

**DISEÑO CONCEPTUAL DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE MICROALGA
Botryococcus braunii EN FOTOBIOREACTORES COMO MATERIA PRIMA
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA
GENERACIÓN**

**ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO
CÓDIGO: 2107507**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA
2016**

**DISEÑO CONCEPTUAL DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE MICROALGA
Botryococcus braunii EN FOTOBIOREACTORES COMO MATERIA PRIMA
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA
GENERACIÓN**

ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO
CÓDIGO: 2107507

**Trabajo de grado presentado como
requisito (parcial) para optar por al título de
Ph.D en Ingeniería Química**

Directores:

VIATCHESLAV KAFAROV

ALEXANDER GUZMÁN MONSALVE

Instituto Colombiano del Petroleo ICP-ECOPETROL.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA**

2016

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. HIPÓTESIS	28
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GENERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS, AVANCE Y DESARROLLOS EN LA UIS	31
4. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA CEPA DE <i>B.</i> <i>braunii</i> Y ANALISIS DE SU AMBIENTE.	35
4.1 INTRODUCCIÓN	35
4.2 METODOLOGIA	37
4.2.1 Muestreo del lago	37
4.2.2 Pre-concentración de colonias y asilamiento	38
4.2.3 Caracterización físico-química del lago	39
4.2.4 Producción de biomasa y selección de medio de cultivo	39
4.2.5 Efecto concentración celular inicial	40
4.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.	40
4.3.1 Método A: Biomasa seca con Blight & Dyer (1959)	40
4.3.2 Método B: Borowitzka & Moheimani (2013)	41
4.3.3 Método C: Biomasa húmeda con modificación a Eroglu & Mellis (2010)	41
4.3.4 Cuantificación de hidrocarburos (Eroglu & Melis, 2010)	42
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.4.1 Aislamiento y caracterización del lago	42
4.4.2 Caracterización del medio	46
4.4.3 Selección medio de cultivo para la nueva cepa	47
4.4.4 Eficiencia extracción de lípidos e hidrocarburos	55

4.4.5 Efecto concentración celular inicial	55
4.5 CONCLUSIONES	56
5. EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y CARBONO EN LA PRODUCCIÓN DE <i>B. braunii</i> .	58
5.1 INTRODUCCIÓN	58
5.2 METODOLOGÍA	59
5.2.1 Fuente de Nitrógeno y Carbono	59
5.3 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS	60
5.3.1 Crecimiento celular (peso seco) (Moheimani et al. 2013)	60
5.3.2 Cuantificación de Lípidos totales (Biomasa húmeda con modificación a Eroglu & Mellis (2010)	61
5.3.3 Cuantificación de hidrocarburos (Eroglu & Melis, 2010)	61
5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5.4.1 Producción de biomasa variando la fuente de nitrógeno.	61
5.4.2 Producción de lípidos e hidrocarburos variando la fuente de nitrógeno	63
5.4.3 Producción de biomasa variando la fuente de carbono	65
5.5 CONCLUSIONES	68
6. EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE <i>B. braunii</i> .	70
6.1 INTRODUCCIÓN	70
6.2 METODOLOGÍA	72
6.2.1 Mejoramiento de la relación carbono/nitrógeno	72
6.3 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS	74
6.3.1 Crecimiento celular (peso seco) (Moheimani et al., 2013)	74
6.3.2 Cuantificación exopolisacaridos (Dubois et al., 1956)	75
6.3.3 Cuantificación de Lípidos totales (Biomasa húmeda con modificación a Eroglu & Mellis (2010)	75
6.3.4 Cuantificación de hidrocarburos (Eroglu & Melis, 2010)	75
6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	76
6.4.1 Producción de biomasa empleando Na ₂ CO ₃	76

6.4.2 Producción de biomasa empleando CO ₂	77
6.4.3 Producción de Lípidos e hidrocarburos empleando Na ₂ CO ₃	78
6.4.4 Producción de Lípidos e hidrocarburos empleando CO ₂	80
6.5 CONCLUSIONES	96
7. ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE <i>B. BRAUNII</i> Y DISEÑO CONCEPTUAL PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS EN COLOMBIA	98
7.1 INTRODUCCIÓN	98
7.2 METODOLOGÍA	99
7.2.1 Escalamiento del cultivo	99
7.2.2 Crecimiento celular (peso seco) (Moheimani et al. 2013)	100
7.2.3 Cuantificación de Lípidos totales (Biomasa húmeda con modificación a Eroglu & Mellis (2010)	100
7.2.4 Cuantificación de hidrocarburos (Eroglu & Melis, 2010)	101
7.2.5 Variables diseño conceptual	101
7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
7.3.1 Diseño conceptual de producción	104
7.4 CONCLUSIONES	111
CONCLUSIONES GENERALES	113
BIBLIOGRAFÍA	116

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Concentración de Carbohidratos (% p/p).	32
Figura 2. Contenido lipídico en las cepas seleccionadas (% p/p).	33
Figura 3. Lago sin Bloom, Agosto 2012 (izquierda) y con Bloom Marzo 2013 (Derecha)	43
Figura 4. Concentración de biomasa (g/L) en los diferentes muestreos	44
Figura 5. Concentración de biomasa (g/L) en los diferentes muestreos	44
Figura 6. Colonias cambiando de estado latente (rojo) a activo (verde) (Izquierda) e Individuos pertenecientes al género <i>Chlorococcum</i> sp (Derecha).	45
Figura 7. Placa axénica de <i>B. braunii</i> (Izquierda) y colonia de <i>B. braunii</i> (Derecha).	45
Figura 8. Producción de biomasa de <i>B. braunii</i> bajo diferentes medios de cultivo.	48
Figura 9. Producción de Lípidos de <i>B. braunii</i> bajo diferentes medios de cultivo.	49
Figura 10. Producción de hidrocarburos de <i>B. braunii</i> bajo diferentes medios de cultivo.	50
Figura 11. Producción de Biomasa de <i>B. braunii</i> para el medio modificado.	52
Figura 12. Producción de lípidos de <i>B. braunii</i> para el medio modificado.	52
Figura 13. Producción de hidrocarburos de <i>B. braunii</i> para el medio modificado.	53
Figura 14. Producción de Biomasa de <i>B. braunii</i> para diferentes concentraciones iniciales de biomasa.	54
Figura 15. Extracción de lípidos empleando los métodos: A. Blight & Dyer, B. Borowitzka & Moheimani y C. biomas húmeda modificado de Eroglu & Melis.	55

Figura 16. Extracción de hidrocarburos empleando los métodos: A. Blight & Dyer, B. Borowitzka & Moheimani y C. biomas húmeda modificado de Eroglu & Melis	56
Figura 17a. Producción de biomasa variando la fuente de Nitrógeno.	62
Figura 17b. Concentración de biomasa variando la fuente de Nitrógeno.	63
Figura 18a. Concentración de Lípidos totales e hidrocarburos variando la fuente de Nitrógeno.	64
Figura 18b. Concentración de Lípidos totales e hidrocarburos variando la fuente de Nitrógeno.	64
Figura 19a. Producción de biomasa variando concentración de NaHCO_3 .	65
Figura 19b. Producción de biomasa variando concentración de Na_2CO_3	66
Figura 19c. Producción de biomasa variando concentración de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$.	67
Figura 20. Producción de lípidos totales e Hidrocarburos según la fuente de carbono.	68
Figura 21. Producción de biomasa empleando Na_2CO_3 .	76
Figura 22. Producción de biomasa CO_2 Continuo.	77
Figura 23. Producción de biomasa CO_2 Semi-continuo.	78
Figura 24. Producción de Lípidos	78
Figura 25. Superficie de respuesta para la producción de hidrocarburos	80
Figura 26. Producción de Lípidos CO_2 Continuo.	80
Figura 27. Producción de Lípidos CO_2 Semi-continuo	81
Figura 28. Producción de Hidrocarburos CO_2 Continuo	82
Figura 29. Producción de Hidrocarburos CO_2 Semi-continuo.	83
Figura 30a. Superficie de respuesta, producción biomasa CO_2 Continuo	84
Figura 30b. PARETO, producción biomasa CO_2 Continuo.	84
Figura 31a. Superficie de respuesta, producción biomasa CO_2 Semi-continuo.	85
Figura 31b. PARETO, producción biomasa CO_2 Semi-continuo.	85
Figura 32a. Superficie de respuesta, producción Lípidos CO_2 Continuo	86
Figura 32b. PARETO, producción Lípidos CO_2 Continuo	86
Figura 33a. Superficie de respuesta, producción Lípidos CO_2 Semi-continuo.	87

Figura 33b. PARETO, producción Lípidos CO ₂ Semi-continuo.	87
Figura 34a. Superficie de respuesta, producción Hidrocarburos CO ₂ Continuo	88
Figura 34b. PARETO, producción Hidrocarburos CO ₂ Continuo	88
Figura 35a. Superficie de respuesta, producción Hidrocarburos CO ₂ Semi-continuo.	89
Figura 35b. PARETO, producción Hidrocarburos CO ₂ Semi-continuo.	89
Figura 36. Superficie de respuesta para la producción de Carbohidratos	90
Figura 37. Producción de biomasa empleando relaciones C/N mejoradas.	92
Figura 38. Producción de lípidos empleando relaciones C/N mejoradas.	92
Figura 39. Producción de Hidrocarburos empleando relaciones C/N mejoradas.	93
Figura 40. Producción biomasa, optimización CO ₂ .	94
Figura 41. Producción Lípidos, optimización CO ₂ .	95
Figura 42. Producción Hidrocarburos, optimización CO ₂ .	96
Figura 43. Producción de biomasa en sistemas abiertos 40 L volumen.	102
Figura 44. Concentración de lípidos en sistemas abiertos 40 L volumen.	103
Figura 45. Concentración de hidrocarburos en sistemas abiertos 40 L volumen.	104
Figura 46. Costo de producción total y venta de la biomasa.	105
Figura 47. Efecto de la producción (kg/m ³) sobre el precio final.	106
Figura 48. Costo de producción total y venta de la biomasa para 0.6 kg/m ³ .	107
Figura 49. Porcentaje de valor de cada uno de los elementos en la producción.	108
Figura 50. Porcentaje de consumo energético (kwh) de cada uno de los procesos.	109
Figura 51. Costo de producción total y venta de la biomasa para 300 Ton/día.	110

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Elementos analizados en la laguna divididos por marco y micronutrientes, además de otras variables de importancia	46
Tabla 2. Comparación de los medios más empleados para el cultivo de <i>B. braunii</i> .	47
Tabla 3. Producción de hidrocarburos de <i>B. braunii</i> bajo diferentes medios de cultivo.	51
Tabla 4. Producción y productividad de biomasa para diferentes concentraciones iniciales de biomasa	54
Tabla 5. Concentraciones de Nitrógeno.	60
Tabla 6. Concentraciones de Carbono.	60
Tabla 7. Diseño de experimentos para el mejoramiento de la relación Carbono/Nitrógeno	73
Tabla 8. Concentraciones de CO ₂ y KNO ₃ a evaluar en el diseño de experimentos	73
Tabla 9. Diseño de Experimentos 2 ³	74
Tabla 10. Mejores concentraciones de la relación Carbono/Nitrógeno.	91
Tabla 11. Variables seleccionadas para el mejoramiento	94
Tabla 12. Variables para el cultivo en Open Pond.	105
Tabla 13. Variables para el cultivo en Open Pond para 0.6 kg/m ³ .	107
Tabla 14. Variables para el cultivo en Open Pond para 300 Ton/día.	111

RESUMEN

TITULO: DISEÑO CONCEPTUAL DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE MICROALGA *Botryococcus braunii* EN FOTOBIOREACTORES COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA GENERACIÓN*.

AUTORES: Andrés Fernando Barajas Solano**

PALABRAS CLAVES: *Botryococcus braunii*, Biocombustibles, Sistemas de cultivo.

DESCRIPCIÓN: *Botryococcus braunii* es una microalga con características especiales que la convierten en una microalga promisoría para la producción de biocombustibles. En el presente trabajo se presenta el aislamiento, caracterización y optimización de las variables de cultivo para una nueva cepa de *B. braunii* aislada en Colombia. Se obtuvo un nuevo medio de cultivo, con el cual es posible obtener hasta 0.7 g/L y una productividad de $0.028 \text{ g/L} \cdot \text{d}^{-1}$ en un periodo de 25 días con una concentración de lípidos e hidrocarburos de 41% y 9% (p/p); por otra parte se pudo comprobar que al aumentar la concentración inicial de biomasa inoculada (de 0.08 a 0.4 g/L) la productividad no se ve afectada, además se encontró que la mejor fuente de nitrógeno fue el nitrato de potasio y la mejor fuente de carbono inorgánico fue el carbonato de sodio, sin embargo al optimizar la relación de estos dos los contenidos finales de hidrocarburos y lípidos totales fueron inferiores (menos del 20%). Por otra parte, al emplear CO_2 las concentraciones de lípidos totales e hidrocarburos aumentaron considerablemente en relación con la otra fuente de carbono. Por último, los resultados obtenidos a partir de la implementación de la calculadora EnAlgae Open Pond permiten conocer el posible costo de implementación y operación de sistemas abiertos para el cultivo de *B. braunii* en las condiciones tanto de Barrancabermeja como de Cartagena, se resalta que con un costo de producción de biomasa de € 2.81 y una producción de $0,6 \text{ kg/m}^3$ es posible tener una tasa de retorno de 0.1 años con una producción de 93936 Ton/año de biomasa y una inversión cercana de € 261 Millones.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingeniería Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Viatcheslav Kafarov.

ABSTRACT

TITLE: CONCEPTUAL DESIGN OF *Botryococcus braunii* PRODUCTION SYSTEM AS RAW MATERIAL FOR THIRD GENERATION BIOFUELS*.

AUTHOR: Andrés Fernando Barajas Solano**

KEYWORDS: *Botryococcus braunii*, Biocombustibles, Sistemas de cultivo.

DESCRIPTON: *Botryococcus braunii* is a microalgae with special features that make it a promising source for biofuels production. In this paper, the isolation, characterization and optimization of culture variables for a new Colombian strain of *B. braunii* is presented. a new culture medium was obtained, with which it is possible to obtain up to 0.7 g/L and a productivity of 0.028 g/L*d⁻¹ in a period of 25 days with an oily lipid concentration of 41% and 9% (w/w); Moreover it was found that increasing the initial concentration of inoculated biomass (from 0.08 to 0.4 g/L) productivity is not affected; in addition it was found that the best source of nitrogen was potassium nitrate and best source of inorganic carbon was sodium carbonate, however by optimizing the ratio of these two final content of hydrocarbons and total lipids were lower (less than 20%). Moreover, when using CO₂ concentrations of total lipids and hydrocarbons increased considerably compared with another carbon source. Finally, the results obtained from the implementation of the EnAlgae Open Pond calculator provide information about the potential cost of implementation and operation of open systems for the cultivation of *B. braunii* in the conditions of both Barrancabermeja and Cartagena, also results highlights that with a biomass production cost of €2.81 and an output of 0.6 kg/m³ is possible to have a payment return of 0.1 years with an output of 93936 tons/year of biomass and an investment of €261 million.

* Research project

** Physical-Chemical Engineering College. Chemical Engineering Department. Advisor: Ph.D. Viatcheslav Kafarov.

INTRODUCCIÓN

Biocombustibles a partir de microalgas. En un mundo donde los requerimientos económicos para la expansión cambian rápidamente, el petróleo se encuentra en el centro de estos cambios; para países como China y otros, las fuentes del petróleo son el factor dominante en sus economías (Song *et al.*, 2008), en las últimas décadas, el consumo anual energético se ha incrementado en cerca de 14 TW (Anamaet *et al.*, 2010) y se espera que este consumo se incremente significativamente debido al desarrollo económico de naciones emergentes (Anamaet *et al.*, 2010), ya que la mayor parte de la energía se deriva de fuentes fósiles, en particular del crudo. La explotación de recursos no convencionales mediante tecnologías como el “fracking” han permitido en el ultimo año a Estados Unidos inclinar la balanza energética mundial a su favor, reduciendo sustancialmente durante el 2014 el precio mundial del petróleo; sin embargo cabe resaltar que aun así el congreso y la Organización de biomasa de microalgas en conjunto con la Asociación industrial para el comercio de microalgas están buscando mecanismos políticos a largo plazo (deducción de impuestos y otras alternativas) para hacer competitivo los diferentes sub-productos obtenibles a partir de microalgas (<http://www.algaebiomass.org/press/8447/algae-biomass-organization-welcomes-house-extension-of-biofuels-tax-credit-calls-for-long-term-solution/>), convirtiendo a los Estados Unidos en uno de los pocos países con políticas energéticas a largo plazo. Otro de los puntos mas problemáticos sobre la implementación de combustibles fósiles es la generación de Gases de Efecto Invernadero (GEI) como el CO₂ (Bilanovic *et al.*, 2009; Chinnasamy *et al.*, 2009), cuyas emisiones anuales aumentaron un 80% entre 1970 y 2004, afectando la estabilidad económica, social y ambiental del planeta (Loera-Quesada & Olguín, 2010). Por ello su mitigación y utilización se han estudiado de manera considerable (Jeong *et al.*, 2003).

Tal vez, la única forma realística para afrontar este problema es encontrar (una combinación de) fuentes de energía renovables, las cuales cubran la demanda mundial mientras limitan la emisión de CO₂. De esta manera, una opción viable, y complementaria con diferentes esfuerzos para la producción de combustibles líquidos para transporte es mediante la implementación de material producido a partir de procesos fotosintéticos, esto se debe a que los combustibles derivados de estos procesos son neutrales en la emisión de CO₂, por lo cual este gas derivado de la combustión de este tipo de combustibles nunca será mayor que la utilizada por los organismos fotosintéticos para crecer y producir este combustible. Existen diferentes candidatos que pueden desplazar a los combustibles fósiles con la intención de eliminar la actual vulnerabilidad del sector energético (Singh *et al.*, 2010). Los biocombustibles derivados de cultivos son fuente de grandes controversias debido a la competencia entre la alimentación y los combustibles; a diferencia, las algas pueden crecer en aguas de baja calidad (aguas residuales) o agua de mar, además no utilizan tierras cultivables (Singh *et al.*, 2010).

Las microalgas por ser fuente de recursos de alto valor son de gran interés en diferentes áreas de la biotecnología como: nutrición, acuacultura, farmacéuticos y biocombustibles. Enlazar este tipo de cultivos con la bio-fijación de CO₂, tiene el potencial, no sólo para reducir los costos en la obtención de productos de valor agregado (Biodiesel y otros) (Jeong *et al.*, 2003; Moráis & Costa, 2007), sino también la compensación de las emisiones de carbono (Beneman & Hughes, 1997); sin embargo, la baja productividad total del cultivo impide su producción a gran escala, esto se debe a que en la mayoría de configuraciones de los fotobiorreactores no hay una incidencia uniforme de luz, limitando así la fijación de dióxido de carbono y por consiguiente la velocidad de crecimiento de las microalgas (Ugwu *et al.*, 2008). Por esto se ha implementado el uso de cultivos mixotróficos de microalgas que además de hacer fotosíntesis pueden crecer mediante el uso de sustratos orgánicos como fuente de energía y de carbono para

el crecimiento celular. Estos sustratos pueden proporcionar la energía necesaria en situaciones de limitación de luz.

Secuestro de CO₂ empleando microalgas. Las microalgas son un grupo de microorganismos unicelulares o multicelulares simples las cuales representan alrededor del 0,5% de la biomasa global y son las responsables del 70% del oxígeno neto en la tierra, además poseen una alta tasa de crecimiento, siendo entre 10 a 50 veces más eficientes en fijación de CO₂ que las plantas terrestres (Costa *et al.*, 2000).

El secuestro biológico de CO₂ empleando microalgas fotosintéticas ha recibido considerable atención en los últimos años, ya que poseen altas tasas de fijación y genera grandes cantidades de biomasa renovable. En teoría estos microorganismos pueden usar hasta el 9% de la energía solar incidente para producir 280 toneladas de biomasa seca por hectárea por año mientras que secuestra/consume un total de 513 toneladas de CO₂; sin embargo el merito de la bio-mitigación del CO₂ radica primariamente en el hecho de que la biomasa producida durante el proceso de fijación de CO₂ puede ser convertida eficientemente en biocombustibles para la producción de energía lo que haría sostenible su implementación (Wang *et al.*, 2008).

Para su crecimiento las Microalgas necesitan dos cosas: una es la fuente de carbono (normalmente en forma de CO₂), otra es la fuente de energía, en este caso la luz, pero no cualquier luz, sino aquella conocida como la radiación fotosintéticamente activa (o PAR de sus siglas en inglés) (Lee 1999, Csogor *et al.*, 2001). El suministro y el control eficiente de estos parámetros definen la producción final (Van Hermelen *et al.*, 2006). La fotosíntesis es un proceso que comprende 2 etapas: una comprende las reacciones de luz, donde las reacciones celulares solo ocurren en presencia de luz y las reacciones de fijación de carbono mejor conocidas como reacciones oscuras. Estas reacciones ocurren tanto en

presencia como en ausencia de luz. En la primera etapa las células convierten la energía lumínica en energía química, la cual es almacenada en compuestos altamente energéticos para luego ser usados en las reacciones de fijación de carbono (Iverson, 2010). Este tipo de reacciones inducen el transporte de electrones, el cual está limitado por las reacciones redox de las plastoquinonas (Pulz & Scheibenbogen, 1998). En este sistema las estructuras antenales en las microalgas son tan eficientes en la utilización de la luz que pueden absorber todos los fotones que las golpean, aun cuando no pueden utilizarlos todos (Lee 1999), obligando a un incremento en el contenido de pigmentos (Richardson *et al.*, 1983), cambiando así la composición de la biomasa (Eriksen *et al.*, 2007) y por tanto la tasa de crecimiento celular alcanzara sus máximos límites cuando se incrementa la energía lumínica, lo cual limitará la cantidad de energía a utilizar (Pulz & Scheibenbogen 1998).

Para el caso específico de los cultivos microalgales, 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 algal es liberado inicialmente dentro del cultivo para luego disiparse en la atmósfera (Cheng *et al.*, 2006). En teoría, las microalgas pueden fijar cerca del 9% de la luz solar incidente y generar 280 toneladas de biomasa seca por ha⁻¹ al año⁻¹, para lo cual se requieren cerca de 513 toneladas de CO₂ (Bilanovic *et al.*, 2009). Según Cheng *et al* (2006), 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. 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 *et al* (2000) 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.

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 (Papazi *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta un enfoque biológico, el CO₂ es convertido en productos de valor agregado tales como proteínas, vitaminas, alimento, combustibles entre otros (Jeong *et al.*, 2003; de-Morais & Costa, 2007). Análisis químicos han demostrado que la biomasa microalgal 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 (Mazzuca *et al.*, 2000).

En principio, la limitación del CO₂ en el medio puede ser evitada al inyectarlo en exceso, ya sea mezclado con el flujo de aire (Chini Zittelli *et al.*, 1996) o directamente en el cultivo (Molina grima *et al.*, 1994; Eriksen *et al.*, 1998); sin embargo el uso de CO₂ representa un gasto operacional significativo, ya que la pérdida de este gas debe ser minimizada, por lo que requiere que el sistema de inyección sea optimizado (García-Sánchez *et al.*, 2003) y en algunos casos sea reciclado.

De acuerdo con la literatura, la adición de carbono para el cultivo masivo de microalgas representa la principal limitante (Benemann *et al.*, 1987; Olaizola *et al.*, 1991; Oswald, 1988; Tapie & Bernard, 1988); 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 (Rados *et al.*, 1975). 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, el cual no puede ser utilizado por el alga y liberado por el cultivo produciendo así una polución innecesaria (Cheng *et al.*, 2006).

Varios autores han estudiado la fijación de CO₂ en la biomasa microalgal (Kajiwara *et al.*, 1997; Chae *et al.*, 2006; Jacob-Lopes *et al.*, 2008a) mientras otros han determinado tasa globales de secuestro de CO₂ mediante balance de masa de los componentes en la fase líquida o gaseosa del sistema; estos autores no establecieron que fracción del global del CO₂ secuestrado fue efectivamente fijado en la biomasa de la microalga (Fan *et al.*, 2007; Jacob-Lopes *et al.*, 2008b). Mientras cambia la composición de la biomasa producida, cambia la tasa específica de consumo de un sustrato y la formación de producto, en el caso de autótrofos, CO₂ y O₂ son el sustrato y producto más importantes. La relación entre la tasa de producción de O₂ y consumo de CO₂ (coeficiente fotosintético) depende de la composición de la biomasa producida y de los sustratos utilizados (Eriksen *et al.*, 2007). El agotamiento de los nutrientes no necesariamente conlleva a que los organismos entren en la fase estacionaria, pero si modifica la composición de la biomasa (Eriksen *et al.*, 2007), ya que durante el agotamiento de los nutrientes tanto almidón como otras formas de almacenamiento de energía pueden acumularse y constituir la mayoría de la biomasa producida (Rigano *et al.*, 2000; Ball, 2002; Zhila *et al.*, 2005).

La fijación del CO₂ por medio de microalgas es ecológicamente sostenible cuando se combina con otros procesos de protección ambiental tales como el tratamiento de aguas residuales (Mallick, 2002) o la remoción de metales pesados (Jacome-Pilco *et al.*, 2009). Para el caso específico de las emisiones de gas invernadero generado en refinerías, estas se componen principalmente de CO₂, CH₄, SO_x y NO_x, de acuerdo con Szklo & Shaeffer (2007), entre el 7% y 15% de la entrada de aceite crudo en estas refinerías es usado en procesos de refinación. Petrobras, la compañía de petróleo más grande de Brasil, reportó emisiones para el 2004 por

un total de 44,4 millones de toneladas de CO₂, 98,8 % son emisiones de CO₂ (Petrobras, 2007). Una gran parte de estas emisiones pueden ser potencialmente mitigadas mediante procesos biológicos. Sin embargo muchas de las cepas de microalgas conocidas se inhiben con concentraciones en el aire de 50 ppm de SO_x (Watanabe *et al.*, 1992, Kurano *et al.*, 1995). Para evitar estos procesos inhibitorios, se han implementado procesos fisicoquímicos como absorción, adsorción y separación con membranas para remover los compuestos tóxicos de estos gases de chimenea (Sung *et al.*, 1999). Otra aproximación a este problema sería incrementar la tolerancia de las especies microalgales a altas concentraciones de CO₂ y SO_x (Silva & Pit, 1984; Maeda *et al.*, 1995).

Los principales sistemas de producción de organismos fotoautotróficos son sistemas abiertos como los *open ponds*, o sistemas cerrados como los fotobiorreactores ya sea en configuración tubular o plana (Borowitzka 1999; Pulz 2001). Dentro de los factores determinantes en la producción de microalgas, la luz ha sido reportado como un factor determinante en cultivos en fotobiorreactores (Janssen *et al.*, 1999, 2000, 2001), de acuerdo con estos autores, la luz es un sustrato limitante en estos sistemas, los cuales están afectados por las zonas de luz/oscuridad que dependen primariamente en la configuración, agitación y mezclado en el reactor, asociado con la posibilidad de cultivos con periodos discontinuos de energía lumínica. Adicionalmente, la concentración celular es otro parámetro determinante en la transferencia de energía lumínica dentro del reactor (Jacob-lopez *et al.*, 2009). Por otro lado, según Doucha *et al.*, (2006), una de las claves para la reducción de los costos del cultivo radica en la disminución de la columna de agua hasta unos cuantos milímetros, mejorando así la frecuencia de los periodos de luz/oscuridad; sin embargo, uno de los problemas operaciones de este tipo de tecnologías es la falta de energía lumínica durante todo el periodo 24 horas) (Jacob-López *et al.*, 2009), ya que a diferencia de los cultivos heterotróficos, los cultivos fotoautotróficos están limitados por el fotobiorreactor el cual debe de utilizar eficientemente la luz (Hu *et al.*, 1998), aunque existen

diferentes revisiones donde hacen hincapié sobre los principales modelos utilizados actualmente (Borowitzka, 1999; Pulz, 2001), no existe un consenso sobre qué modelo se acomoda más a una alta producción. Podemos decir que sea cual sea el modelo debe de aprovechar al máximo la luz, esto cambia cuando el cultivo se vuelve más denso, lo cual evita que entre la luz uniformemente, decreciendo exponencialmente su aprovechamiento (Carlozzi, 2003).

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 y pérdidas (Benemann *et al.*, 1987; Oswald, 1988; Tapie & Bernard, 1988; Mazzuca *et al.*, 2000); además, la eficiencia de captura o fijación del CO₂ en sistemas de cultivo cerrado depende 3 cosas: la especie de microalga, la concentración del CO₂ y del fotobioreactor empleado (Cheng *et al.*, 2006; de-Morais & Costa, 2007), el punto principal de todas las consideraciones relacionadas con el consumo de CO₂, es que por un lado el CO₂ dentro del reactor no puede alcanzar concentraciones altas, las cuales derivarían en inhibición, por otro lado, no debe caer mucho, o limitará el crecimiento (Rados *et al.*, 1975). Estas concentraciones máximas y mínimas varían de especie en especie, y aun no se conocen adecuadamente (Lee & Hing, 1989; Rados *et al.*, 1975). Cheng *et al* (2006) han demostrado el pico (55,3%) de eficiencia de captura con 0,15% CO₂ y la cantidad de CO₂ reducido (80mg L⁻¹ h⁻¹) para *C. vulgaris* cultivada en un fotobioreactor de membrana. En un fotobioreactor serial de 3 tubos, 27-38% y 7-13% de CO₂ fueron fijados respectivamente por *Spirulina* sp. y *Scenedesmus obliquus* en cultivos aireados con 6% de CO₂. en tratamientos aireados con 12% de CO₂, la eficiencia de fijación fue solo de 7-17% para *Spirulina* sp. y 4-9% para *S. obliquus* (de-Morais & Costa, 2007). La dependencia de las especies en la eficiencia en la captura o fijación de CO₂ puede deberse a condiciones fisiológicas de la microalga, como potenciales de crecimiento celular y la habilidad de metabolizar el CO₂ (Chiu *et al.*, 2008).

***Botryococcus braunii* como Fuente de biocombustibles.** El género *Botryococcus* compila una gran variedad de microalgas verdes acumuladoras de hidrocarburos. Dentro de esta misma especie se pueden reconocer 3 diferentes tipos o "razas fitoquímicas", cada una de estas se diferencia por el tipo de hidrocarburos que produce (Metzger & Largeau, 2005). 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 (Metzger & Largeau, 2005), por esto, se cree que microalgas ancestrales pueden ser los depósitos actuales de petróleo (Moldowan & Seifert, 1980) el tipo B comprende un grupo de microalgas coloniales, con células de un tamaño de 10 μ m en longitud. Estas microalgas sintetizan hidrocarburos terpenoides de largas cadenas vía DXP-MEP (Lichtenthaler, 1999) y los depositan en el espacio extracelular, formando así una matriz hidrofobia en la cual múltiples células se adhieren (Banerjee *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2003; Metzger & Largeau, 2005). Debido a estas composiciones las algas son consideradas como fuentes de cierto tipo de crudos en su biogénesis (Moldowan & Seifert, 1980).

