



Desarrollo preliminar de una metodología de suministro de CO₂ a cultivos de *Botryococcus Braunii* para la producción de biocombustibles

Preliminary development of a methodology for supply CO₂ to *Botryococcus braunii* crops for biofuel production

Desenvolvimento preliminar de uma metodologia para o abastecimento de CO₂ a culturas de *Botryococcus braunii* para a produção de biocombustíveis

Nestor Andres Jaimes Villarreal*; Viatcheslav Kafarov**

Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES). Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander (UIS), Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga, Colombia.

*nestorjaimes86@gmail.com, **kafarov@uis.edu.co

Fecha Recepción: 24 de febrero de 2015

Fecha Aceptación: 09 de junio de 2015

Resumen

Diversos estudios sobre el cultivo de microalgas a escala laboratorio y piloto han registrado el potencial de estos microorganismos para la producción de materia prima en la elaboración de biocombustibles. El suministro de una fuente de carbono para el cultivo masivo de microalgas representa una de las principales limitantes en el proceso productivo; estas fijan fotosintéticamente carbono inorgánico (CO₂) y sintetizan metabolitos para la producción de biocombustibles. En el presente estudio se evaluó la influencia de diversos parámetros de suministro de CO₂ sobre cultivos de la especie *Botryococcus braunii* en fotobiorreactores a escala laboratorio. Se plantearon diseños experimentales centrales compuestos para correlacionar los parámetros a evaluar y determinar su efecto en la dilución de CO₂ y producción de metabolitos (biomasa, lípidos e hidrocarburos). Respecto a los parámetros de diseño del fotobiorreactor, alturas > 36cm, diámetros < 7cm y pequeños tamaños de burbuja ayudan a incrementar la dilución del CO₂ hasta en 180%. Se encontró que altas concentraciones de CO₂ (> 0,06v/vm) suministrado de manera continua son ideales para el crecimiento celular. Por otra parte, concentraciones medias (0,04 – 0,06v/vm) de CO₂ son ideales para la producción de lípidos y concentraciones bajas de CO₂ (≤ 0,02v/vm) favorecen la producción de hidrocarburos. Se validó el potencial de la cepa de *B. braunii* colombiana para la producción de biodiésel gracias a sus altas tasas de síntesis de lípidos.

Palabras clave: microalgas, *botryococcus braunii*, CO₂, fotobiorreactor, lípidos, hidrocarburos.

Abstract

Several studies about the cultivation of microalgae in laboratory and pilot scale have recorded the potential of these microorganisms for the production of raw material in the fabrication of biofuels. The provision of a carbon source for the mass cultivation of microalgae is one of the main constraints in the production process; these photosynthetically fixed inorganic carbon (CO₂) and synthesized metabolites for biofuel production. In the present study the influence of various parameters of CO₂ supply over *Botryococcus braunii* crops in laboratory scale photobioreactors was evaluated. Central composite experimental

designs were proposed to correlate the parameters and determine their effect on the dilution of CO₂ and production of metabolites (biomass, lipids and hydrocarbons). Regarding design parameters of the photobioreactor, heights > 36cm, diameter < 7cm and small bubble sizes help increase CO₂ dilution up to 180%. It was found that high concentrations of CO₂ (> 0.06v/vm) continuously supplied are ideal for cell growth. Moreover, medium concentrations of CO₂ (0.04 – 0.06v/vm) are ideal for the production of lipids and low concentrations of CO₂ (< 0.02v/vm) is ideal for the production of hydrocarbons. The potential of the Colombian *B. braunii* strain for biodiesel production was validated thanks to its high lipid synthesis.

Keywords: *microalgae, botryococcus braunii, CO₂, photobioreactor, lipids, hydrocarbons.*

Resumo

Estudos sobre o cultivo de microalgas em escala laboratorial e piloto tem sido o potencial para o cultivo desses microorganismos para a produção de matéria-prima na produção de biocombustíveis. Fornecer uma fonte de carbono para o cultivo em massa de microalgas representa um dos principais constrangimentos no processo de produção; estas fotossinteticamente fixar carbono inorgânico (CO₂) e sintetizam metabólitos para a produção de biocombustíveis. O presente estudo avaliou a influência de diferentes parâmetros de fornecimento de CO₂ nas culturas da espécie *Botryococcus braunii* em fotobiorreatores à escala laboratorial. Composto Central projetos experimentais foram propostos para correlacionar os parâmetros para avaliar e determinar o seu efeito sobre a diluição de CO₂ e produção de metabólitos (biomassa, lipídios e hidrocarbonetos). Em relação aos parâmetros de projeto da fotobiorreator, alturas > 36cm, diâmetro < 7cm e tamanhos pequenos da bolha ajudam a aumentar a diluição de CO₂ até 180%. Verificou que altas concentrações de CO₂ (> 0,06v/vm) fornecido continuamente são ideais para o crescimento de células. Por outro lado, média de concentrações (0,04 - 0,06v/vm) de CO₂ são ideais para a produção de lipídios e baixas concentrações de CO₂ (≤ 0,02v/vm) favorecem a produção de hidrocarbonetos. Validada a tensão potencial de *B. braunii* colombiano para a produção de biodiesel, devido a suas altas taxas de síntese de lipídios.

Palabras-chave: *microalgas, botryococcus braunii, CO₂, fotobiorreator, lipídios e hidrocarbonetos.*

Introducción

El consumo de energía y el progreso de nuevas economías está sustentado por los combustibles fósiles, principales materias primas energéticas las cuales no son renovables y liberan dióxido de carbono (CO₂) a la atmósfera durante su quema, contribuyendo así al calentamiento global [1]. Estos combustibles son actualmente la fuente más importante de energía debido a su fácil disponibilidad, estabilidad y alta densidad energética [2].

En los últimos años se han hecho diversos intentos respecto a la fijación biológica de CO₂ usando las microalgas [3], un grupo de microorganismos fotosintéticos unicelulares o multicelulares simples que necesitan dos cosas fundamentales para crecer, una es la fuente de carbono (normalmente en forma de CO₂), y la otra es una fuente de energía, en este caso la luz [4-6]. Esta fijación biológica ha recibido considerable atención ya que permite la producción de energía de biomasa a través del proceso de fijación de CO₂ mediante la fotosíntesis [7,8].

Las microalgas poseen una alta tasa de crecimiento, siendo entre 10 a 50 veces más eficientes en fijación de CO₂ que las plantas terrestres [9], además de requerir menor energía para la elaboración de biomasa [10]. Sus estructuras biológicas destinadas principalmente a la conversión de energía y su configuración primitiva (carecen de raíces, tallos y hojas) les permite adaptarse a diversas condiciones ambientales y prosperar en el largo plazo [11]. Así, bajo condiciones climáticas adecuadas y con suficientes nutrientes, las microalgas pueden duplicar su biomasa dentro de 24 horas o hasta 3,5 horas durante la fase de crecimiento exponencial, dependiendo principalmente de la cepa utilizada [12].

De acuerdo con la literatura, el suministro de carbono para el cultivo masivo de microalgas representa la principal limitante [13,14]; el CO₂ se disocia como ácido carbónico en medio acuoso, afectando el pH del medio de cultivo lo que influye directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas [15]. Entonces puede existir inhibición del cultivo cuando se usan fracciones molares altas

de CO₂ y/o limitación de nutrientes cuando se usan bajas fracciones molares de CO₂ [16]. Por otra parte, 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 [13,14], además la eficiencia de captura o fijación del CO₂ en sistemas de cultivo cerrado depende principalmente de la especie de microalga, la concentración del CO₂ y el diseño del fotobiorreactor [17].

***Botryococcus braunii* Kützing**

Las microalgas están presentes en todos los ecosistemas existentes de la tierra, no sólo acuático sino también terrestre, lo que representa una gran variedad de especies que viven en una amplia gama de condiciones ambientales. Se estima que existen más de 50.000 especies, pero sólo un número limitado, de alrededor de 30.000, se han estudiado y analizado [18]. Dependiendo de la especie de microalga a cultivar, éstas sintetizan diversos compuestos como lípidos, proteínas, carbohidratos, azúcares, antioxidantes e hidrocarburos [19,20], convirtiéndolas en cultivos potenciales en la obtención de materia prima para diversos tipos de combustibles renovables como el biodiésel, metano, hidrógeno, etanol, entre otros [11].

Botryococcus braunii (*Chlorophyta*, *Botryococcaceae*) es una microalga verde formadora de colonias que produce grandes cantidades de hidrocarburos líquidos que se pueden transformar en combustibles para el transporte [21]. El contenido de hidrocarburos en *B. braunii* varía entre 15-80% del peso celular seco, lo que es mucho mayor que en otros microorganismos [22]. Debido a su riqueza de lípidos y a su capacidad para formar floraciones, a veces perdurables durante muchos años [23], esta microalga se ha propuesto como una fuente de combustibles líquidos renovables [24]. Esta alga crece como una colonia de células individuales adheridas por una matriz compuesta por hidrocarburos y lípidos inusuales [25]. Dentro de esta misma especie se pueden reconocer 3 diferentes tipos o "familias", cada una de éstas se diferencia por el tipo de hidrocarburos que produce. El tipo A produce n-alcadienos (C₂₃-C₃₃, principalmente hidrocarburos dienos y trienos), el tipo B produce hidrocarburos triterpenos C₃₀-C₃₇ mejor conocidos como botriococenos, y escualenos metilados C₃₁-C₃₄, en cambio, las tipo L produce licopodíneos, los cuales son tetraterpenoides simples [26].

