	0,58	0,80
4	90	1,5	0,60	0,50	0,68
5 (C)	60	0,75	0,67	0,73	0,84
6	17	0,75	0,51	0,26	0,25
7	102	0,75	0,50	0,58	0,90
8	60	0	0,83	0,67	0,83

9	60	1,54	0,80	0,73	0,73
10 (C)	60	0,75	0,58	0,69	0,79
Blanco	0	0	0,06	0,12	0,15

(B)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Lípidos (g/g)		
			Día 5	Día 10	Día 15
1	30	0,38	0,28	0,31	0,45
2	30	1,5	0,35	0,51	0,60
3	90	0,38	0,16	0,69	0,26
4	90	1,5	0,23	0,46	0,31
5 (C)	60	0,75	0,17	0,67	0,21
6	17	0,75	0,34	0,65	0,73
7	102	0,75	0,55	0,76	0,24
8	60	0	0,34	0,67	0,35
9	60	1,54	0,13	0,45	0,31
10 (C)	60	0,75	0,22	0,70	0,26
Blanco	0	0	0,05	0,14	0,10

(C)

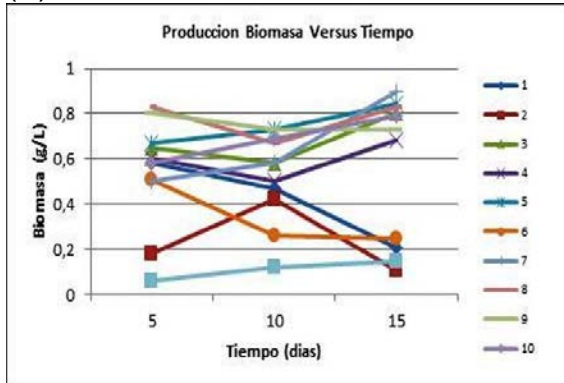
Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Hidrocarburos (µg / g)		
			Día 5	Día 10	Día 15
1	30	0,38	789,3	4221,8	6387,8
2	30	1,5	2181,9	4167,1	13683,7
3	90	0,38	4499,9	4264,9	3857,4
4	90	1,5	4977,7	5233,4	6606,4
5 (C)	60	0,75	1408,4	2938,7	409,1
6	17	0,75	973,5	6514,2	6479,5
7	102	0,75	7165,1	4407,8	3577,2
8	60	0	1195,1	3009,9	417,7
9	60	1,54	974,4	1492,0	534,6
10 (C)	60	0,75	1450,3	2500,8	415,5
Blanco	0	0	360,4	110,5	1090,5

(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

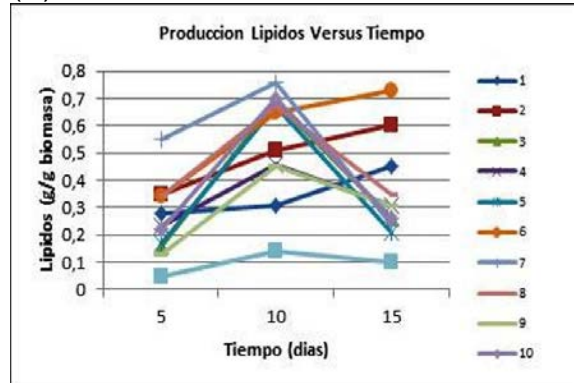
A partir de los resultados anteriores, se construyó la gráfica 11 sobre el avance de la producción en el tiempo y la tabla 22 con los datos de productividad para cada metabolito de interés.

Gráfica 11. Comportamiento de la producción en el tiempo parámetros de suministro.

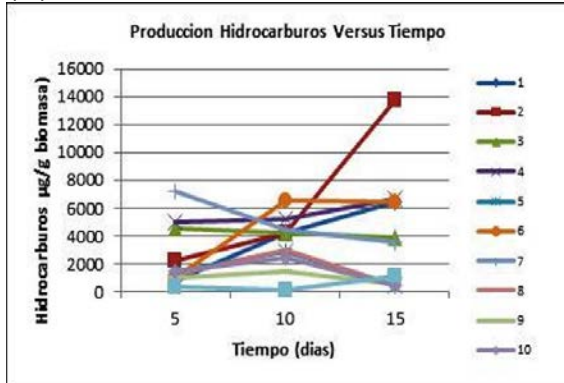
(A)



(B)



(C)



(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

Tabla 22. Resultados de productividad etapa 3.

(A)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Productividad (g/L.día)	
			Día 10	Día 15
1	30	0,38	-0,022	-0,052
2	30	1,5	0,048	-0,062
3	90	0,38	-0,014	0,044
4	90	1,5	-0,02	0,036
5 (C)	60	0,75	0,012	0,022
6	17	0,75	-0,05	-0,002
7	102	0,75	0,016	0,064
8	60	0	-0,032	0,032
9	60	1,54	-0,014	0
10 (C)	60	0,75	0,022	0,02
Blanco	0	0	0,012	0,006

(B)

Tratamiento	CO ₂	KNO ₃	Productividad (g/g.día)
-------------	-----------------	------------------	-------------------------

