

**DISEÑO DE UN SISTEMA DE CONSUMO DE DIÓXIDO DE CARBONO
MEDIANTE CULTIVOS DE BOTRYOCOCCUS BRAUNII**

**ANA MILENA MALAGÓN CUADROS
REYNALDO ANDRES VERA ARENAS**

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

2014

**DISEÑO DE UN SISTEMA DE CONSUMO DE DIÓXIDO DE CARBONO
MEDIANTE CULTIVOS DE BOTRYOCOCCUS BRAUNII**

**ANA MILENA MALAGÓN CUADROS
REYNALDO ANDRES VERA ARENAS**

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

Director:

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

Codirector:

**ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO
Biólogo**

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

2014

Dedicatoria

Este trabajo es el fruto de los años de dedicación y esfuerzo que he consagrado a mi carrera profesional, y con todo el cariño y respeto lo dedico:

A Dios, por haberme permitido tener esta maravillosa experiencia en la UJS y por guiarme en cada paso de este proceso, dándome salud, fuerza, paciencia y sabiduría.

A Mi papá Abelardo Malagón, por darme el ejemplo de ser responsable, disciplinada y persistente en mi sueño, por creer en mí, apoyarme económica y emocionalmente día a día, nunca lo ha dejado de hacer. Te quiero papito eres mi gran amor, gracias por confiar en mí dejándome ir de casa para formarme profesionalmente.

A mis hermanas Tati y Yulita, que a pesar de la distancia son mi motivo para ser mejor persona, y ser una gran Profesional, gracias por compartir momentos únicos que quedaran por siempre en mi corazón, las quiero y quiero siempre lo mejor para ustedes.

A mi mamá Eby Cuadros, sin ella y sin Dios no existiría. Gracias por traerme al mundo y orar por mí y mis hermanos. Te quiero madre.

A mis tías y en especial a mis tías Yaneth y Helena quienes me dan buenos consejos, me dan fuerzas para decirme que la formación profesional abre puertas para un mejor futuro y quieren lo mejor para mí, gracias por recibirme con amor en sus casas cuando voy a vacaciones. las quiero mucho.

A mis primos y en especial a Valentina mi ahijada, por la que me inspiro en ser un ejemplo para ella y decirle que con dedicación y amor al estudio se puede cumplir los sueños.

A mi mejor amiga Jessica Cruz, quien ha sido mi cómplice de aventuras, testigo de lo vivido con la que mayor tiempo he pasado, gracias amiga, juntas de la mano con Dios por siempre.

A mis amigos de la U, Jheimy, Oscarito, Andrés Rojas, Mónica, Mayra, carito gracias por los momentos compartidos, el apoyo que recibí en ocasiones difíciles, y las mejores rumbas con ustedes.

También está dedicado a todas las personas que me brindaron su apoyo, su tiempo y momentos felices.

“Solo dos legados duraderos podemos dejar a nuestros hijos: Uno, raíces; el otro, alas” Hodding Carter

Ana Milena Malagón C.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander, su Escuela de Ingeniería Química y cada uno de los profesores que hacen parte de ella, por todos los conocimientos y valiosas enseñanzas brindadas durante éste tiempo.

A nuestro director de proyecto, profesor Crisóstomo Barajas, por darnos la oportunidad y confiar en nosotros para sacar adelante este proyecto. A nuestro codirector, Andrés Fernando Barajas, por toda su guía, paciencia, apoyo incondicional, dedicación, tiempo y consejos durante la realización de éste proyecto.

A los técnicos de laboratorio Luis Eduardo Carreño y Wilson Eduardo Carreño, por su tiempo, apoyo y porque siempre nos tendieron la mano cada vez que lo necesitamos.

Al grupo de biomasa por su constante acompañamiento y por el interés demostrado dándonos buenos consejos para mejorar constantemente.

A nuestros Padres y demás familiares, quienes se preocupan por que todo nos salga bien, escuchándonos, y colaborándonos en todos los aspectos.

A nuestros amigos con quienes empezamos este sueño y hemos compartido tantos momentos en cada etapa de este proceso, apoyándonos en situaciones difíciles y celebrando fechas importantes. Llenando esta etapa de experiencias y anécdotas inolvidables. Juntos creamos fuertes lazos de amistad. Sin importar en dónde estén queremos darles las gracias por formar parte de nuestras vidas, por todo lo que nos han brindado y por todas sus bendiciones.

A todas las personas que de una u otra manera estuvieron presentes en este proceso brindándonos su apoyo para poder culminar con éxito esta etapa de nuestras vidas.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION.....	14
1. DESCRIPCIÓN METODOLOGICA.....	18
1.1 MICROORGANISMO.....	18
1.2 RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO.....	19
1.3 INYECCIÓN SEMI-CONTINUA DE CO ₂	19
1.4 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS.....	20
1.4.1 CRECIMIENTO CELULAR (PESO SECO).....	20
1.4.2 CUANTIFICACIÓN EXOPOLISACARIDOS (<i>DUBOIS ET AL., 1956</i>).....	20
1.4.3 CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES (<i>BLIGHT & DYER, 1959</i>).....	20
1.4.4 CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS (<i>EROGLU & MELIS, 2010</i>).....	21
2. ANALISIS DE RESULTADOS.....	22
2.1 REGULACIÓN DEL PH.....	22
2.2 PRODUCCIÓN DE BIOMASA.....	22
2.3 PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACARIDOS.....	23
2.4 PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS.....	25
2.5 PRODUCCIÓN DE HIDROCARBUROS.....	26
3 RESULTADOS ESTADISTICOS.....	27
3.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA.....	27
3.1.1 PARETO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA.....	28
3.2 PRODUCCIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	29
3.2.1 PARETO DE LA PRODUCCIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	30
3.3 PRODUCCIÓN DE HIDROCARBUROS.....	32

3.3.1	PARETO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDROCARBUROS.....	33
3.4	PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS	33
3.4.1	PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS HASTA EL DÍA 10.....	33
3.4.2	PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS TOTAL.	34
3.4.3	PARETO DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS TOTAL.	35
4	ANÁLISIS DE RESULTADOS ÓPTIMOS	37
4.1	PRODUCCIÓN DE BIOMASA	37
4.2	PRODUCCIÓN DE CARBOHIDRATOS	38
4.3	PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS	39
4.4	PRODUCCIÓN DE HIDROCARBUROS	41
5	CONCLUSIONES.....	43
6	RECOMENDACIONES	44
7	CITAS BIBLIOGRÁFICAS	45
	BIBLIOGRAFIA	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño de experimentos 2^3 relación C/N.....	19
Tabla 2. Relación óptima C/N	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Metodología experimental para el diseño de consumo de CO_2	18
Figura 2.	Valor del PH de los experimentos en relación con el tiempo.	22
Figura 3.	Resultados de la producción de biomasa (g/L) en relación a los días.	23
Figura 4.	Resultados de la producción de carbohidratos (g/L) en relación a los días.....	24
Figura 5.	Resultados de la producción de lípidos (%p/p) en relación a los días.....	25
Figura 6.	Resultados de la producción de hidrocarburos (ug(g)) en relación a los días.	26
Figura 7.	Resultados de la producción de biomasa con relación a las concentraciones de CO_2 y KNO_3	27
Figura 8.	Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de biomasa.	29
Figura 9.	Resultados de la producción de carbohidratos con relación a las concentraciones de CO_2 y KNO_3	30
Figura 10.	Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de carbohidratos.....	31
Figura 11.	Resultados de la producción de hidrocarburos con relación a las concentraciones de CO_2 y KNO_3	32

Figura 12.	Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de hidrocarburos.....	33
Figura 13.	Resultados del día 10 de lípidos con relación a las concentraciones de CO ₂ y KNO ₃	34
Figura 14.	Resultados de lípidos totales con relación a las concentraciones de CO ₂ y KNO ₃	35
Figura 15.	Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de lípidos total.....	36
Figura 16.	Resultado óptimo de la producción de biomasa (g/L) con relación a los días.....	38
Figura 17.	Resultado óptimo de la producción de exopolisacáridos (g/L) con relación a los días.....	39
Figura 18.	Resultado óptimo de la producción de lípidos (% p/p) con relación a los días.....	40
Figura 19.	Resultado óptimo de la producción de hidrocarburos (ug(g)) con relación a los días.....	41

RESUMEN

TITULO: DISEÑO DE UN SISTEMA DE CONSUMO DE DIÓXIDO DE CARBONO MEDIANTE CULTIVOS DE BOTRYOCOCCUS BRAUNII.*

AUTORES:

ANA MILENA MALAGÓN CUADROS

REYNALDO ANDRES VERA ARENAS**

PALABRAS CLAVES: Biocombustible, Fotobiorreactor discontinuo, Botryococcus Braunii, CO₂, nutrientes, pH.

DESCRIPCIÓN:

Actualmente debido a la gran contaminación ambiental y agotamiento de combustibles fósiles, surge la necesidad de buscar alternativas de solución que sea amena con el medio ambiente y de bajo costo. En este trabajo de investigación se realiza el diseño de un sistema de consumo de dióxido de carbono (CO₂) a partir de micro-algas, en especial de Botryococcus Braunii. Esta alga es caracterizada por ser gran productora de hidrocarburos gracias a la actividad fotosintética y fijación de CO₂. Se encuentra en climas cálidos donde la temperatura está alrededor de 25⁰C. Se adecua un medio de cultivo que garantice la optimización del crecimiento del alga, donde se estudian los efectos que tiene la síntesis en las propiedades finales de obtención como productos principales y subproductos (lípidos, carbohidratos e hidrocarburos). Los efectos evaluados fueron: cantidad de CO₂, pH, condiciones óptimas de luz, nutrientes usado en el medio de cultivo y se hicieron análisis de espectrofotómetro para los resultados de carbohidratos, hidrocarburos y lípidos. Se realizó 3 experimentos (original y replica), a cada experimento se le inyectó CO₂ durante 15 días a diferentes concentraciones de CO₂ y KNO₃. Según los resultados que se obtuvieron, la concentración de CO₂ y la concentración de nutrientes en el medio de cultivo como fuente de nitrógeno fueron las variables con mayor influencia; para el experimento óptimo durante 25 días se escogió una concentración de 100 mL/ min de CO₂ y como fuente de nitrógeno 0,40 g/L de KNO₃. Se observa una producción del 67,26 (% p/p) de lípidos, 43217,07 (ug/g) de hidrocarburos, 0,018 (g/L) de carbohidratos y 0,37 (g/L) de biomasa sin descuidar el pH del cultivo que osciló de 5,5 y 6,0.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Crisóstomo Barajas
Codirector Andrés Barajas

ABSTRACT

TITLE: SYSTEM DESIGN OF A CONSUMER OF CARBON DIOXIDE BY CROPS BOTRYOCOCCUS BRAUNII.*

AUTHORS:

ANA MILENA MALAGÓN CUADROS
REYNALDO ANDRES VERA ARENAS**

KEYWORDS: Biofuel, batch Photobioreactor, Botryococcus braunii, CO₂, nutrients, pH.