En estudios realizados en cultivos de la cepa de *B. braunii* LB-572, se encontró que una concentración del 2,0%v de CO₂ favorece el crecimiento rápido, resultando en la acumulación de biomasa y aumento en la producción de hidrocarburos en el final del período experimental. Más aun, esta cepa fue capaz de crecer en todas las concentraciones ensayadas de CO₂ en 0,5; 1; y 2%v [27]. Por su parte, Ge y colaboradores [28] trabajaron con cultivos de la cepa *B. braunii* 765, a los cuales inyectaron altas concentraciones de CO₂ del 2, 5, 10 y 20%v en una corriente de gases mezclada con aire a una tasa de 600ml/min, obteniéndose tasas de crecimiento similares para concentraciones del 2 y del 20%v.

Fotobiorreactores adecuadamente diseñados pueden reducir el área de cultivo mediante la distribución vertical de los organismos fotosintéticos, estos fotobiorreactores tubulares verticales también aumentan el tiempo de residencia del CO₂ en el medio de cultivo y, en consecuencia, la eficiencia de utilización de CO₂. Los cultivos también pueden llevarse a cabo en fotobiorreactores en serie, en los cuales el efluente de CO₂, sin usar un fotobiorreactor, se utilice para alimentar otro subsecuente [29]. Por otra parte, diversas ventajas se han encontrado mediante la variación de los tipos de rociadores para el burbujeo de CO₂ en el fotobiorreactor. La disminución del tamaño de burbuja desde el difusor aumenta el coeficiente de transferencia de masa entre el medio de cultivo y la corriente de CO₂, aumentando la eficiencia de transferencia hasta en un 500% [30].

Trabajos recientes desarrollados en el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP-ECOPETROL) han demostrado que gracias a su composición, *B. braunii* produce altos rendimientos de *bio-oil*; además, las propiedades calóricas también son mejores que muchos otros materiales biológicos como los lignocelulósicos. Otras Instituciones de Educación Superior, como la Universidad Nacional de Colombia y la Universidad Industrial de Santander han realizado diversas investigaciones a escala laboratorio con el fin de evaluar y comparar el potencial de *B. braunii* respecto a otras especies. Por su parte, el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, así como el Ministerio de Agricultura, también han apoyado la temática con recursos para proyectos de bioprospección nacional de especies de microalgas con potenciales para la producción de biocombustibles.

Con este panorama, y aunque el desarrollo comercial de las microalgas como fuente de biomasa para biocombustibles se encuentra lejos aún, la investigación en este campo, apoyada por Instituciones público/privadas como Colciencias y el ICP, es prometedora y está bien sustentada. Así pues, un estudio de las interacciones entre las variables de suministro y captura de CO₂, determinantes en el crecimiento y producción de lípidos y botriococenos (hidrocarburos) en el alga *B. braunii*, puede ser de gran valor para el desarrollo de un sistema viable de producción de biocombustibles a partir de esta especie. Más aun, para hacer sostenible técnica y económicamente el proceso de producción, es necesario realizar diferentes estudios enfocados en la optimización de las variables de cultivo y de la productividad de los mismos mediante el uso de CO₂, ya que estimados indican que el costo de la producción de biocombustibles es en general 2,3 veces más alto que aquellos derivados de combustibles fósiles [31].

Metodología

Se evaluó el efecto de diversos parámetros de suministro de CO₂ como fuente de carbono en cultivos de una cepa colombiana de *Botryococcus braunii*, teniendo como variables de respuesta la concentración de CO₂ en el medio de cultivo, la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos sintetizados como botriococenos.

Microorganismo

Se utilizó la microalga *Botryococcus braunii* ICP 0001 (tipo B) aislada de un lago ubicado en el municipio de Porce Antioquia en la hacienda Vegas de la Clara de la Universidad de Antioquia - UDEA "San José del Nus" y aislada en el Laboratorio de Transformación de Biomasa del grupo de investigación CIDES de la Universidad Industrial de Santander.

Medio de cultivo

La microalga se mantuvo en un medio de cultivo Bold Basal modificado (MBBM). Cada litro de medio de cultivo está compuesto por: macronutrientes (Molar) NaNO₃ (2,94x10⁻³), MgSO₄·7H₂O (3,04x10⁻⁴), NaCl (4,28x10⁻⁴), K₂HPO₄ (4,31x10⁻⁴), KH₂PO₄ (1,29x10⁻³), CaCl₂·2H₂O (1,70x10⁻⁴) y micronutrientes (g/L) ZnSO₄·7H₂O (3,07x10⁻⁵), MnCl₂·4H₂O (7,28x10⁻⁶), MoO₃ (4,93x10⁻⁶), CuSO₄·5H₂O (6,29x10⁻⁶), Co(NO₃)₂·6H₂O (1,68x10⁻⁶), H₃BO₃ (1,85x10⁻⁴), EDTA (1,71x10⁻⁴), KOH (5,53x10⁻⁴), FeSO₄·7H₂O (1,79x10⁻⁵).

Condiciones fotobiorreactor

Las corridas experimentales se llevaron a cabo en fotobiorreactores con entradas y salidas para gases. Se suministró CO₂ puro a los cultivos desde balas de 10kg de capacidad, fijando la presión con reguladores y el flujo con rotámetros. Los cultivos se mantuvieron bajo un ciclo de iluminación de 12h de luz y 12h de oscuridad utilizando lámparas fluorescentes de 12W. Con el fin de airear y agitar, se suministró aire a los cultivos a razón constante desde bombas de aire.

Método cuantificación de CO₂

La concentración de CO₂ en el medio de cultivo (medio acuoso) se determinó con un equipo de titulación digital marca HACH Modelo 16900 con cartuchos específicos para CO₂.

Método cuantificación de biomasa

Se utilizó la metodología de peso seco. Una vez cada 5 días durante 15 días se tomaron 20mL de medio de cultivo, los cuales se filtraron utilizando filtros Whatman GF/C pre-combustionados durante 1h a 100°C. Una vez terminado el proceso de filtrado, los filtros fueron llevados al horno durante 1 hora a 100°C seguido por 12h en desecador hasta alcanzar peso constante. Se determinó la cantidad de biomasa mediante la diferencia de pesos.

Método cuantificación de hidrocarburos

Se utilizó la metodología descrita por Eroglu y Melis [32]. Al final de la experimentación se tomaron 20mL de medio de cultivo, los cuales se centrifugaron a 3400rpm durante 20min. Al pellet se le agregaron 5mL de heptano grado analítico y 5mg de perlas de vidrio de 0,5mm de diámetro; la mezcla se homogenizó con vortex a velocidad máxima durante 15 minutos; transcurrido el tiempo se agregaron 10mL 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 (cuantificación de hidrocarburos) en un espectrofotómetro Spectroquart Pharo 300 (Merck).

Método cuantificación de lípidos

Se utilizó la metodología descrita por Bligh y Dyer [33]. Al final de la experimentación se tomaron 20mL de medio de cultivo, los cuales se centrifugaron a 3400rpm durante 20 minutos. Al *pellet* se le agregaron 5,7mL de solución de Bligh

y Dyer y 5mg de perlas de vidrio de 0,5mm de diámetro; la mezcla se homogenizó con vórtex a velocidad máxima durante 15 minutos; transcurrido el tiempo la mezcla se llevó a centrifuga a 3400rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se guardó en tubos de vidrio de 50mL; el pellet restante se llevó a una segunda extracción con 5,7mL de solución y homogenización en vórtex por 5 minutos y luego se llevó de nuevo a centrifuga. Los dos sobrenadantes se mezclaron en los tubos de vidrio y se agregaron 3mL de cloroformo analítico. La mezcla se dejó en nevera durante 24 horas para separar las fases (agua y cloroformo con los lípidos). Una vez transcurridas las 24 horas se retiró la capa de agua, los lípidos se traspasaron a cajas de Petri previamente pesadas y llevadas a horno a 38°C hasta evaporar el cloroformo; las cajas de Petri con los lípidos se llevaron a desecador hasta alcanzar peso constante.

Diseño experimental.

Se ejecutaron 3 etapas experimentales; Parámetros de Diseño, Parámetros de Proceso y Parámetros de Suministro. En los Parámetros de Diseño se determinó la influencia de factores geométricos del fotobiorreactor y del tamaño de burbuja sobre la dilución de CO₂ en el medio de cultivo. En los Parámetros de Proceso se determinó la influencia de la concentración de nutrientes (CO₂ y KNO₃) sobre la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos. En los Parámetros de Suministro se determinó la influencia del tipo de suministro

de CO₂ (inyección por pulsos o continua) sobre la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos. Para evaluar los efectos de los parámetros variables seleccionados sobre las diferentes variables de respuesta, se utilizó un diseño de experimentos tipo factorial ampliado a DCC (Diseño Central Compuesto).

Análisis estadístico

Se utilizó la metodología estadística del Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar la influencia de los parámetros variables sobre las variables de respuesta. Dentro del Análisis de Varianza se utilizaron los diagramas de Pareto como herramienta estadística. Se recurrió a la metodología de la Superficie de Respuesta, una herramienta estadística cuyo objetivo es optimizar la variable de interés, determinando las condiciones óptimas de operación del sistema. El planteamiento del diseño experimental y el análisis estadístico se desarrolló utilizando la herramienta informática STATISTIC 7.0.

Resultados

En la Tabla 1 se observan los resultados obtenidos en la etapa experimental de Parámetros de Diseño, incluyendo los experimentos originales y 2 réplicas. Los parámetros seleccionados con sus niveles fueron; altura (20, 30, 40cm), diámetro (6, 8, 10cm) y tipo de difusor (burbujeo, piedra difusora).

Tabla 1. Diseño y resultados experimentales de la etapa Parámetros de Diseño.