			Día 10	Día 15
1	30	0,38	0,006	0,028
2	30	1,5	0,032	0,018
3	90	0,38	0,106	-0,086
4	90	1,5	0,046	-0,03
5 (C)	60	0,75	0,1	-0,092
6	17	0,75	0,062	0,016
7	102	0,75	0,042	-0,104
8	60	0	0,066	-0,064
9	60	1,54	0,064	-0,028
10 (C)	60	0,75	0,096	-0,088
Blanco	0	0	0,018	-0,008

(C)

Tratamiento	CO₂	KNO₃	Productividad (µg/g.día)	
			Día 10	Día 15
1	30	0,38	686,5	433,2
2	30	1,5	397,04	1903,32
3	90	0,38	-47	-81,5
4	90	1,5	51,14	274,6
5 (C)	60	0,75	306,06	-505,92
6	17	0,75	1108,14	-6,94
7	102	0,75	-551,46	-166,12
8	60	0	362,96	-518,44
9	60	1,54	103,52	-191,48
10 (C)	60	0,75	210,1	-417,06
Blanco	0	0	-49,98	196

(A) Biomasa. (B) Lípidos. (C) Hidrocarburos.

En los resultados anteriores se ve que todos los tratamientos presentaron valores finales superiores al blanco, lo que significa que el suministro de ambos nutrientes, en mayor o menor medida, tuvo efectos sobre la producción de biomasa y metabolitos.

En la gráfica 11-A se observan las mejores producciones de biomasa usando concentraciones medias a altas de CO₂ (≥ 60 mL/min) a los 15 días de suministro (tratamiento 3,5,7 y 8) y las producciones más bajas con las concentraciones más bajas de CO₂ (tratamientos 1,2 y 6), haciendo del CO₂ un parámetro clave. El cambio en la concentración de nitrógeno no pareció relevante sobre la variación de la productividad de biomasa, sin embargo los mejores resultados se consiguieron con concentraciones medias a bajas. De acuerdo con la tabla 21-A se alcanzaron valores máximos de producción de biomasa en el día 15 de 0,9

g/L.día (tratamiento 7). La mayor productividad hasta el día 10 fue de 0,022 g/L.día y para el día 15 fue de 0,064 g/L.día. En la gráfica 11-B se observa que los tratamientos con menores concentraciones de CO₂ (tratamientos 1,2 y 6) tuvieron un crecimiento sostenido respecto a la producción de lípidos, y las mayores productividades a los 15 días de suministro. Por su parte los tratamientos con mayores concentraciones de CO₂ (tratamientos 3 y 7) tuvieron un crecimiento acelerado respecto a la productividad hasta el día 10, logrando producciones máximas. Sin embargo, del día 10 en adelante presentaron una caída bastante notoria en la producción de lípidos, lo cual se pudo deber a que los microorganismos ya habían saturado su necesidad biológica de una fuente de carbono, y las cantidades requeridas eran menores respecto a la etapa de crecimiento lo que pudo inhibir el cultivo por las altas concentraciones de CO₂. La concentración de nitrógeno arrojó las mejores producciones de lípidos con valores medios a bajos, sin embargo la concentración de carbono fue mucho más relevante. De acuerdo con la tabla 21-B, se alcanzó el valor máximo de producción de lípidos para el día 10 de 0,76 g/g (tratamiento 7). La mayor productividad hasta el día 10 fue de 0,106 g/L.día y para el día 15 fue de 0,028 g/L.día. La gráfica 11-C muestra una producción máxima de hidrocarburos por encima de todos los tratamientos para el día 15, que implicó baja concentración de CO₂ y alta concentración de nitrógeno. Se puede ver que concentraciones bajas y altas de CO₂ y medias de nitrógeno (tratamientos 4 y 6) también lograron productividades altas. Esto evidencia que el nitrógeno fue una variable fundamental en la producción de hidrocarburos. De la tabla 21-C se observa el valor máximo de producción de hidrocarburos para el día 15 de 13683,7 µg/g (tratamiento 2). La mejor productividad hasta el día 10 fue de 1108,14 µg/g.día y para el día 15 fue de 1903,32 µg/g.día.

5. ANALISIS DE RESULTADOS

En estudios previos, Eriksen, Poulsen y Iversen [32] inyectaron CO₂ puro a medios de cultivo de microalgas utilizando difusores de membrana y difusores de orificios, y observaron que la proporción del CO₂ agregado que se disuelve en el cultivo aumenta del 11% al 55% al usar membrana en vez de orificios, concluyendo que el pequeño tamaño de la burbuja del difusor de membrana (<1mm) aumenta el coeficiente de transferencia de masa de CO₂. En el presente estudio se respaldan dichos resultados, ya que se encontraron aumentos del 18% al 45,9% en la proporción de CO₂ disuelto al usar una piedra difusora sobre un difusor de burbujeo, lo cual puede atribuirse a la influencia opuesta del tamaño de burbuja en el coeficiente de transferencia de masa K_L y el área interfacial específica A_L [23]. Más aun, se obtuvieron diluciones de CO₂ de hasta 57,5% usando geometrías del fotobiorreactor con diámetro de 8 cm y altura de 45 cm.

Con base en los resultados obtenidos en el análisis estadístico, se puede afirmar que dentro de los parámetros de diseño referentes a la geometría del reactor, la altura es influyente sin importar el tipo de difusor. Esto se debe a que esta variable aumenta el tiempo de residencia del gas en el medio acuoso, contribuyendo explícitamente a la dilución. Estudios previos [26] han demostrado que el aumento de la altura de la columna de agua por encima de 30 cm reduciría la pérdida de CO₂, es más, se hallaron transferencias de CO₂ de hasta el 100% cuando la altura de la columna era mayor a 50 cm.

