



**ANÁLISIS MODELACIÓN Y MEJORAMIENTO
DEL PROCESO PRODUCTIVO DE LA
MICROALGA *Botryococcus braunii* CON FINES
ENERGETICOS**

Andrés Alonso Arbeláez Pérez

Facultad de Ingeniería
Grupo de Biotecnología

Universidad de Antioquia

Medellín

2018

**ANÁLISIS MODELACIÓN Y MEJORAMIENTO
DEL PROCESO PRODUCTIVO DE LA
MICROALGA *Botryococcus braunii* CON FINES
ENERGETICOS**

Ing. Alimentos. Andrés Alonso Arbeláez Pérez

Trabajo de investigación para optar al título de
Magister en Ingeniería

Asesor

Lucía Atehortua Garcés

Facultad de Ingeniería
Grupo de Biotecnología

Universidad de Antioquia

Medellín

2018

Dedicatoria

Este trabajo de investigación está dedicado a mi esposa con todo mi cariño y amor, por todo su apoyo, su ayuda y por estar siempre a mi lado.

A mis padres y mi hermano, de quienes siempre recibí palabras de aliento y ánimo, les dedico la meta alcanzada, como un triunfo más logrado en nuestras vidas

Agradecimientos

El desarrollo de este trabajo no podría haber sido realizado, sin el financiamiento económico recibido por la Agencia Nacional de Hidrocarburos (ANH), a través de una convocatoria emitida por Colciencias. Se agradece al Grupo de Biotecnología de la Universidad de Antioquia por la oportunidad de brindar sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto, el cual culmina con una etapa muy importante para mi formación científica, personal y académica.

Además de esto, son muchas las personas que merecen mi agradecimiento por su ayuda directa en la ejecución de este trabajo, en donde quiero agradecer a los profesores Nathalia Gomez Grimaldos y Oscar Vega Castro por el tiempo dedicado, el profesor Juan Fernando Bayer por compartir su gran conocimiento y asesorarme en campos desconocidos para mí, y especialmente agradecerle a la Dra. Lucía Atehortua por el apoyo académico, emocional y persona recibido para realizar este trabajo en el laboratorio, por su direccionamiento científico, por ofrecerme generosamente su visión sobre el mundo y sobre todo la paciencia que debió tener conmigo.

A los compañeros Nestor Giraldo y Danilo Echeverri, porque sin su ayuda no se hubieran logrado resultados tan satisfactorios en el área, además de compartir conocimiento, experiencia y amistad.

Y a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta aportaron a la realización de este trabajo.

CONTENIDO

CAPITULO 1	7
INTRODUCCION	7
1.1 RESUMEN.....	7
1.2 ENFOQUE	7
1.3 ALGA.....	11
1.4 SISTEMAS DE CULTIVO	12
1.4.1 Sistemas Abiertos	12
1.4.2 Sistemas Cerrados.....	13
1.5 <i>Botryococcus braunii</i>	14
1.5.1 Medios de Cultivo para <i>Botryococcus braunii</i>	15
1.5.2 Factores Determinantes de Crecimiento.....	16
1.6 BIOCOMBUSTIBLES DE MICROALGAS.....	18
1.6.1 Biomasa	19
1.7 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	27
1.7.1 Objetivo General.....	27
1.7.2 Objetivos Específicos	27
1.8 MÉTODOS ANALÍTICOS	27
1.8.1 Cepa.....	27
1.8.2 Cuantificación de Biomasa	27
1.8.3 Determinación de Nitrato (NO ₃)	28
1.8.4 Determinación de Fosfato (PO ₄)	28
1.8.5 Viabilidad Celular.....	29
1.9 REFERENCIAS	29
CAPITULO 2.....	47
PARAMETRIZACIÓN DE UN MODELO DE DISTRIBUCIÓN LUMÍNICA EN BIORREACTOR DE 10L, PARA OBTENER EL MÁXIMO RENDIMIENTO FOTOSINTÉTICO	47
2.1 RESUMEN.....	47
2.2 INTRODUCCIÓN.....	48
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
2.3.1 Cepa.....	50
2.3.2 Fuente de Luz	51