Orden Corrida	Altura (cm)	Diámetro (cm)	[] CO ₂ en medio de cultivo (mg / L)			
			Total Promedio (b*)	Desviación Estandar (b)	Total Promedio (p*)	Desviación Estandar (p)
1	20,00	6,00	281,33	4,99	715,33	7,76
2	20,00	10,00	234,00	5,35	584,67	4,99
3	40,00	6,00	444,67	4,11	796,67	8,50
4	40,00	10,00	387,33	2,49	710,67	6,80
5 (C)	30,00	8,00	462,00	4,97	830,00	4,08
6	15,86	8,00	406,00	4,32	698,00	5,35
7	44,14	8,00	495,00	4,08	900,00	4,08
8	30,00	5,17	473,33	4,71	850,00	7,12
9	30,00	10,83	432,00	5,89	750,00	7,12
10 (C)	30,00	8,00	456,67	5,31	832,00	5,89

b* = resultados usando difusor burbujeo.

p* = resultados usando difusor piedra difusora.

En la Tabla 2 se observan los resultados obtenidos en la etapa experimental de Parámetros de Proceso. Los parámetros seleccionados con sus niveles fueron; concentración de CO₂ (0,02, 0,04 y 0,06v/vm) como fuente de carbono y concentración de KNO₃ (0,38, 0,75, 1,5gKNO₃ /L) como fuente de nitrógeno. En esta etapa experimental (Tabla 2) se realizó un suministro continuo de CO₂.

En la Tabla 3 se observan los resultados obtenidos en la etapa experimental de Parámetros de Suministro. Los parámetros seleccionados con sus niveles fueron idénticos a la etapa anterior (Parámetros de Proceso), pero se realizaron pulsos de inyección de CO₂ de 20min con una etapa de asimilación (sin suministro) de 1 hora, para permitir buena solubilización en el medio y fijación por parte de los microorganismos.

Tabla 2. Diseño y resultados experimentales de la etapa Parámetros de Proceso.

Orden Corrida	CO ₂ (mL / min)	KNO ₃ (g / L)	Total Promedio (Original y Replicas)		
			Biomasa (g / L)	Lípidos (g / g)	Hidrocarburos (µg / g)
1	30	0,38	0,70	0,558	46531,10
2	30	1,50	0,83	0,565	22829,70
3	90	0,38	1,43	0,454	19756,20
4	90	1,50	1,78	0,302	25861,20
5 (C)	60	0,75	0,38	0,767	14939,40
6	17	0,75	0,98	0,47	30271,20
7	102	0,75	1,60	0,233	21994,90
8	60	0	0,30	0,839	16285,90
9	60	1,54	0,20	0,511	24964,00
10 (C)	60	0,75	0,42	0,774	15780,00

Tabla 3. Diseño y resultados experimentales de la etapa Parámetros de Suministro.

Orden Corrida	CO ₂ (mL / min)	KNO ₃ (g / L)	Total Promedio (Original y Replicas)		
			Biomasa (g / L)	Lípidos (g / g)	Hidrocarburos (µg / g)
1	30	0,38	0,21	0,45	6387,80
2	30	1,50	0,11	0,60	13683,80
3	90	0,38	0,80	0,26	3857,50
4	90	1,50	0,68	0,31	6606,30
5 (C)	60	0,75	0,84	0,21	409,10
6	17	0,75	0,25	0,73	6479,30
7	102	0,75	0,90	0,24	3577,50
8	60	0	0,83	0,35	417,60
9	60	1,54	0,73	0,31	534,60
10 (C)	60	0,75	0,79	0,26	415,40

Parámetros de diseño

A partir de los resultados experimentales, se construyó la Tabla 4 de efectos estimados y las Figuras 1 y 2 con los diagramas de Pareto y las superficies de respuesta para determinar la influencia de la altura, el diámetro y el difusor sobre la dilución de CO₂.

En la Figura 1-A se observa que usando burbujeo como tipo de difusor, únicamente la altura (H) fue significativa y tuvo un efecto positivo sobre

los resultados, es decir, a mayor altura mayor dilución de CO₂. Por otra parte, en la Figura 1-B se observa que usando piedra difusora como tipo de difusor, ambas variables, altura (H) y diámetro (D), fueron significativas. En este caso, la altura tuvo un mayor grado de significancia y un efecto positivo, es decir, a mayor altura mayor dilución de CO₂. Por el contrario, el diámetro tuvo un efecto negativo, es decir, a mayor diámetro menor dilución de CO₂.

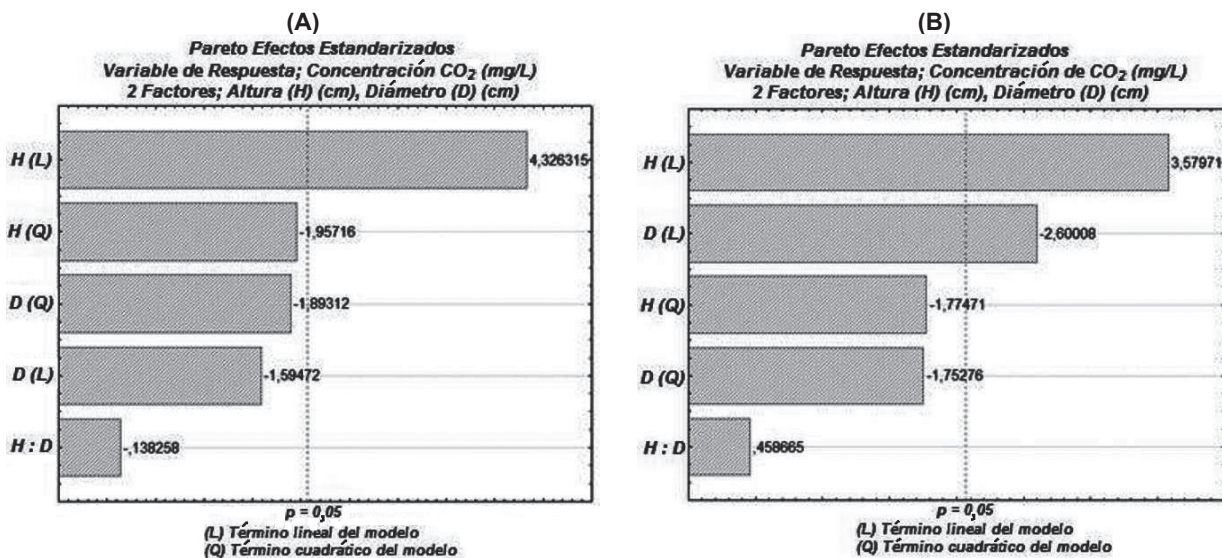


Figura 1. Diagramas de Pareto. (A) Difusor burbujeo. (B) Difusor piedra difusora.

En la Tabla 4 se observa en el caso de difusor burbujeo, que el efecto de la altura fue positivo, entonces la dilución de CO₂ puede aumentar hasta en 163,11mg/L al pasar de un nivel bajo (20cm) a un nivel alto (40cm). Para el caso de la piedra difusora, el efecto de la altura también fue positivo, entonces la dilución de CO₂ puede aumentar hasta en 194,3mg/L para los mismos niveles mencionados. Por el contrario, el efecto del diámetro fue negativo, entonces la dilución de CO₂ puede disminuir hasta en 160,6mg/L al pasar de un nivel bajo (6cm) a un nivel alto (10cm) del diámetro.

La Figura 2-A muestra un valor máximo predicho de dilución (486,4mg CO₂/L) que se obtiene con un valor crítico de altura de 38,5cm y un valor crítico de diámetro de 7,3cm. Por otra parte, la Figura 2-B muestra un valor máximo predicho de dilución (862,9mg CO₂/L) que se obtiene con un valor crítico de altura de 36,9cm y un valor crítico de diámetro de 7,0cm. Se puede observar que el aumento de los valores máximos de dilución estuvo principalmente influenciado por cambios de altura y tamaño de partícula (difusor), mientras la influencia del diámetro del fotobiorreactor no fue tan significativa.

Tabla 4. Efectos estimados Parámetros de Diseño.

Difusor Burbujeo			Difusor Piedra difusora		
Factor	Efecto	Valor-p	Factor	Efecto	Valor-p
Media	459,33	0,00000	Media	831,00	0,0000
Altura (L)	110,63	0,00023	Altura (L)	123,25	0,0015
Altura (Q)	-66,20	0,062057	Altura (Q)	-80,83	0,0886
Diámetro (L)	-40,78	0,123862	Diámetro (L)	-89,52	0,0157
Diámetro (Q)	-64,04	0,070462	Diámetro (Q)	-79,83	0,0924
Diámetro x Altura	-5,00	0,891190	Diámetro x Altura	22,33	0,6506

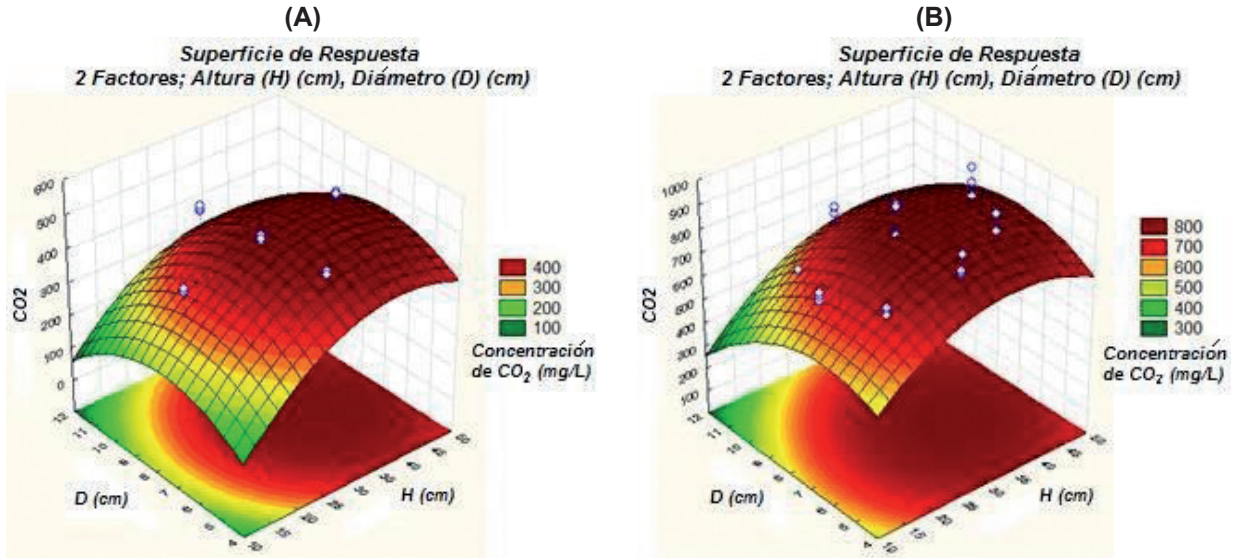


Figura 2. Superficies de Respuesta. (A) Difusor burbujeo. (B) Difusor piedra difusora.