Se puede señalar entonces que las condiciones óptimas para lograr una alta dilución de CO₂ en el medio de cultivo son tamaños de burbuja pequeños (Piedra difusora), alturas de columna de líquido importantes (>30 cm) que aumenten el tiempo de residencia del gas y diámetros medios (≤ 8 cm) que aporten a una baja dispersión de las burbujas en el reactor para aumentar la transferencia.

El crecimiento lento de *B. braunii* ha sido el paso limitante para su explotación exitosa como fuente de hidrocarburos [46]. Ranga Rao, Sarada y Ravishankar [78] encontraron que las cepas de *B. braunii* mostraron incrementos en la producción de biomasa usando atmósferas enriquecidas con CO₂ en comparación con el cultivo de control sin CO₂, lo que muestra la eficiencia metabólica a través del crecimiento fotoautotrófico. Por su parte, Wolf, Nanomura y Bassham [100] hallaron que cultivos de *B. braunii* alimentados con aire enriquecido con 0,3% de CO₂, tienen un tiempo de duplicación de masa mucho más corto (40 horas) en comparación con 6 días para los cultivos suministrados con aire del ambiente. En cuanto al efecto del nitrógeno, Ruangsomboon [81] encontró que la biomasa de la cepa KMITL 2 de *B. braunii* no fue significativamente afectada por la concentración de nitrógeno después de 30 días de cultivo.

El presente estudio respalda y valida estas observaciones mediante un diseño experimental donde se encontró que el tipo de suministro y la concentración de CO₂ tienen una alta significancia estadística sobre la producción de biomasa de *B. braunii*, mientras la concentración de nitrógeno no presenta influencia importante. Esto se puede deber al elevado contenido de carbono (hasta 50% en peso) que se tiene registrado de esta especie de microalga [63], convirtiendo al CO₂ en una fuente de carbono esencial para el crecimiento del cultivo.

Se encontraron las mejores productividades de biomasa suministrando CO₂ de manera continua al cultivo. Los tratamientos a los cuales se les suministro la concentración más alta de CO₂ de 0,06 v/vm (90 mLCO₂/min) exhibieron la producción más alta de biomasa de 1,78 g/L para el día 15, y productividades de hasta 0,186 g/L.día. En estudios previos, Ge, Liu y Tian [37] obtuvieron resultados similares en cultivos de *B. braunii* encontrando producciones máximas de biomasa de 2,31 g/L para el día 25 de cultivo y de 1,18 g/L para el día 15, usando la concentración máxima de CO₂ estudiada de 0,04 v/vm. Los resultados obtenidos permiten afirmar que el aumento de la concentración de CO₂ que se suministra al

cultivo tiene como resultado un aumento significativo en la producción final de biomasa del cultivo. Más aun, se encontró un aumento en la producción de biomasa del 33,7% respecto a lo reportado por Ge et al [37] al aumentar la concentración de CO₂ en 33,3%, obteniendo altas producciones en tiempos más cortos. Además no se presentaron largos periodos de adaptación del cultivo a concentraciones medias de CO₂ como lo reportaron Yoo, Jun y Lee [104], lo cual se puede deber a la diferencia que existe entre las diferentes cepas de microalgas, revelando que la cepa de *B. braunii* utilizada en este estudio puede tolerar y adaptarse a altas concentraciones de CO₂ [56].

Se puede concluir entonces, con base a los resultados obtenidos, que las mejores condiciones para lograr una alta producción de biomasa son altas concentraciones de CO₂ > 0,06 v/vm que pongan a disposición una fuente de carbono suficiente para el crecimiento del cultivo, teniendo en cuenta que la cepa estudiada presento buena tolerancia a altas concentraciones de CO₂.

Para la producción de lípidos, se encontró que tanto la concentración de CO₂ como la concentración de nitrógeno suministradas al cultivo tienen un efecto sobre la producción, siendo el CO₂ el factor más significativo estadísticamente. Estudios previos han reportado que aunque una deficiencia de nitrógeno favorece la acumulación de lípidos al limitar la síntesis de proteínas [10] [24], se requiere nitrógeno para el crecimiento. Más aun, Ge et al [37] concluyeron que el contenido relativamente bajo de lípidos en sus cultivos de *B. braunii* se puede deber a las altas concentraciones de nitrógeno utilizadas comparado con otros trabajos. En el presente estudio se encontraron las mejores producciones de lípidos usando concentraciones bajas a nulas de KNO₃, con contenidos de hasta el 84% p/p (0,84 gramos de lípidos / gramos de biomasa) para suministros nulos de nitrógeno, lo cual respalda los comportamientos previos encontrados en otras investigaciones.