DESCRIPTION:

Currently to the high environmental pollution and fossil fuel depletion, appear the need to seek alternative solution beneficent environment and inexpensive. In this research work design system consumption of carbon dioxide (CO₂) from micro-algae, especially Botryococcus braunii performed. This alga is a major producer of hydrocarbons by photosynthetic activity and CO₂ fixation. It is located in hot weather where the temperature is around 25°C. A culture medium guarantees algal growth optimization, where the effects of the synthesis in obtaining the final properties of main products and by-products (lipids, carbohydrates and hydrocarbons) are studied. Effects of evaluations were: amount of CO₂, pH, optimal light conditions, used in the culture medium nutrients and spectrophotometer analysis for carbohydrates, hydrocarbons and lipids results were made. Three experiments (original and replica) were performed, for each experiment will inject CO₂ for 15 days to different concentrations of CO₂ and KNO₃. According to the results obtained, the concentration of CO₂ and nutrient concentration in the culture medium as a source nitrogen were the most influential variables; was chosen for the optimal experiment for 25 days a concentration of 100 mL / min of CO₂ and nitrogen source as 0,40 g / L of KNO₃. 67,26 a production was observed (% w / w) lipid, 43217,07 (ug / g) of hydrocarbons, 0,018 (g / L) of carbohydrate and 0,37 (g / L) of biomass. Culture pH ranged from 5,5 to 6,0.

* Work Degree

** Faculty of Physical-Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Crisostomo Barajas .Co-director: Andres Barajas

INTRODUCCION

Botryococcus Braunii es una micro-alga que se caracteriza por poseer altas concentraciones de lípidos (entre 35 a 70 % de Ácidos Grasos Libres) con un 75% en peso seco de hidrocarburos acumulados [1]; Dentro de esta misma especie se pueden reconocer 3 diferentes tipos o "razas químicas", cada una de estas se diferencia por el tipo de hidrocarburos que produce [2].

El tipo A produce n-alkadienos (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 licopadienos, los cuales son tetraterpenoides simples [2], por esto, se cree que micro-algas ancestrales pueden ser los depósitos actuales de petróleo [3]. El tipo B comprende un grupo de micro-algas coloniales, con células de un tamaño de 10 micras en longitud. Estas micro-algas sintetizan hidrocarburos terpenoides de largas cadenas vía DXP-MEP [4] y los depositan en el espacio extracelular, formando así una matriz hidrofobia en la cual múltiples células se adhieren [2][5][6].

Los hidrocarburos denominados botriococenos son triterpenos modificados con la fórmula química C_nH_{2n+10} [5], estos pueden llegar a ser entre el 30 y 40% de la biomasa seca [2]. 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 [7]. 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 [8][9]; Sin embargo, para poder producir cualquiera de estos tipos de hidrocarburos se requieren de altas concentraciones de carbono (ya sea orgánico o inorgánico). Wolf demostró que la aireación con 0,3% de CO₂ puede promover significativamente el crecimiento de *B. Braunii* que a pesar de tener una fase de crecimiento exponencial alto, demora un largo periodo de tiempo [9].

Para el caso específico de los cultivos de micro-alga, el CO₂ disuelto en el cultivo es consumido continuamente por las células, una parte de este CO₂ se convierte en biomasa y otra parte se libera en forma de O₂, mientras que el O₂ producido a través de la fotosíntesis alga ha sido liberado inicialmente dentro del cultivo para luego disiparse con los gases de salida [10]. En teoría, las micro-algas pueden fijar cerca del 9% de la luz solar incidente y generar 280 toneladas de biomasa seca por ha⁻¹ y año⁻¹ y consumen alrededor de 513 toneladas de CO₂ [11]. Según Cheng la tasa de fijación fotosintética de CO₂ en *C. vulgaris* depende fuertemente de la concentración de CO₂ y su inyección continua, encontrando que la mayor tasa de fijación se alcanzó con una concentración de 1,0% (v/v) de CO₂ en el aire de inyección [10]. Además sus resultados indicaron que usando un reactor con membrana de fibra hueca como dispersor del CO₂ aumenta el consumo de 80 a 260 mg L⁻¹h⁻¹.

Adicionalmente de ser una fuente de carbono, el CO₂ contribuye al control del pH dentro del cultivo, ya que según Mazzuca durante la inyección de CO₂ se puede observar alguno (o dos) de los siguientes fenómenos: (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 [12]. Las algas pueden fijar CO₂ del ambiente, hasta en lugares con concentraciones 1000 veces más altas que las ambientales, lo cual podría ser útil para controlar los altos niveles de CO₂ industriales [13]. El CO₂ es convertido en productos de valor agregado tales como

proteínas, vitaminas, alimento, combustibles entre otros [14][15]. Análisis químicos han demostrado que la biomasa del micro-alga consiste de 40 a 50% de carbón, esto sugiere que entre 1,5 a 210 kg de CO₂ son necesarios para producir 1 kg de biomasa [12].

En principio, la limitación del CO₂ en el medio puede ser evitada al inyectarlo en exceso, ya sea mezclado con el flujo de aire o directamente en el cultivo [16][17]; sin embargo el uso de CO₂ representa un gasto operacional grande, ya que la pérdida de este gas debe ser minimizada, por lo que requiere que el sistema de inyección sea optimizado [18].

De acuerdo con la literatura, la adición de carbono para el cultivo masivo de micro-algas representa la principal limitante [19][20][21][22]; ya que una de las primeras consideraciones que se debe tener al usar CO₂ es que, grandes concentraciones de este pueden inhibir el crecimiento, por otro lado, bajas concentraciones pueden limitar el crecimiento [23]. Estas concentraciones máximas (inhibidor) y mínimas (limitante) varían de especie en especie, por lo cual la concentración de CO₂ no solo debe ser más baja que cierto valor el cual satisfaga la necesidad de carbono del alga, sino que también que no exceda un límite superior para así evitar una gran pérdida de CO₂ [10]. Para el caso de *B. braunii* Ranga Rao utilizó concentraciones cercanas al 20% (v/v) de CO₂ demostrando además que no existe una inhibición aparente del crecimiento celular [24]; estos resultados son consistentes con los encontrados por Ge [25], donde demuestran que la mejor concentración de CO₂ que mejora el crecimiento de *B. braunii* es de 20% (v/v); cabe resaltar que estos resultados varían drásticamente de los reportados por Yoo [26], y a los de Chiu [27], quienes encontraron que la mejor era hasta 10%.

Todas estas diferencias tan marcadas en la concentración del CO₂ suministrado se debe principalmente a la cepa utilizada, por lo cual se hace indispensable diseñar un medio de cultivo que optimice la producción tanto de biomasa como de

hidrocarburos, además es importante evaluar la forma como el CO₂ es inyectado en el sistema de cultivo; por lo anterior el objetivo de este trabajo es la evaluación del efecto de la inyección de CO₂ de forma semi-continua en la producción de biomasa, hidrocarburos y lípidos en cultivos de *B. braunii*.

1. DESCRIPCIÓN METODOLOGICA

Figura 1. Metodología experimental para el diseño de consumo de CO₂ y la obtención de biomasa, carbohidratos, lípidos e hidrocarburos.



1.1 Microorganismo.

Se utilizará la micro-alga *Botryococcus braunii* obtenida de un lago ubicado en el municipio de Porce, Antioquia y aislada en el Laboratorio de Transformación de Biomasa del grupo de investigación CIDES de la Universidad Industrial de Santander; la cepa se mantuvo en el medio de cultivo Bold Basal modificado (MBBM). Cada litro de medio de cultivo está compuesto por: macronutrientes NaNO₃ (1,5 g/L), (Moles) MgSO₄.7H₂O (3,04 X 10⁻⁴) NaCl (4,28 X 10⁻⁴), K₂HPO₄ (4,31 X 10⁻⁴), KH₂PO₄ (1,29 X 10⁻³), CaCl₂.2H₂O (1,70 X 10⁻⁴) y micronutrientes (g/L) ZnSO₄.7H₂O (3,07 X 10⁻⁵), MnCl₂.4H₂O (7,28 X 10⁻⁶), MoO₃ (4,93 X 10⁻⁶), CuSO₄.5H₂O (6,29 X 10⁻⁶), Co(NO₃)₂.6H₂O (1,68 X 10⁻⁶), H₃BO₃ (1,85 X 10⁻⁴), EDTA (1,71 X 10⁻⁴), KOH (5,53 X 10⁻⁴), FeSO₄.7H₂O (1,79 X 10⁻⁵) y utilizando reactores cilíndricos de diámetro interno de 14cm y 35cm altura con un volumen del cultivo de 2 L. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo con un flujo de 0,6 L/min.

Se instaló un diseño de sistema de cultivo de CO₂ en el laboratorio de procesos conformado por 4 cilindros con capacidad de 25 kg a los que se les abrió las válvulas de 6:00 a.m. hasta las 6:00 p.m; 4 líneas de CO₂ con sus rotámetros que daba paso a la cantidad de concentración de CO₂ a inyectar a una presión de 5,44 atm y temperatura de 25 °C. La inyección de CO₂ se realiza de manera discontinua en intervalos de 40 minutos con una duración de 20 minutos controlando la caída del pH. Un compresor para la inyección continúa de aire a cada reactor y luz artificial fluorescente las 24 horas del día.

1.2 Relación Carbono/Nitrógeno.

Con la intención de comprobar el efecto de la relación entre la cantidad de Nitrógeno presente y la cantidad de CO₂ en el sistema, se desarrolló un diseño de experimentos 2³, para esto se tuvo en cuenta las cantidades de CO₂ (mL/min) reportadas por Yoo [26], Ge [25] y Honda [28]; para la concentración de la fuente de nitrógeno se utilizaron los resultados previamente obtenidos en la Laboratorio de Biomasa para la cepa de *B. braunii* (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño de experimentos 2³ Relación C/N.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
KNO₃ (g/L)	0,75	1,50	0,75	0,38	0,38	0,75	0	1,5	1,54
CO₂ (mL/min)	102,43	30,00	60	90	30	17,57	60	90	60

1.3 Inyección Semi-Continua de CO₂.

La inyección de CO₂ estuvo controlada a partir del cambio de pH en el medio, para cada una de las concentraciones a evaluar el flujo fue constante hasta alcanzar un pH entre 5,5 y 6,0; una vez alcanzo el pH, el flujo de CO₂ se detenía hasta alcanzar nuevamente un pH cercano a 7. Esta metodología se repitió durante 12 horas diarias a lo largo de 15 días.

1.4 Cuantificación de biomasa y metabolitos

Crecimiento celular (peso seco), lípidos totales, hidrocarburos y carbohidratos fueron determinados utilizando los métodos descritos en Moheimani [29].

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

1.4.2 Cuantificación exopolisacaridos (*Dubois et al., 1956*). Se tomó 1 mL del medio libre de células (obtenido a partir del medio residual de la filtración para peso seco) y se le agregaron 0,5 mL de fenol al 5% (p/v) y 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado; la mezcla se homogenizó utilizando un vortex durante 2 minutos a velocidad media (según especificaciones del equipo). Finalmente, cada una de estas muestras fue transferida a las celdas colorimétricas y se midió la absorbancia a 485nm (para la cuantificación de glucosa) en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

1.4.3 Cuantificación de Lípidos totales (*Blight & Dyer, 1959*). Al final de la experimentación se tomaron 20 mL, los cuales se centrifugaron a 3400 rpm durante 20 minutos, al pellet se le agregaron 5,7 mL de solución de Bligh y Dyer y 5 mg de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro; la mezcla se homogenizó con vortex a velocidad máxima durante 15 minutos; transcurrido el tiempo la mezcla se llevó a centrifuga a 3400 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se guardó en tubos de vidrio de 50 mL; el pellet restante se llevó a una segunda extracción con 5,7 mL de solución y homogenización en vortex por 5 minutos y luego se lleva de nuevo a centrifuga.