Botryococcus braunii Kützinger, F.T. (1849) crece como una colonia de células individuales adheridas por una matriz compuesta por hidrocarburos y lípidos inusuales, estas colonias poseen estructuras amorfas, asemejando un ramillete de uvas (Largeau *et al.*, 1980). 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 ha perfilado como una fuente renovable de biocombustibles (Largeau *et al.*, 1980; Casadevall *et al.*, 1985; Wolf *et al.*, 1985; Kojima & Zhang, 1999) en especial en procesos térmicos de producción de biocombustibles, en los que una composición tan particular como la de esta alga puede tener grandes beneficios y ventajas frente a otras fuentes de biomasa que están en desarrollo para este fin como son los residuos agroindustriales lignocelulósicos. Sin

embargo, para hacer sostenible y económicamente viable el proceso de producción de hidrocarburos a partir de esta alga, 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 un estimado en el 2007 indica que el costo de la producción de biocombustibles es en general 2.3 veces más elevado que aquellos derivados de combustibles fósiles (Wang *et al.*, 2008).

Tal vez el mayor reto técnico para el cultivo industrial del alga *B. braunii* es lograr acelerar el crecimiento de los cultivos de *B. braunii* y mantener bajos índices de contaminación. Según Tanoi *et al* (2001) este puede ser mejorado mediante la adición de fuentes orgánicas de carbono, como la glucosa, esto se complementa con la investigación de Niitsu *et al* (2012), donde la síntesis de NADPH mediado por la Pentosa 5 Fosfato (P5P) es el factor clave en la producción de hidrocarburos durante la fase logarítmica de crecimiento celular, sin embargo, la adición de fuentes orgánicas puede acelerar procesos de contaminación por levaduras u otras microalgas.

No de menor importancia, no sólo para la viabilidad técnica sino también para la económica es diseñar sistemas de cultivo para su escalado que optimicen su crecimiento, permitan la recirculación de agua del cultivo y en los que las algas puedan ser cultivadas bajo condiciones y en regiones, donde esta especie sea dominante. Aunque mucho ha sido estudiado desde el Bloom en el río Darwin en Australia en 1979, existen diferentes barreras que impiden el cultivo masivo de esta microalga. En primera instancia, esta microalga posee un tiempo de crecimiento muy lento, por lo cual, un cultivo abierto puede ser colonizado por bacterias, cianobacterias e incluso otras microalgas (Metzger & Casadevall, 1992). Sin embargo, estudios como los adelantados por Dayananda *et al* (2005, 2006 y 2007) y Ranga Rao *et al* (2007, 2010), dan luces sobre cómo se puede obtener un cultivo saludable de esta especie en reactores abiertos utilizando una especie de

la raza A. Existen diferentes estudios sobre el mejoramiento del medio de cultivo, los cuales van desde la mejor fuente de carbono (Tanoi *et al.*, 2011), nitrógeno (Dayananda *et al.*, 2007) y fósforo (An *et al.*, 2003) y otros componentes menores, hasta del efecto de la concentración de CO₂ en la deposición de botriococenos (Ge *et al.*, 2011). Otros estudios más completos como el de Ruangsomboon (2011), evalúan una gran cantidad de nutrientes (nitrógeno, fósforo y hierro), intensidades lumínicas y ciclos luz/oscuridad, encontrando que al igual que en otras algas, al disminuir la concentración inicial de nitrógeno, es posible aumentar la deposición de lípidos, además de aumentar la productividad de botriococenos.

De esta manera un estudio de la biología básica de algas nativas colombianas y de las interacciones entre las variables determinantes en el crecimiento y producción de botriococenos en el alga *B. braunni* puede ser de gran valor para el desarrollo de un sistema viable y sostenible de producción de biocombustibles a partir de esta especie. Los hidrocarburos denominados botriococenos son triterpenos modificados con la fórmula química C_nH_{2n}10 (Banerjee *et al.*, 2002), estos pueden llegar a ser entre el 30 y 40% de la biomasa seca (Metzger & Largeau, 2005). 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 (Casadevall *et al.*, 1985). 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 (Largeau *et al.*, 1980; Wolf *et al.*, 1985). La recuperación de estos hidrocarburos puede ser llevada a cabo mediante la extracción de la biomasa seca utilizando solventes (Metzger & Largeau, 2005); sin embargo, el desaguar y secar la biomasa no se perfila actualmente como un método para su aplicación a escala industrial. Otro acercamiento es la pirólisis de la biomasa producida, la cual ha sido aplicada en Colombia a diferentes residuos

agroindustriales como los desechos del sector azucarero (Castillo, 2008). En esencia el bio-aceite posee numerosas ventajas competitivas sobre los combustibles provenientes de la industria petrolera, tales como: bajas emisiones de NO_x , ya que genera 50% menos de emisiones que un Fuel-Oil liviano en turbinas de gas y turbinas diesel convencionales, además posee emisiones nulas de SO_x debido a que es un combustible proveniente de residuos orgánicos se considera balance nulo de CO_2 ; sin embargo, no existe mucha información sobre pirólisis rápida de microalgas a escala de laboratorio, excepto para *Chlorella protothecoides* y *Microcystis aeruginosa* (Miao *et al.*, 2004), además de pirólisis lenta en *Chlorella protothecoides* (Demirbas, 2006). El rendimiento de Bio-oil de 17,5% y 23,7% fueron reportadas mediante pirólisis rápida para *C. protothecoides* y *M. aeruginosa* respectivamente. Se encontró que el rendimiento para *C. protothecoides* mediante pirólisis lenta es dependiente de la temperatura y varió de 5,7 a 55,3%. 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-aceite; además, las propiedades calóricas también son mejores que muchos otros materiales biológicos como los lignocelulósicos, por lo cual aunque se tenga mucho en contra por lo lejos que puede estar el desarrollo comercial de las algas como fuente de biomasa para biocombustibles es posible defender la investigación en este campo (Guzmán, Comunicación personal, 2012).

En un principio se asumió que estos hidrocarburos no eran catabolizados por el alga (Largeau *et al.*, 1980), pero luego se estableció que estos eran intermediarios en la biosíntesis de epóxidos (Metzger & Casadevall, 1989) y éter lipídicos (Metzger & Casadevall, 1992). Cabe resaltar que análisis geoquímicos al petróleo han demostrado que posiblemente tanto los botriococenos como otros hidrocarburos, producidos por cepas ancestrales de *B. braunii* pueden ser la fuente del petróleo actual (Moldowan & Seifert, 1980). Diferentes estudios se han enfocado en el mejoramiento de la producción tanto de biomasa, como de

hidrocarburos y lípidos en esta especie; desde el mejoramiento de medios de cultivos ya predeterminados como el Chu 13 (Brown *et al.*, 1969; Largeau *et al.*, 1980; Dayananda *et al.*, 2007) hasta el aprovechamiento de aguas residuales, tanto domésticas (Orpez *et al.*, 2009), como agroindustriales (An *et al.*, 2003). Estudios como los de An *et al.* (2003), en el cual se usa aguas residuales agroindustriales, demuestran que el producir mucha biomasa (casi 1 g/L) no produce mucho hidrocarburos (menos de 0,4 g/L) cuando se usa amonio, en cambio, el nitrato aparenta ser una mejor fuente de nitrógeno, (510 mg de N/L produce 0.034 de tasa de crecimiento, y una tasa de producción de hidrocarburos de 0.090 g/L*d⁻¹), al igual que para la formación de lípidos (Choi *et al.*, 2010). Por otro lado Dayananda *et al.*, (2005) encontraron que las condiciones óptimas para el crecimiento y producción de hidrocarburos denota una relación N:P de 1:4, la cual optimiza la producción de hidrocarburos, sin embargo, una relación de N:P 1:0,5 favorece tanto biomasa como hidrocarburos, estos resultados indican la posibilidad de usar un cultivo de 1 o 2 pasos. Es necesario entender que altas cantidades de biomasa pueden lograrse en medios enriquecidos con nitrato, en cultivos donde el nitrógeno ha sido consumido, se acumulan carotenoides, los cuales enmascaran completamente las clorofilas y los lípidos, los cuales bajan la gravedad específica de las algas, obligándolas a flotar. Aquellos viejos cultivos poseen una concentración en proteínas inferior al 10%. sin embargo, la forma de nitrógeno a utilizar varia fuertemente de raza en raza de esta especie, trabajos como el de Dayananda *et al.*, (2006) describen como 2 razas de *B. braunii* (SAG 30,81 y LB 572) crecen mejor y producen más hidrocarburos utilizando nitrato de potasio como fuente de nitrógeno; sin embargo, en un estudio posterior con las mismas cepas mencionadas anteriormente, estas usan mejor el nitrato de sodio al nitrato de potasio, el cambio radical entre estos 2 trabajos es el medio de cultivo que se utiliza, en este último además de probar CHU 13, utilizan BG 11 Y BBM, siendo estos últimos los de mayor rendimiento. Los resultados de este estudio permiten determinar la necesidad de configurar un medio específicamente diseñado para la cepa de trabajo. También es de suma importancia conocer en

qué fase acumula tanto los lípidos como los hidrocarburos (Kalacheva *et al.*, 2002) también se requiere saber si la producción de hidrocarburos es proporcional a la producción de biomasa, así como lo reportan Kojima & Zhang, (1999), ya que un incremento sustancial en el contenido de hidrocarburos ha sido observado en cultivos con baja concentración de nitrógeno (Richmond, 1986), sin embargo, en este caso el aumento relativo en la cantidad de hidrocarburos pueda deberse a cambios en la conformación celular. Existen otros nutrientes que también son importantes en la producción tanto de biomasa, lípidos e hidrocarburos; Tanoi *et al.*, (2011) encontraron que al agregar glucosa, se mejora el cultivo, lo cual no pasa con el acetato de sodio, cabe recordar que en la patente de Nomomura (US 7,923,228 B2) usan acetato de potasio para mejorar la productividad de hidrocarburos ya que según Zhila *et al* (2011), el sodio inhibe el crecimiento celular de *B. braunii*. Ge *et al* (2011), encontraron que la mejor concentración de CO₂ que mejora el crecimiento de *B. braunii* es de 20% v/v estos resultados varían de los de Yoo *et al* (2010), y a los de Chiu *et al* (2008), quienes encontraron que la mejor era hasta 10%. Todas estas diferencias tan marcadas tanto en concentración del CO₂ suministrado, o de fuente de nitrógeno y otros nutrientes, se debe principalmente a la cepa utilizada, por lo cual se hace indispensable.

1. HIPÓTESIS

A partir del estudio de los parámetros de crecimiento a escala de laboratorio de una cepa de alga Colombiana *Botryococcus braunii*, es posible generar un diseño conceptual de un sistema abierto a escala piloto, estable y eficiente para la producción de biomasa con miras a la producción de biocombustibles de tercera generación.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Elaborar un diseño conceptual de sistema abierto a escala piloto de producción de biomasa a partir del estudio de los parámetros de crecimiento a escala de laboratorio de una cepa de alga Colombiana *Botryococcus braunii* con miras a la producción de biocombustibles de tercera generación.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímicamente el medio natural de crecimiento del alga nativa y la composición de la biomasa.
- Diseñar un medio de cultivo que permita el crecimiento selectivo del alga *B.braunii*.
- Desarrollar un método de cuantificación del contenido total de botriococenos en la biomasa producida.
- Determinar la velocidad de crecimiento y encontrar una relación para los diferentes métodos de cuantificación de crecimiento celular.
- Encontrar el efecto de la concentración celular inicial en la velocidad de crecimiento celular y deposición de hidrocarburos (botriococenos).
- Identificar la fuente de nitrógeno que mejore la productividad de biomasa y deposición de hidrocarburos (botriococenos).

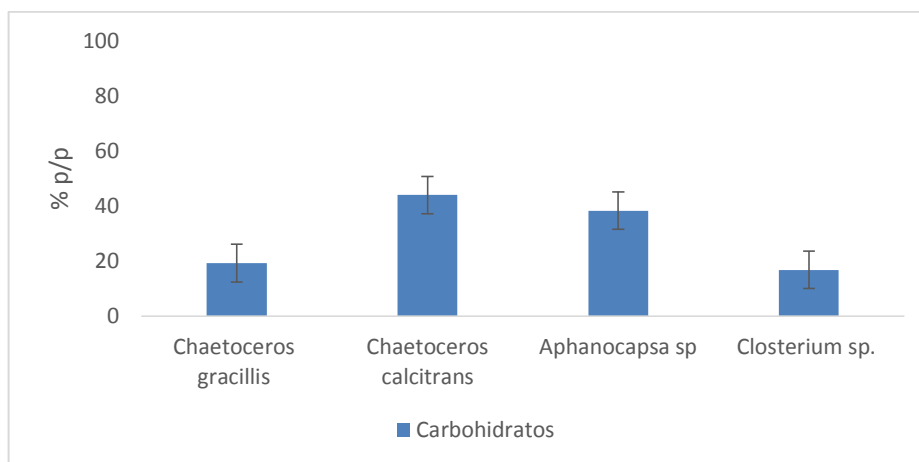
- Evaluar el efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa y deposición de hidrocarburos (botriococenos).
- Diseñar un sistema de inyección de CO₂ (continua, pulsos) que mejore la productividad de biomasa y deposición de hidrocarburos (botriococenos).
- Evaluar la influencia del conjunto de variables de proceso en la producción de biomasa y cantidad de botriococenos en un sistema de cultivo (fotobioreactor de sistema cerrado) a escala de laboratorio.
- Definir las condiciones optimas de cultivo en un sistema de cultivo abierto (fotobioreactor tipo open pond) a escala de laboratorio.
- Elaborar recomendaciones para el escalamiento del proceso a nivel piloto e industrial. Hacer un análisis de costos preliminar del diseño a proponer

3. BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS, AVANCE Y DESARROLLOS EN LA UIS

Durante el periodo comprendido entre el 2000 y 2013 Colombia consolidó de forma excepcional la exploración e inversión de nuevas fuentes de energía que le permitieran al país poder cumplir con la demanda nacional mientras se mitigaban los efectos del cambio climático, gracias a esto el gobierno nacional formuló las leyes 693 de 2001 y 939 de 2004 que promueven el uso del 5 % de biodiesel y 10% bioetanol en los combustibles nacionales, y además crea incentivos para la producción de biodiesel (ley 934 de 2004), Sin embargo para el 2007 la investigación y desarrollo de fuentes para la obtención de este tipo de biocombustibles diferentes a las ya posicionadas en el mercado nacional (caña de azúcar y palma de aceite) se encontraba concentrado en universidades como la Nacional de Colombia ó la Universidad de Antioquia. En el 2008 la alianza liderada por el Instituto Colombiano del Petroleo (ICP-ECOPETROL) y conformada por la Universidad Industrial de Santander (UIS) y la Corporación Instituto Morrosquillo presentaron al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Sosteible (MADR) el proyecto BIOPROSPECCIÓN DE MICROALGAS COLOMBIANAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL (2008-2010), el cual tuvo como meta encontrar a partir de la biodiversidad natural colombiana las especies de microalgas nativas que muestren un potencial real hacia la generación de aceite transformable en biodiesel por transesterificación, y en el proceso lograr identificar los puntos críticos que afectan positiva o negativamente los cuestionamientos ambientales ya identificados sobre los biocombustibles de primera generación, dentro del proyecto se bioprospectaron 5 regionaes nacionales con 7 ambientes diferenciados entre dulce acuícolas, estuarinos, marinos, que arrojan un total de 39 especies nativas colombianas aisladas.

Dentro de las cepas aisladas se pudo determinar la capacidad de algunas de estas para depositar concentraciones considerables de carbohidratos (Figura 1).

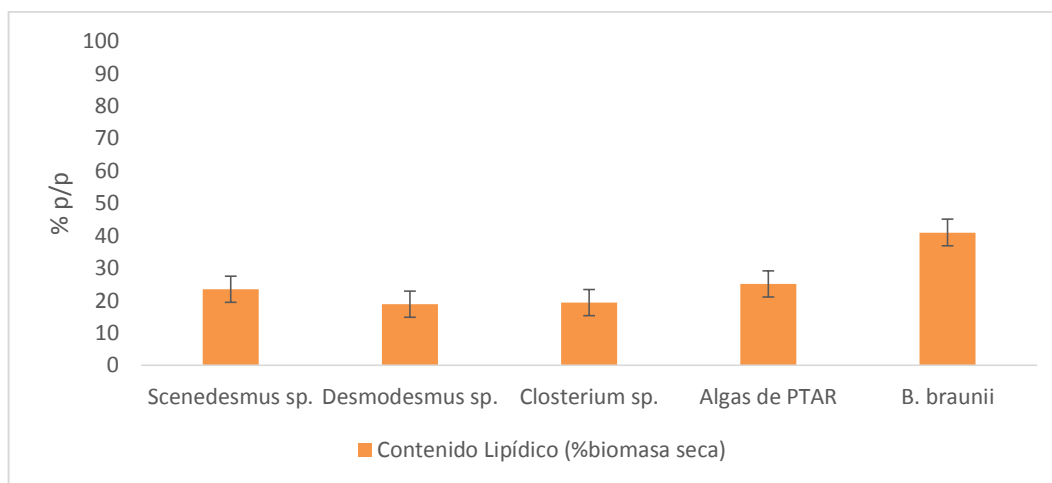
Figura 1. Concentración de Carbohidratos (% p/p).



Los resultados obtenidos para carbohidratos plantearon la necesidad de poder aprovechar esta nueva fuente; a partir de una serie de experimentos se obtuvo el proceso denominado: “Proceso mejorado de obtención de azúcares fermentables a partir de microalgas y macroalgas”; este proceso comprende tratar la biomasa algal mediante una mezcla de metanol y ácido sulfúrico a una temperatura de entre 100 a 200°C y a una presión de entre 101, 14 kPa y 303, 42 kPa, logrando así un debilitamiento en la pared celular y facilitando la extracción de los carbohidratos y aumentando el rendimiento en la hidrólisis de azúcares fermentables, además este nuevo esquema fue protegido por la Superintendencia de Industria y Comercio como la primera patente de Invención (WO 2012085689 A1) para microalgas en Colombia

Con este nuevo esquema se comenzó a evaluar su efecto como proceso de pre-tratamiento para la mejorar la obtención de lípidos para la obtención de biodiesel.

Figura 2. Contenido lipídico en las cepas seleccionadas (% p/p).



Dentro de las cepas prospectadas un grupo de 4 cepas monoalgales y un consorcio destacó por su contenido total de lípidos (figura 2), el cual oscilaba entre 20 y 25% (p/p en biomasa seca); sin embargo el resultado más sobresaliente fue el obtenido de una muestra no aislada de *Botryococcus braunii* de un Bloom poco común y de gran tamaño, ya que en un segundo muestreo se obtuvieron cerca de 2 kg de biomasa seca; esta biomasa fue sometida a una serie de pruebas por parte del Instituto Colombiano del Petróleo (ICP-ECOPETROL) donde se pudo demostrar que gracias a su composición, es posible obtener altos rendimientos de bioaceite, además las propiedades calóricas también son mejores que muchos otros materiales biológicos como los lignocelulósicos (Guzmán-Monsalve, Comunicación personal, 2012), sin embargo estos resultados fueron derivados de la utilización de biomasa proveniente de un bloom y no de un cultivo monoalgal de *B. braunii*, por lo cual hasta la fecha no se conocían las características específicas

que permitieran utilizar esta cepa para la producción de biocombustibles, por esto se planteó el presente proyecto que enmarca el aislamiento, determinación de variables optimas de crecimiento y diseño conceptual para la evaluación de un sistema de producción de biocombustibles.

4. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA CEPA DE *B. braunii* Y ANALISIS DE SU AMBIENTE.

4.1 INTRODUCCIÓN

Las microalgas han sido consideradas durante los ultimos años como una fuente promisoría de biocombustibles y productos de valor agregado, ya que contiene lípidos (en su mayor parte triacilgliceridos), diferentes tipos de carbohidratos, proteínas y otros metabolitos (Borowitzka, 2013), por lo cual el primer paso, para la producción de biocombustibles mediante la implementación de este tipo de microorganismo es la selección de la especie ó cepa a utilizar, ya que dependiendo del tipo de producto a obtener la cepa cambiará drásticamente. A nivel mundial existen grandes colecciones de cepas con gran variedad de especies aisladas a nivel mundial, es preferible buscar cepas nativas al lugar donde se pretende desarrollar la producción, una forma consistente para la selección de la especie/cepa es la implementación de la metodología propuesta por Picardo *et al* (2013) teniendo como resultado la selección de *Botryococcus braunii* e *Isochrysis galvana*.

En algunas especies existe una variación fuertemente marcada entre cepas, principalmente en la composición celular y en su respuesta a ciertas condiciones de crecimiento (Vonshak, 1987; Shaw *et al.*, 1989; Borowitzka, 1992; Rodolfi *et al.*, 2009), este es el caso de *Botryococcus braunii*. La cual se clasifica en 3 tipos o razas basadas en la estructura química de los hidrocarburos producidos. el tipo A produce n-alkadienos (C_{23} - C_{33} , principalmente hidrocarburos dienos y trienos), la raza L producen licopadienos, los cuales son tetraterpenoides simples (Metzger & Largeau, 2005) y por ultimo la raza B produce hidrocarburos triterpenos C_{30} - C_{37} mejor conocidos como botriococenos y escualenos metilados C_{31} - C_{34} , los cuales mediante procesos como el hidrocracking pueden obtenerse combustibles líquidos

(Niehaus *et al.*, 2011). A nivel mundial se han aislado diferentes cepas de *B. braunii*, algunas de ellas como la BOT-22 aislada en Japón y la cepa Var Showa aislada en la Universidad de Berkeley, son consideradas como las más promisorias por su alto contenido de hidrocarburos (entre 20 y 30% p/p), sin embargo estas cepas provienen de zonas globales con incidencias solares y temperaturas inferiores a las colombianas, por lo cual su aplicación a gran escala pueda ser un problema.

La forma más empleada a nivel mundial para el cultivo de esta microalga son los sistemas autotróficos empleando como única fuente de carbono el CO₂ (Yeesang & cheirslip, 2014). Otras de las características más peculiares sobre esta microalga es su forma de crecimiento, normalmente las células se agregan formando colonias articuladas en una matriz polimérica de exopolisacáridos e hidrocarburos (Largeau *et al.*, 1980), además los hidrocarburos se localizan de forma periférica a las células, por lo cual por simple presión mecánica con laminas es posible observar al microscopio los hidrocarburos (Furahashi *et al.*, 2013); otro de los problemas críticos es la velocidad de crecimiento de este microorganismo, debido en parte a la formación del material polimérico que conforma la matriz y al consumo energético asociado con la acumulación de hidrocarburos *B. braunii* es una de las microalgas con la tasa de crecimiento más lento (Choi *et al.* 2013). Existen diferentes estudios sobre el mejoramiento del medio de cultivo, los cuales van desde la mejor fuente de carbono (Tran *et al.*, 2010; Tanoi *et al.*, 2011; Bazaes *et al.*, 2012; Rao & Sarada, 2012), nitrógeno (Dayananda *et al.*, 2007) y fósforo (An *et al.*, 2003) y otros componentes menores, hasta del efecto de la concentración de CO₂ en la deposición de botriococenos (Ge *et al.*, 2011), otros trabajos más completos como el de Ruangsomboon (2011) el cual evalúa una gran cantidad de nutrientes (nitrógeno, fósforo y hierro), intensidades lumínicas y ciclos luz/oscuridad, hasta ahora no se ha evaluado el posible efecto de la concentración celular inicial en la producción de biomasa y deposición de lípidos, especialmente de hidrocarburos como el botriococeno; sin embargo los

hidrocarburos intracelulares son una pequeña fracción del contenido total, a diferencia de los intracelulares, la porción extracelular puede ser extrada mediante la aplicación de presión (Furahashi *et al.*, 2013). Aun teniendo todo lo anterior en cuenta, la recuperación total de la fracción lipídica (tanto hidrocarburos, lípidos neutros y polares, etc) no es fácil en biomasa húmeda, según Frenz *et al* (1989) al mezclar n-hexano con biomasa húmeda solo fue posible extraer 1% del total de los hidrocarburos, por otro lado Moheimani *et al* (2013a, 2014) desarrolló un proceso tipo “milking” para la recuperación parcial de los hidrocarburos empleando heptano, el cual según Eroglu & Melis (2010) es un solvente más apto para la recuperación de botriococenos que el n-heptano o el cloroformo, en este proceso Eroglu & Melis implementaron un “micro-molino” compuesto por perlas de vidrio de 0,5 mm para la destrucción total de la biomasa y recuperación total de la fracción lipídica.

En el presente capítulo se aborda el aislamiento de una nueva cepa de *B. braunii* proveniente de un lago localizado en el municipio de Porce (Antioquia), además de un análisis físico-químico del medio de aislamiento, con la intención de desarrollar un medio de cultivo que permita cultivar eficientemente la cepa aislada, por último se evalúa un nuevo método para la extracción y cuantificación del contenido total de lípidos e hidrocarburos.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Muestreo del lago. Durante los años 2012 a 2013 se desarrollaron salidas de campo (2 cada año) a un lago ubicado en el municipio de Porce (Antioquia). El lago fue dividido en 10 puntos, donde se obtuvieron 4 muestras de 500 mL cada una, para un total de 20 L por muestreo, de igual forma se tomaron muestras del sustrato del lago.

4.2.2 Pre-concentración de colonias y asilamiento. Una vez en el laboratorio, se evaluó la densidad de las colonias presentes, para esto se tomaron 10 mL de medio y se filtraron utilizando papel filtro GF-C (Whatman) de 0.45 μ m previamente pesados, la muestra filtrada fue secada en un horno de convección forzada durante 12 horas a 80°C.

Debido a la habilidad de *B. braunii* para auto-concentrarse en la parte superior del medio cada una de las muestras fue pre-concentrada mediante decantación durante un periodo de 30 minutos, una vez retirado la mayor cantidad de medio se realizó el aislamiento (Montenegro, 2013, comunicación personal), en el cual 500 mL de muestra de colonias fue suspendido en igual volumen de medio Bold Basal estéril, una vez preparada la mezcla se dejó reposar durante 30 minutos en un embudo de decantación; una vez transcurrido el tiempo se decantó el fondo y se descartó. El proceso de lavado se repitió 5 veces. Las colonias decantadas se dividieron en tubos Falcon estériles y centrifugadas a 8000 rpm durante 15 minutos, una vez terminado el tiempo, las colonias suspendidas en la parte superior fueron retiradas, las colonias recuperadas fueron suspendidas nuevamente en medio Bold Basal estéril para dos nuevos ciclos de centrifugación (8000 rpm, 15 minutos). De cada una de las muestras se tomaron 500 μ L y se diluyeron en 1 mL de medio estéril y centrifugados a 12000 rpm durante 20 minutos, una vez transcurrido el tiempo las colonias fueron recuperadas y diluidas nuevamente hasta lograr un volumen de 1.5 mL; para asegurar la eliminación de bacterias y otras microalgas, el proceso se realizó 5 veces.

Una vez terminados los 5 ciclos, se procedió a sembrar las colonias en placas de medio de cultivo sólido, y se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad (12:12) y temperatura (26-29°C) durante 3 meses. Para asegurar la eficiencia del aislamiento una vez a la semana las placas fueron revisadas al microscopio, las placas con crecimiento de otras microalgas fueron descartadas.

4.2.3 Caracterización físico-química del lago. De cada uno de los muestreos se analizó la composición de los principales Macronutrientes que influyen positivamente en el crecimiento microalgal, tales como: Nitrógeno Total, Fosforo disuelto, Nitratos, Nitritos, Sulfatos, Cloruros al igual que ciertos micronutrientes como: Cadmio, cobre, níquel, vanadio, manganeso, aluminio, hierro, zinc, cobalto, molibdeno. Los análisis fueron desarrollados en por el laboratorio de Biotecnología del ICP.

4.2.4 Producción de biomasa y selección de medio de cultivo. Una vez transcurridos 5 meses desde el aislamiento en la U-Nacional, se tomaron pequeños raspados de las placas y se suspendieron en 12 mL de medio de cultivo Bold Basal estéril. Para acelerar el crecimiento, se modificó la concentración de nitrato de sodio a 0.7 g/L; después de 3 semanas de cultivo, las células fueron diluidas en 100 mL de Bold Basal modificado; 3 semanas después el cultivo se llevo a 250 mL, desde acá en adelante los cultivos fueron agitados utilizando un agitador orbital a 100 rpm durante 24 horas todos los días; 3 semanas después el volumen se aumento hasta llegar a 1 L.

Según Watanabe y Tanabe (2013), los medios mas utilizados para el cultivo de *B. braunii* son: Chu 13 modificado (Largeau et al. 1980), BG-11 (Allen 1968, Allen and Stanier 1968, Rippka et al. 1979) y AF-6 (Watanabe et al. 2000); para comprobar el efecto de cada medio de cultivo, se prepararon 200 mL de cada uno de los medios anteriores y 200 mL de medio Bold Basal (cada uno por triplicado); cada uno de los experimentos fue inoculado con 50 mL de un cultivo de *B. braunii* de 3 semanas; cada uno de los experimentos se mantuvo en agitación en un orbital a 100 rpm a una temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ y luz de $150 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en ciclo luz: oscuridad 12:12 durante 30 días. Una vez cada hora durante 10 minutos se adicionó CO_2 a una velocidad de 10mL/min y concentración de 0.01 vvm. Cada

5 días la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos se cuantificaron siguiendo las metodologías descritas por Moheimani *et al* (2013b).

4.2.5 Efecto concentración celular inicial. Para evaluar el efecto de la concentración celular inicial se inocularon suficiente volumen de medio de cultivo AB-Media con diferente volumen de inóculo hasta lograr 4 diferentes concentraciones celulares (0.08 – 0.12 – 0.25 y 0.4 g/L en base seca) hasta alcanzar un volumen de trabajo de 1.5L. Cada uno de los experimentos tuvo una duración de 25 días bajo ciclo de iluminación 12/12 con lámparas fluorescentes ($120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 0,6 L/min y adición discontinua de CO_2 1 vez cada 2 horas a un flujo de 0.01L/min durante 20 minutos.

Una vez cada 3 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.

4.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

4.3.1 Método A: Biomasa seca con Bligh & Dyer (1959). Después de 25 días de cultivo se centrifugó el volumen total del cultivo a 3400 rpm durante 20 minutos y se secó en horno a 60°C en una cama de silica gel durante la noche. Una vez seca la biomasa se maceró hasta homogenizar la muestra, 100 g de la biomasa se le agregaron 7 mL de solución de Bligh y Dyer, la mezcla se homogenizó mediante el uso de un sonicador durante 20 minutos, una vez finalizado el tiempo se agregaron otros 7 mL de solución para una segunda extracción, la muestra se centrifugó a 3400 rpm, una vez separada la biomasa de los lípidos se agregaron 3

mL de cloroformo analítico. La mezcla se dejó en nevera durante 24 horas para separar las fases. Una vez transcurridas las 24 horas se retiró la capa de agua, la fase lipídica se traspasó a tubos de vidrio previamente pesados y se secaron a 40°C bajo atmosfera de nitrógeno y se pesaron para obtener el peso total de lípidos extraídos.