Parámetros de proceso y parámetros de suministro

A partir de los resultados experimentales obtenidos en cada etapa, se determinó la influencia de los factores concentración de CO₂ y de KNO₃ sobre la producción de metabolitos, y se contrastaron los resultados para ambos métodos de suministro (Continuo y Pulsos).

Biomasa. En la Figura 3-A se observa que con suministro continuo la concentración de CO₂ tuvo un efecto positivo sobre la producción de biomasa, es decir, a mayor concentración

de CO₂ mayor producción de biomasa. En la Figura 3-B se observa que con suministro por pulsos el efecto de la concentración de CO₂ presentó el mayor grado de significancia sobre la producción de biomasa. Se observa además que los términos lineal y cuadrático para la concentración de CO₂ tienen diferentes signos, esto quiere decir que el modelo presentó ensilladura. La concentración de nitrógeno influyó en menor grado con efecto negativo, es decir, que al pasar de niveles bajos a niveles altos de nitrógeno, la producción de biomasa tendió a disminuir y viceversa.

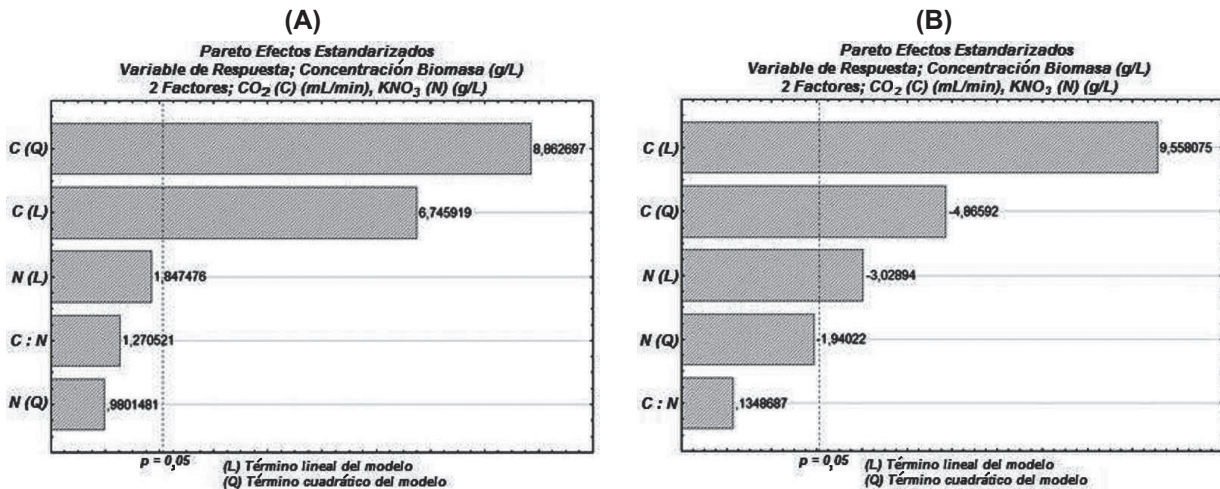


Figura 3. Diagramas de Pareto de la producción de Biomasa (A) Suministro CO₂ continuo. (B) Suministro CO₂ por pulsos.

Según los resultados de los efectos estimados en la Tabla 5, para el suministro continuo el efecto de la concentración de CO₂ fue positivo, entonces la producción de biomasa puede aumentar hasta en 1,11g/L al pasar de un nivel bajo (30mLCO₂/min) a un nivel alto (90mLCO₂/min) de suministro de CO₂. Por otra parte, con el suministro por pulsos se observó que la concentración de CO₂ tuvo efectos positivos y negativos sobre la producción

de biomasa debido a un efecto ensilladura. Sin embargo, el efecto total de la variable concentración de CO₂ fue positivo, es decir, la producción de biomasa tendió a aumentar conforme aumentó el valor de la variable. La concentración de nitrógeno tuvo un efecto negativo sobre la producción de biomasa, así al pasar de un nivel bajo (0,38g/L) a un nivel alto (1,5g/L) la producción puede disminuir hasta 0,17g/L.

Tabla 5. Efectos estimados biomasa Parámetros de Proceso y Suministro.

Suministro Continuo			Suministro por Pulsos		
Factor	Efecto	Valor-p	Factor	Efecto	Valor-p
Media	0,3854	0,000363	Media	0,7859	0,000000
CO ₂ (L)	0,6677	0,000001	CO ₂ (L)	0,5214	0,000000
CO ₂ (Q)	1,1146	0,000000	CO ₂ (Q)	-0,3373	0,000058
KNO ₃ (L)	0,1862	0,077042	KNO ₃ (L)	-0,1682	0,005793
KNO ₃ (Q)	0,1142	0,336791	KNO ₃ (Q)	-0,1246	0,064190
CO ₂ x KNO ₃	0,1684	0,216078	CO ₂ x KNO ₃	0,0098	0,893840

En la Figura 4-A se puede observar que los valores máximos de producción de biomasa se obtuvieron con las concentraciones más elevadas de CO₂, además, el aumento o disminución de los valores de producción estuvo principalmente influenciado por los cambios en la concentración de CO₂, mientras los cambios debido a la concentración de nitrógeno no fueron evidentes. La Figura 4-B para suministro por pulsos, muestra

un valor máximo predicho de producción de biomasa (0,912g/L) que se obtiene con un valor crítico de concentración de CO₂ de 82,9mL/min y un valor crítico de concentración de nitrógeno de 0,57g/L. Se puede observar también que el principal parámetro que provocó una variación en la producción de biomasa fue la concentración de CO₂, la cual a mayores niveles favoreció la productividad.

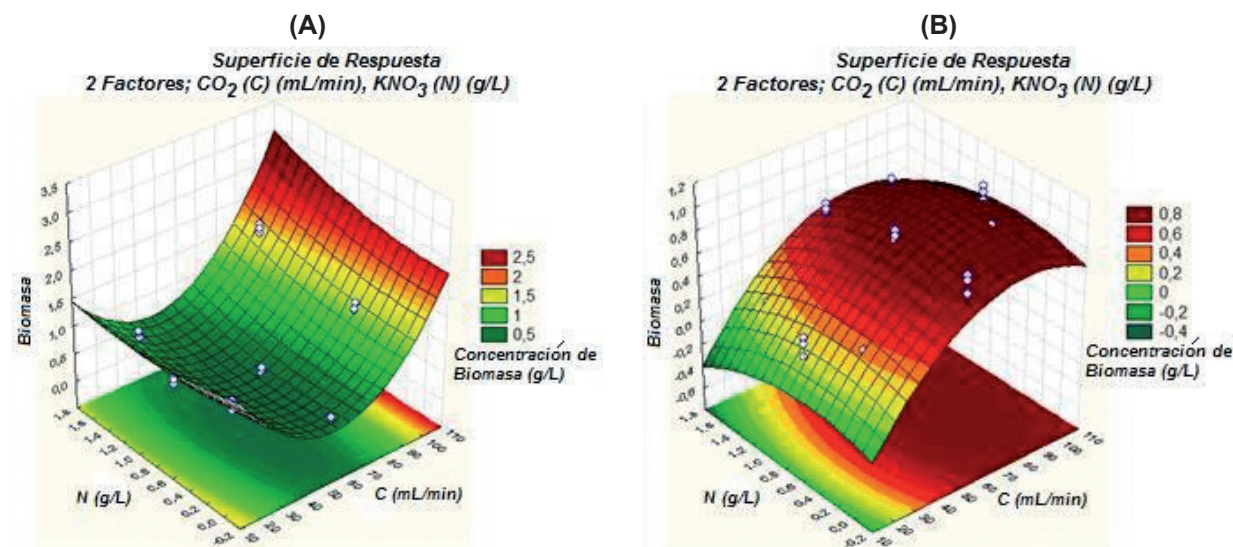


Figura 4. Superficies de Respuesta biomasa. (A) Suministro continuo. (B) Suministro por pulsos.

Lípidos. Para la producción de lípidos con suministro continuo, se observa en la Figura 5-A que todos los parámetros significativos; concentración de CO₂, nitrógeno e interacción entre factores, tuvieron un efecto negativo sobre la producción de lípidos, es decir, a menor valor de los factores mayor producción de lípidos. En la Figura 5-B se observa que al igual que para la biomasa, el efecto

de la concentración de CO₂ presentó el mayor grado de significancia sobre la producción de lípidos, y el modelo también presentó ensilladura. La concentración de nitrógeno influyó aunque en menor grado que para el CO₂. El signo positivo para los efectos del nitrógeno quiere decir que al pasar de niveles bajos a niveles altos de la variable, la producción de lípidos tiende a aumentar.