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

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

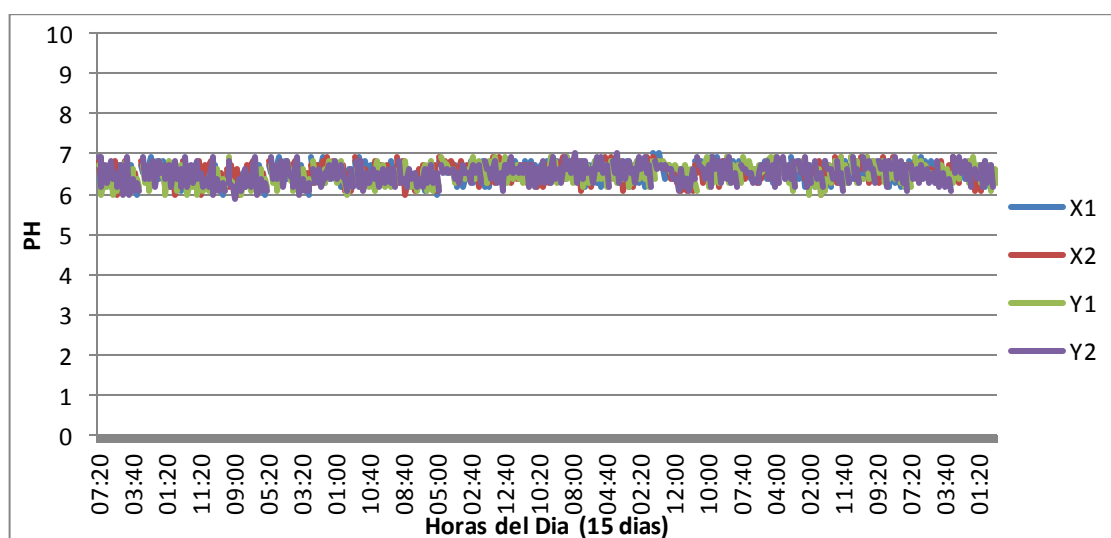
1.4.4 Cuantificación de hidrocarburos (Eroglu & Melis, 2010). Al final de la experimentación se tomaron 20 mL, los cuales se centrifugaron a 3400 rpm durante 20 minutos, al pellet se le agregaron 5 mL de Heptano grado analítico y 5 mg de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro; la mezcla se homogenizó con vortex a velocidad máxima durante 15 minutos; transcurrido el tiempo se agregaron 10 mL de agua destilada para separar la biomasa del extracto de hidrocarburos. Finalmente, cada una de las muestras fue transferida a las celdas de cuarzo y se midió la absorbancia a 190nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

2. ANALISIS DE RESULTADOS

2.1 Regulación del PH

Se hace un seguimiento estricto del pH de los cultivos como variable controlada, con el fin de que no se acidifique el alga, en la figura 2 se muestran los principales movimientos durante la corrida. El pH fue medido antes y después de la inyección de CO₂. En este intervalo el Ph disminuía pero no se dejaba exceder la tasa de decrecimiento ya que esto puede causar la muerte celular de la micro-alga.

Figura 2. Valor del PH de los experimentos en relación con el tiempo.

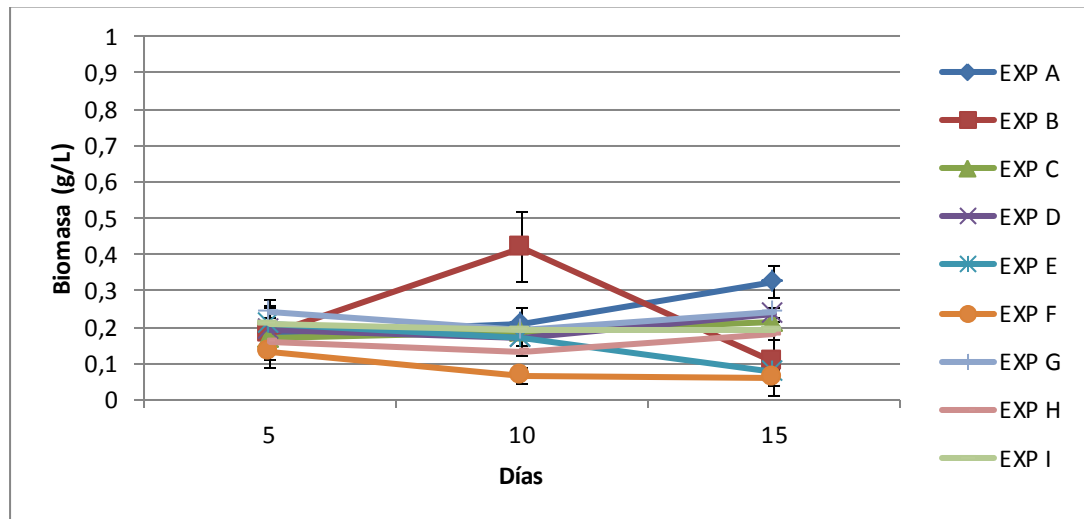


2.2 Producción de Biomasa

Los resultados de la figura 3 se muestran la relación de gramos de biomasa por litro de solución a través del tiempo. La producción de biomasa de los experimentos en el día 15 está comprendida entre 0,33 g/L y 0,062 g/L. Con un suministro medio de Nitrógeno y bajo porcentaje de inyección de CO₂ se tiene un decrecimiento en la biomasa total al final del experimento, mientras que el caso

más favorable se suministra igual cantidad de nitrógeno (0,75g/L KNO_3) con la inyección de CO_2 mas alta (102,43 mL/min). Los experimentos C, D, E, G, H e I presentan una producción similar de biomasa (0,21-0,23 g/L).

Figura 3. Resultados de la producción de biomasa (g/L) en relación con los días.



El experimento donde se suministra mayor nitrógeno a bajas tasas de CO_2 (EXP B) tiene un aumento considerable en la producción de biomasa en el día 10, lo que favorece la producción en corto tiempo. Para este caso, se obtiene un mejor resultado (0,42 g/L) en menos tiempo de lo que tarda en producir el mejor experimento (EXP A) en 15 días (0,32 g/L).

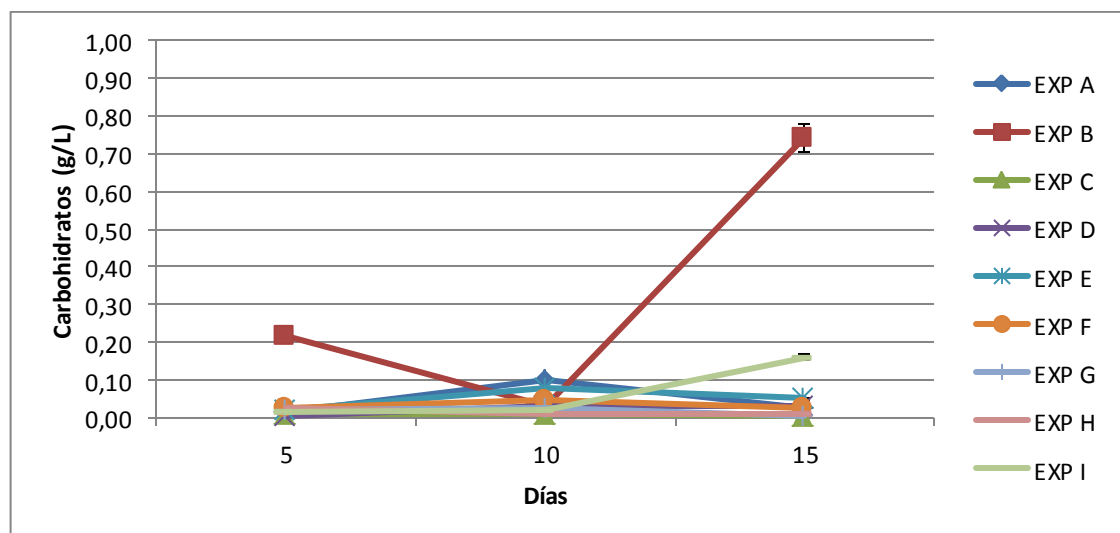
2.3 Producción de Exopolisacaridos

Los Exopolisacaridos son carbohidratos que permiten una buena comunicación celular y le dan el aspecto mucoso al cultivo. La presencia de carbohidratos en el cultivo genera mayores posibilidades de contaminación dando posibilidad a la

presencia de agentes patógenos que consumen carbono y afectan el crecimiento del alga.

Los resultados plasmados en la figura 4 relacionan los gramos de carbohidratos en un litro de solución a través del tiempo. La presencia de Exopolisacaridos en los experimentos estuvo comprendida entre 0,74 y 0,004 g/L, siendo el experimento B y el experimento H el mayor y el menor respectivamente. La relación C/N usada en el EXP H es la que mejores resultados arroja gracias a su comportamiento descendente y mínimo en la presencia de estos carbohidratos. En el experimento B, como se puede observar en la figura 4, contiene la mayor cantidad de exopolisacáridos con respecto a los demás experimentos en el día 5 y 15 (0,21 g/L y 0,74 g/L respectivamente), pero tiene un valor de producción muy bajo en el día 10 (0,018 g/L), valor que sigue apoyando la posibilidad de producir mayor biomasa con menos existencia de carbohidratos en solo 10 días.

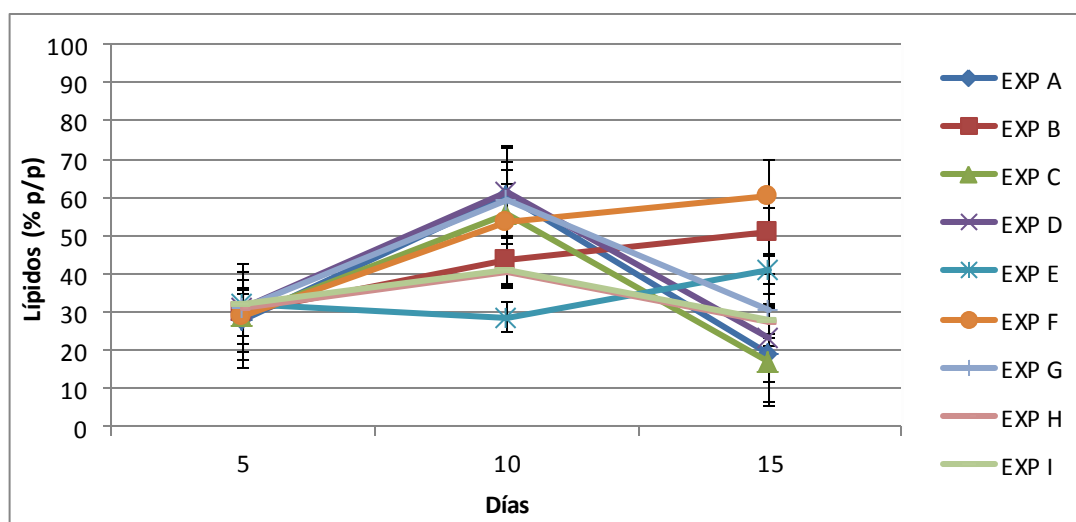
Figura 4. Resultados de la producción de carbohidratos (g/L) en relación con los días.