Se ha reportado que el contenido total de lípidos de *B. braunii* varia en un rango de 26% a 86% del peso seco [28]. Yoo et al [104] compararon la producción de lípidos en 3 especies de microalgas (*Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.*) encontrando que el contenido total de lípidos de *B. braunii* era 2-4 veces mayor que el de las otras dos cepas, alcanzando un contenido máximo de lípidos totales de 25.79% p/p usando una concentración de CO₂ de 0,03 v/vm. Por su parte, Ranga Rao et al [78] expusieron que el contenido total de lípidos de la cepa de *B. braunii* cultivada en diferentes niveles de CO₂ estaba en el intervalo de 28-30% p/p, mientras que en el control sin suministro de CO₂ fue 22% p/p. Ge et al [37] reportaron contenidos de lípidos de 10,41%, 11,21%, 12,44% y 12,71% (p/p) con 0,005, 0,01, 0,02 y 0,04 (v/vm) de aireación CO₂, respectivamente. Estos estudios previos respaldan lo encontrado en el análisis estadístico del presente trabajo, donde se validó la alta significancia estadística que tiene el tipo de suministro y la concentración de CO₂ sobre la producción de lípidos en cultivos de *B. braunii*.

Se encontraron productividades máximas de lípidos para el día 10 de 0,106 g/g.día, logrando producciones de hasta 76% p/p, esto usando concentraciones altas de CO₂ ($\geq 0,06$ v/vm) y suministrándolo de manera discontinua (por pulsos). Para el día 15, la productividad máxima de lípidos fue de 0,098 g/g.día y la producción más alta fue de 84% p/p, esto usando concentraciones medias de CO₂ (0,04 v/vm) y suministrándolo de manera continua al cultivo. Estos resultados son bastante prometedores ya que se obtuvieron producciones mucho más altas que las registradas en la literatura. Teniendo en cuenta que el biodiesel consiste en gran parte de los ésteres metílicos de ácidos grasos, que son producidos por la transesterificación de los lípidos de origen biológico [93], la cepa estudiada a las condiciones de suministro de CO₂ encontradas se perfila como una fuente prometedora de materia prima para la producción de biodiesel.

En cuanto a la producción de hidrocarburos, se encontró que la concentración de CO₂ y su método de suministro influyen significativamente sobre la productividad. La presencia de nitrógeno también tiene significancia estadística sobre la producción, pero el CO₂ es el factor principal que determina este efecto. Estudios previos avalan estos resultados; Casadevall et al [20] reportaron que una concentración inicial de NO₃⁻ > 0,2 mg/L favorece la producción de hidrocarburos. Por su parte, Metzger et al [65] reportaron incrementos en el contenido de hidrocarburos del 5% en condiciones no aireados al 20-61% cuando se suministra aire mezclado con CO₂ al 1%, dependiendo del origen de la cepa.

En el presente estudio se encontraron las productividades más altas de hidrocarburos usando las concentraciones más bajas de CO₂. Producciones máximas de 46531,1 µg/g (4,6% p/p) para el día 15 de cultivo se obtuvieron usando la concentración más baja de CO₂ estudiada (0,02 v/vm) con un suministro continuo. Para el día 10, se encontraron las máximas productividades (1108,14 µg/g.día) usando concentraciones bajas de CO₂ con un suministro discontinuo (pulsos). Estos resultados contrastan con datos obtenidos anteriormente. Por ejemplo Wolf et al [100] reportaron que su cepa de *B. braunii* acumulo entre el 24-29% de la biomasa seca en forma de hidrocarburos botriococenos. Okada, Murakami, y Yamaguchi [71] por su parte estimaron para su cepa de *B. braunii* producciones de hidrocarburos en el rango de 10-38% del peso de la biomasa seca. Además, diversos estudios [65] [78] [37] informaron que el contenido de hidrocarburos de *B. braunii* aumentó con el aumento de la concentración de CO₂. Estas variaciones en el contenido y perfil de hidrocarburos a diferentes concentraciones de CO₂ entre el presente estudio y lo reportado en la literatura, podrían atribuirse a las diferencias entre las razas de las cepas estudiadas, ya que dependiendo de las características biológicas de la especie producen hidrocarburos por diferentes vías metabólicas [78].

6. CONCLUSIONES

La altura de la columna del líquido y del tipo de difusor influyen significativamente sobre la dilución de CO₂ en un medio de cultivo específico para *B. braunii*, logrando mayores diluciones con alturas >35 cm pequeños tamaños de burbuja.

Quedo demostrado que el aumento en la concentración de CO₂ tiene un efecto positivo sobre la producción de biomasa en el cultivo de *B. braunii*, registrando las mayores productividades con las mayores concentraciones suministradas.

Se encontró que la producción de Lípidos en cultivos de *B. braunii* se ve favorecida con concentraciones de CO₂ entre 0,04 – 0,06 v/vm y bajas o nulas de nitrógeno, combinando además regímenes de suministro continuo y por pulsos.

Se evidenció que la producción de Hidrocarburos en cultivos de *B. braunii* se ve favorecida con concentraciones de CO₂ de 0,02 v/vm, aunque las productividades finales fueron muy bajas comparadas con estudios previos.

Quedo comprobado que la variación en el método de suministro (Pulsos y Continuo) afecta directamente la magnitud y el efecto que tiene el CO₂ sobre la producción de Biomasa, Lípidos e Hidrocarburos en cultivos de *B. braunii*.

Se validó el potencial de la cepa de *B. braunii* colombiana para la producción de biodiesel gracias a sus altas tasas de síntesis de lípidos.

7. RECOMENDACIONES

Realizar corridas experimentales más largas (> 15 días) para distinguir mejor el comportamiento de la especie a través del tiempo, teniendo en cuenta que esta es una especie de crecimiento lento.

Realizar una caracterización de los lípidos sintetizados por esta cepa para cuantificar su potencial para fabricar biodiesel.