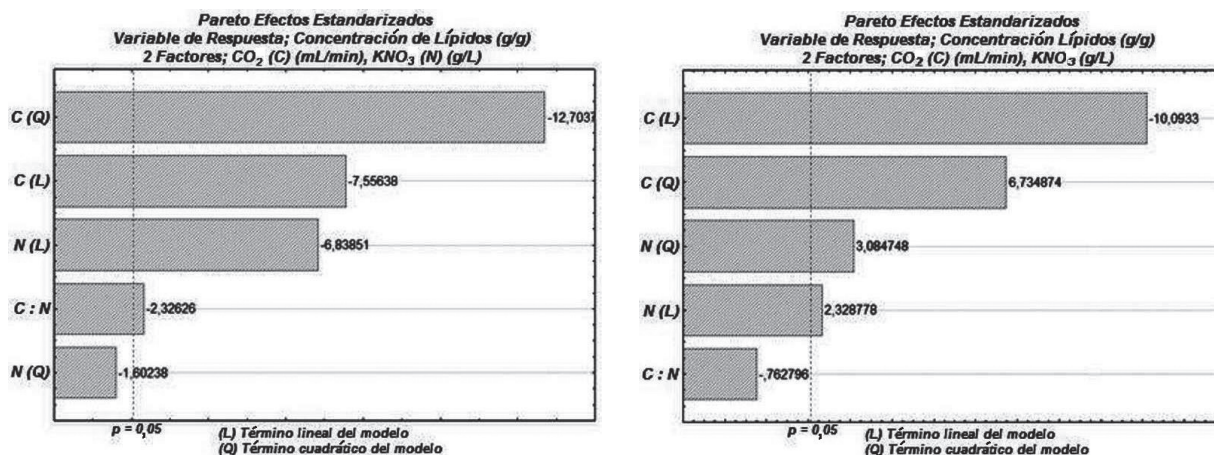


Figura 5. Diagramas de Pareto Lípidos. (A) Suministro CO₂ continuo. (B) Suministro CO₂ por pulsos.

En la Tabla 6 se observa que para el suministro continuo el efecto de la concentración de CO₂ fue negativo, entonces la producción puede disminuir en promedio 0,29g/g al pasar de un nivel bajo a un nivel alto de suministro de CO₂. Asimismo, el efecto de la concentración de nitrógeno fue negativo, entonces la producción de lípidos puede disminuir hasta en 0,17g/g al pasar de un nivel bajo (0,38g/L) a un nivel alto (1,5g/L). Para el suministro por pulsos, en la Tabla 6 se observa que la concentración de CO₂ también

presentó efectos positivos y negativos debido a un efecto ensilladura, teniendo un efecto total negativo, es decir, la producción de lípidos tendió a aumentar conforme disminuyó la concentración de CO₂. La concentración de nitrógeno tuvo un efecto positivo, es decir, a medida que aumentó su nivel, aumentó la producción de lípidos. Es así como al pasar de un nivel bajo (0,38g/L) a un nivel alto (1,5g/L) la producción puede crecer hasta en 0,10g lípidos/g biomasa.

Tabla 6. Efectos estimados lípidos Parámetros de Proceso y Suministro.

Suministro Continuo			Suministro por Pulsos		
Factor	Efecto	Valor-p	Factor	Efecto	Valor-p
Media	0,7112	0,000000	Media	0,2313	0,000000
CO ₂ (L)	-0,1886	0,000000	CO ₂ (L)	-0,2983	0,000000
CO ₂ (Q)	-0,4028	0,000000	CO ₂ (Q)	0,2529	0,000001
KNO ₃ (L)	-0,1737	0,000000	KNO ₃ (L)	0,0700	0,028618
KNO ₃ (Q)	-0,0470	0,122152	KNO ₃ (Q)	0,1073	0,005070
CO ₂ x KNO ₃	-0,0777	0,028774	CO ₂ x KNO ₃	-0,0301	0,453018

La superficie de respuesta para la producción de lípidos con suministro continuo (Figura 6-A) muestra un valor máximo predicho (0,792g lípidos/g biomasa) que se obtiene con un valor crítico de concentración de CO₂ de 58,17mL/min y un valor crítico de concentración de nitrógeno de 0,0g/L. Los cambios en los niveles de CO₂ son los que generan contrastes más notorios en las productividades, notándose que el suministro de concentraciones medias de CO₂ fue ideal para la producción de lípidos. Por otra parte, aunque a menores concentraciones de nitrógeno también se notó un pequeño aumento de la productividad, el efecto es mucho menor comparado

con el CO₂. La Figura 6-B con suministro por pulsos, muestra un valor mínimo predicho de producción de lípidos (0,184g lípidos/g biomasa) que se obtiene con un valor crítico de concentración de CO₂ de 77,2mL/min y un valor crítico de concentración de nitrógeno de 0,80g/L. Se observa entonces que el principal parámetro de variación es la concentración de CO₂, la cual a menores niveles favoreció la producción de lípidos. El efecto de la concentración de nitrógeno, aunque presentó un punto mínimo en un nivel medio y es menos significativo que el CO₂, a medida que aumentó el nivel se favoreció la producción de lípidos.

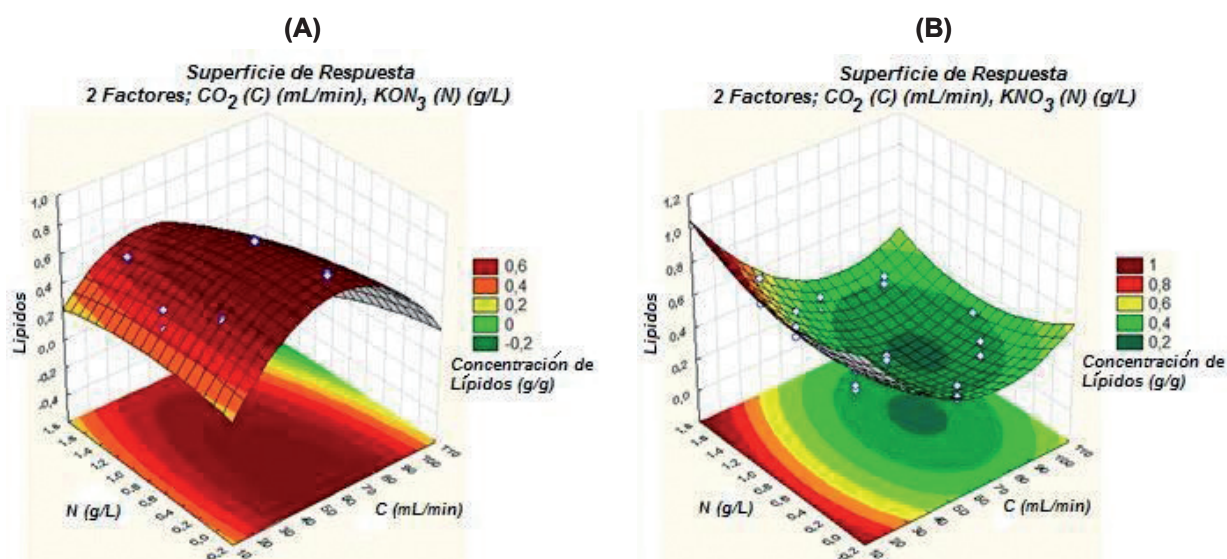


Figura 6. Superficies de Respuesta lípidos. (A) Suministro continuo. (B) Suministro por pulsos.

Hidrocarburos. En el diagrama de Pareto con suministro continuo (Figura 7-A) se observa que el efecto de la interacción entre las variables presentó el mayor grado de significancia, es decir, la presencia de ambos parámetros influyó significativamente sobre la producción de hidrocarburos. El efecto de este factor fue positivo, entonces a mayor nivel de las variables, mayor producción. Además, el efecto de la concentración de CO₂ también fue significativo, convirtiéndolo en un parámetro determinante en la producción de hidrocarburos. Por su parte en la Figura 7-B con suministro por pulsos la concentración de CO₂ presentó el mayor grado de significancia con un modelo que exhibió ensilladura, y la concentración de nitrógeno tuvo un efecto positivo, es decir, al pasar de niveles bajos a niveles altos de la concentración de nitrógeno, la producción de hidrocarburos tendió a aumentar. En la Tabla 7 se observa que el efecto de la

interacción entre variables es positivo sobre la producción de hidrocarburos para suministro continuo, aumentando hasta en 13126,3µg/g al aumentar los niveles en ambos factores, principalmente la concentración de CO₂, la cual tuvo efectos positivos y negativos debido a un efecto ensilladura. Por su parte para el suministro por pulsos se aprecia que la concentración de CO₂ tuvo efectos positivos y negativos sobre la producción de hidrocarburos debido a un efecto ensilladura. Sin embargo, el efecto total de la variable concentración de CO₂ fue positivo, es decir, la producción tiende a aumentar conforme aumenta el valor de la variable. La concentración de nitrógeno tuvo un efecto positivo, es decir, a medida que aumenta su nivel, aumenta la producción de hidrocarburos. Es así como al pasar de un nivel bajo (0,38g/L) a un nivel alto (1,5g/L) la producción puede crecer hasta en 4289,26µg/g.