2.4 Producción de Lípidos

La producción de lípidos favorece la aplicación del alga para la elaboración de aceites combustibles. La mayoría del biodiesel es producido mediante transesterificación alcalina, a causa de su rapidez y condiciones moderadas que la caracterizan. Los resultados muestran el porcentaje en peso (% p/p) producidos por el *B. braunii* a través de los quince días. Como se puede ver en la figura 5, el total de lípidos producido por cada experimento está en el rango de 60,5% y 17,10% para el día 15. El experimento F, con una inyección mínima de 17,57 mL/min de CO₂ y una composición de 0,5 g/L de KNO₃, muestra la mayor producción de lípidos con un 60,5 % p/p. Se puede observar que para el día 5 todos los experimentos tienen un porcentaje muy similar de producción de lípidos (40,8% p/p), después la tendencia de la mayoría es creciente para el día 10. Los experimentos G, I, C A y D se comportan de forma decreciente en los últimos 5 días. Sin embargo, es importante resaltar la cantidad de lípidos producidos por el experimento D en el día 10, ya que alcanza un valor (59,4% p/p) casi igual al alcanzado por el experimento F en el día 15.

Figura 5. Resultados de la producción de lípidos (%p/p) en relación con los días.

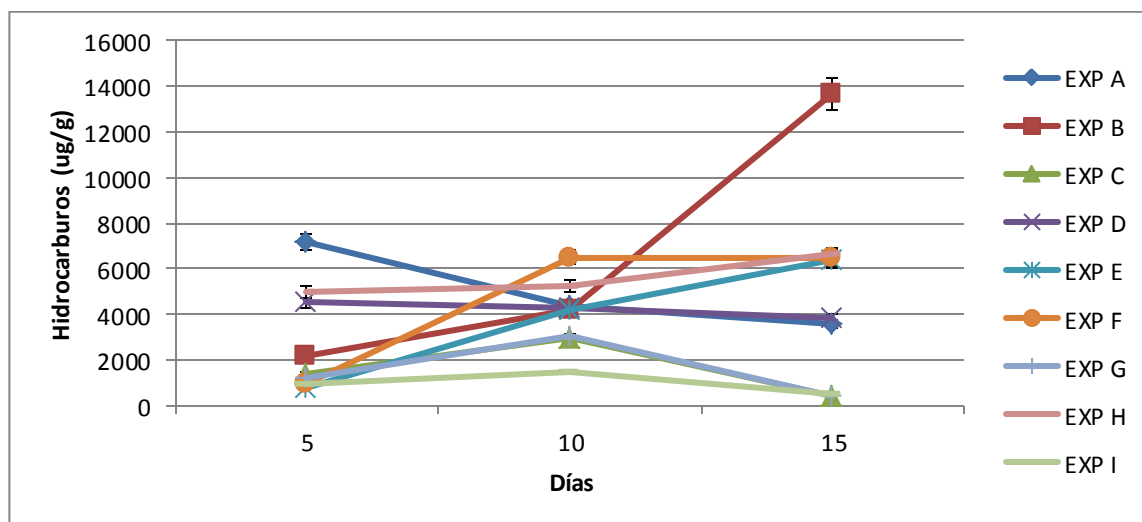


2.5 Producción de Hidrocarburos

Los hidrocarburos son parte importante del alga, esta producción se ve facilitada con una inyección de controlada de CO₂ y la relación con la composición de nitrógeno presente en el cultivo.

Para el día 15, se obtuvieron resultados entre 13683 ug/g y 53455 ug/g siendo el experimento B y G el mayor y menor respectivamente. Los experimentos F, H y E muestra un resultado similar de producción de hidrocarburos de 6610 mg/g aproximadamente. El comportamiento de los hidrocarburos del experimento E fue creciente todo el tiempo. En los experimentos D y A se obtuvo un valor medio de producción (3860 ug/g aproximadamente) y los experimentos I y G un decrecimiento en los últimos 5 días llevándolos a tener el valor más bajo de producción de hidrocarburos (53455 ug/g).

Figura 6. Resultados de la producción de Hidrocarburos (ug/g) en relación con los días.



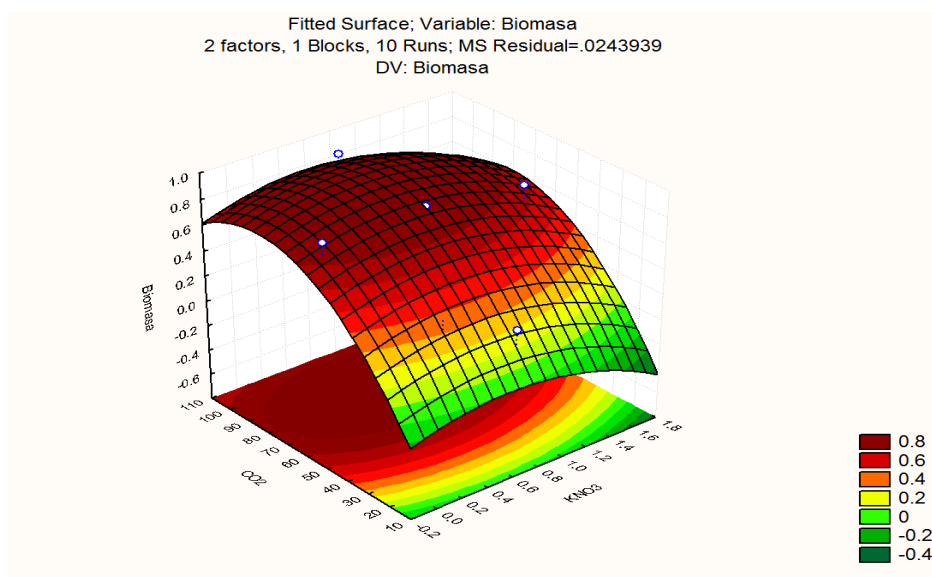
3 RESULTADOS ESTADISTICOS

Estos resultados fueron analizados con la herramienta estadística del análisis de varianza (ANOVA) con el fin de encontrar las diferencias entre los 9 experimentos realizados. Los valores $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3.1 Producción de Biomasa

La figura 7 muestra la relación de producción de biomasa con respecto a las condiciones de presencia de nitrógeno en el cultivo y la tasa de inyección de mL/min CO_2 . El color vino tinto indica una producción favorable del 80% con una inyección medianamente alta de CO_2 (80 mL/min) y una tasa de nitrógeno suministrada de 0,8 g/L.

Figura 7. Resultados de la producción de biomasa, con relación a las concentraciones de CO_2 y KNO_3 .

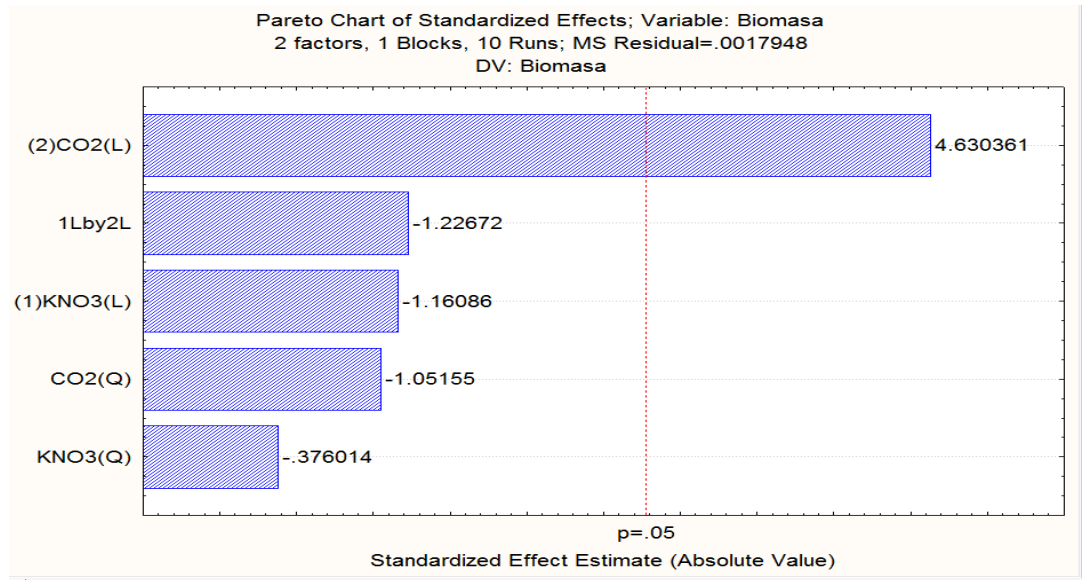


La alta producción de biomasa se restringe para inyecciones de altas concentraciones de CO_2 pero es más tolerante con respecto a la composición de nitrógeno en el medio de cultivo (0,2 a 1,4 g/L). Para inyecciones inferiores de 50 mL/ min de CO_2 , la producción de biomasa decrece rápidamente, alcanzando valores muy mínimos en inyecciones de 20 a 10 mL/min de CO_2 . Por otro lado, es visible la baja producción de biomasa cuando se tiene una baja inyección CO_2 , resultado que reafirma el argumento de que la inyección del CO_2 acelera y mejora el crecimiento de la microalga. De la misma forma, se puede ver que la producción más baja se presenta cuando la composición del KNO_3 presente en el cultivo es máxima a bajas inyecciones del CO_2 .

3.1.1 Pareto de La Producción de Biomasa. En la figura 8 de significancia del Pareto de la Producción de Biomasa, la inyección del dióxido de carbono es muy importante para la producción de biomasa de la micro-alga. La tasa de inyección suministrada de mL/ min de CO_2 es directamente proporcional a la producción total de biomasa.

Es decir, si se desea obtener mayor producción de biomasa en el cultivo se hace necesario una inyección más alta de concentración de CO_2 . De igual forma, se puede ver la poca incidencia que tiene la presencia del nitrógeno para la producción de biomasa, resultado que confirma la tolerancia a la composición medianamente baja o alta concentración de KNO_3 en el cultivo.

Figura 8. Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de biomasa.



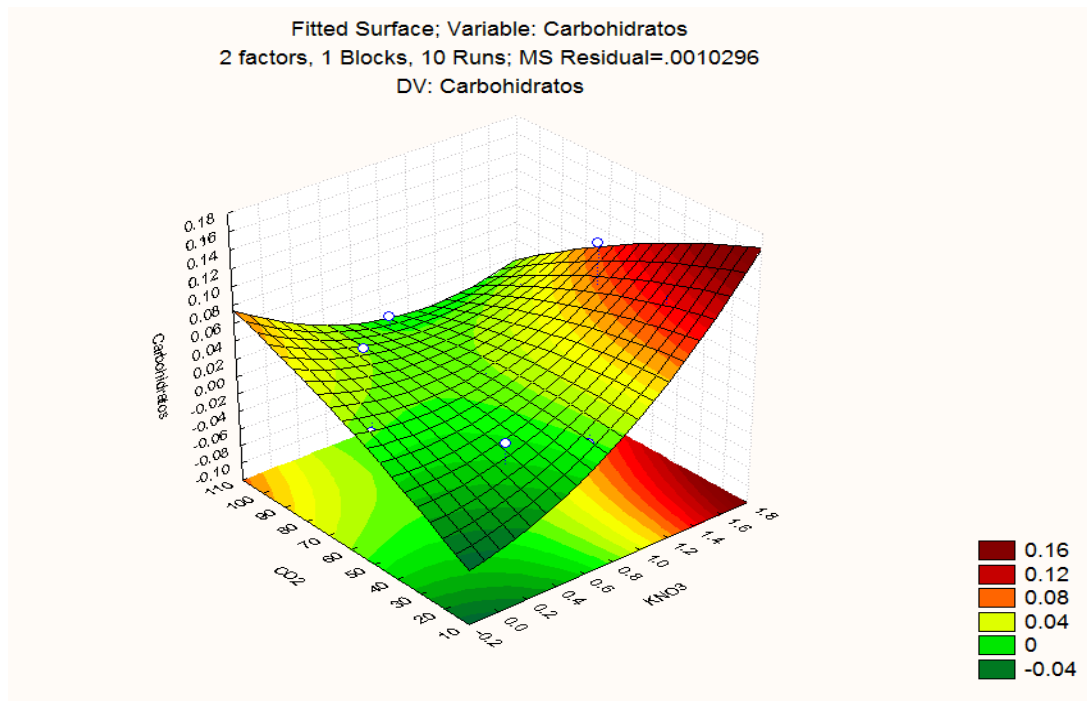
3.2 Producción de Carbohidratos

La figura 9 muestra las diferentes relaciones entre inyección de CO₂ y presencia de nitrógeno en el cultivo (KNO₃) para la producción de carbohidratos del *B. braunii*. Como se había mencionado, las mejores condiciones de cultivo del *B. braunii* son cuando se presenta la menor producción, que en este caso corresponde a la zona de color verde.