4.3.2 Método B: Borowitzka & Moheimani (2013). Después de 25 días de cultivo se tomaron 10 mL de cultivo y se filtró en membranas de GF/C de 47 mm de diámetro (Whatman) y se secó en horno a 60°C en una cama de silica gel durante la noche. Una vez seco el filtro se pesó para determinar el peso seco y se sumergió en nitrógeno líquido y se maceró hasta destruir completamente el filtro, una vez destruido el filtro se agregan 7 mL de solución de Bligh y Dyer y se homogenizó en un sonicador durante 20 minutos, una vez finalizado el tiempo se agregaron otros 7 mL de solución para una segunda extracción, transcurrido el tiempo la mezcla se llevó a centrifuga a 3400 rpm durante 15 minutos, una vez separada la biomasa de los lípidos se agregaron 3 mL de cloroformo analítico. La mezcla se dejó en nevera durante 24 horas para separar las fases.

Una vez transcurridas las 24 horas se retiró la capa de agua, la fase lipídica se traspasó a tubos de vidrio previamente pesados y se secaron a 40°C bajo atmosfera de nitrógeno y se pesaron para obtener el peso total de lípidos extraídos.

4.3.3 Método C: Biomasa húmeda con modificación a Eroglu & Mellis (2010). Después de 25 días de cultivo, 10 mL de cultivo se agregan en tubos falcon de 50 mL y se adicionan 5.7 mL de Bligh & Dyer y aproximadamente 50 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm y se homogenizó con vortex durante 15 minutos a máxima velocidad, una vez finalizado el tiempo se agregaron otros 7 mL de solución para una segunda extracción, transcurrido el tiempo la mezcla se llevó a centrifuga a 3400 rpm durante 15 minutos, una vez separada la biomasa de los lípidos se

agregaron 3 mL de cloroformo analítico. La mezcla se dejó en nevera durante 24 horas para separar las fases. Una vez transcurridas las 24 horas se retiró la capa de agua, la fase lipídica se traspasó a tubos de vidrio previamente pesados y se secaron a 40°C bajo atmosfera de nitrógeno y se pesaron para obtener el peso total de lípidos extraídos.

4.3.4 Cuantificación de hidrocarburos (Eroglu & Melis, 2010). Para determinar la eficiencia de extracción de hidrocarburos se evaluaron los tres métodos mencionados anteriormente con una modificación en el solvente empleado, en vez de agregar solución de Bligh & Dyer se agregaron 5 mL de heptano (grado analítico), para separar el heptano del resto de la muestra se agregaron 10 mL de medio de cultivo estéril, la mezcla se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos. La fase superior de la muestra (heptano con hidrocarburos) fue transferida a celdas de cuarzo y se midió la absorbancia a 190nm en un espectrofotómetro UV-VIS.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Aislamiento y caracterización del lago. Durante el tiempo de monitoreo al lago solo se registraron 2 blooms, el primero en agosto de 2010 y el segundo en marzo de 2013 (Figura 3), de igual forma los resultados peso seco de las muestras evidencian cambios significativos, pasando de menos de 0.6 g/L en el 2012 a 8 g/L en el 2013 (Figura 4), cabe resaltar que durante el muestreo en el 2013, las muestras del Bloom estaba compuesto principalmente por colonias en estado latente, sin embargo fue posible encontrar colonias en estado activo.

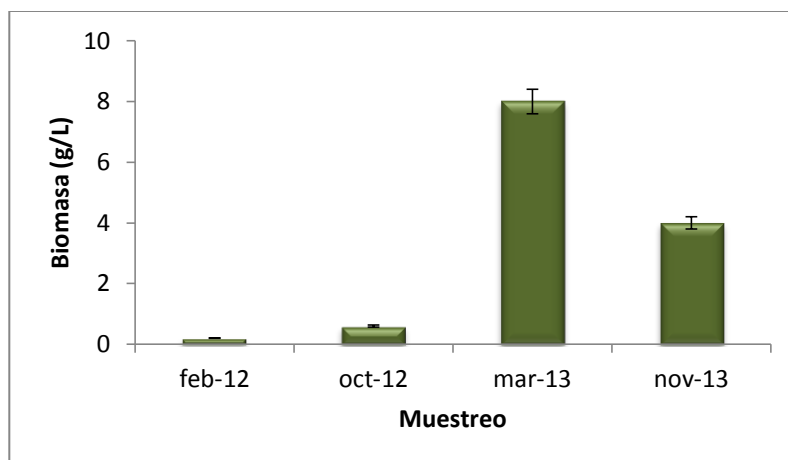
La biomasa obtenida en cada uno de los muestreos fue analizada para conocer principalmente su contenido de Lípidos, hidrocarburos y proteínas (Figura 5), los resultados evidencian el alto contenido de lípidos, el cual es mayor o igual al 40% de la biomasa seca, con un contenido de hidrocarburos del 6% (p/p). Mucho se ha

discutido desde el Bloom en el río Darwin en 1979, donde los valores encontrados para la concentración de lípidos totales rondaba el 75% del peso total y hasta la fecha no se ha podido demostrar con ninguna cepa (ni con la misma aislada de ese Bloom) que estos valores se puedan repetir, sin embargo durante el aislamiento de esta nueva cepa se pudo observar que muchas de las colonias en estado latente (color rojo) no poseían células en su interior, permaneciendo solo la matriz exopolimérica la cual contiene la mayoría de los hidrocarburos, por lo cual existe la pequeña posibilidad que en su momento, el Bloom del 79 proviniera de un sistema depositado de *B. braunii* con muchas colonias, algunas de ellas ya sin material celular vivo, dando así la apariencia de poseer concentraciones muy elevadas.

Figura 3. Lago sin Bloom, Agosto 2012 (izquierda) y con Bloom Marzo 2013 (Derecha)



Figura 4. Concentración de biomasa (g/L) en los diferentes muestreos



Después de 3 semanas de incubación de las placas se evidenció el cambio fotosintético en las colonias, pasando de color rojo (latencia) a verde (activo), Sin embargo, comenzaron a proliferar rápidamente otras microalgas como *Chlorococcum* sp (Figura 6), Las cuales dificultaron la posibilidad de obtención de colonias monoalgales.

Figura 5. Concentración de biomasa (g/L) en los diferentes muestreos

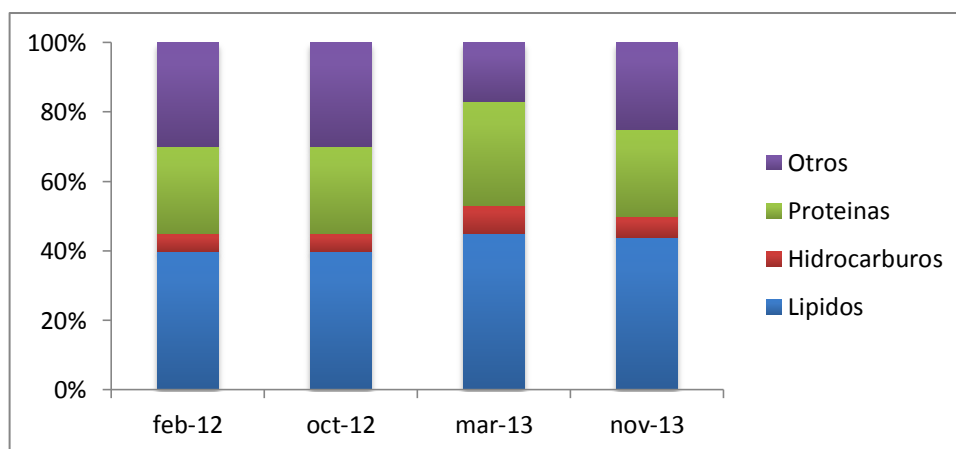
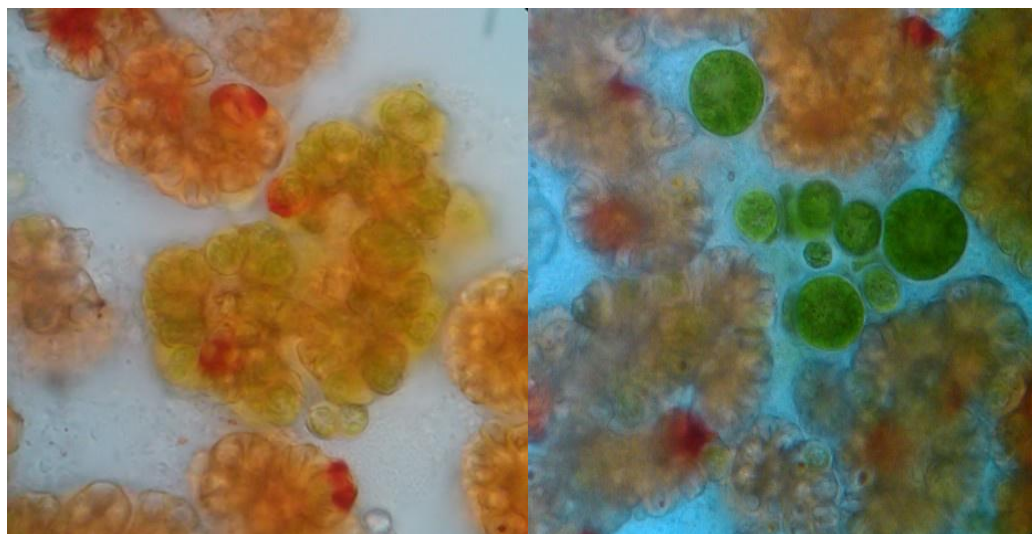


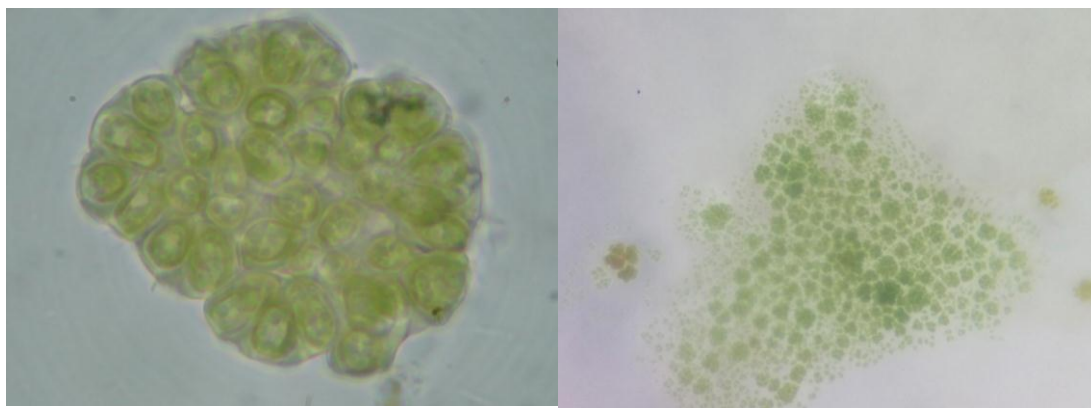
Figura 6. Colonias cambiando de estado latente (rojo) a activo (verde) (Izquierda) e Individuos pertenecientes al género *Chlorococcum* sp (Derecha).



Fuente: Autor

Después de 3 meses de incubación en las cajas de Petri se obtuvieron colonias (Figura 7).

Figura 7. Placa axénica de *B. braunii* (Izquierda) y colonia de *B. braunii* (Derecha).



4.4.2 Caracterización del medio. De las muestras analizadas del lago, es posible determinar que los niveles de los diferentes macronutrientes esenciales para el crecimiento óptimo microalgal son muy bajos, si se evalúa más detalladamente los niveles de nitrógeno (tanto NO_3 como N total) son relativamente bajos comparados con el contenido de un medio de cultivo como AF-6 (102 y 23 mg/L de NO_3 y N, respectivamente), lo cual estimula el cambio de fase de *B. braunii* hacia un estado latente (rojo).

Tabla 1. Elementos analizados en la laguna divididos por marco y micronutrientes, además de otras variables de importancia

MACRONUTRIENTES			
		2009	2012
Nitratos POR C.I.	mg NO_3 /L	0.23	<0.090
Nitritos POR C.I.	mg NO_2 /L	<0.031	<0.070
Nitrógeno Total (Kjeldahl)	mg/L	1.26	<1.00
Sólidos totales	mg/L	31.40	-----
Sulfatos	mg SO_4 /L	<0.45	<0.50
Sodio por ICP-MS	mg Na/L	3.61	3.63
Potasio por ICP-MS	mg P/L	2.03	1.62
Fosfato por ICP-MS	mg PO_4 /L	---	----
MICRONUTRIENTES			
		2009	2012
Cadmio por ICP-MS	$\mu\text{g/L}$	0.061	<0.020
Cobre por ICP-MS	$\mu\text{g/L}$	6.875	0.997
Níquel por ICP-MS	$\mu\text{g/L}$	1.626	0.292
Vanadio por ICP-MS	$\mu\text{g/L}$	1.28	2.65
Manganeso por ICP-MS	$\mu\text{g/L}$	1.81	60,9
Magnesio por ICP-MS	$\mu\text{g/L}$	781	848
Aluminio por ICP-MS	$\mu\text{g/L}$	30.15	402
Hierro por ICP-MS	$\mu\text{g/L}$	171.7	772
Zinc por ICP-MS	$\mu\text{g/L}$	29	<15.2
Cobalto por ICP-MS	$\mu\text{g/L}$	<0.322	1.24
Molibdeno por ICP-MS	$\mu\text{g/L}$	0.207	<0.029

Tabla 1. Continúa...

OTRAS VARIABLES		2009	2012
DQO	mg O ₂ /L	34.4	106
ALCALINIDAD TOTAL	mg CaCO ₃ /L	10.40	13.60
BICARBONATOS	mg HCO ₃ ⁻ /L	-----	20.30
CLORUROS EN AGUAS POR I.C.	mg/L	4.09	2.67

4.4.3 Selección medio de cultivo para la nueva cepa. La Tabla 7 se muestra la comparación entre los 4 medios seleccionados para el cultivo de *B. braunii* se muestra el efecto de los diferentes medios en la producción de biomasa de la nueva cepa de *B. braunii*

Tabla 2. Comparación de los medios más empleados para el cultivo de *B. braunii*.

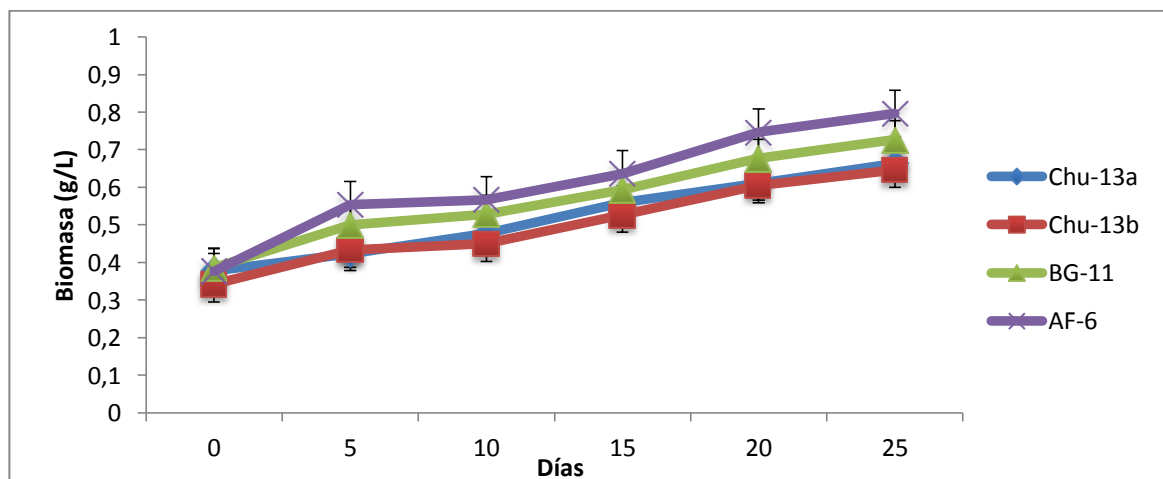
	AF-6	Modif Chu 13 ^a	Modif Chu 13 ^b	BG-11
NaNO ₃	140	---	---	1500
KNO ₃	---	200	400	---
KH ₂ PO ₄	10	---	---	---
K ₂ HPO ₄	5	40	80	30.53
MgSO ₄ 7H ₂ O	30	100	200	75
CaCl ₂ 2H ₂ O	10	80	107	36
MES Buffer	400	---	---	---
NH ₄ NO ₃	22	---	---	---
Fe-Citrate	2	10	20	---
Citric acid	2	100	100	6
Ferric Ammonium citrate	---	---	---	6
Na ₂ CO ₃	---	---	---	20
MgNa ₂ EDTA H ₂ O	---	---	---	1
H ₃ BO ₃	---	2.86	5.72	2.86
CoCl ₂	0.02	0.01	0.02	---
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.18	1.81	3.62	1.81

Tabla 2. Continúa...

	AF-6	Modif Chu 13 ^a	Modif Chu 13 ^b	BG-11
ZnSO ₄	0.11	0.22	0.44	0.22
CuSO ₄	---	0.08	0.16	0.079
Na ₂ MoO ₄	2E ⁻⁵	0.042	0.084	3.9E ⁻⁴
NaEDTA 2H ₂ O	5	---	---	---
FeCl ₃ 6H ₂ O	098	---	---	---
Co(NO ₃) ₂	---	---	---	0.049
MoO ₃	---	---	---	---
Thiamine HCl	0.01	---	---	---
Biotin	0.002	---	---	---
Pyridoxine	0.001	---	---	---
Cyanocobalamin	0.001	---	---	---

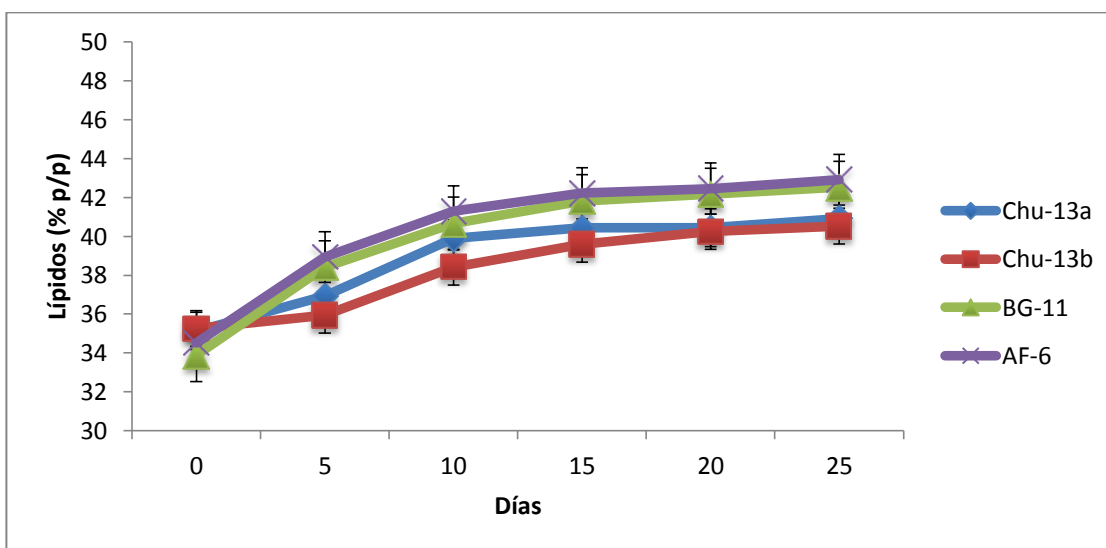
Durante un cultivo de 25 días se pudo evidenciar que el medio de cultivo que aumenta significativamente la biomasa producida es el AF-6 con una producción final de 0,8 g/L (Figura 8), seguido por el medio BG-11 con 0,7 g/L, por último los medios CHU-13 obtuvieron las menores producciones de biomasa (entre 0,63 y 0,66).

Figura 8. Producción de biomasa de *B. braunii* bajo diferentes medios de cultivo.



Al igual que la producción de biomasa, los lípidos como los hidrocarburos (figura 9 y 10 respectivamente) se vieron influenciados positivamente por los medios AF-6 y BG-11 (entre 42.9 y 42.5 % para lípidos 11 y 9.9 % p/p para hidrocarburos) mientras que los cultivos con el medio CHU las producciones fueron ligeramente menores.

Figura 9. Producción de Lípidos de *B. braunii* bajo diferentes medios de cultivo.



Teniendo en cuenta los resultados anteriores se procedió a diseñar un medio de cultivo para la nueva cepa aislada, además de los dos medios anteriores (AF-6 y BG-11), se utilizó el medio BBM debido a que fue en este medio se desarrolló el aislamiento, a partir de estos resultados se decidió diseñar un medio de cultivo para la cepa aislada, debido a que la intención es evaluar la viabilidad económica de la producción de esta cepa, en el nuevo medio se eliminó la adición de vitaminas.

Figura 10. Producción de hidrocarburos de *B. braunii* bajo diferentes medios de cultivo.

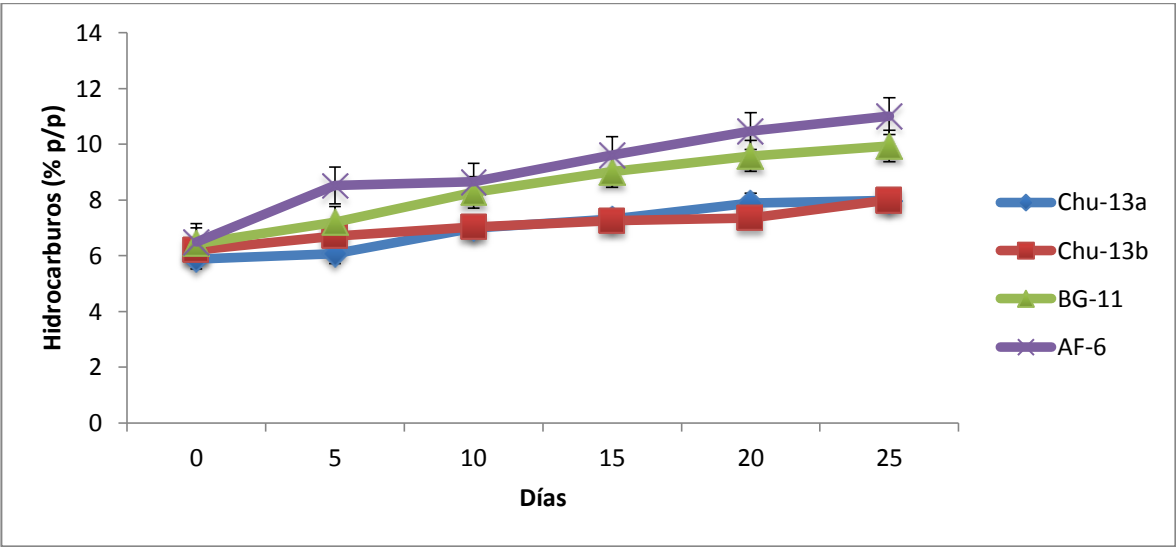


Tabla 3. Producción de hidrocarburos de *B. braunii* bajo diferentes medios de cultivo.

	AF-6	Modif Chu 13 ^a	Modif Chu 13 ^b	BG-11	BBM	AB-Media*
NaNO ₃	140	---	---	1500	250	---
KNO ₃	---	200	400	---	---	200-1500
KH ₂ PO ₄	10	---	---	---	175	175
K ₂ HPO ₄	5	40	80	31	75	75
MgSO ₄ 7H ₂ O	30	100	200	75	75	75
CaCl ₂ 2H ₂ O	10	80	107	36	25	25
MES Buffer	400	---	---	---	---	---
NH ₄ NO ₃	22	---	---	---	---	---
Fe-Citrate	2	10	20	---	---	2
Citric acid	2	100	100	6	---	2
Ferric Ammonium citrate	---	---	---	6	---	---
Na ₂ CO ₃	---	---	---	20	---	---
MgNa ₂ EDTA H ₂ O	---	---	---	1	---	---
NaCl	---	---	---	---	25	25
EDTA	---	---	---	---	50	50
KOH	---	---	---	---	31	31
FeSO ₄ 7H ₂ O	---	---	---	---	5	5
H ₃ BO ₃	---	2.860	5.720	2.860	11.420	2.860
CoCl ₂	0.020	0.010	0.020			
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.180	1.810	3.620	1.810	1.441	1,810
ZnSO ₄	0.110	0.220	0.440	0.220	8.828	0,220
CuSO ₄		0.080	0.160	0.079	1.571	0,079
Na ₂ MoO ₄	2E ⁻⁵	0.042	0.084	3.91E ⁻⁴	---	3.91E ⁻⁴
NaEDTA 2H ₂ O	5	---	---	---	---	---
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,80	---	---	---	---	---
Co(NO ₃) ₂	---	---	---	0.049	0.489	0.489
MoO ₃	---	---	---	---	0.710	0.710

^a Según Largeau (1980)

^b Según Yamaguchi *et al* (1987)

* Designed media for *B. braunii*

Los resultados muestran que el nuevo medio diseñado permite un crecimiento rápido de la cepa aislada de *B. braunii* con cerca de 0.7 g/L después de 25 días (figura 11), lo cual lo pone al nivel del medio BG-11 y aún por debajo del medio AF-6, sin embargo, al no utilizar vitaminas el medio desarrollado es económicamente más viable que el AF-6.

Figura 11. Producción de Biomasa de *B. braunii* para el medio modificado.

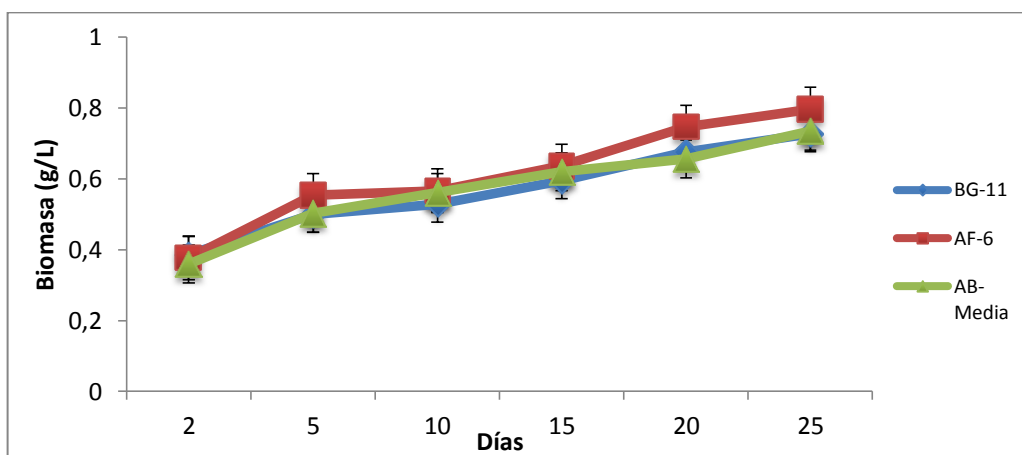
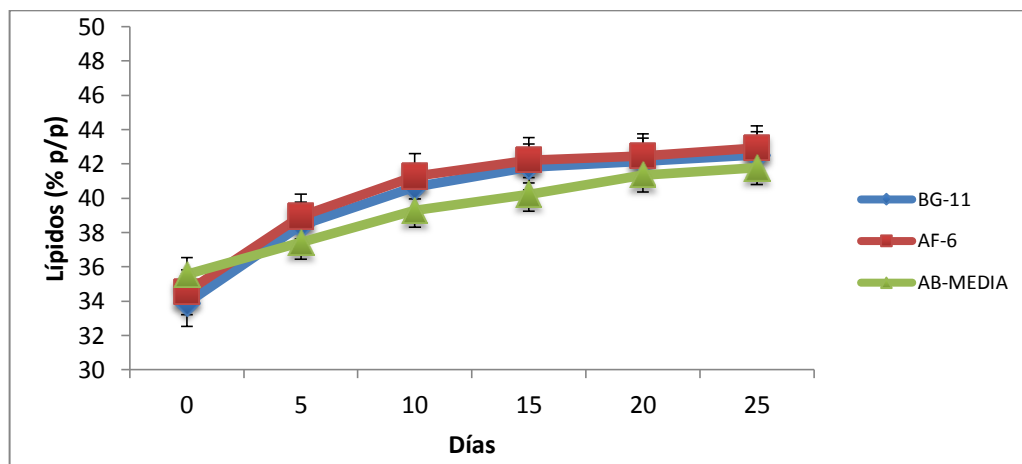
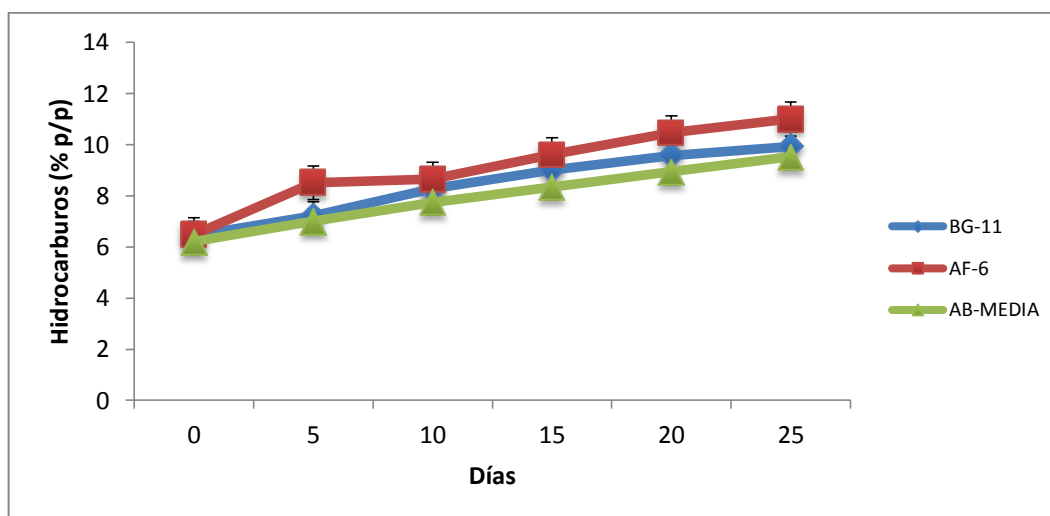


Figura 12. Producción de lípidos de *B. braunii* para el medio modificado.



De igual forma, la concentración de lípidos (Figura 12) empleando el medio propuesto es menor que los anteriores (41 contra 42 %); este comportamiento se repite igual en la deposición de hidrocarburos (9 contra 11%) (Figura 13) el cual es uno de los principales atractivos de esta especie, la cual aunque posee un crecimiento lento en comparación a géneros como *Chlorella* y *Scenedesmus*, la alta producción de lípidos, principalmente hidrocarburos la convierten en una cepa promissora para la obtención de biocombustibles.

Figura 13. Producción de hidrocarburos de *B. braunii* para el medio modificado.