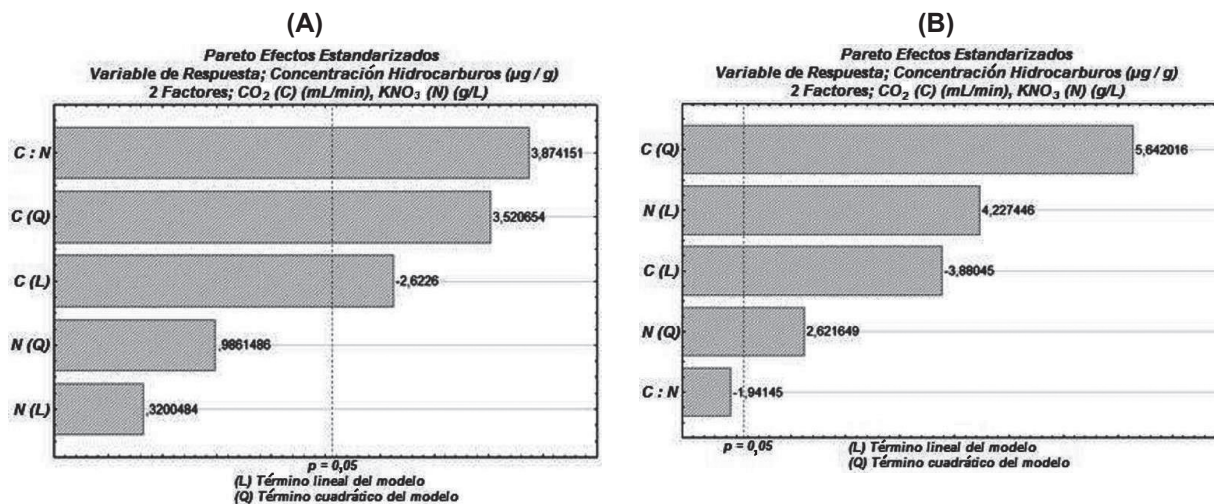


Figura 7. Diagramas de Pareto Hidrocarburos. (A) Suministro CO_2 continuo. (B) Suministro CO_2 por pulsos.

Tabla 7. Efectos estimados hidrocarburos Parámetros de Proceso y Suministro.

Suministro Continuo			Suministro por Pulsos		
Factor	Efecto	Valor-p	Factor	Efecto	Valor-p
Media	18202,1	0,000000	Media	479,07	0,613368
CO_2 (L)	-6635,1	0,014921	CO_2 (L)	-3867,5	0,000712
CO_2 (Q)	11316,9	0,001751	CO_2 (Q)	7144,5	0,000008
KNO_3 (L)	824,42	0,751701	KNO_3 (L)	4289,8	0,000269
KNO_3 (Q)	2937,24	0,333898	KNO_3 (Q)	3076,1	0,014953
$\text{CO}_2 \times \text{KNO}_3$	13126,5	0,000724	$\text{CO}_2 \times \text{KNO}_3$	-2591,3	0,064034

En la Figura 8-A se observa que la producción de hidrocarburos aumentó con el aumento de la concentración de CO_2 , pero también aumentó a medida que disminuye la concentración de CO_2 , esta condición se da por un punto de ensilladura que une los máximos de la función. Es evidente que los máximos valores de producción de hidrocarburos se consiguieron con altas concentraciones de CO_2 y de nitrógeno, o bajas concentraciones de ambos nutrientes, ratificando la importancia de la interacción y el suministro de ambas variables sobre la productividad. En la superficie de respuesta con

suministro por pulsos (Figura 8-B) se evidencia un mínimo predicho de producción de hidrocarburos para valores medios de los parámetros (CO_2 ; 64,6mL/min y nitrógeno; 0,58g/L). Estos resultados muestran que tanto la concentración de CO_2 como la concentración de nitrógeno influyen casi con la misma significancia sobre la respuesta. Respecto al CO_2 , altos y bajos niveles favorecieron a una alta producción de hidrocarburos. Por su parte respecto al nitrógeno, aunque presentó un punto mínimo en un nivel medio, a medida que aumenta el nivel del factor se favorece la producción de hidrocarburos.

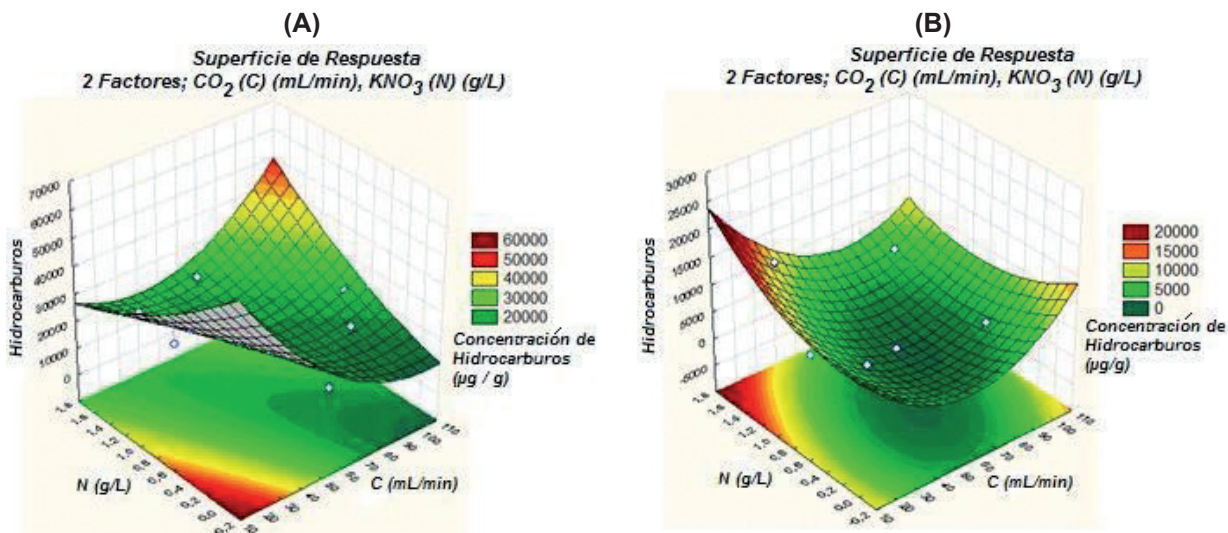


Figura 8. Superficies de Respuesta hidrocarburos. (A) Suministro continuo. (B) Suministro por pulsos.

Resultados de productividad

En las Tablas 8 y 9 se observa la producción de los metabolitos de interés (biomasa, lípidos e hidrocarburos) para los días 5, 10 y 15 de la experimentación.

La biomasa presentó su producción más alta con suministro continuo de CO₂ (Tabla 8) con valores de hasta 1,78g/L. Las corridas 3, 4 y 7 con las concentraciones más altas de CO₂ (90, 90 y 102mL/min, respectivamente) presentaron las más altas productividades para los días 10 y 15. La concentración de nitrógeno no fue relevante sobre altas producciones de biomasa,

ya que los valores más altos se consiguieron tanto con concentraciones altas como bajas del nutriente. Las productividades más altas de lípidos durante los 10 primeros días se lograron con suministro por pulsos de concentraciones altas de CO₂ (> 90mL/min) y concentraciones medias a bajas de nitrógeno (< 0,75g/L) como se ve en las corridas 3 y 7 (Tabla 9). Después del día 10 se observó que el suministro continuo de concentraciones medias de CO₂ (50-60mL/min) y bajas a nulas de nitrógeno, como ocurren en las corridas 5, 8 y 10 (Tabla 8) fueron ideales para altas producciones de lípidos.

Tabla 8. Productividad Parámetros de Proceso.

Corrida	CO ₂	KNO ₃	Biomasa (g/L)			Lípidos (g/g)			Hidrocarburos (µg/g)		
			Día 5	Día 10	Día 15	Día 5	Día 10	Día 15	Día 5	Día 10	Día 15
1	30	0,38	0,20	0,50	0,70	0,11	0,26	0,56	9133,3	3945,6	46531,1
2	30	1,5	0,18	0,65	0,83	0,79	0,77	0,57	9947,0	2671,5	22829,2
3	90	0,38	0,68	0,72	1,43	0,40	0,42	0,45	740,8	389,3	19756,8
4	90	1,5	0,90	0,85	1,78	0,40	0,34	0,30	666,6	291,2	25861,2
5 (C)	60	0,75	0,33	0,90	0,38	0,66	0,27	0,77	1737,1	315,5	14939,3
6	17	0,75	0,19	0,43	0,98	0,48	0,69	0,47	8603,6	2961,7	30271,7
7	102	0,75	0,75	0,83	1,60	0,66	0,44	0,23	781,7	409,6	21994,9
8	60	0	0,28	0,43	0,30	0,52	0,72	0,84	2808,5	551,7	16285,9
9	60	1,54	0,25	0,69	0,20	0,52	0,50	0,51	2367,8	356,9	24964,4
10 (C)	60	0,75	0,38	0,79	0,42	0,70	0,38	0,78	1950,3	500,8	15764,6
Blanco	0	0	0,06	0,12	0,15	0,05	0,14	0,10	360,4	110,5	1090,5

Tabla 9. Productividad Parámetros de Suministro.

Corrida	CO ₂	KNO ₃	Biomasa (g/L)			Lípidos (g/g)			Hidrocarburos (µg/g)		
			Día 5	Día 10	Día 15	Día 5	Día 10	Día 15	Día 5	Día 10	Día 15
1	30	0,38	0,58	0,47	0,21	0,28	0,31	0,45	789,3	4221,8	6387,8
2	30	1,5	0,18	0,42	0,11	0,35	0,51	0,60	2181,9	4167,1	13683,7
3	90	0,38	0,65	0,58	0,80	0,16	0,69	0,26	4499,9	4264,9	3857,4
4	90	1,5	0,60	0,50	0,68	0,23	0,46	0,31	4977,7	5233,4	6606,4
5 (C)	60	0,75	0,67	0,73	0,84	0,17	0,67	0,21	1408,4	2938,7	409,1
6	17	0,75	0,51	0,26	0,25	0,34	0,65	0,73	973,5	6514,2	6479,5
7	102	0,75	0,50	0,58	0,90	0,55	0,76	0,24	7165,1	4407,8	3577,2
8	60	0	0,83	0,67	0,83	0,34	0,67	0,35	1195,1	3009,9	417,7
9	60	1,54	0,80	0,73	0,73	0,13	0,45	0,31	974,4	1492,0	534,6
10 (C)	60	0,75	0,58	0,69	0,79	0,22	0,70	0,26	1450,3	2500,8	415,5
Blanco	0	0	0,06	0,12	0,15	0,05	0,14	0,10	360,4	110,5	1090,5

La producción de hidrocarburos presentó máximos de producción para el día 15 en las corridas 1 y 2 (Tabla 8), para niveles altos y bajos de nitrógeno, siendo máximo el valor suministrando de manera continua. Con suministro continuo hubo un comportamiento similar a través del tiempo; para el día 10 la productividad de todos los ensayos venía en caída. Por el contrario, el suministro por pulsos arrojó aumentos en la productividad hasta el día 10 para las corridas 2, 3 y 6, todas con suministro bajo de CO₂.