Se puede observar que la mejor relación C/N para una baja producción se encuentra en una inyección de CO₂ de 30 a 80 mL/ min y una composición de 0,8 a 0 g/L de KNO₃. Es importante destacar lo similar de este rango con el óptimo para producir biomasa. En este caso, es más tolerante el rango de inyección de CO₂ en que se producen pocos carbohidratos y es menor el rango de composición de nitrógeno presente en el cultivo. Por otra parte, la alta producción de

carbohidratos se da en cultivos con gran presencia de nitrógeno y baja tasa de inyección de CO_2 .

Figura 9. Resultados de la producción de carbohidratos con relación a las concentraciones de CO_2 y KNO_3 .

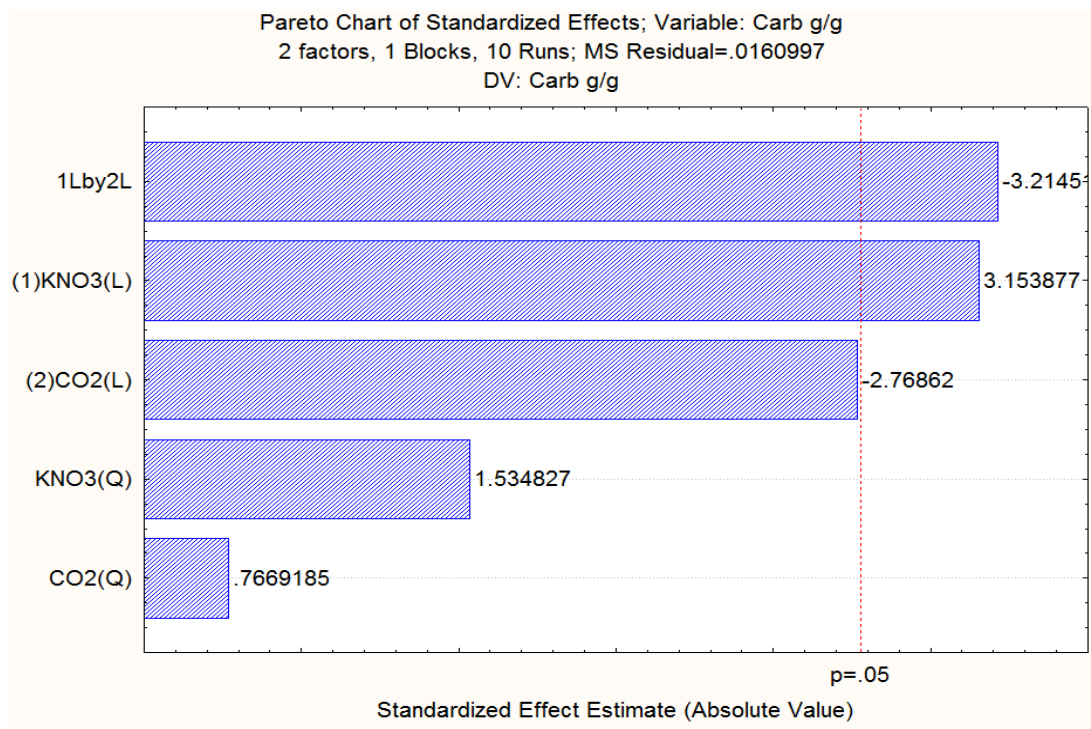


3.2.1 Pareto de La Producción de Carbohidratos. Se analizó la significancia de los resultados de producción de carbohidratos se tienen varios aspectos importantes: es muy importante la relación (C/N) que se maneja en el medio, es un factor muy incidente la presencia del nitrógeno para la tasa de producción de exopolisacáridos y es un poco relevante la presencia de inyecciones de CO_2 . Como se puede ver en la tabla el aspecto más relevante es la relación de dióxido de carbono y nitrato de potasio, es decir, la relación (C/N). El signo negativo de la significancia indica la relación inversa, en donde a menores tasas de inyecciones de CO_2 y mayor presencia de KNO_3 se obtiene mayor producción de

carbohidratos. Como se puede ver en la figura, y como se había analizado anteriormente, a una mayor inyección de CO₂ y menor presencia del nitrógeno obtuvo la condición favorable, o sea la menor producción de exopolisacáridos.

El otro aspecto significativo es la presencia de KNO₃ en el medio de cultivo, para obtención de carbohidratos a partir del *B. braunii* es necesario incluir altas tasas de nitrógeno en su composición. La inyección de CO₂ en el cultivo no promueve significativamente la formación de carbohidratos, ya que como se puede observar en la figura 10, no logra superar el punto de significancia del Pareto.

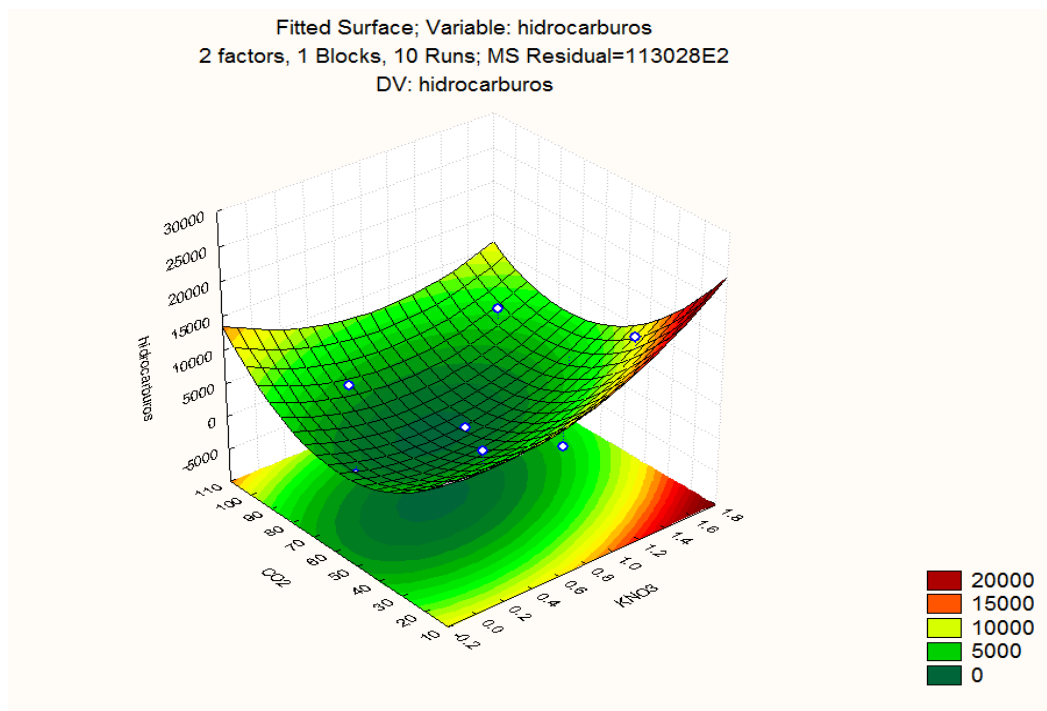
Figura 10. Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de carbohidratos.



3.3 Producción de Hidrocarburos

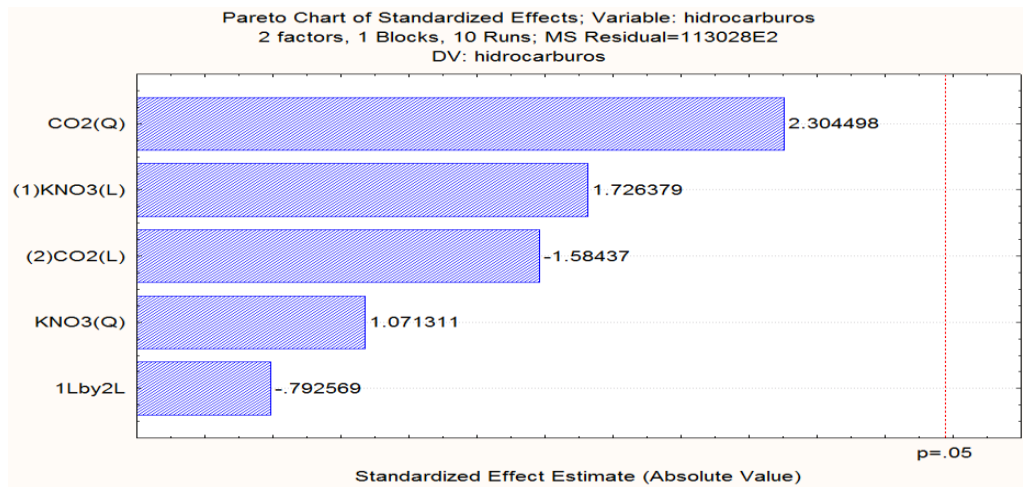
La figura 11 muestra la relación de hidrocarburos producidos para diferentes tasas de inyección de CO_2 y composiciones de KNO_3 en el cultivo. Aquí se puede observar la formación de hidrocarburos relativamente baja en inyecciones de CO_2 de 65 mL/min y composición de KNO_3 de 0,7 g/L. Las mejores tasas de producción de hidrocarburos se dan cuando las inyecciones de CO_2 son mínimas y hay gran presencia de KNO_3 en el medio. Los valores medianamente bajos de producción se dan cuando hay o muy altas o muy bajas inyecciones de CO_2 con un rango de tolerancia de nitrato relativamente alto. Es posible intuir la posibilidad de que tanto el CO_2 como el KNO_3 no son muy significativos a la hora de producir hidrocarburos, ya que la figura 11 no muestra una tendencia estable.

Figura 11. Resultados de la producción de Hidrocarburos con relación a las concentraciones de CO_2 y KNO_3 .



3.3.1 Pareto de La Producción de Hidrocarburos. Como se puede observar en la figura 12, ninguno de los aspectos que se tuvo en cuenta son significantes en la producción de hidrocarburos. A pesar de esto, la presencia de CO₂ fue el factor que más tuvo relevancia, pero igual no se tiene una significancia relativamente alta.

Figura 12. Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de hidrocarburos.