Escalar las condiciones de suministro de CO₂ propuestas en Fotobiorreactores tanto abiertos como cerrados a escala piloto para cultivos de la cepa colombiana de *Botryococcus braunii*.

Ejecutar estudios comparativos entre las mejores condiciones de suministro de CO₂ encontradas en el presente estudio, y comparar los resultados versus el uso de otras fuentes de carbono orgánicas para cultivos de *Botryococcus braunii*.

8. BIBLIOGRAFIA

[1] ACIEN FERNANDEZ, Francisco, *et al.* Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. En: Chemical Engineering Science. 2001, no. 56, p. 2721-2732.

[2] ADMINISTRATION, E. I. Annual Energy Review. U.S. Department of Energy. 2008.

[3] ADMINISTRATION, U. E. International Energy Outlook 2013. Washington: Independent Statistics & Analysis. 2013.

[4] AN, Jin-Young, *et al.* Hydrocarbon Production from Secondarily Treated Piggery Wastewater by the Green Alga *Botryococcus braunii*. En: Journal of Applied Phycology. 2003, no. 15, p. 185-191

[5] ANAMAET, Ida G.; BEKKER, Martijn y HELLINGWERF, Klaas J. Algal Photosynthesis as the Primary Driver for a Sustainable. En: Marine Biotechnology. Noviembre 2010, no. 12, p. 619-629.

[6] ASHOKKUMAR, Veeramuthu y RENGASAMY, Ramasamy. Mass culture of *Botryococcus braunii* Kutz. under open raceway pond for biofuel production. En: Bioresource Technology. Noviembre 2011, no. 104, p. 394-399.

[7] BAILLIEZ, Christine, *et al.* Photosynthesis, growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized by entrapment and adsorption in polyurethane foams. En: Applied Microbiology and Biotechnology. Septiembre 1988, no. 29, p. 141-147.

[8] BANERJEE, Anirban, *et al.* *Botryococcus braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. En: Critical Reviews in Biotechnology. 2002, no. 22, p. 245-279.

[9] BECKER, E. Wolfgang. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Great Britain: Cambridge University Press. 1994. 204 p. ISBN 978052106113.

[10] BEN-AMOTZ, Ami; TORBENE, Thomas G. y THOMAS, William H. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. En: Journal of Phycology. Marzo 1985, no. 21, p. 72-81.

[11] BENEMAN, John y HUGHES, Edward. Biological fossil CO2 mitigation. En: Energy Conversion and Management. 1997, no. 38, p. 467-473.

[12] BENEMAN, John, *et al.* The controlled eutrophication process: using microalgae for CO2 utilization and agricultural fertilizer recycling. En: 6th international conference- Greenhouse gas control technologies. Oxford: Pergamon. 2003, p. 1433-1438.

[13] BILANOVIC, Dragoljub, *et al.* Freshwater and marine microalgae sequestering of CO2 at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis. En: Energy Conversion and Management. Febrero 2009, no. 50, p. 262-267.

[14] BLIGH, e.g. y DYER w.j. A rapid method of total lipid extraction and purification. En: Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. Agosto 1959, no 37, p. 911-917.

[15] BOROWITZKA, Michael A. Algal biotechnology products and processes—matching science and economics. En: Journal of Applied Phycology. Septiembre 1992, no. 4, p. 267-279.

[16] BOROWITZKA, Michael A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. En: Journal of Biotechnology. 1999, no. 70, p. 313-321.

[17] BOROWITZKA, Michael A. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. En: Journal of Applied Phycology. Octubre 1997, no. 9, p. 393-401.

[18] BRENCKMAN, Frantz (1989). Effect of nitrogen nutrition on growth and hydrocarbon production of the unicellular microalga *Botryococcus braunii*. En: Biomass. 1989, no. 10, p. 717.

- [19] CASADEVALL, Eliette, *et al.* Hydrocarbon production by unicellular microalga *Botryococcus braunii*. En: *Biosciences*. 1983, no. 2, p. 129-133.
- [20] CASADEVALL, Eriquer, *et al.* Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition. En: *Biotechnology and Bioengineering*. Marzo 1985, no. 27, p. 286-295.
- [21] CHENG, Lihua; ZHANG, Lin y CHEN, Huanlin. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. En: *Separation and Purification Technology*. Julio 2006, no. 50, p. 324-329.
- [22] CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. En: *Biotechnology Advances*. Junio 2007, no. 25, p. 294-306.
- [23] CONTRERAS, Antonio, *et al.* Interaction Between CO₂-Mass Transfer, Light Availability, and Hydrodynamic Stress in the Growth of *Phaeodactylum tricornutum* in a Concentric Tube Airlift Photobioreactor. En: *Biotechnology and Bioengineering*. Noviembre 1998, no. 60, p. 317-325.
- [24] CONVERTI, Attilio, *et al.* Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. En: *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. Junio 2009, no. 48, p. 1146–1151.
- [25] COSTA, Rejane y MEDRI, Waldir. High-rate pond for treatment of piggery wastes. En: *Water Science Technology*. 2000, no. 42, p. 357-362.
- [26] CSOGÖR, Zsuzsa, *et al.* Light distribution in a novel photobioreactor – modelling for optimization. En: *Journal of Applied Phycology*. Agosto 2001, no. 13, p. 325-333.
- [27] DAYANANDA, Chandrappa, *et al.* Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharide in various media. En: *Biomass Bioenergy*. Enero 2007, no. 31, p. 87–93.