2.3.3	Coeficiente de Extinción Másico	52
2.3.4	Fotosíntesis vs Irradiancia.....	53
2.3.5	Distribución Lumínica	54
2.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
2.4.1	Fuente de Luz	55
2.4.2	Fotosíntesis.....	58
2.4.3	Propiedades Ópticas.....	61
2.4.4	Distribución lumínica en biorreactor de 10L.....	65
2.5	CONCLUSIONES.....	68
2.6	REFERENCIAS	69
CAPITULO 3.....		74
PRODUCCIÓN EN LOTE Y EN CONTINUO DE <i>Botryococcus braunii</i> A ESCALA DE BIORREACTOR DE 10L.....		74
3.1	RESUMEN.....	74
3.2	INTRODUCCIÓN.....	75
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS	77
3.3.1	Parámetros Iniciales	77
3.3.2	Cinéticas Experimentales.....	78
3.3.3	Modelo	80
3.3.4	Cultivo en Reactor	83
3.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
3.4.1	Determinación del Inoculo.....	86
3.4.2	Consumo de Nutrientes.....	88
3.4.3	Obtención de Rendimientos Teóricos	90
3.4.4	Modelo y Ajuste	92
3.4.5	Cultivo en Reactor	100
3.5	CONCLUSIONES.....	106
3.6	REFERENCIAS	107
CAPITULO 4.....		111
POTENCIAL ENERGETICO DE LA MICROALGA <i>Botryococcus braunii</i>		111
4.1	RESUMEN.....	111
4.2	INTRODUCCIÓN.....	112

4.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	114
4.3.1	Caracterización Físicoquímica de la Biomasa.....	114
4.3.2	Análisis Termogravimétrico	116
4.3.3	Simulación del Proceso de Gasificación	118
4.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119
4.4.1	Biomasa Bruta	119
4.4.2	Poder Calorífico.....	121
4.4.3	Pirólisis de biomasa microalgal	123
4.4.4	Proceso de Gasificación con Aire	127
4.5	CONCLUSIONES.....	131
4.6	REFERENCIAS	132

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 RESUMEN

La finalidad de este trabajo de tesis, fue establecer un sistema de producción de biomasa de la microalga *Botryococcus braunii* en un biorreactor con un volumen de trabajo de 10L, que acople un uso eficiente de energía lumínica y macronutrientes en el medio, para proporcionar un estimado de la productividad energética generada por la microalga a escala de laboratorio. A lo largo de este trabajo, se muestran cultivos en lote y en continuo, modelos y simulación de crecimiento, consumo, y distribución lumínica, análisis termogravimétricos y simulación de procesos termoquímicos. Aunque, las técnicas utilizadas pueden ser utilizadas en cualquier microalga verde, el objetivo principal fue evaluar específicamente el potencial que posee la microalga *Botryococcus braunii* como fuente de energía renovable. Para esto, se evalúa los flujos máxicos de salida en un sistema de producción adecuado y se relaciona con el potencial energético de la microalga como una fuente alternativa de biocombustible, comparándola con combustibles convencionales de energía renovable y fuentes fósiles.

1.2 ENFOQUE

Actualmente existe una preocupación general frente al uso de los recursos naturales, las actividades industriales y su efecto sobre el medio ambiente, por lo cual se han establecido regulaciones y normas internacionales tal como lo es el tratado de Kioto (Naciones Unidas, 1998), las cuales buscan racionalizar y minimizar el efecto de la actividad humana sobre el medio ambiente. A sí mismo, la academia busca contribuir a la salud del planeta, generando soluciones tecnológicas que permitan desplazar desarrollos anteriores, minimizando el impacto de las tecnologías menos eficientes en cuanto al uso de los recursos naturales.

Algunas de las políticas propuestas son: reducir la emisión de gases contaminantes, la producción de combustibles a partir de fuentes renovables, el manejo sostenible de los bosques, establecer estrategias de protección de los suelos y áreas costeras por medio del control de los niveles de concentración de contaminantes, la reducción de la pesca excesiva y la promoción del desarrollo sostenible. Finalmente se considera prioritario el cuidado de la Biodiversidad (Naciones Unidas, 1998).

Para resolver los retos descritos, la comunidad científica ha planteado como soluciones la instalación de unidades de filtración de contaminantes, la búsqueda de mejores materias primas, la optimización de procesos para productos de consumo diario y la implementación de alternativas a la producción de derivados del petróleo como biocombustibles y biopolímeros (Ali *et al.*, 2015; Alvarez, 2009; Demirbas, 2009; Nigam & Singh, 2011).