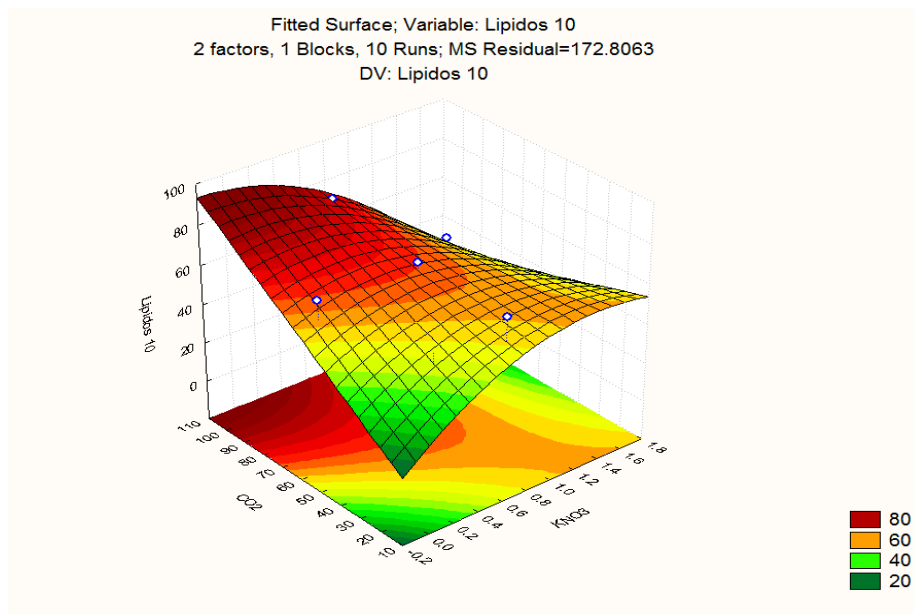


3.4 Producción de Lípidos

3.4.1 Producción de Lípidos Hasta el Día 10. Ya que la producción de lípidos es tan importante para los fines estudiados en esta experiencia, se decide hacer un estimativo de la producción para total en los 15 días y la producción de lípidos hasta el día 10. La figura 13 muestra la producción de lípidos hasta el día 10 con relación la tasa de inyección de CO₂ y la presencia de KNO₃ en el medio de cultivo. Como se puede ver, la producción de lípidos es alta (color vino tinto) en inyecciones altas de CO₂ (90 a 110 mL/min) y baja presencia de KNO₃ (0 a 0,2 g/L). La formación de lípidos se ve altamente influenciada por las inyecciones de CO₂ para el día 10, por lo que se consideraría implementar este experimento con

estas condiciones de cultivo como una optimización de la producción de lípidos en muy poco tiempo. De igual forma, se puede observar que para bajas tasas de inyección del gas hay baja producción de lípidos, sin importar el rango de KNO_3 presente en el medio.

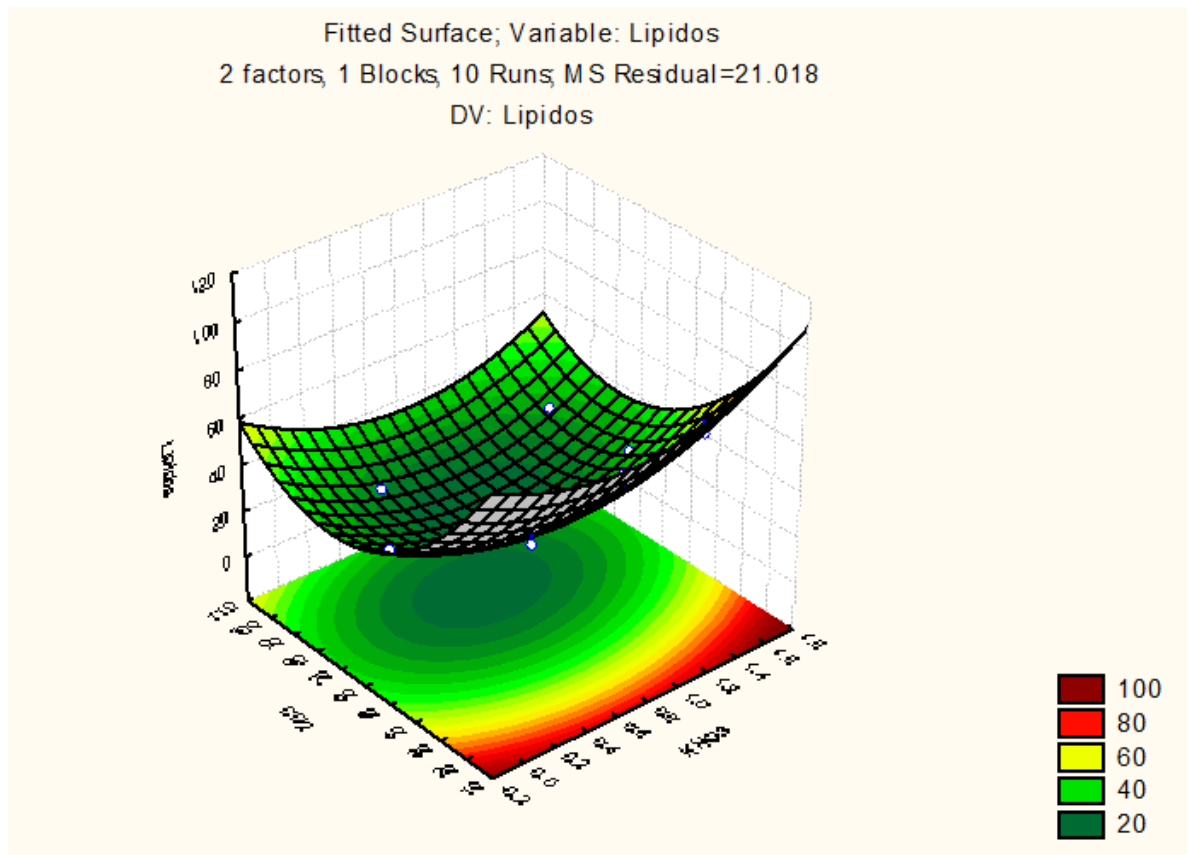
Figura 13. Resultados del día 10 de lípidos con relación a la concentración de CO_2 y KNO_3 .



3.4.2 Producción de Lípidos Total. En la figura 14, se muestra la producción de lípidos con relación la tasa de inyección de CO_2 y la presencia de KNO_3 en el medio de cultivo. A diferencia de los resultados del día 10, se puede notar la producción más alta de lípidos a bajas inyecciones de CO_2 (10 a 20 mL/min) y cualquier concentración de KNO_3 . La producción más baja da en inyecciones de CO_2 medianamente altas y una composición de KNO_3 de 0,8 g/L. Se puede observar la relación inversa entre la presencia del CO_2 y la formación de lípidos.

De igual forma, al tener una inyección media de CO₂ se obtiene cerca del 60% de lípidos, con una tasa de nitrógeno que puede ser variable ya que la gráfica muestra la gran tolerancia a la presencia de KNO₃.

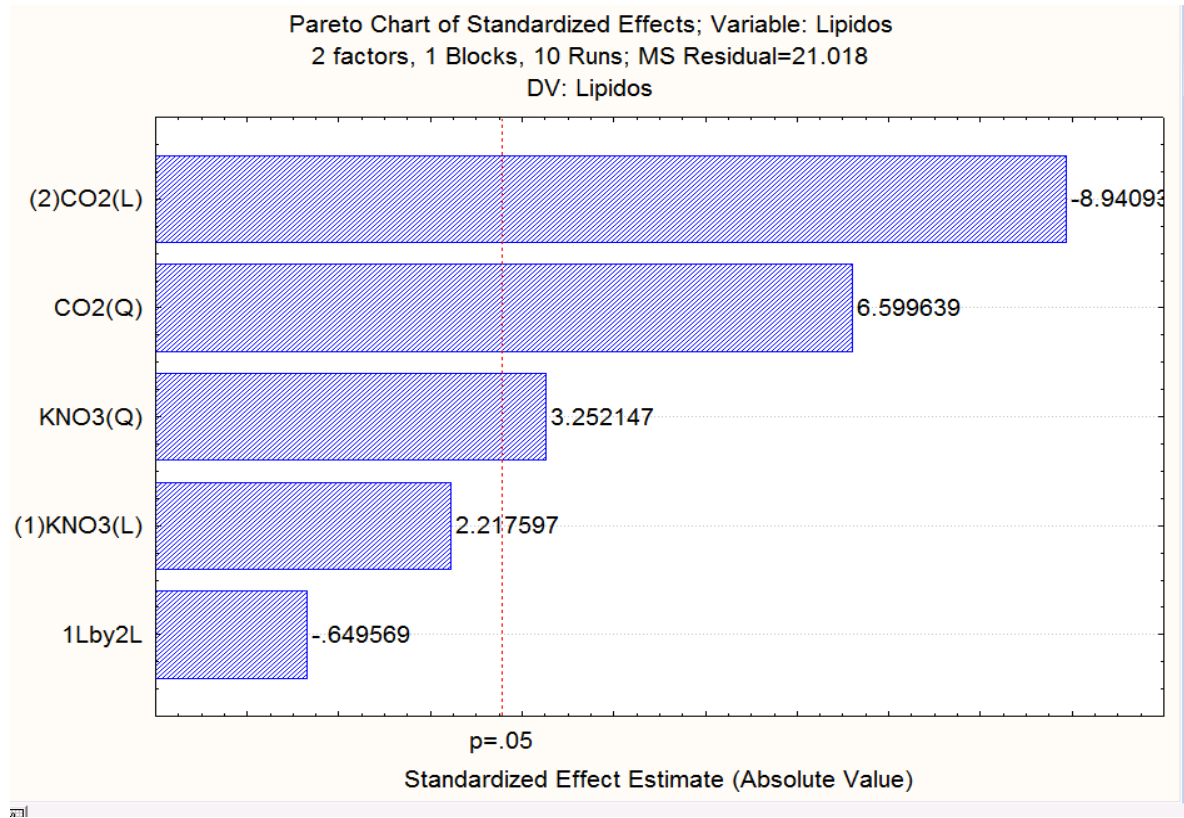
Figura 14. Resultados de lípidos totales en relación a la concentración de CO₂ Y KNO₃.



3.4.3 Pareto de la Producción de Lípidos Total. Como se puede ver en la figura 15, la presencia de CO₂ y KNO₃ son aspectos importantes en la producción de Lípidos. El símbolo negativo en la significancia de CO₂ determina la relación inversa entre la presencia de inyecciones del gas y la formación de lípidos, como ya se había mencionado anteriormente. Por otra parte, la presencia de nitrato en el medio de cultivo del alga incentiva la formación de lípidos de una forma

directamente proporcional. Es decir, la condición óptima de producción de lípidos por el *B. braunii* se presenta en alta presencia de KNO_3 y mínimas inyecciones de CO_2 .

Figura 15. Diagrama de Pareto estandarizado de la producción de lípidos total.



4 ANALISIS DE RESULTADOS ÓPTIMOS

Realizando un análisis de los experimentos anteriormente tratados se toman las condiciones de relación carbono-nitrógeno (C/N) en las que la producción de biomasa, hidrocarburos y lípidos son óptimas (con baja producción de carbohidratos) y se comparan con un cultivo del *B. braunii* en ausencia de inyección de CO₂ (Experimento CONTROL). Se tienen las siguientes condiciones:

Tabla 2. Relación óptima C/N.