La figura 14 muestra el crecimiento de *B. braunii* bajo diferentes concentraciones iniciales de biomasa, se puede observar que al final del experimento (día 25) al utilizar la mayor concentración celular (0.4 g/L) es posible obtener hasta 0.8 g/L de biomasa, seguido por la concentración inicial de 0,12 g/L con una producción de 0.63 g/L); sin embargo, cabe resaltar que aunque la concentración inicial afecta significativamente la concentración final de biomasa, la productividad (Tabla 8) entre cada uno de los diferentes son relativamente parecidas (entre 0.02 y 0.03

g/L*d⁻¹), por lo cual la concentración celular inicial no afecta de forma representativa la producción de biomasa en *B. braunii*.

Figura 14. Producción de Biomasa de *B. braunii* para diferentes concentraciones iniciales de biomasa.

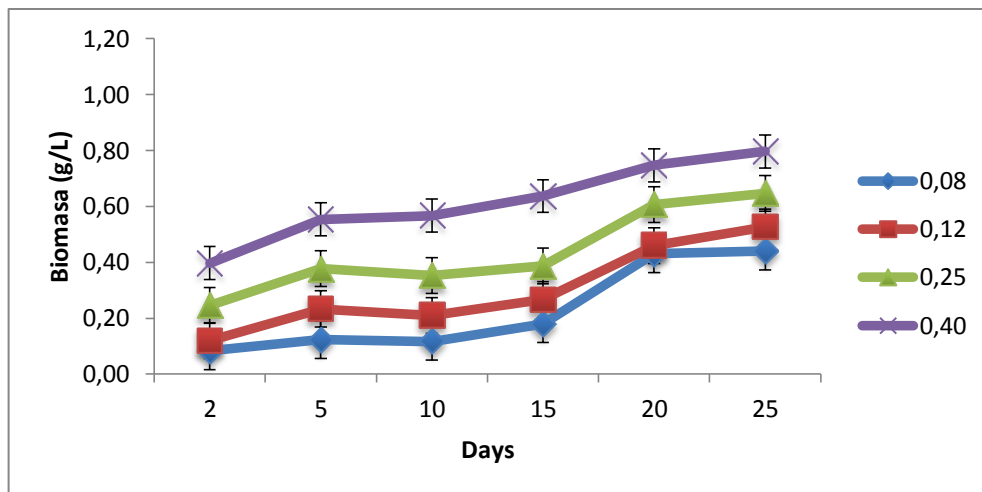
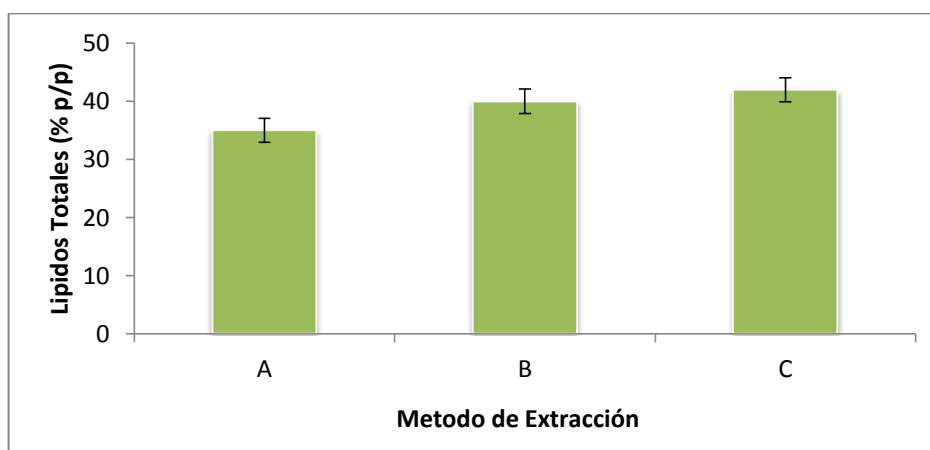


Tabla 4. Producción y productividad de biomasa para diferentes concentraciones iniciales de biomasa

Concentración inicial Biomasa (g/L)	Producción Biomasa (g/L)	Productividad Biomasa (g/L *dia ⁻¹)
0.08	0.44	0.02
0.12	0.53	0.02
0.25	0.65	0.03
0.4	0.8	0.03

4.4.4 Eficiencia extracción de lípidos e hidrocarburos. Las gráficas 15 y 16 muestran la eficiencia de extracción para lípidos totales e hidrocarburos, donde el método C (extracción asistida con perlas de vidrio) es más eficiente (20% más) que el método Blight & Dyer utilizando biomasa seca y muy similar al método descrito por Borowitzka & Moheimani (2013) con la diferencia en el tipo de disrupción celular empleada. El método desarrollado aplica los principios de destrucción celular asistida por vortex descritos por Eroglu & Melis (2010) para la extracción *in vivo* de botriococenos, pero en vez de utilizar heptano se empleó una solución de metanol/cloroformo/agua.

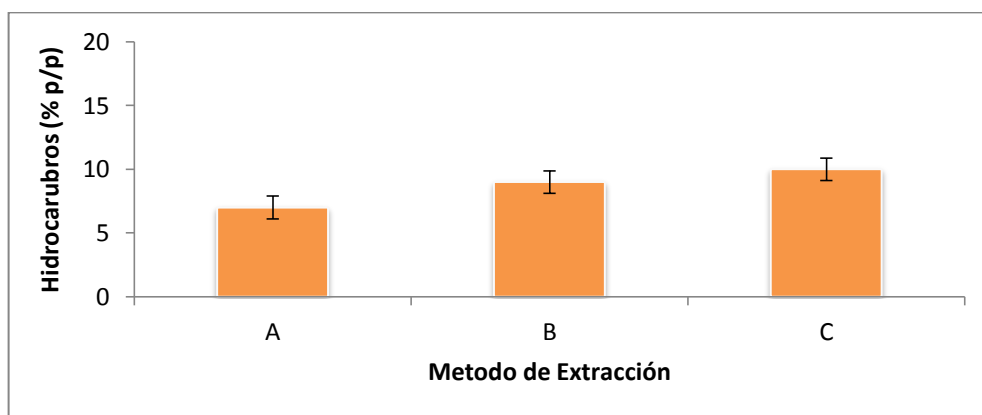
Figura 15. Extracción de lípidos empleando los métodos: A. Blight & Dyer, B. Borowitzka & Moheimani y C. biomas humeda modificado de Eroglu & Melis.



4.4.5 Efecto concentración celular inicial. A diferencia del presente, el método de Borowitzka & Moheimani (2013) requiere del uso constante de nitrógeno líquido para asegurar una eficiente extracción, el cual posee restricciones para su manejo e implementación; de igual forma el método planteado mediante la experimentación posee la ventaja de no requerir de un secado previo, ya que según Weiss *et al* (2010) al secar la biomasa la matriz polimérica extracelular que

rodea las colonias pueden cambiar morfológicamente y comportarse como una barrera impermeable que evite la remoción eficiente de los hidrocarburos de la colonia hacia al medio exterior que los hidrocarburos líquidos no sean removidos de la colonia.

Figura 16. Extracción de hidrocarburos empleando los métodos: A. Blight & Dyer, B. Borowitzka & Moheimani y C. biomas húmeda modificado de Eroglu & Melis.



4.5 CONCLUSIONES

A partir de los muestreos desarrollados durante 2 años fue posible aislar una cepa de *Botryococcus braunii* considerada según ICP-ECOPETROL como promisoría para la producción de biocombustibles, de igual forma se obtuvo un nuevo medio de cultivo, con el cual es posible obtener hasta 0.7 g/L y una productividad de 0.028 g/L*d⁻¹ en un periodo de 25 días con una concentración de lípidos e hidrocarburos de 41% y 9% (p/p); por otra parte se pudo comprobar que al aumentar la concentración inicial de biomasa inoculada (de 0.08 a 0.4 g/L) la productividad no se ve afectada, ya que el aumento no es significativo (de 0.02 a 0.03 g/L), por otro lado se encontró que el método de extracción empleando

biomasa húmeda con asistencia mecánica demostró ser más simple para la recuperación de lípidos totales e hidrocarburos presentes en *B. braunii*, ya que al reemplazar el uso de agentes peligrosos y de alto costo como el nitrógeno líquido por procesos mecánicos no reactivos con la biomasa (en este caso las perlas de vidrio) reduce los costos para el monitoreo en la concentración total de lípidos e hidrocarburos, de igual forma este método posee una eficiencia de 20% más en comparación al método tradicional de Blight & Dyer, además no requiere de grandes cantidades de biomasa (20 mL de cultivo contra 100 mg de biomasa seca) y menos tiempo de procesamiento, evitando así que la biomasa pueda ser alterada por procesos térmicos que puedan modificar irreversiblemente la matriz polimérica extracelular.

5. EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y CARBONO EN LA PRODUCCIÓN DE *B. braunii*.

5.1 INTRODUCCIÓN

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

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

Existen diferentes estudios sobre el mejoramiento del medio de cultivo, los cuales van desde la mejor fuente de carbono (Linh *et al.*, 2010; Tanoi *et al.*, 2011; Bazaes *et al.*, 2012; Rao & Sarada, 2012), nitrógeno (Dayananda *et al.*, 2007) y fósforo (An *et al.*, 2003) y otros componentes menores, hasta del efecto de la concentración de CO₂ en la deposición de botriococenos (Ge *et al.*, 2011).

Otros estudios más completos como el de Ruangsomboon (2011), evalúan una gran cantidad de nutrientes (nitrógeno, fósforo y hierro), intensidades lumínicas y ciclos luz/oscuridad, encontrando que al igual que en otras algas, al disminuir la concentración inicial de nitrógeno, es posible aumentar la deposición de lípidos, además de aumentar la productividad de botriococenos. No obstante, cada una de estas variables fue evaluada por separado lo que no permite visualizar un sistema integral de cultivo de *B. braunii*, ya que aunque se conozcan cada una de estas

variables por separado, se desconoce por completo el efecto de su interacción en la producción de botriocenos, debido a que en organismos fotosintéticos hasta el 50% del carbono fijado (en forma de CO_2) se destina para la fijación del nitrógeno (Huppe & Turpin, 1994), por lo cual la optimización de las condiciones de cultivo *B. braunii* es esencial para el desarrollo comercial y rentable en la producción de biocombustible. Sin embargo, muchos investigadores que abordan este tema han utilizado diferentes cepas, lo que dificulta proponer las mejores condiciones de cultivo para todas las cepas de *B. braunii*. Sin lugar a dudas, las condiciones de cultivo óptimas son propias de cada cepa específica.

En el presente capítulo se presenta una metodología para la obtención de la mayor cantidad de biomasa e hidrocarburos producidos por *B. braunii* evaluando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno y diferentes concentraciones de estos; una vez obtenidos la mejor fuente de carbono y nitrógeno se procederá a evaluar el efecto de sus concentraciones en la producción final de biomasa y la concentración de lípidos e hidrocarburos.

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Fuente de Nitrógeno y Carbono. Se evaluaron 3 formas diferentes de nitrógeno (NO_3^- , NH_4^+ , NH_2^-), dividido en 4 fuentes (NaNO_3 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ y $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) y 3 diferentes concentraciones de cada una (Tabla 9). La concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ y $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ fueron ajustadas teniendo en cuenta la cantidad de N molecular en las diferentes concentraciones de KNO_3 ; Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

Tabla 5. Concentraciones de Nitrógeno.

KNO ₃ (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	(NH ₄) ₂ CO ₃ (g/L)	CO(NH ₂) ₂ (g/L)
1.50	1.26	0.45	0.71
0.75	0.63	0.22	0.36
0.38	0.32	0.11	0.18

Para la fuente de carbono se utilizaron 3 fuentes de carbono (Tabla 10): 2 inorgánicas (Na₂CO₃ y NaHCO₃) y una fuente orgánica (C₂H₃NaO₂), evaluando 3 concentraciones, teniendo en cuenta la concentración de C molecular en NaHCO₃; Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

Tabla 6. Concentraciones de Carbono.

NaHCO ₃ (g/L)	Na ₂ CO ₃ (g/L)	C ₂ H ₃ NaO ₂ (g/L)
2.00	2.52	0.98
1.00	1.26	0.49
0.50	0.63	0.24

5.3 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS

5.3.1 Crecimiento celular (peso seco) (Moheimani et al. 2013). 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 peso constante.

5.3.2 Cuantificación de Lípidos totales (Biomasa húmeda con modificación a Eroglu & Mellis (2010)). Al final de la experimentación se toman 10 mL de cultivo y se agregan en tubos falcon de 50 mL y se adicionan 5.7 mL de Bligh & Dyer y aproximadamente 50 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm y se homogenizó con vortex durante 15 minutos a máxima velocidad, una vez finalizado el tiempo se agregaron otros 7 mL de solución para una segunda extracción, transcurrido el tiempo la mezcla se llevó a centrifuga a 3400 rpm durante 15 minutos, una vez separada la biomasa de los lípidos se agregaron 3 mL de cloroformo analítico. La mezcla se dejó en nevera durante 24 horas para separar las fases. Una vez transcurridas las 24 horas se retiró la capa de agua, la fase lipídica se traspasó a tubos de vidrio previamente pesados y se secaron a 40°C bajo atmosfera de nitrógeno y se pesaron para obtener el peso total de lípidos extraídos.

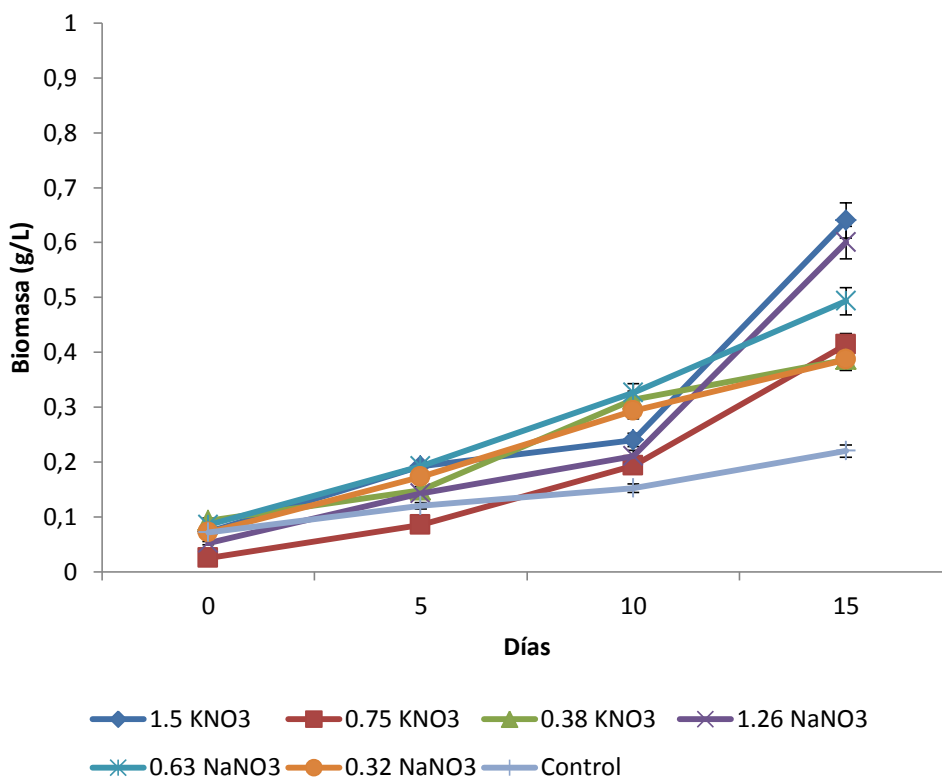
5.3.3 Cuantificación de hidrocarburos (Eroglu & Melis, 2010). Al final de la experimentación se tomaron 20 mL, los cuales se centrifugaron a 3400 rpm durante 20 minutos, al pellet se le agregaron 5 mL de Heptano grado analítico y 5 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro; la mezcla se homogenizó con vortex a velocidad máxima durante 15 minutos; despues 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)

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Producción de biomasa variando la fuente de nitrógeno. Las producciones de biomasa variando la fuente de nitrógeno se muestran en las figuras 17a y b; para el caso de la fuente de nitrato, se encontró que a mayores concentraciones de esta (1.5 g/L KNO_3 y 1.26 g/L NaNO_3) se obtienen las mayores concentraciones de biomasa en un tiempo de 15 días, estos resultados

son congruentes por los reportados por Dayananda et al (2006), donde obtienen las mayores productividades de biomasa con la mayor concentración de nitrato (1.5 g/L de NaNO_3), de igual forma es congruente con lo reportado por Cheng et al (2014).

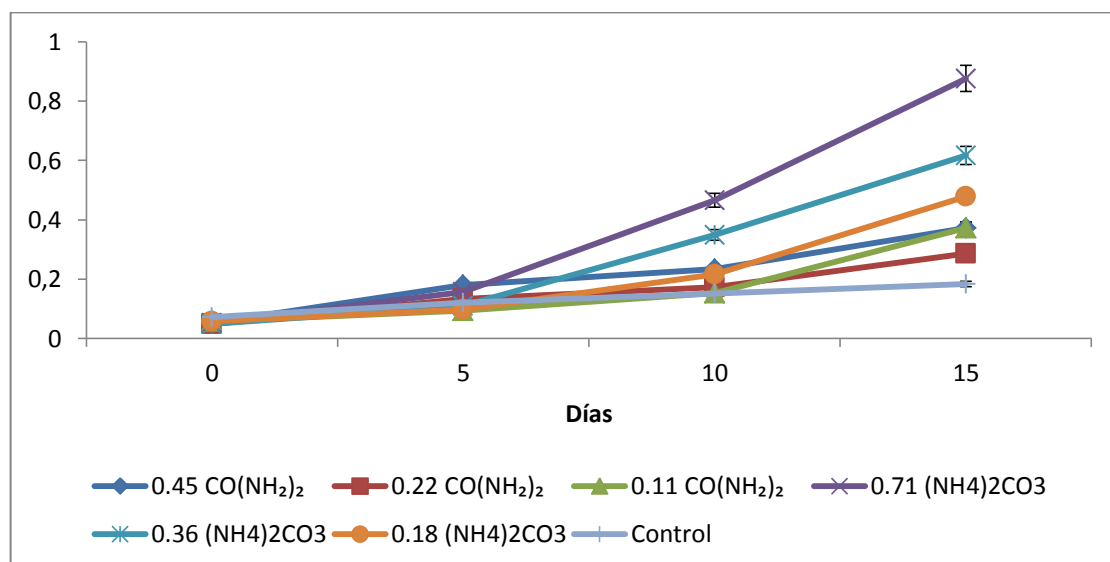
Figura 17a. Producción de biomasa variando la fuente de Nitrógeno.



Por otro lado, al utilizar otras formas de nitrógeno (NH_2^- y NH_4^+) se obtienen menores concentraciones de biomasa, esto está acorde a lo reportado por Dayananda et al (2006). De acuerdo con Ohmori et al., (1984), altas concentraciones de NH_4^+ afectan negativamente la producción de biomasa, sin embargo en el presente estudio se obtiene la producción más alta (0.88 g/L) más

alta, esta diferencia en los resultados se debe principalmente a la diferencia en las fuentes utilizadas, Ohmori *et al.*, (1984) utilizaron NH_4NO_3 , mientras que en este trabajo se utilizó $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, gracias al exceso de C debido al ion carbonato presente en esta sustancia es posible obtener la concentración más alta de biomasa (0.88 g/L)

Figura 17b. Concentración de biomasa variando la fuente de Nitrógeno.



5.4.2 Producción de lípidos e hidrocarburos variando la fuente de nitrógeno.

Después de 15 días de cultivo tanto el contenido de lípidos como de hidrocarburos fue cuantificado para cada uno de los experimentos, demostrando que sin importar la fuente implementada de nitrógeno, la síntesis y deposición de lípidos e hidrocarburos no se ve afectada significativamente, presentando valores similares para todos la mayoría de experimentos (35% p/p en lípidos y 6% p/p de hidrocarburos), sin embargo debido a la presencia del ion carbonato en los experimentos con carbonato de amonio, las concentraciones de estos dos

metabolitos fueron ligeramente mayores (38% p/p para lípidos y 7% p/p para hidrocarburos).

Figura 18a. Concentración de Lípidos totales e hidrocarburos variando la fuente de Nitrógeno.

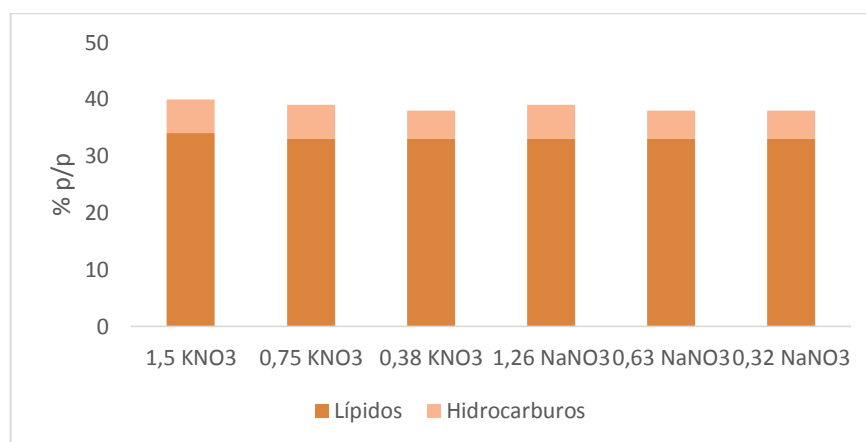
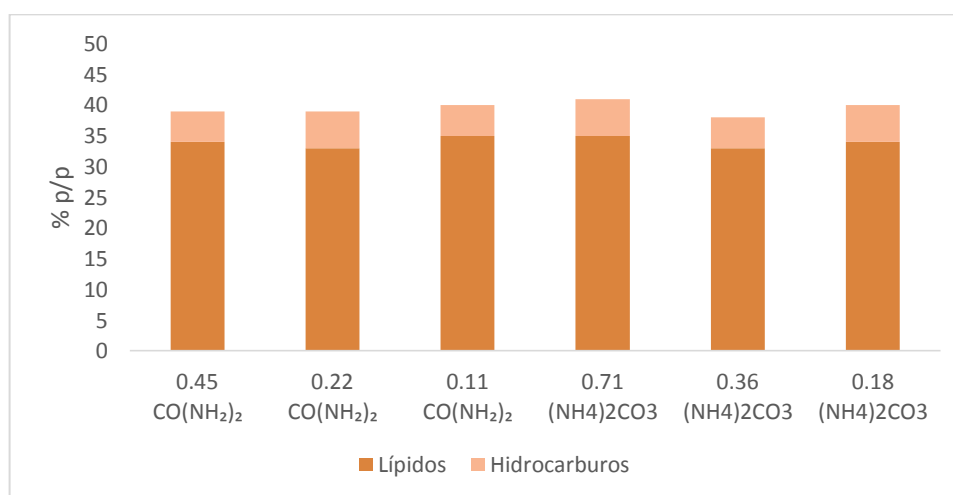


Figura 18b. Concentración de Lípidos totales e hidrocarburos variando la fuente de Nitrógeno.



5.4.3 Producción de biomasa variando la fuente de carbono. La influencia de la fuente de carbono en la producción de biomasa se muestra en la figura 19(a, b y c), donde se observa que la fuente que más favorece la producción de biomasa es el acetato de sodio, con una producción final de 0,92 g/L empleando 0,98 g/L de acetato, esto se debe primero que todo a que a diferencia de las otras dos fuentes empleadas, el acetato de sodio es una fuente orgánica de carbono, además *B. braunii* posee la habilidad de crecer de forma mixotrófica (Weetall, 1985), de igual forma Kong *et al* (2010) demostraron que *B. braunii* cuando emplea acetato como fuente de carbono crece más eficientemente en concentraciones entre 10 y 20 mM (0.82-1.64 g/L); por otro lado Nomomura (2011) patentó un método para cultivar el género *Botryococcus* utilizando 2 formas de acetato (sodio y potasio); sin embargo, después del quinto día las concentraciones de biomasa decrecen rápidamente; a diferencia del acetato, las fuentes inorgánicas (carbonato y bicarbonato) requieren de un tiempo más largo de producción de hasta 15 días.

Figura 19a. Producción de biomasa variando concentración de NaHCO_3 .

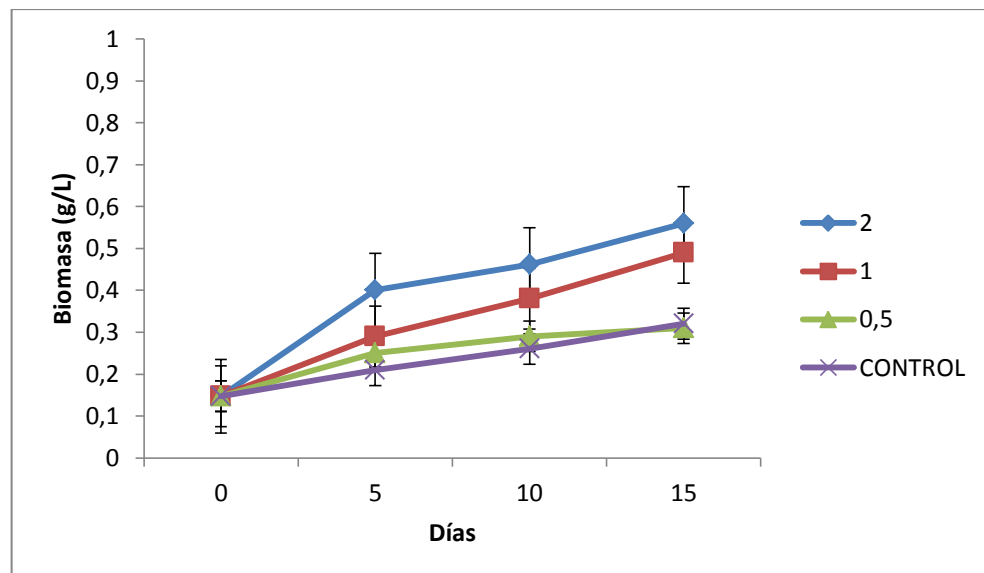
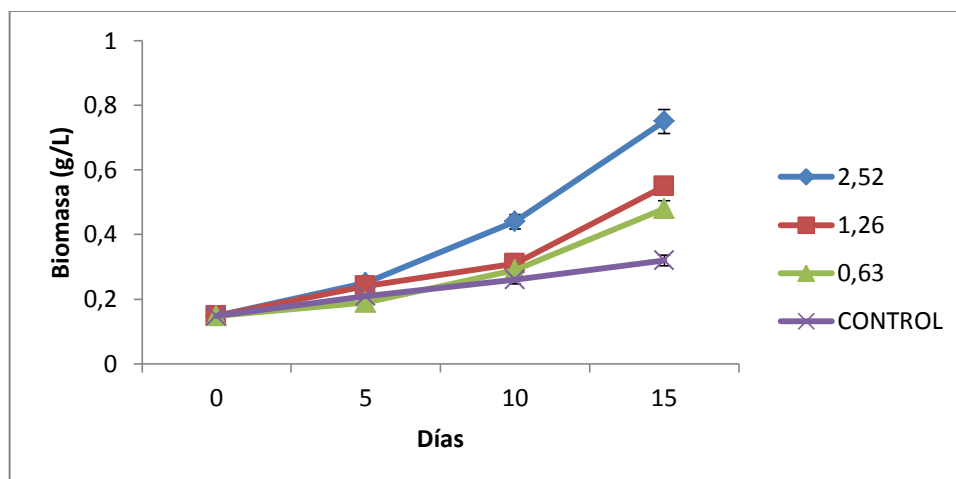
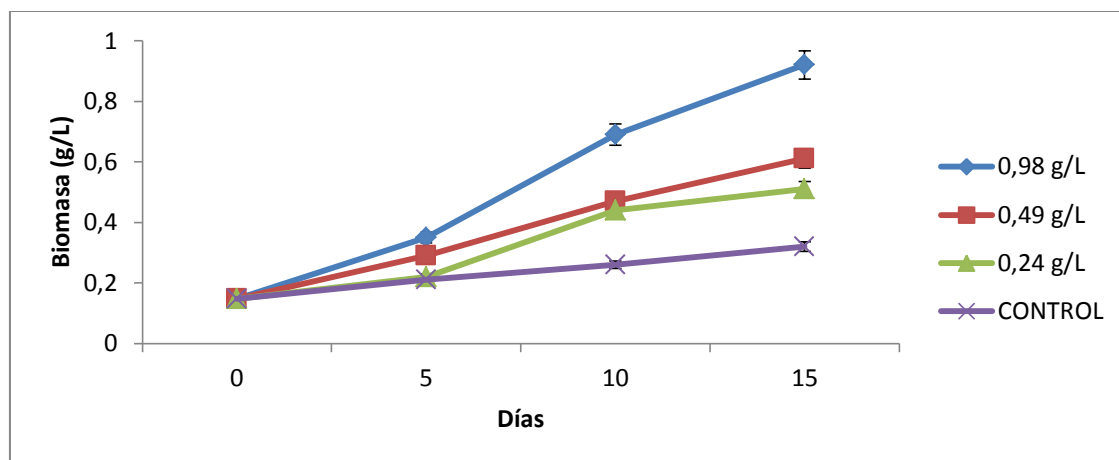


Figura 19b. Producción de biomasa variando concentración de Na_2CO_3



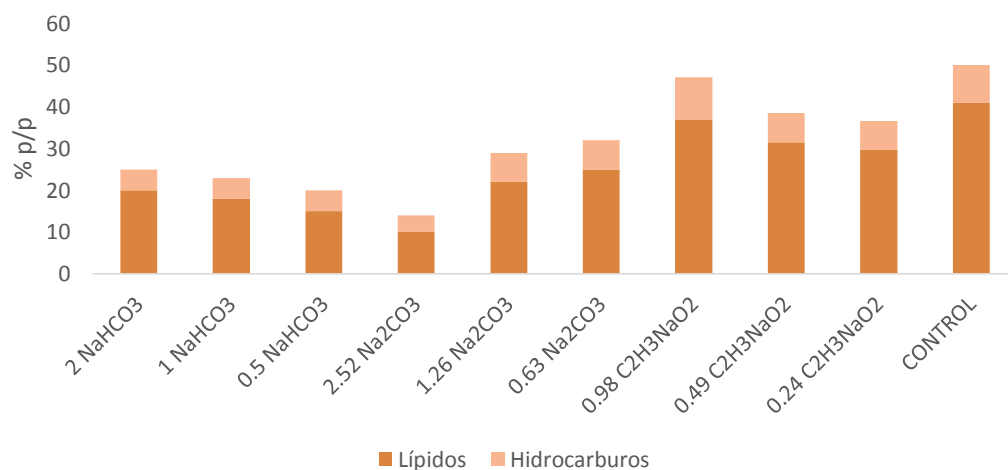
Con respecto a las dos otras fuentes de carbono, el carbonato de sodio (Na_2CO_3) fue empleada más eficientemente (0.75 g/L después de 15 días) que el bicarbonato (NaHCO_3) (0.56 g/L después de 15 días), aun sabiendo que todos los experimentos contaban con la misma cantidad de carbono aun no es claro porqué el alga crece mejor en presencia de carbonato que bicarbonato. Sin embargo los resultados encontrados son congruentes con lo descrito por Rao y Sarada (2012), los cuales encontraron que una concentración de 0.1% (p/v) de Na_2CO_3 incrementa sustancialmente la producción de biomasa en un tiempo de 25 días; en el presente estudio se encontró que la cepa reportada puede tolerar hasta 0.2% p/v (o 2 g/L) de Na_2CO_3 con una producción de biomasa de hasta 0.75 g/L en 15 días

Figura 19c. Producción de biomasa variando concentración de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$.