La búsqueda para la producción sostenible de combustibles alternativos, se remonta a la primera crisis petrolera ocurrida en 1973 (Alvarez, 2009), en la que países como Estados Unidos optaron por la mezcla de gasolina y etanol, con miras a prolongar el tiempo de las existencias de los combustibles fósiles, dando lugar al término biocombustibles de primera generación. El etanol producido desde entonces para estos fines, utilizaba como materia prima los granos de maíz para la fermentación (Nigam & Singh, 2011). La técnica más empleada para el año 2008, la molienda seca, producía el 80% del etanol utilizado en los Estados Unidos. La aceptación exitosa de este proceso, es debida a que el procesado del maíz, utiliza tecnología convencional relativamente de bajo costo (Alvarez, 2009)

Los biocombustibles de primera generación, emplean como materia prima la biomasa de diferentes materias primas de origen agroindustrial, las cuales son de interés, debido a su contenido de almidón, azúcar y aceites, tales como la caña de azúcar, la remolacha o betabel, la semilla del girasol, la soya, la palma, el ricino, la semilla de algodón, el coco, el maní o cacahuate, entre otros, para los cuales las técnicas de fermentación, transesterificación y digestión anaerobia son aplicadas con el fin de obtener el biodiesel, bioetanol o biogás (Demirbas, 2009). En la actualidad, se producen cerca de 50 billones de litros de biocombustibles de primera generación anualmente (Naik *et al.*, 2010), sin embargo este tipo de biocombustibles presentan una gran desventaja, relacionada con la desviación de recursos alimenticios hacia la producción de energía, desventaja que se acrecentó con el aumento de la población y por tanto la demanda de alimentos, lo cual pone en alto riesgo la seguridad alimentaria de las poblaciones más vulnerables.(Naik *et al.*, 2010).

En respuesta a la problemática relacionada con la producción de biocombustibles de primera generación, surgen los de segunda generación en los que el material lignocelulósico disponible en gran cantidad como residuos agroindustriales, es usado como materia prima para su producción. Tal es el caso del bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallo, hojas y olote), la paja de trigo, el aserrín, las hojas y ramas secas de árboles (Naik *et al.*, 2010) entre otros, de los cuales se

obtiene una ventaja aparente con respecto a los biocombustibles de primera generación, sin embargo la producción rentable no ha sido alcanzada, ya que la tecnología aún es joven y requiere de un desarrollo que permita disminuir los costos y aumentar la rentabilidad (Damartzis & Zabaniotou, 2011)

Es así como los biocombustibles de tercera generación a partir de micro algas, surgen como una alternativa económicamente sustentable, sus principales ventajas se relacionan con la reducción de las emisiones de CO₂, el cual es fijado y usado como fuente de carbono en el cultivo además de la liberación de O₂ (oxígeno) al ambiente; así el CO₂ que se captura se estaría destinado a la producción de diferentes productos de interés comercial (Wang *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2012; Taher *et al.*, 2015).

Las algas pueden cultivarse en áreas donde no hay tierras fértiles, ni agua potable (Chisti, 2007), así que no compite con terrenos destinados a producción agrícola (Chisti, 2010), haciendo útiles desiertos y planicies (Demirbas, 2010). Es interesante destacar, que bajo condiciones de laboratorio se han logrado obtener cultivos con contenidos de hasta 57% de lípidos adecuados para una transformación posterior en biocombustibles. En especies como, *Chlorella protothecoides* (Xiong *et al.*, 2008) estos porcentajes resultan ser superiores en comparación a los obtenidos con plantas como la palma de cera, dichas ventajas están relacionadas con la alta eficiencia fotosintética que las micro-algas poseen y que a su vez permiten postular a estos microorganismos como ayuda en la mitigación del calentamiento global ocasionado por el CO₂ y en el tratamiento de aguas residuales (Nigam & Singh, 2011).

La biomasa en general es una promisoriosa fuente de material y energía que puede ser convertida en combustibles sólidos, líquidos o gaseosos (Alipour *et al.*, 2014; Saidina *et al.*, 2012; Uemura *et al.*, 2015). Diversos informes, documentan el potencial de la biomasa microalgal para generar biocombustibles (Novakovic *et al.*, 2005; Morais and Costa, 2007; Ratledge and Cohen, 2008). Entre los diversos tipos que se pueden obtener se encuentra el biodiesel derivado de los aceites (Sawayama *et al.*, 1995; Banerjee *et al.*, 2002; Morais and Costa, 2007; Nazari, 2015), el gas metano producido por digestión anaerobia de la biomasa (Spolaore *et al.*, 2006), bioetanol a partir de la fermentación enzimática de la celulosa (Demirbas, 2009) y procesos termoquímicos que conlleven a la generación de combustibles líquidos, sólidos y gaseosos (Onwudili *et al.*, 2013; Duman *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017)

La conversión termoquímica de la biomasa es un camino prometedor para la transformación de biomasa en diferentes formas de energía útil (Lopez-Gonzales *et al.*, 2013). Estos procesos principalmente incluyen la combustión directa para generar calor y electricidad, dentro de los que se encuentran la pirolisis y gasificación, los cuales son usados para producir combustibles líquidos y gaseosos, que son adecuados para alimentar eficientemente motores y turbinas (Blasi, 2009). La pirolisis juega un rol importante en los procesos de conversión termoquímica, siendo el inicio químico de los procesos de gasificación y combustión, dividiéndose en dos escenarios consecutivos que involucran la descomposición térmica de la biomasa, mediante la evaporación de los compuestos más volátiles y una lenta conversión heterogénea a carbón (Blasi, 2009).