Análisis de Resultados

En estudios previos, Eriksen, Poulsen y Iversen [30] inyectaron CO₂ puro a medios de cultivo de microalgas utilizando difusores de membrana y difusores de orificios, y observaron que la proporción del CO₂ agregado que se disuelve en el cultivo aumenta del 11% al 55% al usar membrana en vez de orificios, concluyendo que el pequeño tamaño de la burbuja del difusor de membrana (<1mm) aumenta el coeficiente de transferencia de masa de CO₂. En el presente estudio se respaldan dichos resultados, ya que se encontraron aumentos del 18% al 45,9% en la proporción de CO₂ disuelto al usar una piedra difusora sobre un difusor de burbujeo, lo cual puede atribuirse a la influencia opuesta del tamaño de burbuja en el coeficiente de transferencia de masa K_L y el área interfacial específica A_L [34]. Más aun, se obtuvieron diluciones de CO₂ de hasta 57,5% usando geometrías del fotobiorreactor con

diámetro de 8cm y altura de 45cm. Con base en los resultados obtenidos, se puede afirmar que dentro de los parámetros de diseño referentes a la geometría del reactor, la altura es influyente sin importar el tipo de difusor. Esto se debe a que esta variable aumenta el tiempo de residencia del gas en el medio acuoso, contribuyendo explícitamente a la dilución. Estudios previos [5] han demostrado que el aumento de la altura de la columna de agua por encima de 30cm reduciría la pérdida de CO₂, es más, se hallaron transferencias de CO₂ de hasta el 100% cuando la altura de la columna era mayor a 50cm. Se puede resaltar entonces que se encontraron condiciones óptimas para lograr una alta dilución de CO₂ en el medio de cultivo con tamaños de burbuja pequeños (piedra difusora), alturas de columna de líquido importantes (>30cm) que aumenten el tiempo de residencia del gas y diámetros medios (≤8cm) que aporten a una baja dispersión de las burbujas en el reactor para aumentar la transferencia.

El crecimiento lento de *B. braunii* ha sido el paso limitante para su explotación exitosa como fuente de hidrocarburos [35]. Ranga Rao [27] encontraron que las cepas de *B. braunii* mostraron incrementos en la producción de biomasa usando atmósferas enriquecidas con CO₂ en comparación con el cultivo de control sin CO₂, lo que muestra la eficiencia metabólica a través del crecimiento foto autotrófico. Por su parte, Wolf, Nanomura y Bassham [36] hallaron que cultivos de *B. braunii* alimentados con aire enriquecido con 0,3% de CO₂, tienen un tiempo de duplicación de masa mucho más corto

(40 horas) en comparación con 6 días para los cultivos suministrados con aire del ambiente. En cuanto al efecto del nitrógeno, Ruangsomboon [37] encontró que la biomasa de la cepa KMITL 2 de *B. braunii* no fue significativamente afectada por la concentración de nitrógeno después de 30 días de cultivo. El presente estudio respalda y valida estas observaciones mediante un diseño experimental donde se encontró que el tipo de suministro y la concentración de CO₂ tienen una alta significancia estadística sobre la producción de biomasa de *B. braunii*, mientras la concentración de nitrógeno no presenta influencia importante. Esto se puede deber al elevado contenido de carbono (hasta 50%p) que se tiene registrado de esta especie de microalga [38], convirtiendo al CO₂ en una fuente de carbono esencial para el crecimiento del cultivo. Se encontraron las mejores productividades de biomasa suministrando CO₂ de manera continua al cultivo. Los tratamientos a los cuales se les suministró la concentración más alta de CO₂ de 0,06v/vm (90mLCO₂/min) exhibieron la producción más alta de biomasa de 1,78g/L para el día 15, y productividades de hasta 0,186g/L.día. En estudios previos, Ge, Liu y Tian [28] obtuvieron resultados similares en cultivos de *B. braunii* encontrando producciones máximas de biomasa de 2,31g/L para el día 25 de cultivo y de 1,18g/L para el día 15, usando la concentración máxima de CO₂ estudiada de 0,04v/vm. Por el contrario, Yoshimura, Okada y Honda [39] encontraron las mejores productividades usando concentraciones de hasta 0,015v/vm; a concentraciones superiores las tasas de crecimiento comenzaron a decrecer. Estos resultados permiten afirmar que la concentración óptima de CO₂ para el crecimiento es específica para cada cepa. En el presente estudio, el aumento de la concentración de CO₂ que se suministra al cultivo de la cepa colombiana tiene como resultado un aumento significativo en la producción final de biomasa. Más aun, con el tipo de suministro de CO₂ y las concentraciones máximas planteadas en el presente estudio se encontró un aumento en la producción de biomasa del 33,7% respecto a lo reportado por Ge *et al.* [28] obteniendo más altas producciones en tiempos más cortos. Se puede reportar entonces que las mejores condiciones para lograr una alta producción de biomasa en cultivos de *B. braunii* son altas concentraciones de CO₂ > 0,06v/vm suministrado de manera continua, que pongan a disposición una fuente de carbono suficiente para el crecimiento del cultivo, teniendo en cuenta que

la cepa estudiada presentó buena tolerancia a altas concentraciones de CO₂.

Para la producción de lípidos, se encontró que tanto la concentración de CO₂ como la concentración de nitrógeno suministradas al cultivo tienen un efecto sobre la producción, siendo el CO₂ el factor más significativo estadísticamente. Estudios previos han reportado que aunque una deficiencia de nitrógeno favorece la acumulación de lípidos al limitar la síntesis de proteínas [40,41], se requiere nitrógeno para el crecimiento. Más aun, Ge *et al.* [28] concluyeron que el contenido relativamente bajo de lípidos en sus cultivos de *B. braunii* se puede deber a las altas concentraciones de nitrógeno utilizadas comparado con otros trabajos. En el presente estudio se encontraron las mejores producciones de lípidos usando concentraciones bajas a nulas de KNO₃, con contenidos de hasta el 84%p (0,84g de lípidos / gramos de biomasa) para suministros nulos de nitrógeno, lo cual respalda los comportamientos previos encontrados en otras investigaciones. Se ha reportado que el contenido total de lípidos de *B. braunii* varía en un rango de 26% a 86% del peso seco [42]. Yoo *et al.* [43] compararon la producción de lípidos en 3 especies de microalgas (*Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.*) encontrando que el contenido total de lípidos de *B. braunii* era 2-4 veces mayor que el de las otras dos cepas, alcanzando un contenido máximo de lípidos totales de 25,79%p usando una concentración de CO₂ de 0,03v/vm. Por su parte, Ranga Rao *et al.* [27] expusieron que el contenido total de lípidos de la cepa de *B. braunii* cultivada en diferentes niveles de CO₂ estaba en el intervalo de 28-30%p, mientras que en el control sin suministro de CO₂ fue 22%p. Ge *et al.* [28] reportaron contenidos de lípidos de 10,41, 11,21, 12,44 y 12,71%p con 0,005, 0,01, 0,02 y 0,04v/vm de aireación CO₂, respectivamente.

En el presente estudio se encontraron productividades máximas de lípidos para el día 10 de 0,106g/lípidos/gbiomasa.día, logrando producciones de hasta 76%p, esto usando concentraciones altas de CO₂ (≥0,06v/vm) y suministrándolo de manera discontinua (por pulsos). Para el día 15, la productividad máxima de lípidos fue de 0,098g/g.día y la producción más alta fue de 84%p, esto usando concentraciones medias de CO₂ (0,04v/vm) y suministrándolo de manera continua al cultivo. Estos resultados son bastante prometedores ya que se planteó una metodología de suministro de CO₂ con la cual se

obtuvieron producciones mucho más altas que las registradas en la literatura. Teniendo en cuenta que el biodiésel consiste en gran parte de los ésteres metílicos de ácidos grasos, que son producidos por la transesterificación de los lípidos de origen biológico [44], la cepa estudiada a las condiciones de suministro de CO₂ encontradas se perfila como una fuente prometedora de materia prima para la producción de biodiésel.