La concentración final de hidrocarburos para las diferentes fuentes de carbono se presenta en la figura 20, donde se identifica que el acetato es la fuente que más promueve la biosíntesis de hidrocarburos (10%), seguido por el Na_2CO_3 (0.63 y 1.25 g/L de Na_2CO_3) con una concentración de 7% (p/p); por otro lado la mayor concentración de lípidos (37, 31 y 29% p/p) se obtiene empleando acetato en las diferentes concentraciones estudiadas, seguido por el carbonato (25% p/p) empleando 0.63 g/L; por ultimo la menor concentración de hidrocarburos (4%) se obtuvo al utilizar 2.52 g/L de carbonato de sodio, cabe resaltar que además de reducir la producción de hidrocarburos, la concentración total de lípidos para este experimento fue la menor registrada (10% p/p).

Figura 20. Producción de lípidos totales e Hidrocarburos según la fuente de carbono.



5.5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se encontró que el nitrato (tanto KNO₃ como NaNO₃) es la forma de nitrógeno que mas favorece la producción de biomasa, sin embargo no se pudo determinar una diferencia significativa en la deposición de lípidos e hidrocarburos.

En la evaluación de la fuente de carbono se obtuvo que al emplear 0.98 (g/L) de acetato de sodio se obtiene la mayor producción de biomasa (0.92 g/L) en comparación con las otras dos fuentes de carbono estudiadas (Na₂CO₃ y NaHCO₃), esto se debe en gran medida a la naturaleza orgánica del acetato y a la capacidad de crecimiento en condiciones mixotróficas de *B. braunii*; aun teniendo en cuenta estos resultados la principal barrera con el uso de fuentes orgánicas es el alto nivel de contaminación y su costo elevado, por lo cual aunque los resultados son promisorios el acetato no es una fuente que pueda ser rentable a gran escala.

Dentro de las dos fuentes inorgánicas de carbono estudiadas, al emplear carbonato de sodio (Na_2CO_3) se obtuvo la mayor producción de biomasa (0.75 g/L de después de 15 días) utilizando 2.62 g/L, sin embargo esta concentración de carbonato no favoreció la concentración tanto de lípidos (10% p/p) e hidrocarburos (4% p/p); por otro lado las otras dos concentraciones de carbonato (0.63 y 1.26 g/L) favorecieron la concentración tanto de lípidos (25 y 22%) como de hidrocarburos (7% para los dos), mientras que al implementar el bicarbonato de sodio los valores de lípidos se mantuvieron por debajo del 20%.

El mejoramiento de las condiciones del cultivo de *B. braunii* es un proceso esencial para el desarrollo de biocombustibles, los cuales requieren de procesos con un costo-beneficio aceptable, ya que el principal problema con esta especie radica en la especificidad para cada una de las cepas; por lo cual teniendo en cuenta el costo de la fuente de carbono y la viabilidad de obtención de los diferentes metabolitos, se decide mejorar la relación carbono/nitrógeno utilizando Na_2CO_3 y KNO_3 .

6. EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE *B. braunii*.

6.1 INTRODUCCIÓN

Los altos niveles de botriococenos presentes en la raza B de *B. braunii* 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 (Casdevall et al., 1985). 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 (Largeau et al., 1980; Wolf et al., 1985); Sin embargo, para poder producir cualquiera de estos tipos de hidrocarburos se requieren de altas concentraciones de carbono (ya sea orgánico o inorgánico), además como se demostró en los capítulos anteriores, la implementación de otras fuentes de carbono diferentes al CO₂ conlleva problemas tanto metodológicos; Wolf et al (1985) 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.

Uno de los nutrientes más problemáticos a la hora de optimizar la producción de microalgas es el nitrógeno, ya que la tasa de consumo de este nutriente es importante en la regulación metabólica celular (Solovchenko et al., 2008; Takagi et al., 2000), además si se suma el efecto que tiene el consumo de carbono sobre este nutriente (ya sea NO₃⁻ y/o NH₄⁺) ya que hasta el 55% del carbón asimilado está comprometido con el metabolismo del nitrógeno (Huppe & Turpin 1994), por lo cual se hace necesario evaluar estos dos elementos en conjunto.

De acuerdo con Zhila *et al* (2005) bajo limitaciones en la concentración de nitrógeno (específicamente KNO_3) la concentración de ciertos lípidos polares en *B. braunii* cambia drásticamente, en especial en la concentración final de ácido oleico (Choi *et al.*, 2010), además según Cheng *et al* (2013) bajo limitaciones de nitrógeno tanto el contenido de lípidos como de hidrocarburos aumenta sustancialmente y mientras el perfil de hidrocarburos es casi el mismo, la proporción de lípidos cambia, no solo la concentración de ácido oleico sino de ácido linoleico. Sin embargo hasta ahora no existe literatura donde se relacione el posible efecto de estos dos elementos en la producción final de *B. braunii* tanto de biomasa como en metabolitos con valor estratégico para la obtención de biocombustibles como lo son los lípidos y los hidrocarburos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo anterior, se plantea por primera vez un experimento donde se pretende evaluar el efecto del carbono (carbonato de sodio) y de nitrógeno (Nitrato de potasio) en la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos.

De acuerdo con la literatura, la adición de carbono para el cultivo masivo de microalgas representa la principal limitante (Beneman *et al.*, 1987; Oswald, 1988; Tapie & Bernard, 1988; Olaizola *et al.*, 1991) ya que una de las primeras consideraciones que se debe tener al usar CO_2 es que, grandes concentraciones de este pueden inhibir el crecimiento, por otro lado, bajas concentraciones pueden limitar el crecimiento (Rados *et al.*, 1975). Estas concentraciones máximas (inhibidor) y mínimas (limitante) varían de especie en especie, por lo cual la concentración de CO_2 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 CO_2 , el cual no puede ser utilizado por el alga y liberado por el cultivo produciendo así una polución innecesaria (Cheng *et al.*, 2006). Para el caso de *B. braunii*, Ranga Rao *et al* (2007) utilizaron concentraciones cercanas al 20% (v/v) de CO_2 demostrando además que no existe una inhibición aparente del crecimiento celular; estos resultados son consistentes

con los encontrados por Ge *et al* (2011), 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 *et al* (2010), y a los de Chiu *et al* (2008), 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*.

6.2 METODOLOGÍA

6.2.1 Mejoramiento de la relación carbono/nitrógeno. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente se decidió evaluar el efecto del nitrato de potasio (KNO₃) y carbonato de sodio (Na₂CO₃) en la deposición de hidrocarburos y lípidos en *B. braunii*; para desarrollar el análisis se implementó un diseño de experimentos con composición central no factorial de 2³ y 9 experimentos utilizando el software STATISTICA 7.0 (Tabla 11).

Tabla 7. Diseño de experimentos para el mejoramiento de la relación Carbono/Nitrógeno

Exp	KNO ₃ (g/L)	Na ₂ CO ₃ (g/L)
A	0	0.94
B	0.75	0.49
C	0.38	0.63
D	1.54	0.94
E	0.75	0.94
F	1.50	1.26
G	0.38	1.26
H	1.50	0.63
I	0.75	1.39

Una vez obtenido la mejor fuente de nitrógeno se procedió a evaluar el efecto del CO₂ en el cultivo de *B. braunii*, para esto se desarrolló un diseño de experimentos (2³) variando la concentración de los elementos mencionados anteriormente (Tabla 12 y 13).

Tabla 8. Concentraciones de CO₂ y KNO₃ a evaluar en el diseño de experimentos

KNO ₃ (g/L)	CO ₂ (mL/min)
1.5	90
0.75	60
0.38	30

Para los experimentos de adición continua de CO₂ los cultivos se mantuvieron con flujo constante de CO₂ dependiendo de la concentración en cada uno de los

tratamientos; por otro lado, para realizar los experimentos para la adición semi-continua de CO₂ se optó por un control de pH, en cada uno de los experimentos el tiempo de adición de CO₂ dependió de la velocidad para alcanzar un pH máximo de $6 \pm 0,4$; una vez alcanzado el límite inferior se detuvo la adición del gas y se permitió que el cultivo alcanzara un pH de 7; este proceso se repitió durante 12 horas.

Tabla 9. Diseño de Experimentos 2³

Tratamiento	KNO ₃ (g/L)	CO ₂ (mL/min)
A	0.75	102.43
B	1.50	30.00
C	0.75	60.00
D	0.38	90.00
E	0.38	30.00
F	0.75	17.57
G	0.00	60.00
H	1.50	90.00
I	1.54	60.00

6.3 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS

6.3.1 Crecimiento celular (peso seco) (Moheimani et al., 2013). 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.

6.3.2 Cuantificación exopolisacaridos (Dubois et al., 1956). Se tomó 1 mL del medio libre de células (obtenido a partir del medio residual de la filtración para peso seco) se agregaron 0,5 mL de fenol al 5% (p/v) y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado; la mezcla se homogenizó en vortex durante 2 minutos a velocidad media. 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).

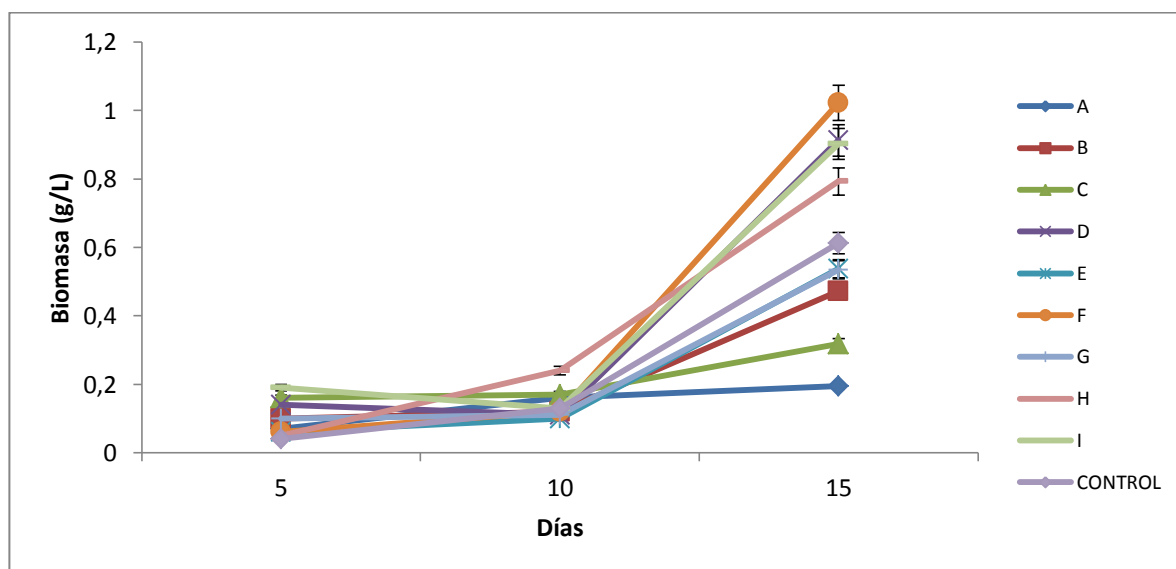
6.3.3 Cuantificación de Lípidos totales (Biomasa húmeda con modificación a Eroglu & Mellis (2010)). Al final de la experimentación se toman 10 mL de cultivo y se agregan en tubos falcon de 50 mL y se adicionan 5,7 mL de Bligh & Dyer y aproximadamente 50 mg de perlas de vidrio de 0,5 mm y se homogenizó con vortex durante 15 minutos a máxima velocidad, una vez finalizado el tiempo se agregaron otros 7 mL de solución para una segunda extracción, transcurrido el tiempo la mezcla se llevó a centrifuga a 3400 rpm durante 15 minutos, una vez separada la biomasa de los lípidos se agregaron 3 mL de cloroformo analítico. La mezcla se dejó en nevera durante 24 horas para separar las fases. Una vez transcurridas las 24 horas se retiró la capa de agua, la fase lipídica se traspasó a tubos de vidrio previamente pesados y se secaron a 40°C bajo atmosfera de nitrógeno y se pesaron para obtener el peso total de lípidos extraídos.

6.3.4 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; despues 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).

6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

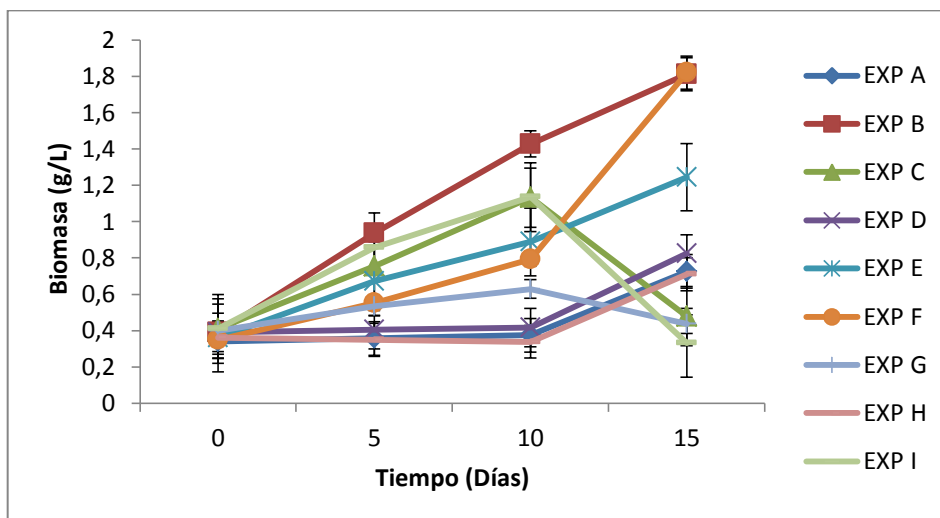
6.4.1 Producción de biomasa empleando Na_2CO_3 . La producción de biomasa siguiendo la metodología de la relación carbono/nitrogeno se presenta en la figura 21. En todos los experimentos presentan un incremento significativo a partir del día 10, sin embargo el experimento E logra su mayor producción al día 10 pero decrece ahí en adelante en comparación con los otros experimentos. Al día 15 los mejores resultados para la producción de biomasa fueron el C, A y D que presentan relaciones de carbono y nitrogeno (4:3; 1:0; 1:2.) alcanzando cerca 1 g/L permitiendo demostrar que al ajustar la relación molecular entre estos dos compuestos es posible mejorar desde 0,75 g/L hasta cerca de 1 g/L.

Figura 21. Producción de biomasa empleando Na_2CO_3 .



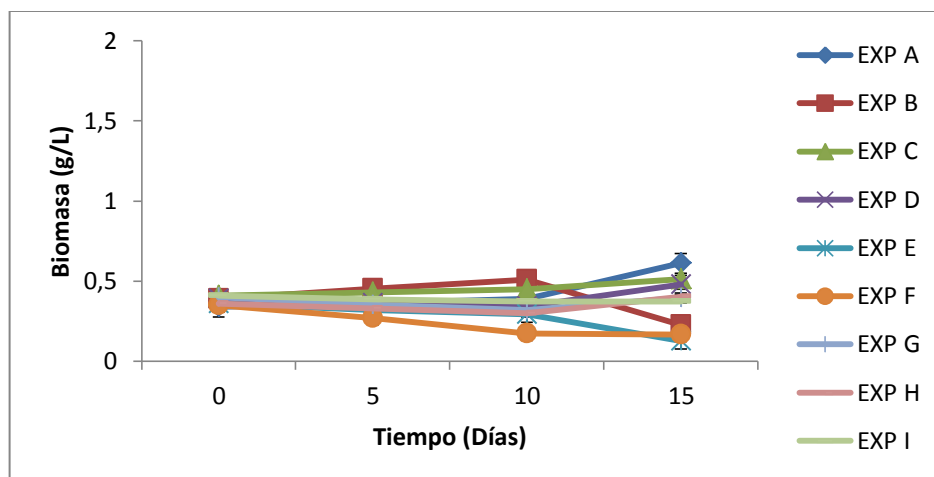
6.4.2 Producción de biomasa empleando CO₂:

Figura 22. Producción de biomasa CO₂ Continuo.



Bajo condiciones de adición continua de CO₂ es posible obtener hasta 1,8 g/L (Figura 22) en 15 de días de cultivo con condiciones de bajas concentraciones de CO₂ (entre 17 y 30 mL/min) y altos contenidos de nitrógeno (entre 0,75 y 1,5 g/L), sin embargo en los experimentos con concentraciones de 60 mL/min de CO₂ y altos valores de nitrógeno (entre 0,75 y 1,5 g/L) después de 10 días el crecimiento se vuelve negativo, esto puede deberse a cambios en la cantidad de nitrógeno en el medio; por otro lado, los concentraciones mayores de CO₂ y con diferentes concentraciones de nitrógeno (A, D y H) crecieron lentamente, esto puede deberse al pH, el cual vario entre 4,5 y 5,6 durante el tiempo de cultivo.

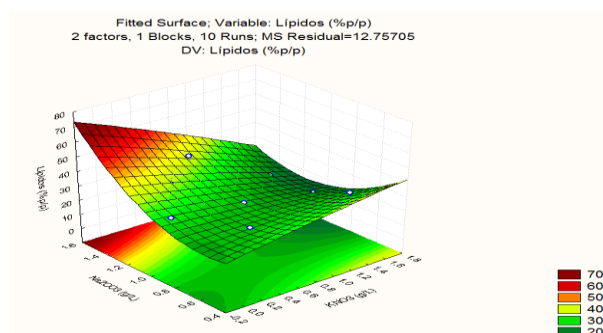
Figura 23. Producción de biomasa CO_2 Semi-continuo.



Los cultivos con adición semi-continua (Figura 23) demuestran que es necesario adicionar grandes cantidades de CO_2 permitiendo así una saturación rápida en el medio, para así obtener los valores más altos en este experimento (0,6 g/L), sin embargo las producciones son inferiores a los reportados para el cultivo continuo, lo cual permite dilucidar que se requiere de un control de pH entre 5 y 6.

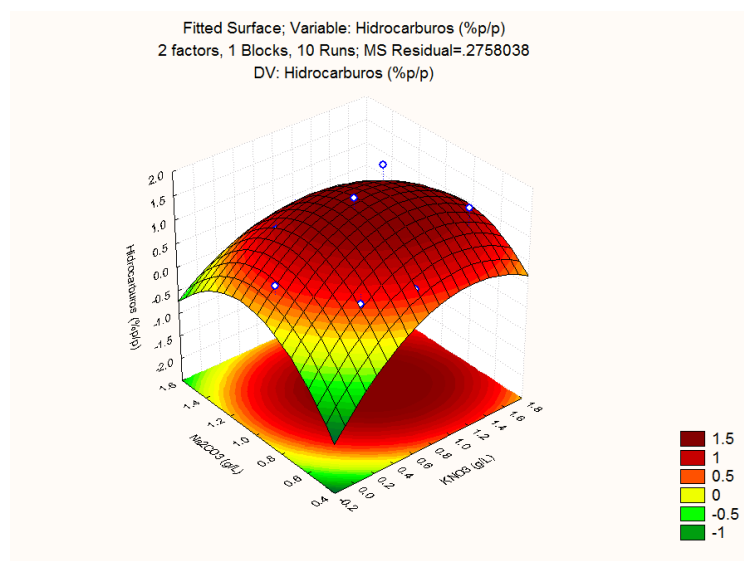
6.4.3 Producción de Lípidos e hidrocarburos empleando Na_2CO_3 .

Figura 24. Producción de Lípidos



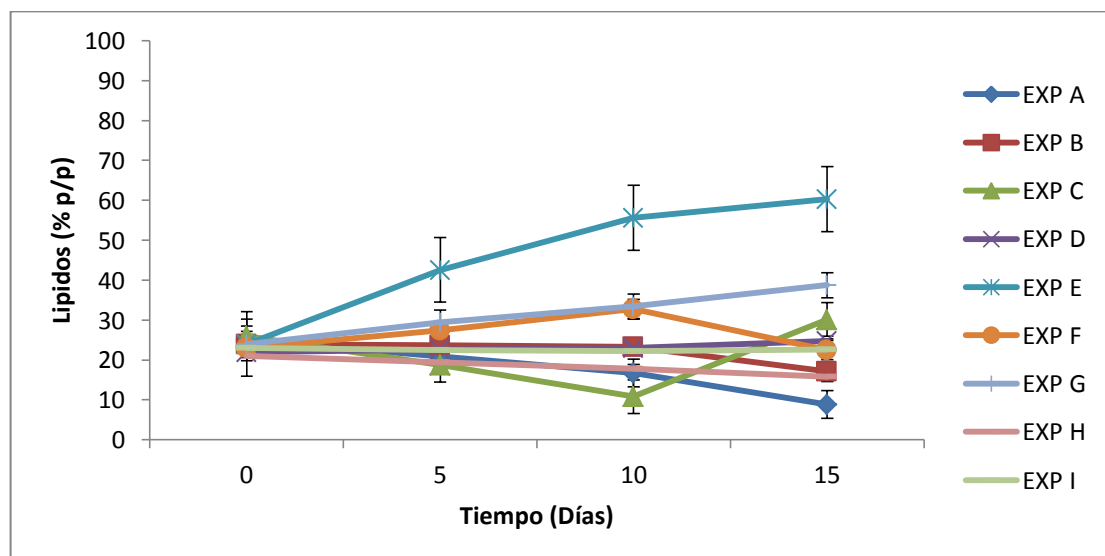
Por el lado de la producción de lípidos (Figura 24) e hidrocarburos (Figura 25) empleando Na_2CO_3 como fuente de carbono se observa que para aumentar la deposición de lípidos se requieren concentraciones altas de Na_2CO_3 ($>1,3$ g/L) y bajas concentraciones de KNO_3 ($<0,2$ g/L), por otro lado, para promover la concentración de hidrocarburos se requieren concentraciones ligeramente menores (entre 0,8 y 1,2 g/L) Na_2CO_3 y un incremento de KNO_3 (entre 0,6 y 1 g/L). Estos resultados permiten determinar que mediante un ajuste en la relación C/N es posible mejorar en significativamente la producción de lípidos (de 27% hasta 60% p/p), de igual forma ocurre con los hidrocarburos, los cuales aumentan hasta valores cercanos al 7% (p/p), esto representa un aumento del 40% sobre el valor reportado inicialmente (5%) sin modificación en la relación Carbono/Nitrógeno. Un aspecto importante a resaltar sobre los resultados anteriores es que para la producción de biomasa, la relación C/N no tiene un efecto aparente, sin embargo, para la síntesis y deposición de lípidos e hidrocarburos el efecto si es notorio, ya que para la deposición de hidrocarburos se requieren altas concentraciones de nitrógeno, podría proponerse que su deposición es temprana, en comparación con la de lípidos totales, la cual requiere de concentraciones menores de nitrógeno, sin embargo la necesidad de altas concentraciones de carbono para cada uno de los metabolitos anteriormente mencionados permite asumir que la fuente de carbono debe adicionarse varias veces para mantener niveles óptimos que favorezcan la síntesis de los anteriores.

Figura 25. Superficie de respuesta para la producción de hidrocarburos



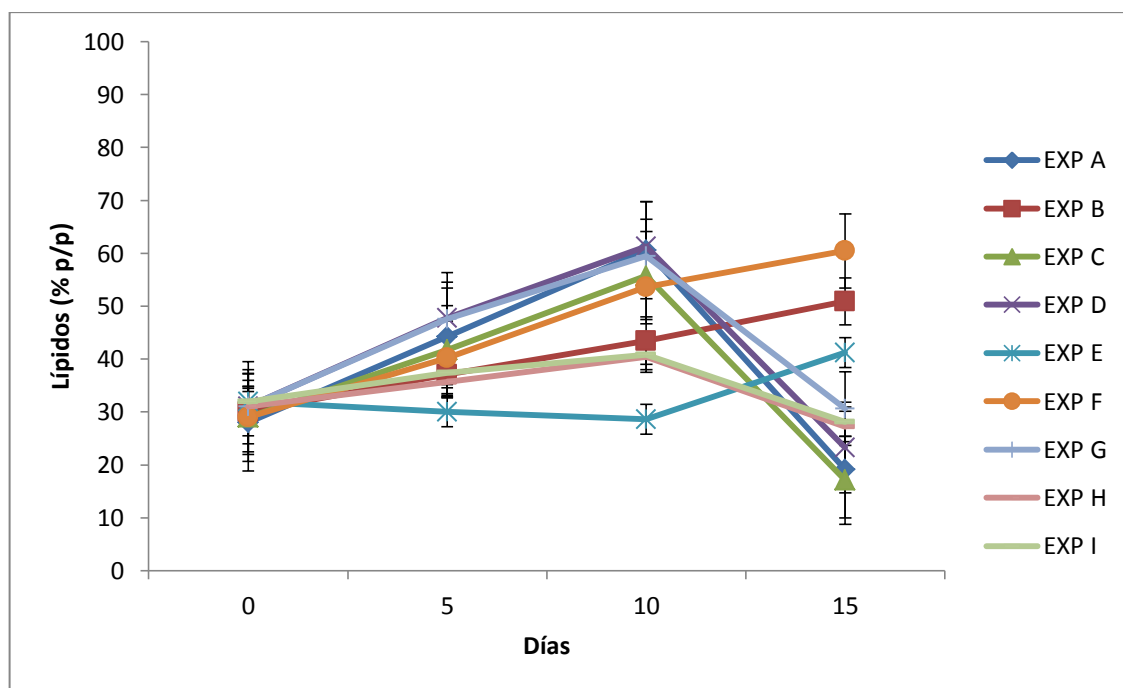
6.4.4 Producción de Lípidos e hidrocarburos empleando CO₂:

Figura 26. Producción de Lípidos CO₂ Continuo.



Al igual que la producción de biomasa, la producción de lípidos se ve fuertemente influenciada por la concentración de CO₂; En la figura 26 y 27 se observa que a las diferentes concentraciones los valores de lípidos no son altos (menos de 30%), solo en 3 experimentos (C, E y G) se observan tendencias de acumulación, donde el experimento E alcanza concentraciones cercanas al 60% (p/p); por otro lado, para las condiciones de CO₂ semi-continuo, las mayores concentraciones de lípidos se obtienen en los experimentos con concentraciones de CO₂ superiores a 60 mL/min, (A, D, H), por otro lado, los cultivos con concentraciones moderadas de CO₂ (17-30 mL/min) presentan una acumulación constante.

Figura 27. Producción de Lípidos CO₂ Semi-continuo



Otro de los aspectos a resaltar es que en aquellos cultivos con alta concentración de CO₂, después de 10 días, la cantidad de lípidos decae rápidamente, sin

embargo utilizando concentraciones moderadas de CO_2 (experimentos B y E), esto nos permite concluir que no es necesario agregar grandes cantidades de CO_2 al medio, sino mantener una adición constante (o semi-continua) que nos permita mantener valores constantes de CO_2 en el medio y así mantener un pH entre 5 y 6. A diferencia de los resultados obtenidos hasta ahora, la acumulación de hidrocarburos no depende de la concentración de CO_2 en el medio, sin embargo esta se mantiene constante siempre y cuando su adición sea constante, ya que después de adaptarse a la concentración de CO_2 disuelto en el medio, la acumulación de estos es rápida (figura 28), por otra parte, si la adición es semi-continua, la acumulación de CO_2 si se ve influenciada por la cantidad de CO_2 y el pH (Figura 29), ya que al utilizar concentraciones moderadas de CO_2 es posible obtener una acumulación constante de hidrocarburos.

Figura 28. Producción de Hidrocarburos CO_2 Continuo

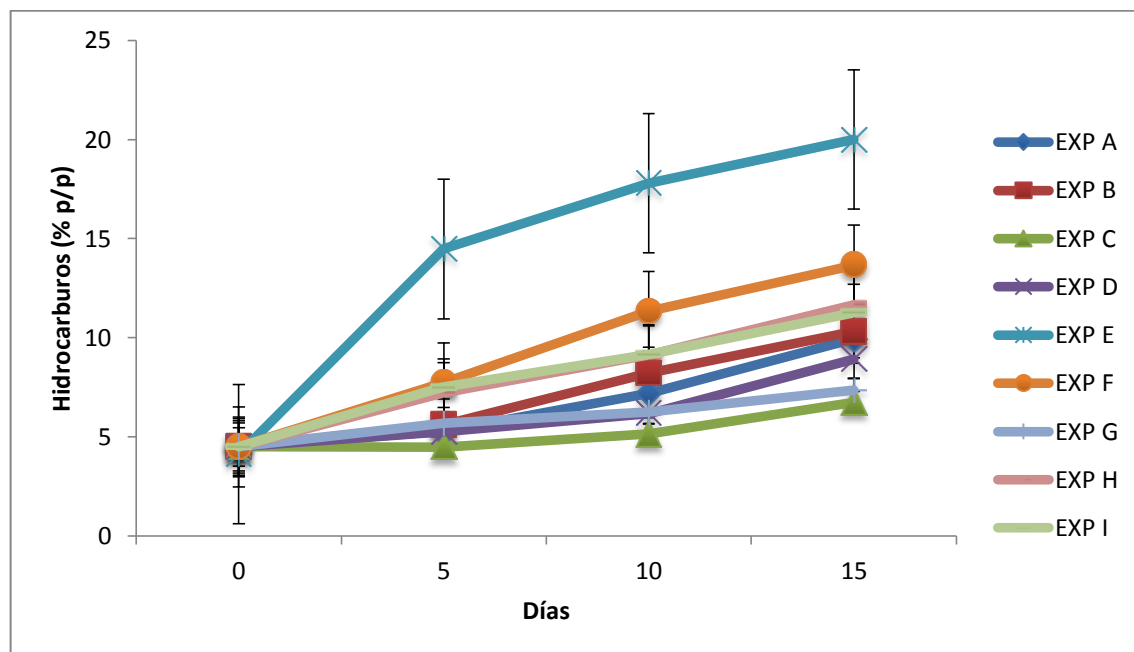
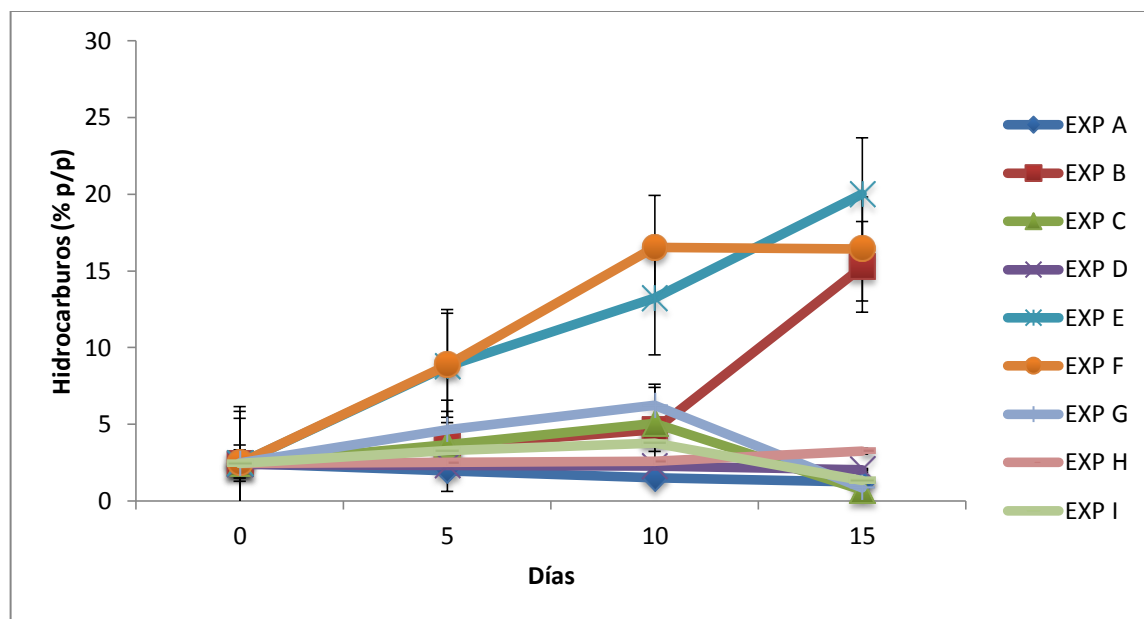


Figura 29. Producción de Hidrocarburos CO₂ Semi-continuo.