REACTOR	KNO ₃ (g/L)	CO ₂ (mL/min)
Sc1	0,60	80,00
Sc2	0,40	100,00

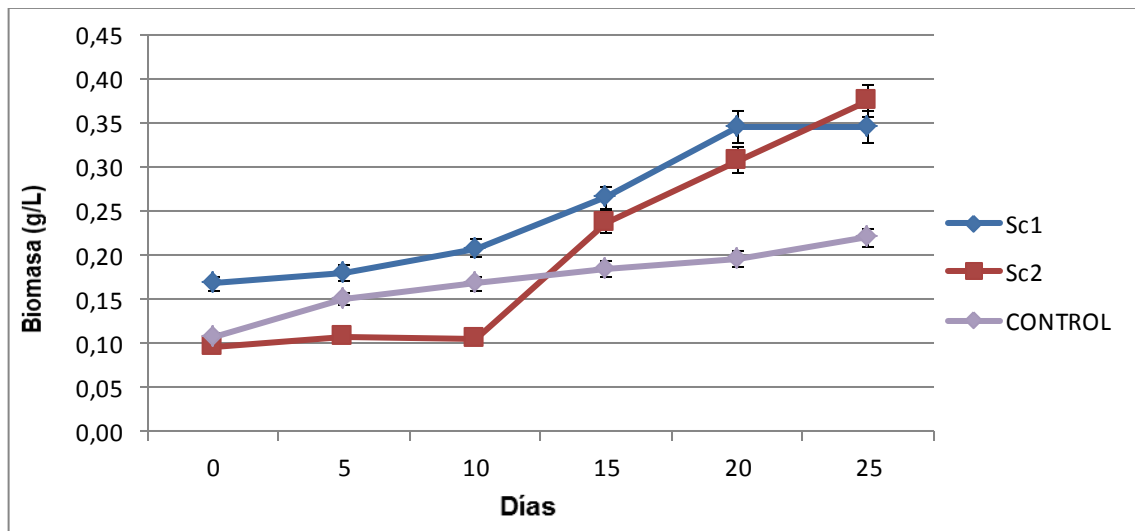
4.1 Producción de Biomasa

Como se puede observar en la figura 16 ambos experimentos (SC₁ y SC₂) presentan notable mejoramiento de la producción gracias a la inyección de CO₂. Estos cultivos se realizaron para un periodo de 25 días obteniendo valores relativamente altos de producción entre 0,37 g/L y 0,35g/L (EXP SC₂ y SC₁ respectivamente). El EXP SC₁ (con la tasa más baja de inyección de CO₂) todo el tiempo de la experiencia obtuvo mejores resultados que el EXP CONTROL, mientras que el SC₂ los primeros 10 días obtuvo tasas de producción más bajas pero mejores para los últimos 15 días.

Es considerable tener en cuenta la diferencia de la producción de biomasa con presencia de CO₂, la cual está alrededor de los 0,14 g/L aproximadamente. Ge

obtuvo una producción de 2,5 g/L de biomasa en un cultivo con una aireación de 0,2 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto) a una tasa de 20% de CO₂ de forma continua, una producción más alta pero con un gasto alto de carbono [25]. Ranga Rao obtiene una producción de biomasa de 1,4 g/L en *B. braunii* tipo A, en 18 días con grado de salinidad de 17 mM de cloruro de sodio, sin presencia de CO₂, que demuestra el efecto de la presencia salina en el aumento de producción de ácido oleico y palmítico [24]. Yoo obtiene una producción de biomasa de 26 mg/L.d a una tasa de inyección de 10% de CO₂ en *B. braunii*, mostrando la baja producción del alga pero la alta adaptabilidad a cualquier medio [26].

Figura 16. Resultado óptimo de la producción de biomasa (g/L) con relación a los días.

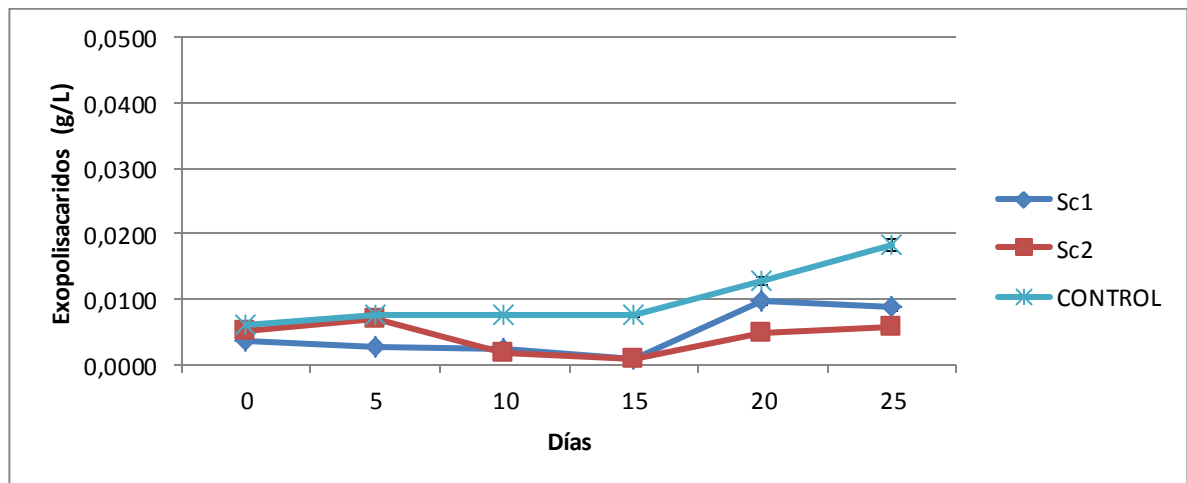


4.2 Producción de Carbohidratos

Como se puede apreciar en la figura 17 es evidente la disminución de producción de carbohidratos en cultivos con altas tasas de inyección de CO₂, obteniendo resultados entre 0,0087 g/L y 0,0057 g/L para SC₁ y SC₂ respectivamente. En

ambos experimentos se tiene menor producción de Exopolisacaridos a lo largo del tiempo. Cabe resaltar la diferencia de producción entre el CONTROL y los dos experimentos óptimos (alrededor de 0,01 g/L), así como la baja producción similar a los experimentos anteriormente analizados (EXP H).

Figura 17. Resultado óptimo de la producción de carbohidratos (g/L) con relación a los días.



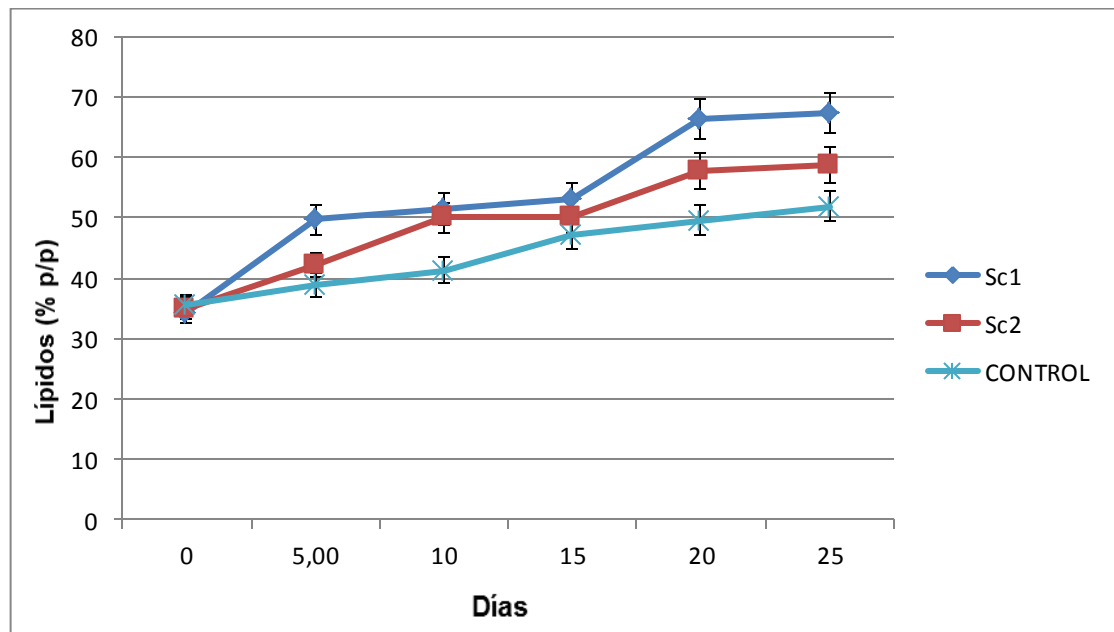
Ranga Rao en su experimento obtiene una producción de carbohidratos de 2,8 g/L, cifra que muestra lo peligroso que puede ser para el cultivo la presencia salina porque aumenta la presencia de agentes patógenos [24]. Yoo muestra la buena compatibilidad de la microalga en producción de biocombustibles gracias a su bajo contenido de hidrocarburos, al compararla con *C. vulgaris* y *Scenedesmus sp.* [26].

4.3 Producción de Lípidos

La producción de lípidos se encontró mejorada en un 10% con relación al cultivo CONTROL. Como se aprecia en la figura 18, el experimento SC₁ con una

presencia de nitrógeno de 0,6 (g/L de KNO_3) y una inyección de CO_2 de 80 (mL/min) muestra el mayor porcentaje peso a peso de producción (67,26%). Es el primer caso en que el EXP SC_1 obtiene mejores resultados que el EXP SC_2 . Sin embargo, ambos experimentos obtienen mejores resultados de producción en relación al CONTROL en los 25 días. Es notable observar el aumento en la producción entre el día 15 y el día 25.

Figura 18. Resultado óptimo de la producción de lípidos (%p/p) con relación a los días.

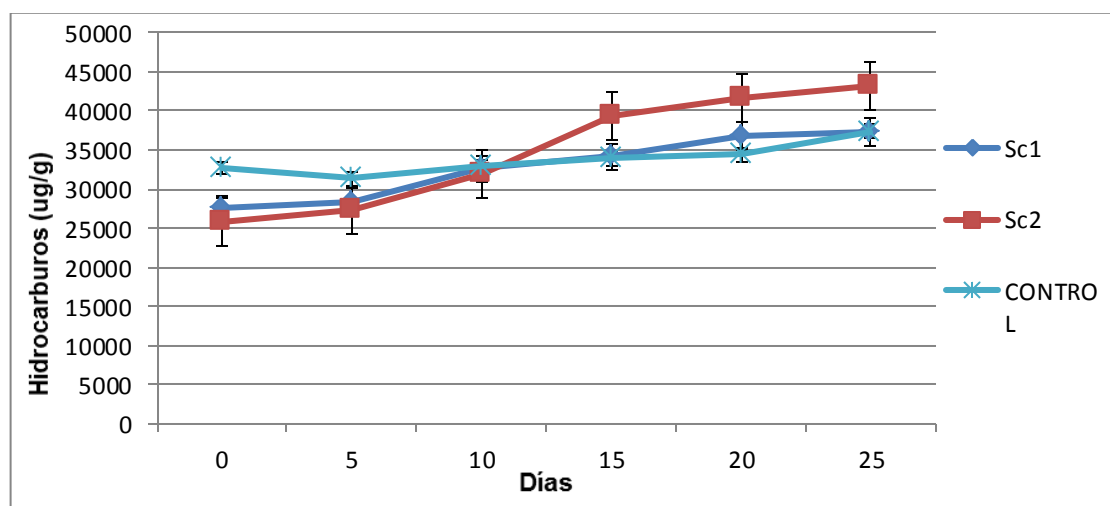


Yoo obtiene en su experimento una productividad de lípidos en *B. braunii* de 5,51 mg/L, con una inyección de 10% de CO_2 de manera continua, destacando la alta producción del alga de ácidos grasos [26]. Ge obtiene tan solo 12,71% p/p de lípidos con un 20% de inyección de CO_2 (aireación de 0,02 vvm) en el día 25 [25].