En cuanto a la producción de hidrocarburos, se encontró que la concentración de CO₂ y su método de suministro influyen significativamente sobre la productividad. La presencia de nitrógeno también tiene significancia estadística sobre la producción, pero el CO₂ es el factor principal que determina este efecto. Estudios previos avalan estos resultados; Casadevall *et al.* [24] reportaron que una concentración inicial de NO₃⁻ > 0,2mg/L favorece la producción de hidrocarburos. Por su parte, Metzger *et al.* [26] reportaron incrementos en el contenido de hidrocarburos desde el 5% para cultivos sin aire, hasta el 61% para cultivos con suministro de aire mezclado con CO₂ al 1%, dependiendo del origen de la cepa. Moheimani *et al.* [45] estudiaron la recuperación de hidrocarburos en cultivos de *B. braunii* después de una primera extracción, encontrando tiempos de 11 días para cultivos sin suministro de CO₂ y de 4 días para cultivos con suministro de 0,02v/vm. En el presente estudio se encontraron las productividades más altas de hidrocarburos usando las concentraciones más bajas de CO₂. Producciones máximas de 46531,1µg/g (4,6%p) para el día 15 de cultivo se obtuvieron usando la concentración más baja de CO₂ estudiada (0,02v/vm) con un suministro continuo. Para el día 10, se encontraron las máximas productividades (1108,14µg/g.día) usando concentraciones bajas de CO₂ con un suministro discontinuo (pulsos). Estos resultados contrastan con datos obtenidos anteriormente. Por ejemplo Wolf *et al.* [36] reportaron que su cepa de *B. braunii* acumuló entre el 24-29% de la biomasa seca en forma de hidrocarburos botriococenos. Okada, Murakami, y Yamaguchi [46] por su parte estimaron para su cepa de *B. braunii* producciones de hidrocarburos en el rango de 10-38% del peso de la biomasa seca. Además, diversos estudios [22,27,28] informaron que el contenido de hidrocarburos de *B. braunii* aumentó con el aumento de la concentración de CO₂. Estas diferencias en el contenido y perfil de hidrocarburos entre lo encontrado en el presente

estudio y lo reportado en la literatura, podrían atribuirse a las diferencias entre las razas de las cepas estudiadas, ya que dependiendo de las características biológicas de la especie producen hidrocarburos por diferentes vías metabólicas [27], concluyendo así que aunque la especie *B. braunii* se caracteriza por metabolizar hidrocarburos naturales, la cepa estudiada no posee una buena capacidad de síntesis de hidrocarburos.

Con base en los análisis anteriores se valida la importancia y aporte del estudio realizado, ya que se plantearon metodologías de suministro de CO₂ a cultivos de *B. braunii* con las que se obtuvieron producciones de biomasa similares a lo reportado en la literatura, pero en tiempos más cortos de suministro y cultivo, además se evidenciaron producciones de lípidos hasta 3 veces mayores a lo reportado en estudios previos, lo cual, además de resaltar la validez y eficiencia de los métodos planteados, resalta el potencial de la cepa colombiana de *B. braunii* estudiada como potencial fuente de lípidos para la producción de biodiésel.

Conclusiones

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

Quedó demostrado que el aumento en la concentración de CO₂ tiene un efecto positivo sobre la producción de biomasa en el cultivo de *B. braunii*, registrando las mayores productividades con las mayores concentraciones suministradas. Se encontró además que la producción de lípidos en cultivos de *B. braunii* aumenta hasta 7 veces respecto a los ensayos sin suministro, usando concentraciones de CO₂ entre 0,04 – 0,06v/vm y bajas o nulas de nitrógeno, combinando además regímenes de suministro continuo y por pulsos. Esto demuestra la importancia que tiene la fuente de carbono (CO₂) en la síntesis de lípidos para la cepa estudiada. También se evidenció que la producción de hidrocarburos en cultivos de *B. braunii* se ve favorecida con concentraciones de CO₂ de 0,02v/vm, aunque las productividades finales fueron muy bajas comparadas con estudios previos. Quedó comprobado que la variación en el método de suministro (Pulsos y Continuo) afecta directamente la magnitud y el efecto que tiene el CO₂ sobre la producción de biomasa, lípidos e hidrocarburos en cultivos de *B. braunii*. Así

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

Referencias bibliográficas

- [1] Garcia Alba L, Torri C, Samori C, Brilman DW. Hydrothermal Treatment (HTT) of Microalgae: Evaluation of the Process As Conversion Method in an Algae Biorefinery Concept. *Energ. Fuels*. 2012;26(1):642-57.
- [2] Energy Information Administration. Annual Energy Review. United States: Department of Energy; 2008.
- [3] Wang B, Li Y, Wu N, Lan CQ. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2008;79(5):707-18.
- [4] Li Y, Wang B, Wu N, Lan C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2008;8:629-36.
- [5] Csogör Z, Herrenbauer M, Schmidt K, Posten C. Light distribution in a novel photobioreactor – modeling for optimization. *J. Appl. Phycol*. 2001;13:325-33.
- [6] Lee C. Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors. *Biotechnol. Bioprocess Eng*. 1999;4(1):78-81.
- [7] Kondili E, Kaldellis J. Biofuel implementation in East Europe: current status and future prospects. *Renew. Sust. Energ*. 2007;11:2137-51.
- [8] De Morais MG, Vieira Costa J. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three stage serial tubular photobioreactor. *J. Biotechnol*. 2007;129:439-45.
- [9] Costa R, Medri W, Perdomo C. High-rate pond for treatment of piggery wastes. *Water Sci. Technol*. 2000;42(10):357-62.
- [10] 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. *Energ. Convers. Manage*. 2009;50(2):262-7.
- [11] Falkowski PG, Raven JA. Aquatic photosynthesis. London: Princeton University Press; 1997.
- [12] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv*. 2007;25(3):294-306.
- [13] Beneman J, Hughes E. Biological fossil CO₂ mitigation. *Energ. Convers. Manage*. 1997;38(19):467-73.
- [14] Tapie P, Bernard A. Microalgae production technical and economic evaluations. *Biotechnol Bioeng*. 1988;32(7):873-85.
- [15] Abalde A, Cid A, Fidalgo P, Torres E, Herrero C. Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Universidad Da Coruña; 1995. Monografía No.26, p. 210.
- [16] Mallick N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals*. 2002;15(4):377-90.
- [17] Cheng L, Zhang L, Chen H. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Sep. Purif. Technol*. 2006;50(3):324-9.
- [18] Richmond A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. United States: Blackwell Science Ltd; 2004.
- [19] Li Y, Horsman M, Wu N, Lan C, Dubois-Calero N. Biofuels from microalgae. *Biotechnol. Progr*. 2008;24(4):815-20.
- [20] Raja R, Hemaiswarya S, Kumar N, Sridhar S, Rengasamy R. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit. Rev. Microbiol*. 2008;34(2):77-88.
- [21] Weiss TL, 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*. 2010;23(5):833-9.
- [22] Banerjee A, Sharma R, Chisti Y, Banerjee U. *Botryococcus braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol*. 2002;22(3):245-79.
- [23] Wake L, Hillen L. Study of a 'bloom' of the oil-rich alga *Botryococcus braunii* in the Darwin River Reservoir. *Biotechnol. Bioeng*. 1980;22(8):1637-56.
- [24] 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(3):286-95.
- [25] Largeau C, Casadevall E, Berkaloff C, Dhamliencourt P. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochem*. 1980;19:1043-51.
- [26] Metzger P, Largeau C. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2005;66:486-96.
- [27] Ranga Rao A, Sarada R, Ravishankar G.

- Influence of CO₂ on Growth and Hydrocarbon Production in *Botryococcus braunii*. J. Microbiol. Biotechnol. 2007;17(3):414-9.
- [28]Ge Y, Liu J, Tian G. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* under high CO₂ concentration in photobioreactor. Bioresource Technol. 2011;102(1):130-4.
- [29]Ono E, Cuello J. Design parameters of solar concentrating systems for CO₂ mitigating algal photobioreactors. Energ. Conver. Manage. 2004;29:1651-7.
- [30]Eriksen N, Poulsen B, Lonsmann J. Dual sparging laboratory-scale photobioreactor for continuous production of microalgae. J. Appl. Phycol. 1998;10(4):377-82.
- [31]Khan S, Hussain M, Prasad S, Banerjee U. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. Renew. Sust. Energ. Rev. 2009;13(9):2361-72.
- [32]Eroglu E, Melis A. Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae *Botryococcus braunii* var. Showa. Bioresource Technol. 2010;101:2359-66.
- [33]Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochem. and Physiol. 1959;37(8):911-7.
- [34]Contreras A, García F, Molina E, Merchuk J.C. Interaction Between CO₂-Mass Transfer, Light Availability, and Hydrodynamic Stress in the Growth of *Phaeodactylum tricornutum* in a Concentric Tube Airlift Photobioreactor. Biotechnol. Bioeng. 1998;60(3):317-25.
- [35]Iwamoto H. Production of hydrocarbons by microalgae. Bio. Sci. Ind. 1986;44;1160-7.
- [36]Wolf F, Nanomura A, Bassham J. Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii*. J. Phycol. 1985;21(3):388-96.
- [37]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. Bioresour. Technol. 2012;109:261-5.
- [38]Mazzuca T, Garcia F, Camacho F, Acien F, Molina E. Carbon Dioxide Uptake Efficiency by Outdoor Microalgal Cultures in Tubular Airlift Photobioreactors. Biotechnol. Bioeng. 2000;67(4):465-75.
- [39]Yoshimura T, Okada S, Honda M. Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: Optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. Bioresour. Technol. 2013;9:133:232-9.
- [40]Ben-Amotz A, Torbene T. G, Thomas W. H. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. J. Phycol. 1985;21(1):72-81.
- [41]Converti A, Casazza A.A, Ortiz E.Y, Perego P, Del Borghi M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chem. Eng. Process. 2009;48:1146-51.
- [42]Dayananda C, Sarada R, Usha Rani M, Shamala T.R, Ravishankar G.A. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharide in various media. Biomass Bioenerg. 2007;31(1):87-93.
- [43]Yoo C, Jun S, Lee J, Ahh C, Oh H. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. Bioresource Technol. 2010;101(1):71-4.
- [44]Wackett L.P. Biomass to fuels via microbial transformations. Curr. Opin. Chem. Biol. 2008;12(2):187-93.
- [45]Moheimani NR, Matsuura H, Watanabe MM, Borowitzka MA. Non-destructive hydrocarbon extraction from *Botryococcus braunii* BOT-22 (race B). J. Appl. Phycol. 2014;26:1453-63.
- [46]Okada S, Murakami M, Yamaguchi K. Hydrocarbon composition of newly isolated strains of green microalga *Botryococcus braunii*. J. Appl. Phycol. 1995;7(6):555-9.