Los resultados estadísticos obtenidos para la producción de biomasa con una adición continua de CO₂ permiten evidenciar que el la fuente de carbono es la más influyente; según la gráfica de PARETO (Figura 30a y b) muestra que el la fuente de carbono es la más significativa, ya que, si se tiene demasiado CO₂ se va a producir suficiente biomasa, sin embargo, esta no es una variable concluyente para el proceso.

Figura 30a. Superficie de respuesta, producción biomasa CO₂ Continuo

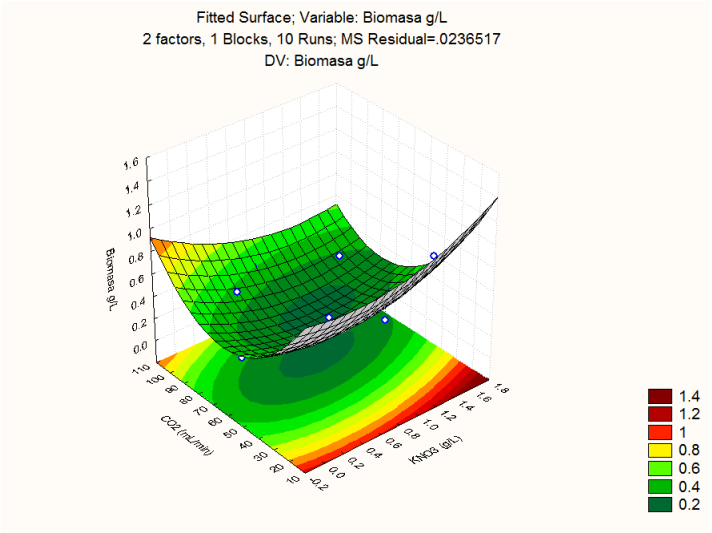


Figura 30b. PARETO, producción biomasa CO₂ Continuo.

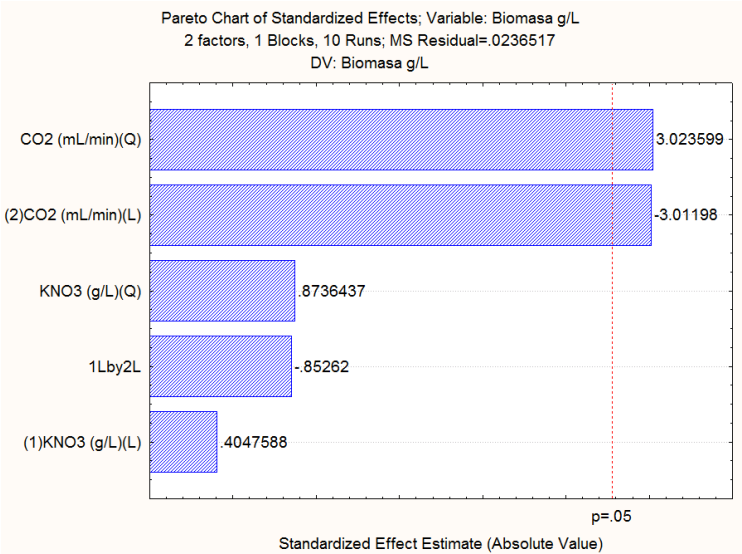
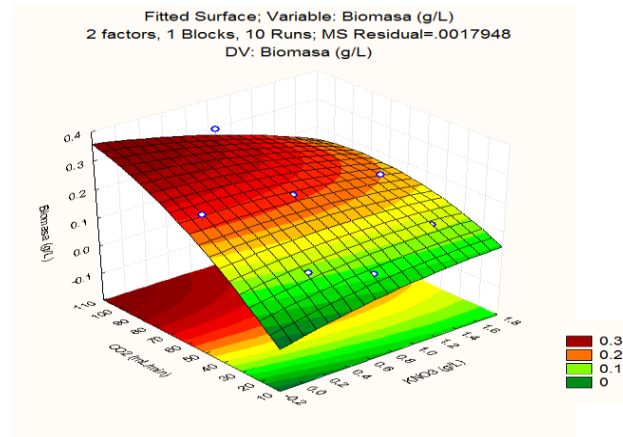


Figura 31a. Superficie de respuesta, producción biomasa CO₂ Semi-continuo.



En comparación a la producción de biomasa en el sistema continuo, la producción de lípidos bajo este sistema es mucho más evidente, permitiendo obtener las mayores concentraciones de lípidos (hasta 60% p/p) utilizando concentraciones intermedias de CO₂ (entre 40 y 80 mL/min); por otro lado, la gráfica de PARETO (Figura 32a y b) permite observar que el nitrógeno afecta de forma inversa (a menor nitrógeno, mayor cantidad de lípidos).

Figura 32a. Superficie de respuesta, producción Lípidos CO₂ Continuo

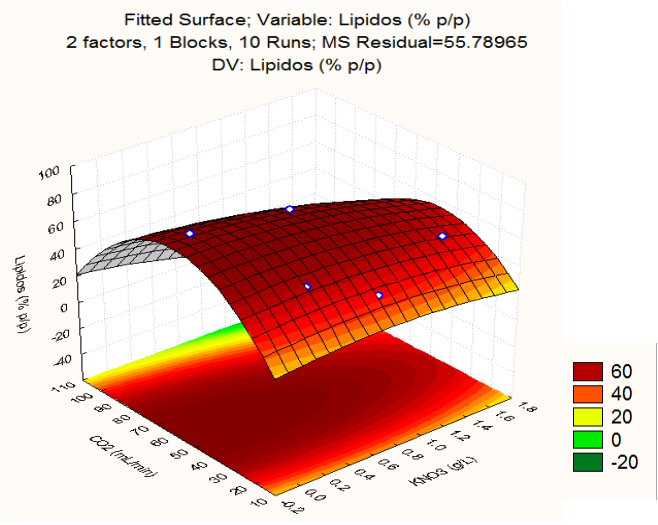


Figura 32b. PARETO, producción Lípidos CO₂ Continuo.

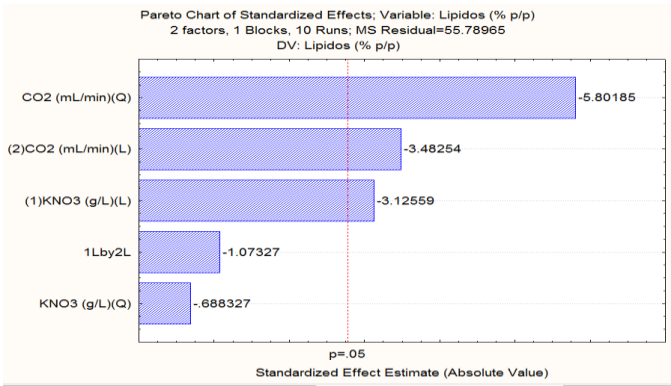


Figura 33a. Superficie de respuesta, producción Lípidos CO₂ Semi-continuo.

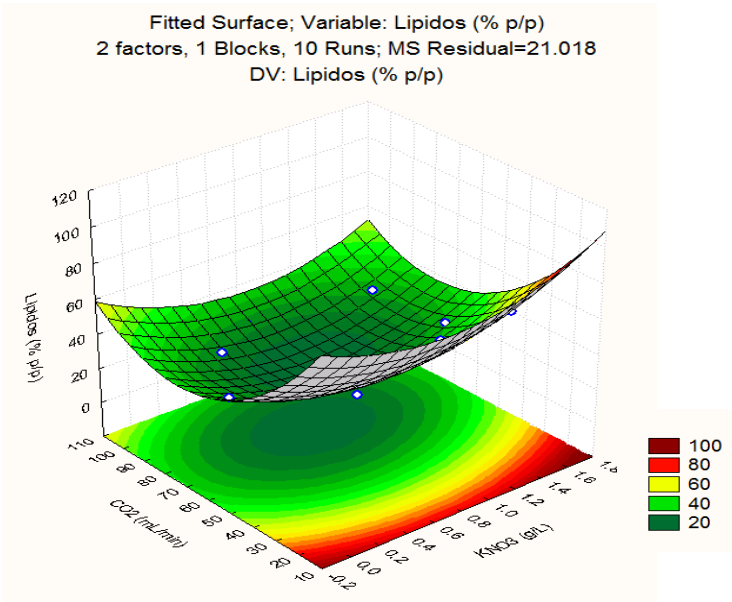
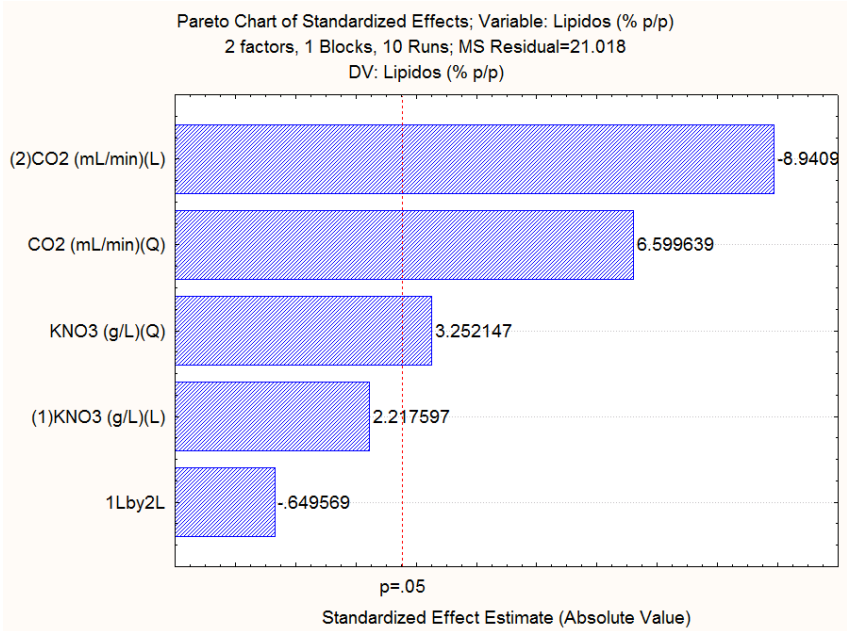


Figura 33b. PARETO, producción Lípidos CO₂ Semi-continuo.



En la figura 33 (a y b) se observa que, para la producción de lípidos utilizando CO₂ de forma semi-continua, se requieren bajas concentraciones de CO₂, siendo de poca importancia el nitrógeno, sin embargo es posible obtener altas concentraciones de lípidos si se emplean concentraciones mayores de CO₂, sin embargo utilizar concentraciones de CO₂ mayores a 100 mL/min significa una pérdida mayor de este debido a la rápida saturación del CO₂ en el medio; por otro lado, la gráfica de PARETO (33b) sustenta los resultados obtenidos anteriormente.

Figura 34a. Superficie de respuesta, producción Hidrocarburos CO₂ Continuo

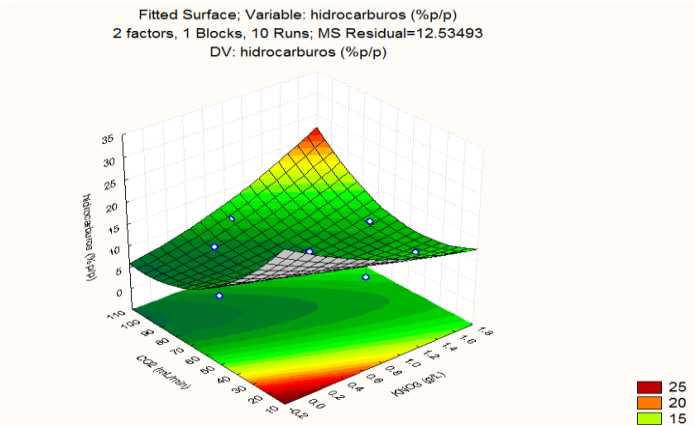


Figura 34b. PARETO, producción Hidrocarburos CO₂ Continuo.

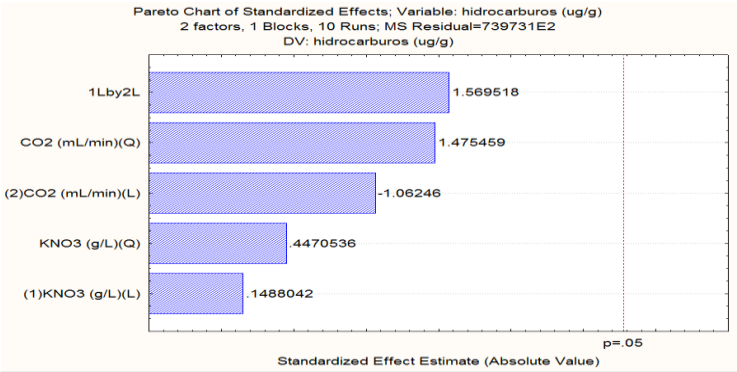
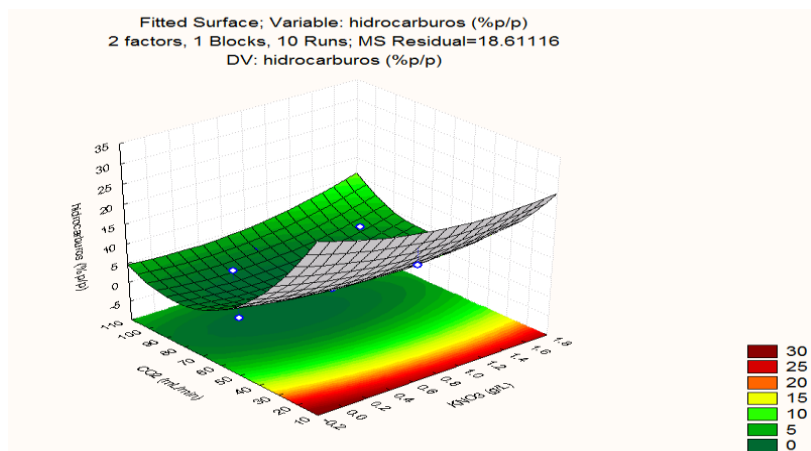
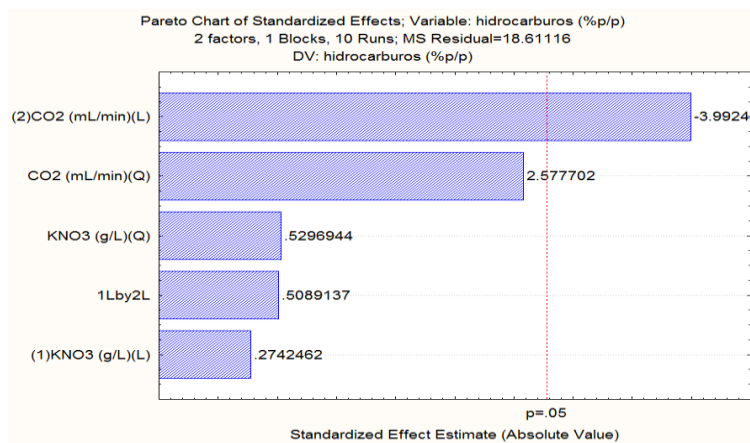


Figura 35a. Superficie de respuesta, producción Hidrocarburos CO₂ Semi-continuo.



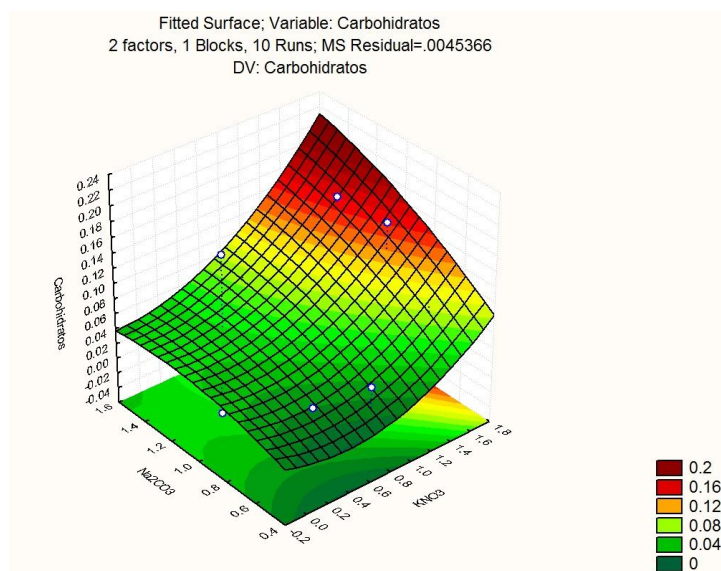
Para finalizar, la acumulación de hidrocarburos no depende de la concentración de CO₂ en el medio, sin embargo esta se mantiene constante siempre y cuando su adición sea constante, esto se evidencia en tanto en las superficies de respuesta (figuras 34a y 35a) y en las gráficas de PARETO (figuras 34b y 35b).

Figura 35b. PARETO, producción Hidrocarburos CO₂ Semi-continuo.



Además de la deposición de hidrocarburos, otra de las habilidades más notorias de este género es la producción de exopolisacaridos (Watanabe y Tanabe, 2013), los cuales pueden ser aprovechados para la obtención de diferentes subproductos como bioplásticos; sin embargo este tipo de subproducto puede ser aprovechado por hongos, levaduras y otras microalgas como fuente de carbono, aumentando la probabilidad de contaminación, por lo cual se hace necesario reducir sustancialmente la cantidad de exopolisacaridos presentes en el medio; según la figura 36, es posible reducir la cantidad de exopolisacardios en menos de 0.06 g/L bajo las condiciones donde se obtienen las mayores concentraciones posibles de hidrocarburos, esto permite inferir que mediante el ajuste de la relación carbono/nitrógeno es posible dirigir el metabolismo celular hacia la producción de largas cadenas de carbono como los hidrocarburos mientras se reduce la producción de otros compuestos como los exopolisacaridos.

Figura 36. Superficie de respuesta para la producción de Carbohidratos



Aunque una deficiencia de nitrógeno favorezca la acumulación de lípidos (Ben-Amotz *et al.*, 1985), el nitrógeno se requiere para el crecimiento. Estudios con nitrógeno suministrado como NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+ revelan que el factor primario que regula el metabolismo de nitrógeno en *B. braunii* es la asimilación del nitrato en el sistema. El nitrógeno generalmente se suministra como sales de nitrato. La concentración inicial de NO_3^- es de 0.2 kg/m^3 favorece la producción de hidrocarburos (Casadevall *et al.*, 1985), sin embargo las concentraciones empleadas en estos experimentos son muy superiores a otros medios de cultivos como el Bold Basal (0.25 g/L) o el AF-6 (0.14 g/L).

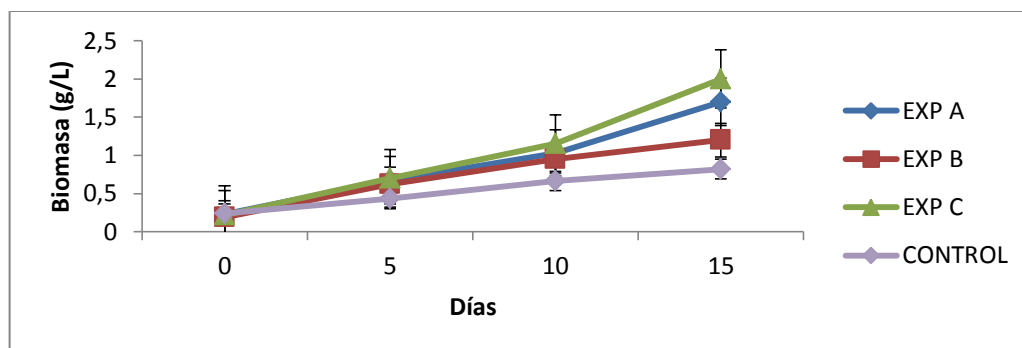
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos empleando Na_2CO_3 se plantearon 3 nuevos experimentos (Tabla 14) para mejorar la producción de biomasa y la deposición de lípidos e hidrocarburos.

Tabla 10. Mejores concentraciones de la relación Carbono/Nitrógeno.

	KNO_3 (g/L)	Na_2CO_3 (g/L)
A	0	0.94
B	0.75	0.49
C	0.38	0.63
CONTROL	1.50	0

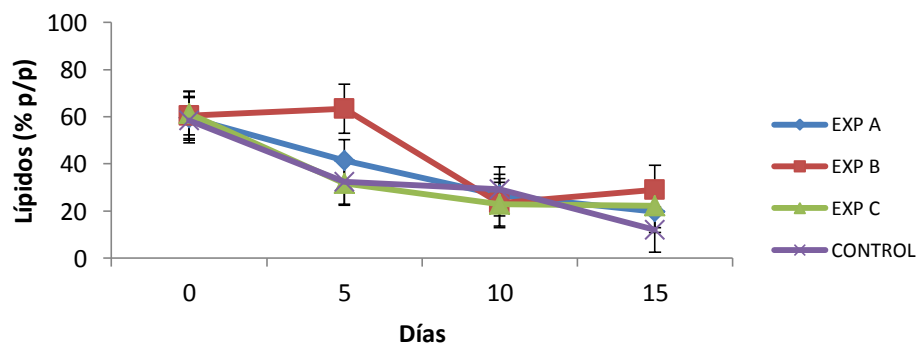
En la figura 37 se observan los resultados para la producción de biomasa; después de 15 días de cultivo es posible obtener hasta 2 g/L, teniendo en cuenta que según los datos iniciales, era posible obtener en 15 días hasta 1 g/L, el mejoramiento en la relación C/N permitió una duplicación de la biomasa producida.

Figura 37. Producción de biomasa empleando relaciones C/N mejoradas.



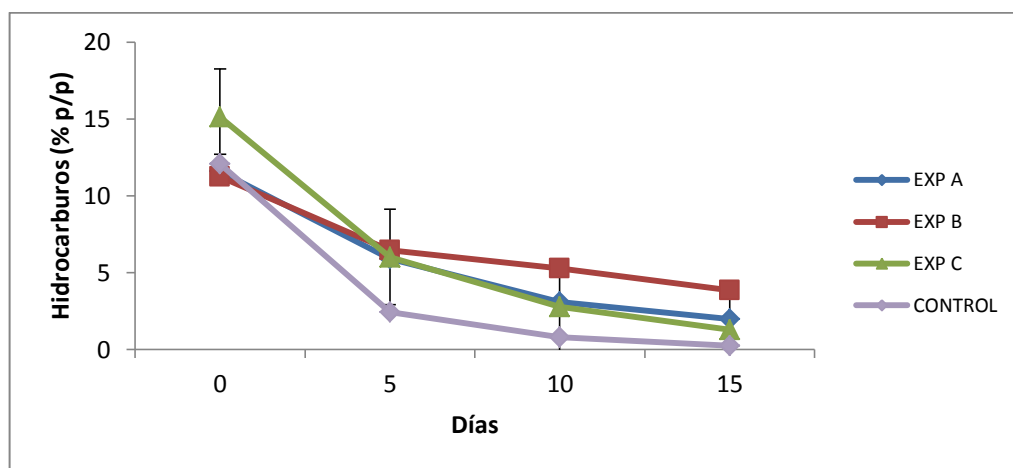
Aun con resultados significativos en la producción de biomasa, tanto la producción de lípidos como de hidrocarburos (Figura 38 y 39 respectivamente) no se vieron afectadas positivamente, presentando una reducción considerable con respecto a los valores iniciales, por lo cual es posible concluir que una sola adición de Na_2CO_3 es suficiente para influir positivamente en la producción de biomasa, pero no en la producción de lípidos e hidrocarburos, por lo que sería necesario inyectar una cierta cantidad diaria de Na_2CO_3 al medio para asegurar un aumento significativo en la deposición de lípidos e hidrocarburos.

Figura 38. Producción de lípidos empleando relaciones C/N mejoradas.



Sin embargo es necesario monitorear el efecto de una adición considerable de esta fuente de carbono, ya que excesos de sales puede llevar a la inhibición del crecimiento del organismo, según Furuhashi *et al* (2013), el uso de altas concentraciones de agua de mar afectan negativamente la producción de biomasa, por lo cual, un cultivo con adición continua o semi-continua de Na_2CO_3 aunque sea una forma más estable de adición de carbono, pueda reducir la producción de biomasa significativamente.

Figura 39. Producción de Hidrocarburos empleando relaciones C/N mejoradas.



Teniendo en cuenta los diferentes resultados obtenidos a partir de la evaluación de la relación Carbono/nitrógeno se escogieron 2 combinaciones para las adiciones continuas y semi-continuas de CO_2 , las cuales permitan mejorar sustancialmente la deposición de lípidos e hidrocarburos (Tabla 15).

Tabla 11. Variables seleccionadas para el mejoramiento

		KNO ₃ (g/L)	CO ₂ (mL/min)
Semi-continua	Sc ₁	0.60	80
	Sc ₂	0.40	100
Continua	C ₁	0.80	60
	C ₂	0.60	50

Como se puede observar en la figura 40, para 3 casos (excepto Sc₁) se obtuvo un incremento sustancial en la producción de biomasa, llegando en 25 días a cerca de 2,5 g/L para el experimento C₂ y cerca de 1,5 g/L para los otros dos.

Figura 40. Producción biomasa, optimización CO₂.

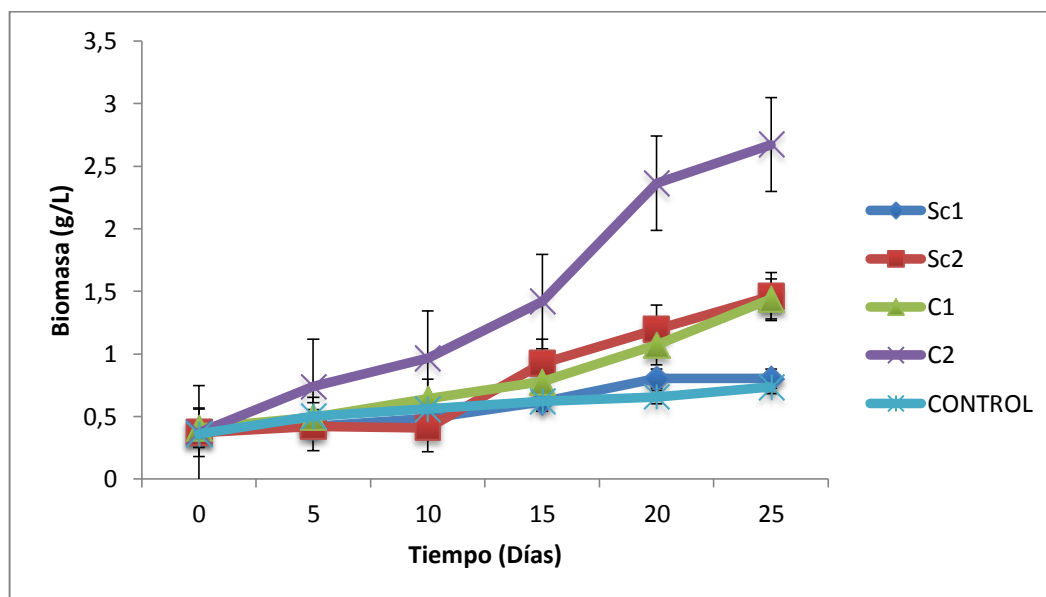
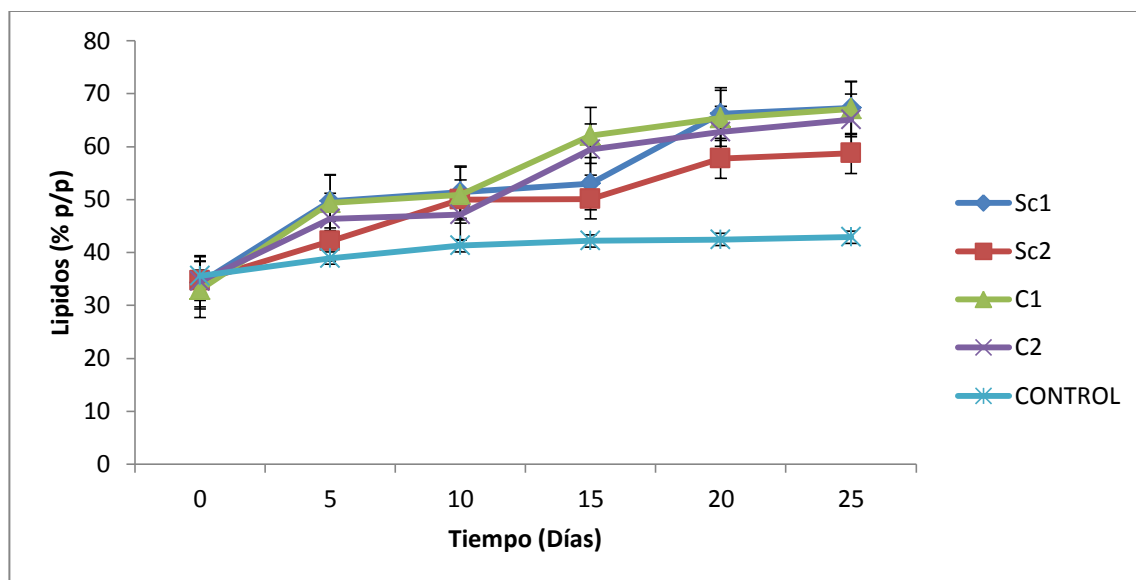
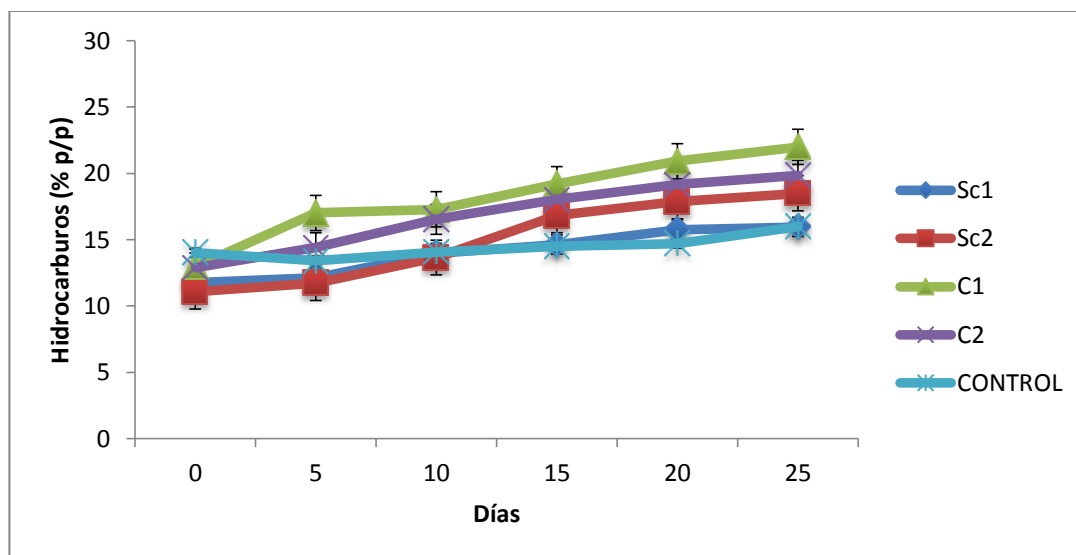


Figura 41. Producción Lípidos, optimización CO₂.