4.4 Producción de Hidrocarburos

La producción de hidrocarburos estuvo comprendida entre 37368,42 ug/g y 43217,07 ug/g. Como se puede ver en la figura 19, antes del décimo día la producción de los experimentos óptimos es más baja, y los siguientes 15 días asciende y se mantiene similar a la del CONTROL. El experimento SC₂ obtiene mejores resultados con una diferencia de 6000 ug/g, lo que lo consolida como el mejor productor tanto de hidrocarburos como de biomasa y carbohidratos para los fines de esta experiencia. El experimento SC₁ obtiene una producción igual a la del CONTROL, lo que demuestra que la inyección de CO₂ no afecta la producción de hidrocarburos significativamente, como ya se había hecho mención anteriormente.

Figura 19. Resultado óptimo de la producción de Hidrocarburos (ug/g) con relación a los días.



Ge obtiene en el experimento mencionado anteriormente una producción de hidrocarburos de 24,45% p/p con aireación continua del 20% para un periodo de 25 días [25]. De igual forma, Ranga Rao obtiene un 28% p/p de productividad de hidrocarburos en su experimento salino de 18 días [24]. Yoshimura considera que

1% de aireación de CO₂ debe ser burbujeado en el medio para obtener el crecimiento óptimo de la cepa [30]. Wolf asegura que las condiciones óptimas de CO₂ para producción de hidrocarburos difieren entre las cepas [9].

5 CONCLUSIONES

Es notable la afinidad de la micro-alga *Botryococcus braunii* para la producción de biocombustibles, gracias a la alta producción de lípidos, alta composición de hidrocarburos y baja producción de carbohidratos. La micro-alga es considerada capaz de crecer en diferentes medios, en presencia de ambientes salinos, aguas contaminadas o en ausencia de nutrientes.

El *B.braunii* es muy buena productora de hidrocarburos pero a un ritmo lento. Las inyecciones de CO₂ aceleran este crecimiento y mejoran el rendimiento de la producción, dándole una mayores eficiencias en corto tiempo y sin un gasto excesivo del carbono usado.

La presencia del carbono en el *B. braunii* causa una caída en el pH del cultivo, el cual debe ser controlado con el fin de evitar la muerte celular y disminuir el rendimiento de producción; Como se puede observar en las comparaciones, dicho rendimiento aumenta si se trabaja de forma continua, lo cual también representa mayor uso de dióxido de carbono.

La relación Carbono-Nitrógeno suministrado al cultivo es muy importante porque ésta afecta directamente la producción de lípidos e hidrocarburos, el hecho de que proporcione una alta inyección de CO₂ sin tener en cuenta la relación con el nitrato no garantiza un excelente rendimiento.

6 RECOMENDACIONES

Es conveniente realizar experimentos de forma discontinua con el *B. braunii* en ambientes salinos.

Debido al alto consumo de agua y la escasez que atraviesa nuestro país de este importante mineral, sería conveniente realizar experimentos con aguas residuales. La buena adaptabilidad de *B. braunii* a medios extremos es una ventaja que puede ser aprovechada con el fin de ahorrar el agua potable que aún tenemos.

7 CITAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Knothe, G. (2007) Some aspects of biodiesel oxidative stability. *Fuel Process. Technol.* 88: 669–677.
- [2] Metzger, P. & Largeau, C. (2005) *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 486–496.
- [3] Moldowan JM, Seifert WK. First discovery of botryococcene in petroleum. *JCS Chem. Comm.* 1980; 19: 912–914.
- [4] Lichtenthaler HK. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1999; 50, 47–65.
- [5] Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U.C. (2002) *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22: 245–279.
- [6] Sato Y, Ito Y, Okada S, Murakami M, Abe H. Biosynthesis of the triterpenoids, botryococcones and tetramethylsqualene in the B race of *Botryococcus braunii* via the non-mevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.* 2003; 44, 7035–7037.
- [7] Casadevall E, Dif D, Largeau C, Gudin C, Chaumont D, Desanti O. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition. *Biotechnol. Bioeng.* 1985; 27, 286–295.
- [8] Largeau C, Caradevall E, Berkaloff C, Dhamliencourt P. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochem.* 1980; 19:1043–51.
- [9] Wolf FR, Nanomura AM, Bassham JA. Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii*. *J. Phycol.* 1985; 21: 388–396.
- [10] Cheng L, Zhang L, Chen H, Gao C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separ Purific Technol.* 2006; 50:324–9.

- [11] Bilanovic D, Andargatchew A, Kroeger T, Shelef G. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N Concentrations – Response surface methodology analysis. *En Cons Manag.* 2009; 50: 262-67.
- [12] Mazzuca Sobczuk T, Garcia Camacho F, Camacho Rubio, Acien Fernandez FG, Molina Grima E. Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 2000; 67:465–475.
- [13] Papazi A, Makridis P, Divanach P, Kotzabasis K. Bioenergetic changes in the microalgal photosynthetic apparatus by extremely high CO₂ concentrations induce an intense biomass production. *Physiol. Plant.* 2008; 132: 338-349.
- [14] Jeong ML, Gillis, JM, Hwang JY, Carbon Dioxide Mitigation by Microalgal Photosynthesis, *Bull. Korean Chem. Soc.* 2003; 24(12): 1763-66.
- [15] De-Morais MG, Costa JA. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 2007a; 129, 439–45.
- [16] Molina Grima E, Garcia Camacho F, Sanchez Perez JA, Urda Cardona J, Acien Fernandez FG, Fernandez Sevilla JM. 1994. Outdoor chemostat culture of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in a tubular photobioreactor for the production of eicosapentaenoic acid. *Biotechnol Appl Biochem.* 1994; 20:279–290.
- [17] Eriksen NT, Poulsen BR, Iversen JJ. Dual sparging laboratory-scale photobioreactor for continuous production of microalgae. *Journal of Applied Phycology.* 1998; 10:377–382.
- [18] Garcia-Sanchez JL, Berenguel M, Rodriguez F, Fernandez-Sevilla JM. Brindley-Alias C. Acien Fernandez FG. Minimization of Carbon Losses in Pilot-Scale Outdoor Photobioreactors by Model-Based Predictive Control. *Biotechnol Bioeng.* 2003; 84(5): 533-543.
- [19] Beneman JR, Tillett DM, Weissman JC. Microalgae biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1987; 5:47– 53.

- [20] Olaizola M, Duerr EO, Freeman DW. Effect of CO₂ enhancement in an outdoor algal production system using *Tetraselmis*. *J Appl Phycol*. 1991; 3:363–366.
- [21] Oswald JA. Large-scale algal culture systems (engineering aspects). In: Borowitzka LJ, Borowitzka MA, editors. *Microalgal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press. 1988; p 357–395.
- [22] Tapie P, Bernard A. Microalgae production technical and economic evaluations. *Biotechnol Bioeng*. 1988; 32:873–885.
- [23] Rados S, Vaclav B, Frantisek D. CO₂ balance in industrial cultivation of algae. *Arch Hydrobiol*. 1975; 46(suppl):297–310.
- [24] Ranga Rao, A., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R. & Ravishankar, G.A. (2007) Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol*. 98: 560–564
- [25] Ge Y, Liu J, Tian G. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. *Bioresource Technology* 2011; 102:130–134.
- [26] Yoo, C., Jun, S.Y., Lee, J.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresour. Technol*. 101, 71–74.
- [27] Chiu SY., Kao CY, Chen CH, Kuan TC, Ong SC, Lin, CS. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Biores. Technol*. 2008 ; 99 : 3389–96
- [28] Ryo Honda, Jarungwit Boonnorat, Chart Chiemchaisri, Wilai Chiemchaisri, Kazuo Yamamoto. Carbon dioxide capture and nutrients removal utilizing treated sewage by concentrated microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. *Bioresource Technology* 125 (2012) 59–64.
- [29] Moheimani R. Navid, Doana C Quang, Lewisa M. David. Corrigendum to “Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus” [*Biomass Bioenergy* 46 (2012) 79–88]

[30] T. Yoshimura, Okada S. Honda M. Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: Optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. Central Research Institute of Electric Power Industry, 1646 Abiko, Chiba 270-1194, Japan. *Bioresource Technology* 133 (2013) 232–239

BIBLIOGRAFIA

BANERJEE, A., SHARMA, R., CHISTI, Y. & BANERJEE, U.C. Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. En: Crit. Rev. Biotechnol. 2002. vol 22, p. 245–279.

DE-MORAIS, M., COSTA, J., Biofixation of carbon dioxide by Spirulina sp and Scenedesmus obliquus cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. En: J. Biotechnol. Febrero, 2007a. vol 129, p. 439–445.

GE, Y., LIU, J., TIAN, G. Growth characteristics of Botryococcus braunii 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. En: Bioresource Technology. Junio, 2011. vol 102, p. 130–134.

HONDA, R., JARUNGWIT Boonnorat, CHIEMCHAISRI, C., CHIEMCHAISRI, Wilai, YAMAMOTO, Kazuo. Carbon dioxide capture and nutrients removal utilizing treated sewage by concentrated microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. En: Bioresource Technology. Septiembre, 2012. vol 125, p. 59–64.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. En: Fuel Process. Technol. Julio 2007. vol 88, no. 7, p. 669–677.

LARGEAU, C., CARADEVALL, E., BERKALOFF, C., DHAMLIENCOURT, P. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in Botryococcus braunii. En: Phytochem. Agosto, 1980. vol 19, p. 1043–1051.

MAZZUCA, Sobczuk, GARCIA, F., CAMACHO, R., ACIEN, G., MOLINA GRIMA, E. Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. En: Biotechnol Bioeng. Marzo, 2000. vol 67, p. 465–475.

METZGER, P. & LARGEAU, C. Botryococcus braunii: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. En: Appl. Microbiol. Biotechnol. Mayo 2005. vol 66, no. 4, p. 486–496.

MOHEIMANI, R., NAVID, Doana, QUANG, C., LEWISA, M. David. Corrigendum to “Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus”. En: Biomass Bioenergy. Mayo, 2012. vol 46, p. 79–88.

RANGA RAO, A., DAYANANDA, C., SARADA, R., SHAMALA, T.R. & RAVISHANKAR, G.A. Effect of salinity on growth of green alga Botryococcus braunii and its constituents. En: Bioresour. Technol. Junio, 2007. vol 98, p. 560–564.

WOLF, F., NANOMURA, A., BASSHAM, J. Growth and branched hydrocarbon production in a strain of Botryococcus braunii. En: J. Phycol. Febrero, 1985. vol 21, p. 388–396.

YOO, C., JUN, S.Y., LEE, J.Y., AHN, C.Y., OH, H.M. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. En: Bioresour. Technol. Abril, 2010. vol 101, p. 71–74.

YOSHIMURA, T., OKADA S. HONDA M. Culture of the hydrocarbon producing microalga Botryococcus braunii strain Showa: Optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. En: Bioresource Technology. Enero, 2013. vol 133, p. 232–239.