[28] DAYANANDA, Chandrappa, *et al.* Influence of Nitrogen Sources on Growth, Hydrocarbon and Fatty Acid Production by *Botryococcus braunii*. En: Asian Journal of Plant Sciences. 2006, no. 5, p. 799-804.

[29] DE MORAIS, Michele Greque y VIEIRA COSTA, Jorge Alberto. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. En: Journal of Biotechnology. Mayo 2007, no. 129, p. 439-445.

[30] DEMIRBAS, Francisco. Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review. En: Applied Energy. 2009, no 25, p. 151-161.

[31] EPA. Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990–2009. Environmental Protection Agency. 2011.

[32] ERIKSEN, Niels; POULSEN, Bjarne R. y IVERSEN, J. Lonsmann. Dual sparging laboratory-scale photobioreactor for continuous production of microalgae. En: Journal of Applied Phycology. Agosto 1998, no. 10, p. 377-382.

[33] EROGLU, Era y MELIS, Anastasios. Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae *Botryococcus braunii* var. *Showa*. En: Bioresource Technology. Abril 2010, no. 101, p. 2359-2366.

[34] FALKOWSKI, Paul y RAVEN, John. Aquatic photosynthesis. London: Princeton University Press. 1997.

[35] FUNDACIÓN WIKIMEDIA, I. (s.f.). *www.wikipedia.com*. Recuperado el 15 de 06 de 2014, de http://es.wikipedia.org/wiki/Di%C3%B3xido_de_carbono.

[36] GARCIA ALBA, Laura, *et al.* Hydrothermal Treatment (HTT) of Microalgae: Evaluation of the Process As Conversion Method in an Algae Biorefinery Concept. En: *Energy & Fuels*. Noviembre 2011, no. 26, p. 642-657.

[37] GE, Yaming; LIU, Junzhi y TIAN, Guangming. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* under high CO₂ concentration in photobioreactor. En: *Bioresource Technology*. Enero 2011, no. 102, p. 130-134.

[38] GRICE, Kant, *et al.* A remarkable paradox: Sulfurised fresh water algal (*Botryococcus braunii*) lipids in an ancient hyper saline auxinic ecosystem. En: Organic Geochemistry. 1998, no. 28, p. 195-216.

[39] HAI-FENG, Jin; BYUNG-RAN, Lin y KISAY, Lee. Influence of Nitrate Feeding on Carbon Dioxide Fixation by Microalgae. En: *Journal of Environmental Science and Health*. Febrero 2007, no. 41, p. 2813-2824.

[40] HANAGATA, Ni, *et al.* (1992). Tolerance of microalgae to high CO₂ and high-temperature. En: *Phytochemistry*. 1992, p. 3345-3348.

[41] HILL, Gordon A. (2006). Measurement of Overall Volumetric Mass Transfer Coefficients for Carbon Dioxide in a Well-Mixed Reactor Using a pH Probe. En: *Industrial & Engineering Chemistry*. Junio 2006, no. 45, p. 5796-5800.

[42] HILLEN, Lance W, *et al.* Hydrocracking of the oils of *Botryococcus braunii* to transport fuels. En: *Biotechnology and Bioengineering*. Enero 1982, no. 24, p. 193-205.

[43] HUBER, George W; IBORRA, Sara y CORMA, Avelino. Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering. En: *Chemical Reviews*. Junio 2006, no 106, p. 4044 - 4098.

[44] IANCU, Petrica, *et al.* (2010). Modelling and Simulation of CO₂ Absorption in Alkaline Buffer Solutions in gPROMS. En: *Chemical Engineering Transactions*. 2010, no. 21, p. 679-684.

[45] IPCC, I. p. Fourth assessment report – climate change. 2007.

[46] IWAMOTO, Hiroshi. (1986). Production of hydrocarbons by microalgae. En: *Biological Sciences*. 1986, no. 44, p. 1160-1167.

[47] KADAM, Kiran L. Power plant flue gas as a source of CO₂ for microalgae cultivation: economic impact of different process options. En: *Energy Conversion and Management*. 1997, no 38, p. 505-510.

[48] KALACHEVA, Galina S.; ZHILA, Natalia O. y VOLOVA, Tatiana G. Lipids of the Green Alga *Botryococcus* Cultured in a Batch Mode. En: Microbiology. Mayo 2001, no. 70, p. 256–262.

[49] KITA, K. (2010). Thermal pre-treatment of wet microalgae harvest forefficient hydrocarbon recovery. En: Applied Energy. Julio 2010, no. 87, p. 2420-2423.

[50] KOJIMA, Eiichi, y ZHANG, Kai. Growth and hydrocarbon production by microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactor. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Junio 1999, no. 87, p. 811-815.

[51] KONDILI, Emilia y KALDELLIS, John K. Biofuel implementation in East Europe: current status and future prospects. En: Renewable Sustainable Energy. Diciembre 2007, no. 11, p. 2137-2151.

[52] LAL, Rup. (2008). Sequestration of Atmospheric CO₂ in Global Carbon Pool. En: Energy & Environmental Science. Julio 2008, no. 1, p. 86-100.