A diferencia de la producción de biomasa, tanto la producción de lípidos e hidrocarburos (Figura 41 y 42, respectivamente) fue positiva y continua en todos los 4 experimentos con valores entre 50 y 65% (p/p) en lípidos y hasta 22% (p/p) en hidrocarburos, esto se debe a que la selección de las variables se hizo teniendo en cuenta la máxima deposición de lípidos e hidrocarburos, y una producción considerable de biomasa.

Figura 42. Producción Hidrocarburos, optimización CO₂.



6.5 CONCLUSIONES

A partir del ajuste en la relación carbono/nitrógeno empleado como fuente de carbono el carbonato de sodio (Na₂CO₃) fue posible mejorar sustancialmente la producción de biomasa, al pasar de 1 a 2 g/L en 15 días, duplicando así la producción de biomasa en el mismo tiempo, sin embargo tanto la producción de lípidos como de hidrocarburos no se vieron afectadas positivamente, presentando una reducción considerable con respecto a los valores iniciales, por lo cual es posible concluir que una sola adición de Na₂CO₃ es suficiente para influir positivamente en la producción de biomasa, pero no en la producción de lípidos e hidrocarburos, por lo que sería necesario inyectar una cierta cantidad diaria de Na₂CO₃ al medio para asegurar un aumento significativo en la deposición de lípidos e hidrocarburos. Sin embargo es necesario monitorear el efecto de una mayor cantidad de adiciones de esta fuente de carbono, ya que excesos de sales puede llevar a la inhibición del crecimiento del organismo por lo cual su

aplicabilidad en una mayor escala no necesariamente tenga un impacto positivo en todo el proceso.

A diferencia de los resultados obtenidos empleando Na_2CO_3 , el uso de CO_2 ha demostrado ser más eficiente, sin embargo se pudo establecer que mejorar significativamente la producción de biomasa por encima de 2 g/L, es necesario adicionar 50 mL/min de CO_2 de forma continua con un ajuste en la concentración inicial de 0.6 g/L de KNO_3 ; cabe resaltar que, la concentración de lípidos no se vio afectado por el régimen de adición de CO_2 , obteniendo valores de entre el 58 y 65% del peso seco de la biomasa, sin embargo la deposición de hidrocarburos si se vio afectada, donde la adición continua permite obtener valores entre el 18 y 22%, mientras que la adición discontinua es posible obtener valores que oscilan entre el 15 y 17% de la biomasa total.

7. ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE *B. BRAUNII* Y DISEÑO CONCEPTUAL PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS EN COLOMBIA

7.1 INTRODUCCIÓN

Aun cuando las microalgas son la alternativa más promisoría para desplazar al petróleo no renovable a nivel mundial son pocas las plantas de producción de microalgas dedicadas 100% a la obtención de biocombustibles, un ejemplo de esto es la planta de producción de la compañía ALGENOL (www.algenol.com) con su tecnología DIRECT TO ETHANOL® puede producir concentraciones considerables de bioetanol a partir de cianobacterias modificadas genéticamente; sin embargo incógnitas como el costo real de capital, operación, mantenimiento y otros factores hacen que poco sostenible el proceso y su escalamiento (Zittelli *et al.*, 2013). En Colombia los esfuerzos para la producción de biocombustibles se han enfocado fuertemente en la bioprospección y selección de cepas, sin embargo hasta la fecha ninguna universidad o centro de investigaciones posee un sistema a escala piloto (ya sea open pond o PBR) lo cual ha dificultado a nivel país el desarrollo e innovación en este campo.

Bajo la perspectiva de bajo desarrollo tecnológico la posibilidad de proponer procesos a una escala superior a los 100 litros requiere de experimentación previa que respalde la iniciativa, y aún más cuando una microalga como *B. braunii* que posee un crecimiento más lento en comparación con otras microalgas y que gracias a su producción de exopolisacaridos es más propensa a ser sobrepoblada por hongos bacterias u otras algas, por lo cual se propone evaluar el efecto del aumento en el volumen de cultivo en sistemas abiertos.

El principal problema que ha afrontado a nivel mundial la producción de microalgas enfocada hacia la obtención de biocombustibles es el costo de inversión y operación, ya que existen muchos vacíos y los precios varían de locación en locación, haciendo más difícil poder conocer el verdadero impacto económico a escala regional, nacional y global. Colombia no es ajena a esta problemática, ya que en los últimos 10 años ha invertido cerca de 2 Millones USD en la investigación en microalgas, sin embargo no existen plantas funcionales con volúmenes considerables que demuestren si es realmente viable o no.

Para resolver esta problemática el consorcio EnAlgae que reúne 19 partners y 14 observadores de 7 miembros de la Unión Europea se ha enfocado en los últimos 2 años en generar herramientas para llenar los vacíos existentes en el cálculo de la producción de microalgas, gracias a esto en el 2014 publicaron un grupo de 3 calculadoras en Excel para Open pond, Flat plate y PBR tubular.

Teniendo en cuenta lo anterior el siguiente capítulo se centra en el diseño conceptual que reúne todos los resultados obtenidos a través de este proyecto para obtener mediante la implementación de la calculadora EnAlgae Open Pond obtener resultados que permitan evidenciar un primer acercamiento hacia la producción a gran escala de *B. braunii* en condiciones Colombianas.

7.2 METODOLOGÍA

7.2.1 Escalamiento del cultivo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente se decidió aumentar el volumen de trabajo de 1.5 L hasta 40 L, para esto se evaluaron 2 tipos de reactores abiertos (open pond y vertical flat-panel), para el sistema de open pond se utilizaron 2 reactores de 35 litros cada uno con 20 litros de volumen de trabajo, por otro lado se usaron 4 reactores verticales flat-panel de 20 litros de volumen, cada uno con un volumen de trabajo de 13 litros.

Cada uno de los reactores se inoculó con $\pm 0,4$ g/L en peso seco de *B. braunii* cultivada siguiendo los parámetros mejorados de crecimiento con adición continua de CO₂ (50 mL/min) y 0,6 g/L de KNO₃ en el medio AB-Media, además se acondicionaron lámparas fluorescentes en los reactores para lograr una radiación de 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Como control se utilizaron rectores de 1,5 L de volumen de trabajo con cultivos pre-esterilizados y axenicos de *B. braunii* con las modificaciones en CO₂ y KNO₃ en medio AB-media. Los reactores y el control se localizaron en un laboratorio con temperatura regulada y purificación de aire para reducir al mínimo la contaminación por agentes externos. Los experimentos se mantuvieron durante 25 días manteniendo un control de cada 3 días de producción de biomasa, concentración de lípidos totales e hidrocarburos.

7.2.2 Crecimiento celular (peso seco) (Moheimani et al. 2013). 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.

7.2.3 Cuantificación de Lípidos totales (Biomasa húmeda con modificación a Eroglu & Mellis (2010)). Al final de la experimentación se toman 10 mL de cultivo y se agregan en tubos falcon de 50 mL y se adicionan 5,7 mL de Bligh & Dyer y aproximadamente 50 mg de perlas de vidrio de 0,5 mm y se homogenizó con vortex durante 15 minutos a máxima velocidad, una vez finalizado el tiempo se agregaron otros 7 mL de solución para una segunda extracción, transcurrido el tiempo la mezcla se llevó a centrifuga a 3400 rpm durante 15 minutos, una vez separada la biomasa de los lípidos se agregaron 3 mL de cloroformo analítico. La mezcla se dejó en nevera durante 24 horas para separar las fases. Una vez

transcurridas las 24 horas se retiró la capa de agua, la fase lipídica se traspasó a tubos de vidrio previamente pesados y se secaron a 40°C bajo atmosfera de nitrógeno y se pesaron para obtener el peso total de lípidos extraídos.

7.2.4 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; despues 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).

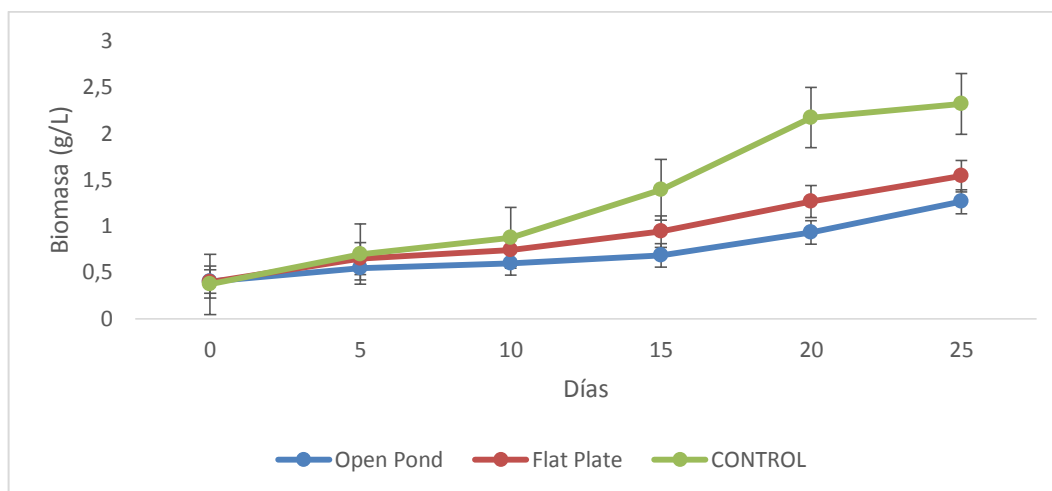
7.2.5 Variables diseño conceptual. Teniendo en cuenta los diferentes resultados a escala laboratorio y del escalamiento del cultivo se evaluará la producción de *B. braunii* implementando la calculadora EnAlgae Open Pond, para esto se tendrá en cuenta las variables climáticas de Barrancabermeja y Cartagena, al igual que los valores promedio de irradiación solar anual, evaporación anual, temperatura promedio anual (mínimos y máximos), presencia de fuentes hídricas (natural y aguas residuales), tierra, fertilizantes, energía (Kwh) y producción (en peso seco) de *B. braunii* para una planta de pirolisis con capacidad de producción de aceite de pirolisis de 195 Toneladas de aceite/día (300 Ton/día con 10% de humedad).

7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según los resultados reportados en la figura 43 muestran que la producción de biomasa en los 2 sistemas abiertos empleados es menor a la obtenida en el control, sin embargo dentro de los dos tipos evaluados en el Flat plate se pudo obtener más biomasa en comparación con el open pond; estos resultados pueden

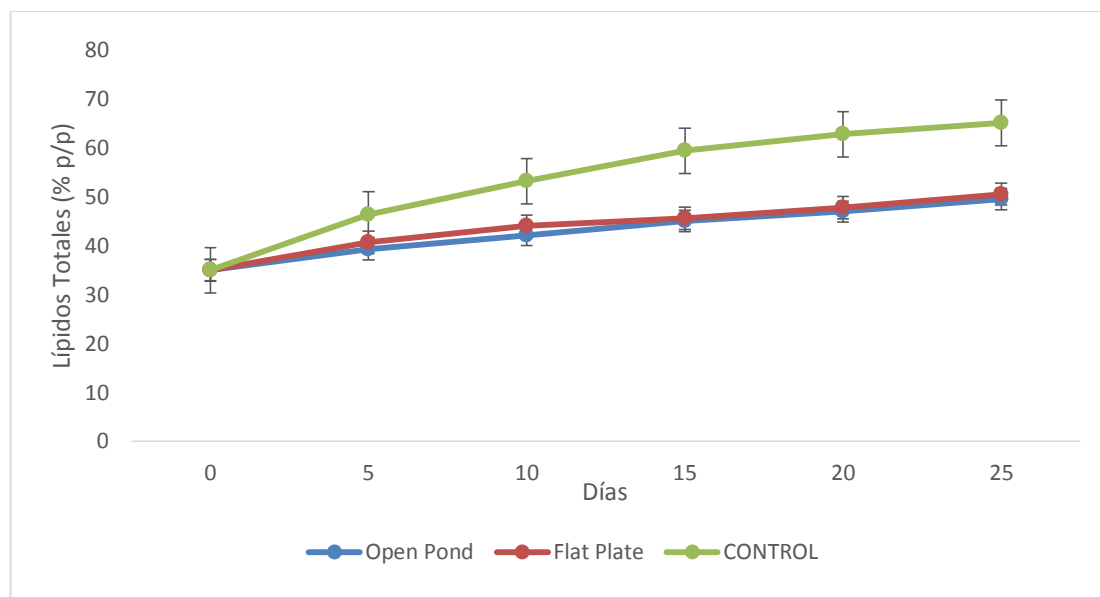
ser explicados por efectos como: menor agitación y transferencia de CO₂ al igual que a un aumento considerable en la columna de agua.

Figura 43. Producción de biomasa en sistemas abiertos 40 L volumen.



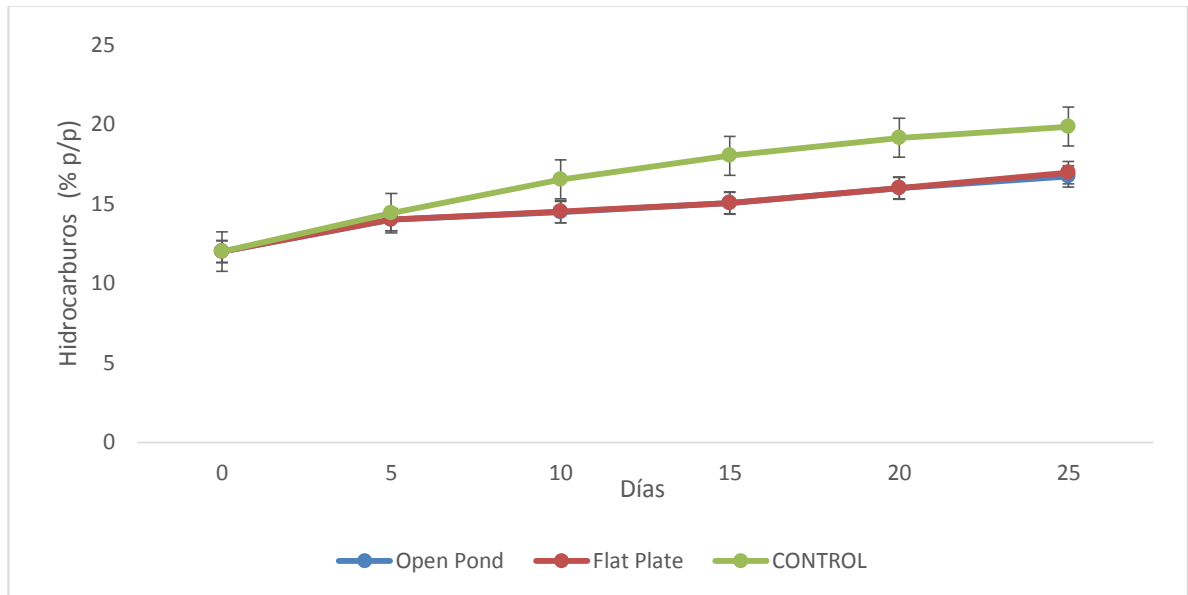
Además de los resultados de producción de biomasa, se puede observar que los valores obtenidos para lípidos totales e hidrocarburos (Figura 44 y 45 respectivamente) son de igual forma menores a los reportados por el control, sin embargo los valores de los dos sistemas abiertos son muy cercanos durante todo el tiempo del experimento con un valor final de 50% (p/p) para lípido totales y 16% (p/p) para hidrocarburos.

Figura 44. Concentración de lípidos en sistemas abiertos 40 L volumen.



Como se demostró en los capítulos anteriores el CO_2 es un factor determinante en la deposición de lípidos e hidrocarburos, por lo cual en los sistemas analizados aunque la agitación y difusión del CO_2 no son las mismas que en el control, es posible aumentar considerablemente la deposición de estos metabolitos durante el tiempo de experimentación, otra de las posibilidades para la reducción considerable en la deposición es la contaminación por bacterias y hongos, sin embargo en revisiones realizadas cada 5 días por cultivo en placas de Petri no se evidenció la sobrepoblación (datos no presentados).

Figura 45. Concentración de hidrocarburos en sistemas abiertos 40 L volumen.



7.3.1 Diseño conceptual de producción. Para el calculo de la producción de biomasa de *B. braunii* en sistemas de cultivos Open Pond utilizando la Calculadora EnAlgae OpenPond se emplearon unidades de cultivo de 1000 ponds, cada uno con un tamaño de 1000 m² y una profundidad de 0.3 m con un tiempo de trabajo de 12 meses y una producción de 0.3 kg/m³ (este valor de acuerdo con lo reportado por EnAlgae para open ponds). Teniendo en cuenta estas variables y un precio de venta de € 6, en la figura 46 y tabla 16 se destaca que para para producir 2452 Ton/Año se requieren 2,6 Millones de m³ de agua y 44 Millones de kWh para un costo de € 8'016.930, lo cual sumando depreciación, intereses, mantenimiento y seguros de operación el costo asciende a € 10'926.659, por lo cual el precio de un kg de biomasa se registra en € 4.46.

Figura 46. Costo de producción total y venta de la biomasa.

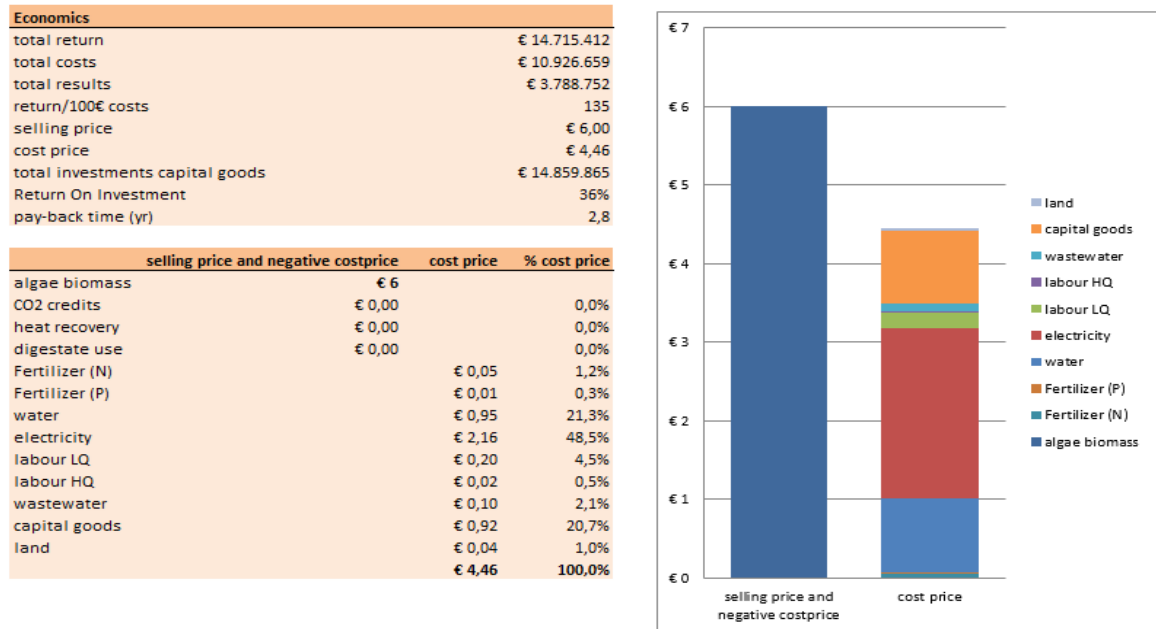
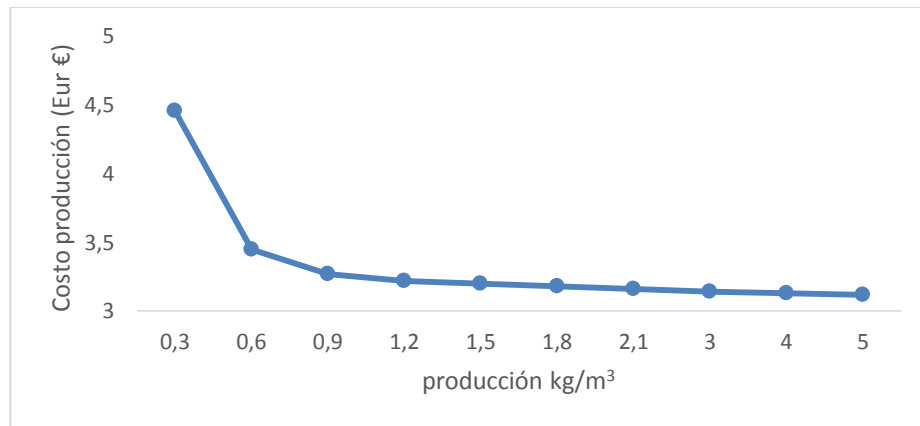


Tabla 12. Variables para el cultivo en Open Pond.

return	amount	selling price	total return
algae biomass	2452569 kg ds DM	6 €/kg	€ 14.715.412
variable costs	amount	price per unit	total variable costs
Water use	2652808 m3	0,878 €/m3	€ 2.329.166
Electricity	44128880 kWh	0,12 €/kWh	€ 5.295.466
CO2	4856086 kg	0 €/kg	€ 0
Heat recovery	0 kWh	0 €/kWh	€ 0
Labour LQ	43031 hr	11,53 €/hr	€ 496.151
Labour HQ	1950 hr	25,57 €/hr	€ 49.853
digestate	0 m3	-20 €/m3	€ 0
Fertilizer (N)	117363 kg N	1,08 kg N	€ 126.752
Fertilizer (P)	14979 kg P	2,22 kg P	€ 33.326
Wastewater	2340066 m3	0,1 €/m3	€ 234.007
Total			€ 8.564.719
capital goods			total costs capital goods
depreciation			€ 1.138.989
interest			€ 449.511
maintenance			€ 593.727
insurance			€ 74.299
Total			€ 2.256.526
land	total land use	price per ha	total costs land use
Land	101,2619 ha	1041 €/ha	€ 105.414
total costs			€ 10.926.659

Una de las mejores características que posee la calculadora es la posibilidad de poder modificar ciertas variables e identificar otras que no se consideran tan importantes, en este caso se pudo relacionar el efecto que tiene la producción de biomasa (kg/m^3) con el precio final de producción, en la figura 47 se demuestra que solo duplicando la producción (de 0.3 a 0.6 kg/m^3) el precio de se reduce en € 1 sin embargo cuando la producción de biomasa supera 1.2 kg/m^3 el precio final comienza a reducir lentamente, por lo cual es posible afirmar que aunque la producción final no supere 1 kg/m^3 el precio se mantendrá cercano a los € 3.22.

Figura 47. Efecto de la producción (kg/m^3) sobre el precio final.



Teniendo en cuenta los anteriores resultados se calculó nuevamente el costo final a partir de una producción de 0.6 kg/m^3 , los resultados se muestran en la figura 48 y tabla 17.

Figura 48. Costo de producción total y venta de la biomasa para 0.6 kg/m³.

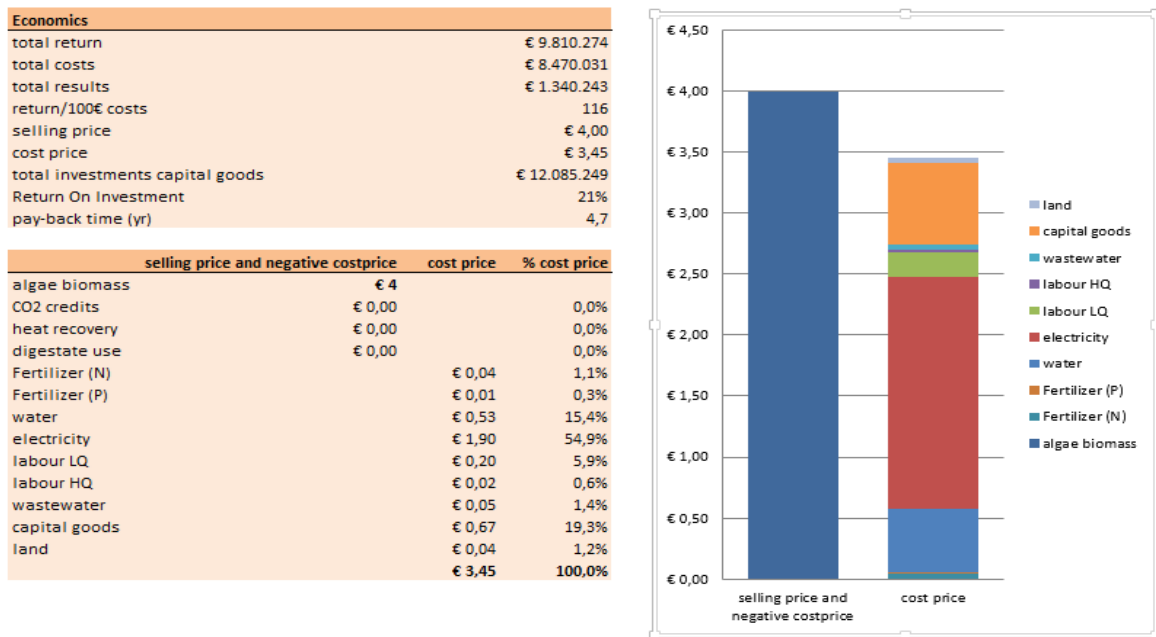
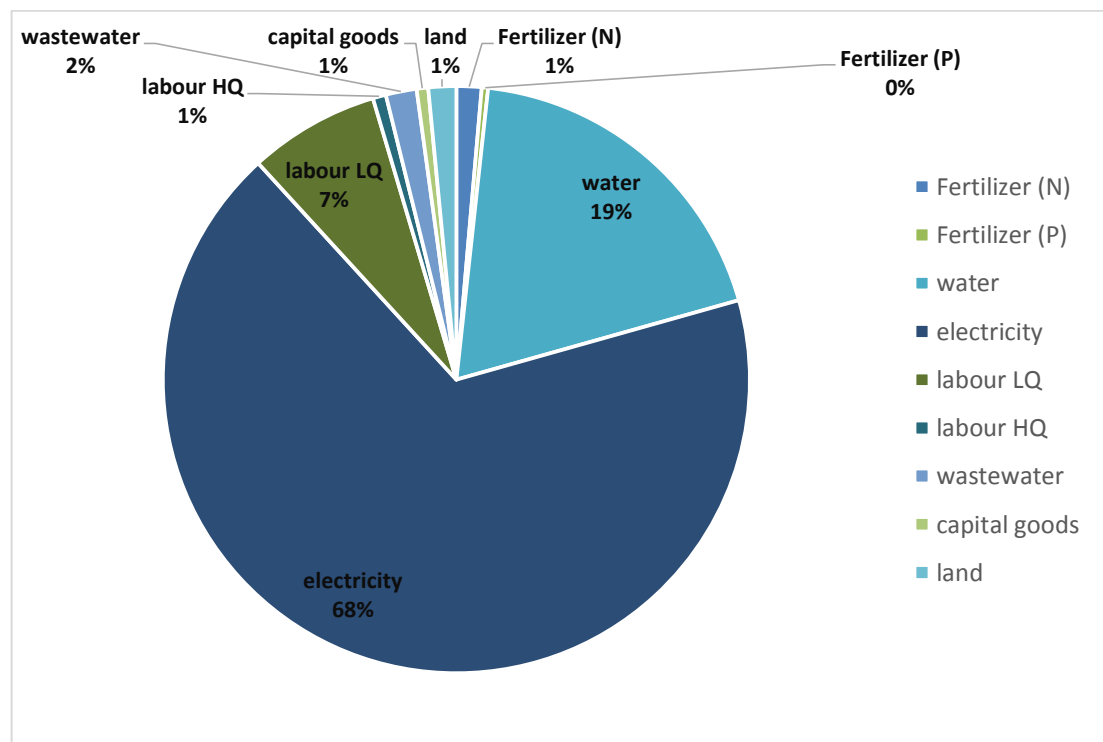


Tabla 13. Variables para el cultivo en Open Pond para 0.6 kg/m³.

return	amount	selling price	total return
algae biomass	2452569 kg ds DM	4 €/kg	€ 9.810.274
variable costs	amount	price per unit	total variable costs
Water use	1481736 m3	0,878 €/m3	€ 1.300.964
Electricity	38750440 kWh	0,12 €/kWh	€ 4.650.053
CO2	4856086 kg	0 €/kg	€ 0
Heat recovery	0 kWh	0 €/kWh	€ 0
Labour LQ	43031 hr	11,53 €/hr	€ 496.151
Labour HQ	1950 hr	25,57 €/hr	€ 49.853
digestate	0 m3	-20 €/m3	€ 0
Fertilizer (N)	88086 kg N	1,08 kg N	€ 95.133
Fertilizer (P)	10797 kg P	2,22 kg P	€ 24.021
Wastewater	1168993 m3	0,1 €/m3	€ 116.899
Total			€ 6.733.074
capital goods			total costs capital goods
depreciation			€ 889.274
interest			€ 365.579
maintenance			€ 316.265
insurance			€ 60.426
Total			€ 1.631.544
land	total land use	price per ha	total costs land use
Land	101,2619 ha	1041 €/ha	€ 105.414
total costs			€ 8.470.031

Según los resultados presentados anteriormente el costo de venta de un kg de biomasa es de € 3.45 con una producción de 2452 Ton/Año, lo cual representa una productividad de 24 Ton/ha/año, por lo cual 1 unidad de producción compuesta por 1000 ponds, (cada uno con un tamaño de 1000 m² y una profundidad de 0.3 m) con un tiempo de trabajo de 309 (teniendo en cuenta los días de limpieza, perdida por contaminación y preparación) se obtiene una producción de 0.08 Ton/ha/día.