[53] LARGEAU, Claude; CASADEVALL, Eliette y BERKALOFF, Claire. (1980). The Biosynthesis of long-chain hydrocarbons in the green alga *Botryococcus Braunii*. En: Phytochemistry. 1980, no. 19, p. 1081-1085.

[54] LARGEAU, Claude, *et al.* (1980). Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. En: Phytochemistry. 1980, no. 19, p. 1043-1051.

[55] LEE, Choul-Gyun. Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors. En: Biotechnology and Bioprocess Engineering. Abril 1999, no. 4, p. 78-81.

[56] LEE, Jin-Suk. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1. En: Bioresource Technology. Marzo 2002, no. 82, p. 1–4.

[57] LEE, R. Phycology. New York: Cambridge University Press. 1980.

[58] LI, Yanqui, *et al.* Biofuels from microalgae. En: Biotechnology Progress. Agosto 2008, no. 24, p. 815-820.

[59] LI, Yanqui, *et al.* Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*. En: Applied Microbiology and Biotechnology. Diciembre 2008, no. 81, p. 629-636.

[60] LUPI, Filipa M., *et al.* Temperature profiles of cellular growth and exopolysaccharide synthesis by *Botryococcus braunii* Kütz. UC 58. En: Journal of Applied Phycology. Marzo 1991, no. 3, p. 35–42.

[61] MATA, Teresa M.; MARTINS, Antonio A. y CAETANO, Nidia S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. Enero 2010, no. 14, p. 217-232.

[62] MAXWELL, Eugene; FOLGER, Gray y HOGG, Susan. Resource Evaluation and Site Selection for Microalgae Production Systems. Golden, Colorado: SERI/TR-215-2484. 1985. 83 p.

[63] MAZZUCA, Sobczuk, *et al.* Carbon Dioxide Uptake Efficiency by Outdoor Microalgal Cultures in Tubular Airlift Photobioreactors. En: Biotechnology and Bioengineering. Febrero 2000, no. 67, p. 465-475.

[64] McGINNIS, Karen M.; DEMPSTER, Thomas A. y SOMMERFELD, Mark R. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. En: Journal of Applied Phycology Febrero 1997, no. 9, p. 9–24.

[65] METZGER, Pierre, *et al.* (1985). Alkadiene and botryococcene producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. En: Phytochemistry. 1985, no. 24, p. 2305- 2312.

[66] METZGER, Pierre, VILLARREAL-ROSALES, Eduardo y CASADEVALL, Eliette. (1991). Methyl-branched Fatty Aldehydes and Fatty Acids in *Botryococcus braunii*. En: Phytochemistry. 1991, no. 30, p. 185–191.

- [67] METZGER, Pierre, y POUET, Yves. N-alkenylpyrogallol dimethyl ethers, aliphatic diol monoesters and some minor ether lipids from *botryococcus braunii* a race. En: *Phytochemistry*. 1995, no. 40, p. 543-554.
- [68] METZGER, Pierre y LARGEAU, Claude. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, no. 66, p. 486-496.
- [69] MIRÓN, Asterio S., *et al.* Bubble column and airlift photobioreactors for algal culture. En: *AIChE Journal*. Septiembre 2000, no. 46, p. 1872-1887.
- [70] MORAIS, Michele Greque y COSTA, Jorge Alberto. (2007a). Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. En: *Journal of Biotechnology*. Mayo 2007, no. 129, p. 439-445.
- [71] OKADA, Shigeru; MURAKAMI, Masahiro y YAMAGUCHI, Katsumi. Hydrocarbon composition of newly isolated strains of green microalga *Botryococcus braunii*. En: *Journal of Applied Phycology*. Diciembre 1995, no. 7, p. 555-559.
- [72] OLAIZOLA, Miguel; DUERR, Eirik y FREEMAN, Donald. Effect of CO₂ enhancement in an outdoor algal production system using *Tetraselmis*. En: *Journal of Applied Phycology*. Diciembre 1991, no. 3, p. 363-366.
- [73] LI, Qiang; DU, Wei y LIU, Dehua. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. En: *Applied Microbiology Biotechnology*. Octubre 2008, no. 80, p. 749-756.
- [74] PETERS, Wouter, *et al.* An atmospheric perspective on North American carbon dioxide exchange: CarbonTracker. En: *Proceedings of the National Academy of Science*. Septiembre 2007, no. 48, p. 18925-18930.
- [75] POSTEN, Clemens. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. En: *Engineering in Life Sciences*. Junio 2009, no. 9, p. 165-177.

[76] QUIN, Jianguang. Hydrocarbons from Algae. En: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. 2010, p. 2817-2826.

[77] RADOS, Sven, *et al.* CO₂ balance in industrial cultivation of algae. En: Archiv fur Hydrobiologie. 1975, p. 297-310.

[78] RANGA RAO, Ambati, *et al* (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. En: Bioresource Technology. Febrero 2007, no. 98, p. 560–564

[79] RANGA RAO, Ambati; SARADA, Ravi y RAVISHANKAR, Gokare. (2007). Influence of CO₂ on Growth and Hydrocarbon Production in *Botryococcus braunii*. En: Journal of Microbiology and Biotechnology. 2007, no. 17, p. 414-419.

[80] RICHMOND, A. (2004). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd. 2004. 545 p.

[81] RUANGSOMBOON, Suneerat. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. En: Bioresource Technology. Abril 2012, no. 109, p. 261-265.