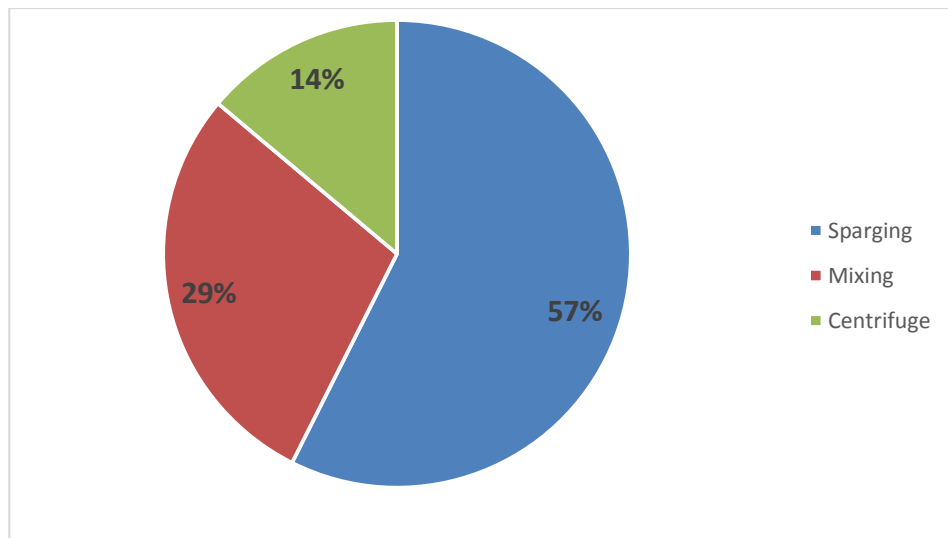
Figura 49. Porcentaje de valor de cada uno de los elementos en la producción.



Uno de los principales costos asociados con la producción de biomasa es la electricidad con un 57% de participación (Figura 49), sin embargo dentro del costo por electricidad, el mayor costo se deriva por la adición de oxígeno, con un 58%

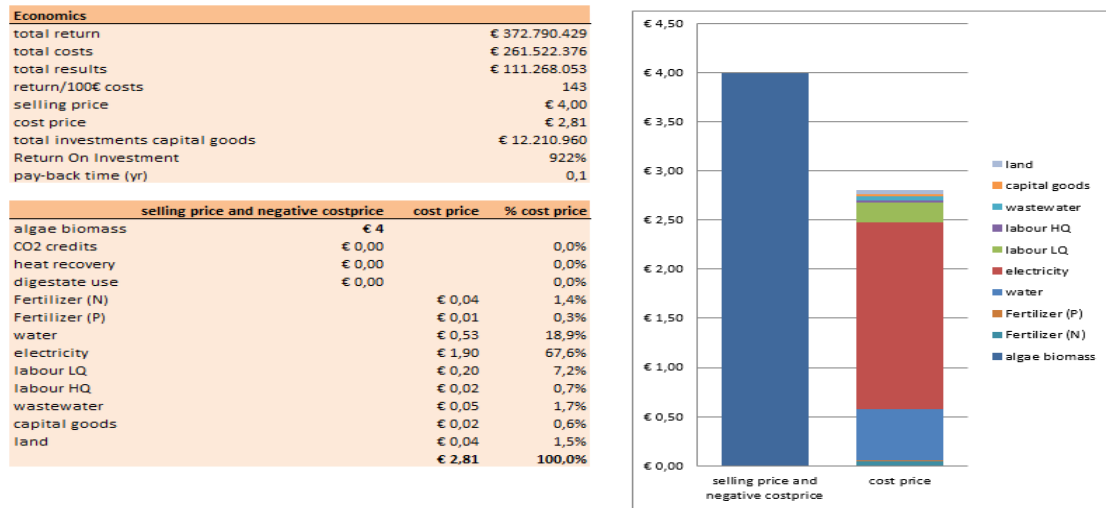
del total (Figura 50), mientras que la concentración de la biomasa solo representa el 13%, este cambio se debe principalmente al tipo de tecnología utilizada para el cálculo, en este caso EnAlgae utiliza los valores obtenidos empelando la centrifuga EVODOS.

Figura 50. Porcentaje de consumo energético (kwh) de cada uno de los procesos.



De acuerdo con cálculos brindados por ICP-ECOPETROL, para una planta de pirolisis con capacidad de producción de aceite de pirolisis de 195 Toneladas de aceite/día se necesitan 300 Ton/día (10% de humedad) de *B. braunii*. Sin embargo el sistema calculado posee una capacidad de 8 Ton/día, por lo cual se necesitarían cerca de 38 sistemas de 1000 ponds cada uno.

Figura 51. Costo de producción total y venta de la biomasa para 300 Ton/día.



Teniendo en cuenta los resultados presentados en la figura 51 y tabla 17 se observa que en un centro de cultivo compuesto por 38 sistemas de 1000 ponds, es posible producir 93936 Ton/año de biomasa a un precio de € 2.81, sin embargo el alto valor en la cantidad de agua (56 millones m³ anuales) y un costo total de € 261 Millones, sin embargo la cantidad de tierra necesaria (3848 ha) para este sistema se encuentra muy por debajo de lo proyectado por La Federación Nacional de Cultivadores de Palma, FEDEPALMA, la cual prevee que para el año 2020 habrán cultivadas 743.000 Ha con una producción de 5.5 ton/Ha de aceite de palma crudo, por tanto es necesario conocer la influencia de este costo en el comportamiento del mercado nacional de los combustibles para así determinar el verdadero impacto de esta tecnología y su rol en la sostenibilidad nacional energética.

Tabla 14. Variables para el cultivo en Open Pond para 300 Ton/día.

return	amount	selling price	total return
algae biomass	93197607 kg ds DM	4 €/kg	€ 372.790.429
variable costs	amount	price per unit	total variable costs
Water use	56305956 m3	0,878 €/m3	€ 49.436.629
Electricity	1472516718 kWh	0,12 €/kWh	€ 176.702.006
CO2	184531262 kg	0 €/kg	€ 0
Heat recovery	0 kWh	0 €/kWh	€ 0
Labour LQ	1635189 hr	11,53 €/hr	€ 18.853.730
Labour HQ	74087 hr	25,57 €/hr	€ 1.894.405
digestate	0 m3	-20 €/m3	€ 0
Fertilizer (N)	3347286 kg N	1,08 kg N	€ 3.615.069
Fertilizer (P)	410283 kg P	2,22 kg P	€ 912.785
Wastewater	44421738 m3	0,1 €/m3	€ 4.442.174
Total			€ 255.856.797
capital goods			total costs capital goods
depreciation			€ 900.588
interest			€ 369.382
maintenance			€ 328.837
insurance			€ 61.055
Total			€ 1.659.861
land	total land use	price per ha	total costs land use
Land	3847,9528 ha	1041 €/ha	€ 4.005.719
total costs			€ 261.522.376

7.4 CONCLUSIONES

Se evaluó el crecimiento de *B. braunii* en dos sistemas abiertos (open pond y flat plate) con volúmenes de 40 litros es posible con valores de producción de biomasa de 1,5 g/L en 25 días (valores menores a los registrados por el control el cual fue de 2.5 g/L) y una productividad de 0,06 g/L*d⁻¹, de igual forma se encontró que tanto la concentración de lípidos totales como de hidrocarburos fueron menores a las del control (50 y 17% en comparación a 65 y 20% de lípidos totales e hidrocarburos respectivamente) los resultados son prometedores para sistemas abiertos, sin embargo es necesario de mejorar la agitación del medio y la difusión del CO₂ en este.

Los resultados obtenidos a partir de la implementación de la calculadora EnAlgae Open Pond permiten conocer el posible costo de implementación y operación de sistemas abiertos para el cultivo de *B. braunii* en las condiciones tanto de Barrancabermeja como de Cartagena, además se resalta que con un costo de producción de biomasa de € 2.81 y una producción de 0,6 kg/m³ es posible tener una tasa de retorno de 0.1 años con una producción de 93936 Ton/año de biomasa y una inversión cercana de € 261 Millones, sin embargo es necesario conocer la influencia de este costo en el comportamiento del mercado nacional de los combustibles para así determinar el verdadero impacto de esta tecnología y su rol en la sostenibilidad nacional energética.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Seis (6) artículos publicados en revistas indexadas ante COLCIENCIAS.

Barajas-Solano A.F., Guzmán-Monsalve, A., Kafarov V (2016). Effect of carbon–nitrogen ratio for the biomass production, hydrocarbons and lipids on *Botryococcus braunii* UIS 003. Chemical Engineering Transactions, *Paper to be published*.

Barajas-Solano A.F., Gonzalez-Delgado A.D., Kafarov V (2014). Effect of Thermal Pre-Treatment on Fermentable Sugar Production of *Chlorella vulgaris*. Chemical Engineering Transactions, 37(2) 655-660. ISSN: 1974-9791.

Gonzalez-Delgado A.D., **Barajas-Solano A.F.**, Kafarov, V. (2013). Obtaining high value products in a biorefinery topology using microalgae. CT&F, 5(3) 95 – 106. ISSN 0122-5383.

Estevez-Landazabal L.L., **Barajas-Solano A.F.**, Barajas-Ferreira C., Kafarov V. (2013). Improvement of lipid productivity on *Chlorella vulgaris* using waste glycerol and sodium acetate" CT&F, 5(2) 113-126. ISSN: 0122-5383.

Barajas-Solano A.F., Godoy-Ruiz C.A., Monroy-Avila J.D. Barajas-Ferreira C., Kafarov V. (2012), Improvement of CO₂ sequestration by *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 on lab-scale photobioreactors. ION, 25(2) 39-47. ISSN: 0120-100X.

Jerez-Mogollón S.J., Rueda-Quiñonez L.V., Alfonso-Velazco L.Y., **Barajas-Solano A.F.**, Barajas-Solano A.F., Kafarov V. (2012). Improvement of lab-scale production of microalgal carbohydrates for biofuel production. CT&F, 5(1) 103-116. ISSN: 0122-5383.

2. Treinta y Cinco (35) tesis de pregrado co-dirigidas en Ingeniería Química y biología.

3. Primera patente de Invención en microalgas para Colombia.

Barajas-Solano A.F., Garzón, L.L., Núñez-Isaza M., Kafarov V. (2014). “Proceso mejorado para la obtención de azúcares fermentables a partir de microalgas y macroalgas” Patente de invención en conjunto con ECOPETROL S.A. WO 2012085689 A1.

4. Premio de Investigación a Investigador Consolidado “ELOY VALENZUELA UIS-2014”.

“De aguas residuales a biocombustibles: desarrollo de un sistema de aprovechamiento microalgal integrada con la bioremediación de vinazas”.

5. Dieciocho (18) Ponencias nacionales e internacionales.

6. Aislamiento de una nueva cepa de *Botryococcus braunii*.

7. Obtención de un nuevo medio de cultivo (AB-Media) diseñado para mejorar el crecimiento de la nueva cepa.

8. Desarrollo de un nuevo método de extracción que requiere 20 mL de cultivo y empleando perlas de vidrio y sin la necesidad de adición de calor.

9. Relación carbono/nitrógeno empleando Na_2CO_3 y KNO_3 que mejora la producción de biomasa, sin embargo el Na_2CO_3 no es eficiente para la deposición de lípidos e hidrocarburos.

10. Relación carbono/nitrógeno empleando CO_2 y KNO_3 que mejora la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos.

11. Primer análisis empleando condiciones Colombianas para la producción de *B. braunii* a escala industrial con un costo de producción de biomasa de € 2.81 y una producción de 0,6 kg/m³ es posible tener una tasa de retorno de 0.1 años con una producción de 93936 Ton/año de biomasa y una inversión cercana de € 261 Millones.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALLEN MM. Simple conditions for growth of unicellular bluegreen algae on plates. *J Phycol.* 1968; 4:1–4.
2. ALLEN MM, and Stanier RY. Growth and division of some unicellular blue-green algae. *J. Gen. Microbiol.* 1968; 51:199–202.
3. AN J, Sim S, Lee J, Kim B. Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *J App Phycol.* 2003; 15: 185–91.
4. ANEMAET A, Ida G, Bekker M,. Hellingwerf K. Algal Photosynthesis as the Primary Driver for a Sustainable Development. *Energy, Feed, Food Prod Mar Biotechnol.* 2010; 12: 619–29.
5. Ashokkumar V. Rengasamy R. Mass culture of *Botryococcus braunii* Kutz. Under open raceway pond for biofuel production. *Bioresour Tecnol.* 2012; 104: 394-9.
6. BALL SG. The intrinsic pathway of starch biosynthesis and degradation in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aust J Chem.* 2002; 55:49–59.
7. BANERJEE A, Sharma R, Chisti Y, Benerjee UC. *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2002; 22(3): 245–79.

8. BAZAES J, Sepulveda C, Acién FG, Morales J, Gonzales L, Rivas M, Riquelme C. Outdoor pilot-scale production of *Botryococcus braunii* in panel reactors. *J Appl Phycol* 2012; 24:1353–60.
9. BENEMAN JR, Hughes E. Biological fossil CO₂ mitigation. *En Conv. Man.* 1997; 38: 467–73.
10. BENEMAN JR, Tillett DM, Weissman JC. Microalgae biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1987; 5:47– 53.
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. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959 37:911–917.
13. BOROWITZKA MA. Commercial production of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes and Fermenters. *Journ Biotech.* 1999; 70: 313-321.
14. BOROWITZKA MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy. Developments in Applied Phycology* 5, 2013. Springer, Dordrecht, pp 265–285.
15. BOROWITZKA MA. Algal biotechnology products and processes: matching science and economics. *J Appl Phycol.* 1992 4:267–279.
16. BOROWITZKA MA. Species and Strain Selection 2013 In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy.* Springer, Dordrecht, pp 265–285

17. BROWN AC, Knights BA, Ellisie C. Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochem.* 1969; 8:543–7.
18. CARLOZZI P. Dilution of Solar Radiation Through “Culture” Lamination in Photobioreactor Rows Facing South–North: A Way to Improve the Efficiency of Light Utilization by Cyanobacteria (*Arthrospira platensis*). *Biotechnol Bioeng* 2003; 81(3):305-315.
19. 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.
20. CASTILLO EF. Potencial del proceso de pirólisis como alternativa para la valorización de los residuos de cosecha en el sector azucarero colombiano. *Técnicaña*. 2009, 20: 16-21
21. CHAE SR, Hwang EJ, Shin HS. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. *Bioresour Technol.* 2006; 97:322–9.
22. 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.
23. CHENG PF, Ji B, Gao L, Zhang W, Wang J, Liu T. The growth, lipid and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* with attached cultivation. *Bioresour Technol.* 2013; 138: 95-100.

24. CHENG PF, Wang JF, and Liu TZ. Effects of nitrogen source and nitrogen supply model on the growth and hydrocarbon accumulation of immobilized biofilm cultivation of *B. braunii*. *Bioresour Technol.* 2014; 166:527-533.
25. CHINNASAMY S, Ramakrishnan B, Bhatnagar A, Das KC. Biomass production potential of a Wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10: 518-532.
26. 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.
27. CHOI G, Kim B, Ahn C, Oh H. Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *J Appl Phycol.* 2010; 23(6): 1031-37.
28. CHOI SP, Bahn SH, Sim SJ. Improvement of hydrocarbon recovery by spouting solvent into culture of *Botryococcus braunii*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2013; 36(12):1977-85.
29. COSTA R, Medri W, Perdomo CC. High-rate pond for treatment of piggery wastes. *Water Sci. Technol.* 2000; 42: 357–362.
30. CSOGÖR Z, Herrenbauer M, Schmidt K, Posten C. Light distribution in a novel photobioreactor – modelling for optimization. *Journ Appl Phycol.* 2001; 13: 325–333.
31. DAYANANDA C, Sarada R, Bhattacharya S, Ravishankar G. Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. *Process Biochem.* 2005; 40: 3125–3131

32. DAYANANDA C, Sarada R, Srinivas B, Shamala T, Ravishankar G. Presence of methyl branched fatty acids and saturated hydrocarbons in botryococcene producing strain of *Botryococcus braunii*. *Acta Physiol Plantarum*. 2006; 28(3): 251-56.
33. DAYANANDA C, Sarada R, Ranib U, Shamala T, Ravishankar G. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass Bioeng*. 2007; 31: 87–93.
34. DE-MORAIS MG, & Costa JAV. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Convers Manage*. 2007; 48: 2169-73.
35. DEMIRBAS, A. Oily products from mosses and algae via pyrolysis. *Ener Sourc*, Part A 2006, 28 (10), 933–940.
36. Disponible en: <http://www.algaebiomass.org/press/8447/algae-biomass-organization-welcomes-house-extension-of-biofuels-tax-credit-calls-for-long-term-solution/>
37. DOUCHA J, Livansky K. Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella sp.*) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *J Appl Phycol*. 2006; 18:811–26.
38. DUBOIS M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem*. 1956; 28(3): 350–356.

39. ERIKSEN NT, Poulsen BR, Iversen JJ. Dual sparging laboratory-scale photobioreactor for continuous production of microalgae. *J. Appl Phycol.* 1998; 10:377–382.
40. ERIKSEN NT, Riisgard FK, Gunther WS, Iversen JJL. On-line estimation of O₂ production, CO₂ uptake, and growth kinetics of microalgal cultures in a gas-tight photobioreactor. *J Appl Phycol.* 2007; 19:161–174.
41. EROGLU E, MELIS A. Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae *Botryococcus braunii* var. *Showa*. *Bioresour Technol.* 2010; 101(7): 2359-66.
42. FAN L, ZHANG Y, Cheng L, Zhang L, Tang D, Chen H. Optimization of carbon dioxide fixation by *Chlorella vulgaris* cultivated in a membrane photobioreactor. *Chem. Eng. Technol.* 2007; 8:1094–9.
43. FRENZ J, Largeau C, Casadevall E. Hydrocarbon recovery by extraction with a biocompatible solvent from free and immobilized cultures of *Botryococcus braunii*. *Enzyme Microb Technol.* 1989; 11:717–24.
44. FURUHASHI K, Saga K, Okada S, Imou K. Seawater-cultured *Botryococcus braunii* for efficient hydrocarbon extraction. *PLoS One.* 2013; 8(6): e66483.
45. 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.

46. GE Y, LIU J, Tian G. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. *Bioresour Technol* 2011; 102:130–4.
47. HU Q, Zarmi B, Richmond A. A combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *Eur. J. Phycol.* 1998; 33: 165-171.
48. HUPPE HC, & Turpin DH. Integration of Carbon and Nitrogen Metabolism in Plant and Algal Cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1994 ; 45: 577-607.
49. IVERSON TM. Evolution and unique bioenergetic mechanisms in oxygenic photosynthesis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006; 10: 91–100.
50. JACOB-LOPES E, Lacerda LM, Franco TT. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nageli* in a bubble column photobioreactor. *Biochem Eng J.* 2008a; 40:27–34.
51. JACOB-LOPES E, Scoparo CH, Franco TT. Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica Nageli* in tubular photobioreactors. *Chem Eng Process* 2008b; 47:1365–73.
52. JACOB-LOPES E, Scoparo CH, Ferreira LM, Teixeira TF. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chem Eng Process.* 2009; 48:306–10.
53. JACOME-PILCO CR, Cristiani-Urbina E, Flores-Cotera LB, Velasco-Garcia R, Ponce-Noyola T, Canizares-Villanueva RO. Continuous Cr (VI) removal by

- Scenedesmus incrassatulus* in an airlift photobioreactor. *Bioresour Technol* 2009; 100: 2388–91.
54. JANSSEN M, KUIJPERS TC, Veldhoen B, Ternbach MB, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light: dark cycles: 13–87s, *J. Biotechnol.* 1999; 70: 323–33.
 55. JANSSEN M, SLENDERS P, Winter M, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH., Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles, *Enzyme Microb. Technol.* 2001; 29:298–305.
 56. JANSSEN M, WINTER M, Tramper J, Mur LR, Snel J, Wijffels RH. Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light: dark cycles, *J. Biotechnol.* 2000; 78:123–137.
 57. JEONG ML, GILLIS, JM, Hwang JY, Carbon Dioxide Mitigation by Microalgal Photosynthesis, *Bull. Korean Chem. Soc.* 2003; 24(12): 1763-66.
 58. KAJIWARA S, YAMADA H, Narumasa O. Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. *Energy Convers Manage* 1997; 38:529–32.
 59. KALACHEVA GS, ZHILA NO, Volova TG, Gladyshev MI. The effect of temperature on the lipid composition of the green alga *Botryococcus*. *Microbiology.* 2002; 71: 286–293.
 60. KOJIMA E, ZHANG K. Growth and Hydrocarbon Production of Microalga *Botryococcus braunii* in Bubble Column Photobioreactors. *Jour Biosci Bioeng.* 1999; 87(6):811-5.

61. WEI-BAO KONG WB, Song H, Hua SF, Yang H, Yang, Q and Xia CG. Enhancement of biomass and hydrocarbon productivities of *Botryococcus braunii* by mixotrophic cultivation and its application in brewery wastewater treatment. Af J. Microb Res. 2012; 6(7), 1489-96.
62. KURANO N, IKEMOTO H, Miyashita H, Hasegawa H, Hata T, Miyachi S. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. Ener Conver Manag. 1995; 36 (6): 689-692.
63. LARGEAU C, CARADEVALL E, Berkloff C, Dhamliencourt P. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. Phytochem. 1980; 19:1043–51.
64. LEE YK, HING HK. Supplying CO₂ to photosynthetic algal cultures by diffusion through gas-permeable membranes. Appl Microbiol Biotechnol. 1989; 31:298–31.
65. LEE CG. Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors. Biotechnol. Bioprocess Eng. 1999; 4, 78-81.
66. 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.
67. LOERA-QUESADA MM., & Olguín EJ. Las microalgas oleaginosas como fuente debiodiesel: retos y oportunidades. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal 2010; 1: 91-116.

68. MAEDA K, OWADA M, Kimura N, Omata K, Karube I. CO₂ fixation from flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Convs. Mgmt.* 1995; 36, 693–696.
69. MALLICK, N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals* 2002; 15: 377–390.
70. 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.
71. METZGER P & CASADEVALL E .Aldehydes, very long chain alkenylphenols, epoxides and other lipids from an alkadiene producing strain of *Botryococcus braunii*. *Phytochem* 1989; 28: 2097–2104.
72. METZGER P and CASADEVALL E. Ether lipids from *Botryococcus braunii* and their biosynthesis. *Phytochem* 1992; 7: 2341–2349
73. METZGER P, LARGEAU C. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005; 66, 486–496.
74. MIAO X, WU Q, Yang C. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 2004; 71(2): 855–863.
75. MOHEIMANI NR, CORD-RUWISCH R, Raes E, Borowitzka MA. Non-destructive oil extraction from *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). *J Appl Phycol.* 2013a; 25: 1653-61.

76. MOHEIMANI NR, BOROWITZKA MA, Isdepsky A, Fon Sing S (2013b) Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, pp 265–284.
77. MOHEIMANI NR, MATSUURA H, Watanabe M, Borowitzka MA. Non-destructive hydrocarbon extraction from *Botryococcus braunii* BOT-22(race B). *J Appl Phycol*. 2014; 26: 1453-63.
78. MOLDOWAN JM, SEIFERT WK. First discovery of botryococcene in petroleum. *JCS Chem. Comm*. 1980; 19: 912–914.
79. 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.
80. NIEHAUS TD, OKADA S, Devarenne TP, Watt DS, Sviripa V, Chappell J. Identification of unique mechanisms for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108(30):12260-5.
81. NIITSU R, KANAZASHI M, Matsuwaki I, Ikegami Y, Tanoi T, Kawachi M, Watanabe MM, Kato M. Changes in the hydrocarbon-synthesizing activity during growth of *Botryococcus braunii* B70. *Bioresour Technol*. 2012; 109:297-99.
82. NOMOMURA AM. Methods and compositions for growth of hydrocarbons in *Botryococcus* sp. 2006; Patent No: US 7,923,228 B2

83. OHMORI M, Wolf FR, and Bassham JA. *Botryococcus braunii* carbon/nitrogen metabolism as affected by ammonia addition. *Arch Microbiol.* 1984; 140:101-06.
84. 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.
85. ÓRPEZ R, MARTÍNEZ M, Hodaifa M, El-Yousfi M, Jbari N, Sánchez S. Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Desalination.* 2009; 246: 625–630.
86. 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.
87. 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.
88. Petrobras. Management of atmospheric emissions. Technical Report. Rio de Janeiro; 2005. 35p.
<http://www2.petrobras.com.br/meio_ambiente/portugues/pdf/131205VersaoFinalPetrobrasInternet.pdf>. Viewed November 2007 [in Portuguese].
89. PICARDO MC, de MEDEIROS JL, Garcia-M Monteiro J, Chaloub RM, Giordano M, Fernandes Araujo OQ. A methodology for screening of microalgae as a decision making tool for energy and green chemical process applications. *Clean Techn Environ Policy.* 2013; 15:275–91.

90. PULZ O, & SCHEIBENBOGEN K. Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1998; 59: 123–52.
91. PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *App Microbiol and Biotechnol.* 2001; 57:287–93.
92. RADOS S, VACLAV B, Frantisek D. CO₂ balance in industrial cultivation of algae. *Arch Hydrobiol.* 1975; 46(suppl):297 –310.
93. RAO R, DAYANANDA A, Sarada, C Shamala R, Ravishankar TR. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol.* 2007; 98:560-564.
94. RAO RA, REDDY RL, Baskaran V, SARADA R, Ravishankar RV. Characterization of Microalgal Carotenoids by Mass Spectrometry and Their Bioavailability and Antioxidant Properties Elucidated in Rat Model. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 8553–59
95. RANGA Rao A, RAVISHANKAR GA, Sarada R. Cultivation of green alga *Botryococcus braunii* in raceway, circular ponds under outdoor conditions and its growth, hydrocarbon production. *Bioresour Technol.* 2012 123:528-33.
96. RICHARDSON K, BEARDALL J, Raven JA. Adaptation of unicellular algae to irradiance: An analysis of strategies. *New Phytol.* 1983; 93:157–191
97. RICHMOND AMOS. In: CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.; 1986. p. 127 printed in United States.

98. RIGANO VDM, Vona V, Cargagna S, Esposito S, Carillo P, Rigano C. Effects of sulfate-starvation and resupply on growth, NH_4 + uptake and starch metabolism in *Chlorella sorokiniana*. *Aust J Plant Physiol*. 2000; 27:335–342.
99. RIPPKA, R., DERULLES, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., and Stainer, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol*. 1979; 111:1–61.
100. RODOLFI L, ZITTELLI GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2009; 102:100–12.
101. RUANGSOMBOON S. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. 2011. in press.
102. SATO Y, Ito Y, Okada S, Murakami M, Abe H. Biosynthesis of the triterpenoids, botryococcenes and tetramethylsqualene in the B race of *Botryococcus braunii* via the non-mevalonate pathway. *Tetrahedron Lett*. 2003; 44, 7035–7037.
103. SHAW PM, Jones GJ, Smith JD, Johns RB. Intraspecific variations in the fatty acids of the diatom *Skeletonema costatum*. *Phytochemistry*, 1989; 28:811–15.
104. SILVA H, Pirt SJ. Carbon dioxide inhibition of photosynthetic growth of *Chlorella*. *J. Gen. Microbiol*. 1984; 130: 2833–38.

105. SINGH A, SMYTH BM, Murphy JD. A biofuel strategy for Ireland with an emphasis on production of biomethane and minimization of land-take. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2010; 14: 277–88.
106. SOLOVCHENKO AE, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Cohen Z, Merzlyak MN. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J Appl Phycol* 2008; 20:245–51.
107. SONG D, Fu J, Shi D. Exploitation of Oil-Bearing Microalgae for Biodiesel. *Chin. Jour. Biotech.* 2008; 24: 341-348.
108. SUNG KD, Lee JS, Shin CS, Park SC, Choih MJ. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. *Bioresour Technol.* 1999; 68:269-73.
109. SZKLO A, Schaeffer R. Fuel specification, energy consumption and CO₂ emission in oil refineries. *Ener.* 2007; 32:1075–92.
110. TAKAGI M, Watanabe K, Yamaberi K, Yoshida T. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000;54(1):112-17.
111. TANOI, T. Kawachi, M. Watanabe, M. (2011). Effects of carbon source on growth and morphology of *Botryococcus braunii*, *J Appl Phycol.*
112. TAPIE P, BERNARD A. Microalgae production technical and economic evaluations. *Biotechnol Bioeng.* 1988; 32:873–885.

113. TRAN HL, Kwon JS, Kim ZH, Oh Y, Lee, CG. Statistical optimization of culture media for growth and lipid production of *Botryococcus braunii* LB572. *Biotechnol Bioproc Eng*. 2010, 15(2); 277-84.
114. UGWU CU, Aoyagi H, Uchiyama H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol*. 2008; 99:4021–4028.
115. VAN HARMELEN T, Oonk H. *Microalgae Biofixation Processes: Applications and Potential Contributions to Greenhouse Gas Mitigation Options*. Report, International Network on Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement, The Netherlands. 2006.
116. VONSHAK A. Strain selection of *Spirulina* suitable for mass production. *Hydrobiologia* 1987;151–152:75–77.
117. WANG B, Li Y, Wu N, Lan CQ. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008; 79:707–718.
118. WATANABE, Y., Ohmura, N., Saiki, H., 1992. Isolation and determination of cultural characteristics of microalgae which Cunc lions under CO₂ enriched atmosphere. *Energy Conversion Management*. 1992; 33 (5-S):545-52.
119. WATANABE, M. M., Kawachi, M., Hiroki, M., and Kasai, F. 2000. NIES Collection List of Strains. Sixth Edition, 2000, Microalgae and Protozoa. Microbial Culture Collections, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan, 159 pp.
120. WATANABE, M., Tanabe, Y. (2013). Biology and Industrial Potential of *Botryococcus braunii*. In Richmond, A., Hu, Q WB (Eds) *Handbook of Microalgal Culture*, Wiley, pp 369-387

121. WEETALL HH. Studies on the Nutritional Requirements of the Oil-Producing Alga *Botryococcus braunii*. *Appl Biochem Biotechnol*. 1985; 11(5) 377-391.
122. WEISS TL, J. Spencer Johnston JS, Fujisawa K, Okada S, Devarenne TP. Genome size and phylogenetic analysis of the A and L races of *Botryococcus braunii*. *J Appl Phycol*. 2011; 23(5): 833-839.
123. WOLF FR, Nanomura AM, Bassham JA. Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii*. *J. Phycol*. 1985; 21: 388–396.
124. YEESANG C, Cheirsilp B. Low-cost production of green microalga *Botryococcus braunii* biomass with high lipid content through mixotrophic and photoautotrophic cultivation. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014; 174(1):116-29
125. YOO C, Jun SY, Lee JY, Ahn CY, Oh HM. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresour. Technol*. 2010; 101, 71–74.
126. ZHILA NO, Kalacheva GS, Volova TG. Effect if nitrogen limitation on the growth and lipid composition of the green alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *Russ J Plant Physiol*; 2005; 52:357–365.
127. ZHILA N, Kalacheva G, Volova T. Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *J Appl Phycol*, 2011; 23:47–52.
128. CHINI ZITTELLI G, Rodolfi L, Biondi N, & Tredici MR. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 2006;261: 932–943.

129. ZITTELLI GC, Biondi N, Rodolfi L, Tredici MR. Photobioreactors for Mass Production of Microalgae in: Richmond A, Hu Q. Handbook of Microalgal Culture, 2013. Wiley Blackwell, pp 225–267.