[82] SAKAMOTO, Kohei, *et al.* Optimization of light for growth, photosynthesis, and hydrocarbon production by the colonial microalga *Botryococcus braunii* BOT-22. En: Bioresource Technology. Abril 2012, no. 110, p. 474–479.

[83] SCHMIDELL, W y LIMA, A. Biotecnologia Industrial; fundamentos. Sao Paulo: Edgard Blucher Ltda. 2001. 254 p.

[84] SHEEHAN, John; DUNAHAY, Terri; BENEMANN, John y ROESSLER, Paul. A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. The National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado; 1998. 294 p. NREL/TP-580-24190

[85] SINGH, Anoop; SMYTH, Beatrice M. y MURPHY, Jerry D. A biofuel strategy for Ireland with an emphasis on production of biomethane and minimization of

land-take. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. Enero 2010, no. 14, p. 277-288.

[86] SINGH, Yogendra y KUMAR, Himanshu. Lipid and hydrocarbon production by *Botryococcus* spp. under nitrogen limitation and anaerobiosis. En: World Journal of Microbiology and Biotechnology. Marzo 1992, no. 8, p. 121-124.

[87] SKJANES, Kari; LINDBLAD, Peter y MULLER, Jiri. BioCO₂—a multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products. En: Biomolecular Engineering. Octubre 2007, no. 24, p. 405-413.

[88] SPOLAORE, Pauline, *et al.* Commercial Applications of Microalgae. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Febrero 2006, no. 101, p. 87-96.

[89] TAPIE, Pierre, y BERNARD, Amy. Microalgae production technical and economic evaluations. En: Biotechnology and Bioengineering. Septiembre 1988, no. 32, p. 873-885.

[90] TEMPLIER, Joelle, *et al.* Metabolism of *n*-Alkadienes in the A Race of *Botryococcus braunii*. En: Phytochemistry. Enero 1992, no. 31, p. 113–120.

[91] THOMAS, W; TORNABENE, T. y WEISSMAN, J. (1984). Screening for lipid yielding microalgae: activities for 1983. Solar Energy Research Institute; Golden, Colorado; 1984. 44 p. SERI/STR-231-2207.

[92] VAZQUEZ-DUHALT, Rafael y ARREDONDO-VEGA, Bertha O. Haloadaptation of the Green Alga *Botryococcus braunii* (Race A). En: Phytochemistry. 1991, no. 30, p. 2119–2925.

[93] WACKETT, Lawrence P. Biomass to fuels via microbial transformations. En: Current Opinion in Chemical Biology. Abril 2008, no. 12, p. 187–193.

[94] WAKE, Lane y HILLEN, Lance. Study of a 'bloom' of the oil-rich alga *Botryococcus braunii* in the Darwin River Reservoir. En: Biotechnology and Bioengineering. Agosto 1980, no. 22, p. 1637-1656.

[95] WANG, Bei, *et al.* CO₂ bio-mitigation using microalgae. En: Applied Microbiology Biotechnology. Julio 2008, no. 79, p. 707-718.

[96] WEETALL, Howard H. Studies on the nutritional requirements of the oil-producing alga *Botryococcus braunii*. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Octubre 1985, no. 11, p. 377-391.

[97] WEISS, Taylor, *et al.* Genome size and phylogenetic analysis of the A and L races of *Botryococcus braunii*. En: Journal of Applied Phycology. Junio 2010, no. 46, p. 534-540.

[98] WEISSMAN, Joseph C.; GOEBEL, Raymond P. y BENEMANN, John R. Photobioreactor design: mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. En: Biotechnology and Bioengineering. Marzo 1988, no. 31, p. 336-344.

[99] WILSON, Elizabeth y GERARD, D. (2007). *Carbon capture and sequestration: integrating technology, monitoring, regulation*. Energy and Environmental Policy and Law, Humphrey Institute of Public Affairs. United States: University of Minnesota; Blackwell Publishing. 2007.

[100] WOLF, Fred; NANOMURA, Arthur y BASSHAM, James. Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii*. En: Journal of Phycology. Septiembre 1985, no. 21, p. 388-396.

[101] WORLD ENERGY COUNCIL. World Energy Resources Survey. London: World Energy Council Publications. 2013.

[102] YAMAGUCHI, Katsumi, *et al.* Lipid Composition of a green alga, *Botryococcus braunii*. En: Agricultural and Biological Chemistry. Septiembre 1987, no. 51, p. 493-498.

[103] YANG, Suling, *et al.* Utilization of nitrite as a nitrogen source by *Botryococcus braunii*. En: Biotechnology Letters. Febrero 2004, no. 26, p. 239-243.

[104] YOO, Chan, *et al.* Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. En: Bioresource Technology. Enero 2010, no. 101, p. 71-74.

[105] YOSHIMURA, Takeshi; OKADA, Shigeru y HONDA, Masaki. Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus brauni* strain Showa: Optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. En: Bioresource Technology. Abril 2013, no. 133, p. 232-239.

[106] ZHANG, Huifang, *et al.* Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. En: Biomass and Bioenergy. Mayo 2011, no. 35, p. 1710-1715.

[107] ZHILA, Natalia; KALACHEVA, Galina y VOLOVA, Tatiana. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. En: Journal of Applied Phycology. Junio 2005, no. 17, p. 309-315.