Entre las principales tecnologías termoquímicas, la gasificación es considerado el proceso más prometedor con la mejor relación entre el costo y la eficiencia para la conversión de biomasa en bioenergía, incluyendo la biomasa lignocelulósica (Lasa *et al.*, 2011). La gasificación es una tecnología que mediante una conversión termoquímica convierte material sólido de base carbonosa en gas de síntesis, el cual está compuesto por hidrógeno, monóxido de carbono, dióxido de carbono y metano (Balat, *et al.*, 2009; Tiong *et al.*, 2016).

La gasificación tiene al menos 100 años a partir de su primer uso. En 1920 los vehículos en Suecia eran propulsados con gasificadores de madera, para ampliar el uso de la madera, y contrarrestar la escasez de las fuentes de petróleo, y durante la segunda guerra mundial, numerosos estudios fueron enfocados en la optimización del diseño de los gasificadores de madera para el mejoramiento en sus prestaciones (Khan *et al.*, 2008)

Existe un potencial atractivo en la utilización de microalgas para la generación de biocombustibles renovables, dentro de estos beneficios se encuentra la destacable capacidad de fijar grandes cantidades de CO₂ (para la síntesis de 1Kg de biomasa se requieren 1,8Kg de CO₂) (Mata *et al.*, 2010; Rawat *et al.*, 2013), la habilidad para crecer en diversos ambientes (agua dulce/salada, sobre tierra) (Pingle & Landge, 2013) y las altas tasas de crecimiento que posee (Brown *et al.*, 2010; Raheem *et al.*, 2015). En el proceso de gasificación, la biomasa algal normalmente es calentada en cantidades deficientes de O₂, aire o una mezcla de ambas, en donde el producto del proceso es una combustión incompleta de la biomasa generando gas de síntesis, el cual puede mejorar su rendimiento dependiendo de las condiciones de combustión (Sikarwar *et al.*, 2017). Un significativo número de investigaciones sobre el uso de microalgas unicelulares y pluricelulares para la

generación de bioenergía esta reportado en la literatura, contemplando procesos como licuefacción (Minowa *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2010), pirolisis (Miao *et al.*, 2004; Shuping *et al.*, 2010; Babich *et al.*, 2011) y gasificación (Stucki *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2010; Chakinala *et al.*, 2010).

1.3 ALGA

Las algas son reconocidas como una de las formas de vida más antiguas (Falkowski, 1997), se componen de una gran variedad de organismos eucariotas y procariotas principalmente fotosintéticos, de diferentes complejidades, color y forma (Borowitzka & Moheimani, 2013). Son catalogadas como plantas primitivas (Thallophytes) al no poseer organelas especializadas (raíz, tallo, etc.), pero incluyen otras características como la presencia de clorofila *a*, fijación de carbono a través de la fotosíntesis y ambientes acuáticos o húmedos para su crecimiento (Borowitzka & Moheimani, 2013; Lee, 1980). La estructura que poseen las algas es especializada para la conversión de energía sin ningún desarrollo más allá de la célula, y este desarrollo simple le permite adaptarse a condiciones ambientales adversas y prosperar a lo largo del tiempo (Falkowski, 1997)

Las células procariotas denominadas cianobacterias, carecen de organelas como plastidios, mitocondria, núcleo, aparato de Golgi y flagelo, y son más afines a las bacterias que a las algas. Las células eucariotas las cuales comprenden diferentes tipos de alga, contienen estas organelas que le permiten sobrevivir y reproducirse, y son categorizadas dependiendo de una variedad de caracteres principalmente definidas por su pigmentación, ciclo de vida y estructura celular básica (Khan *et al.*, 2009).

Las clases más importantes son: algas verdes (*Chlorophyta*), algas rojas (*Rhodophyta*) y diatomeas (*Bacillariophyta*). Las algas pueden ser autotróficas o heterotróficas, en donde las primeras requieren solo compuestos inorgánicos como CO₂, sales y energía lumínica para su crecimiento; mientras que la segunda clasificación al no ser fotosintética, requiere de fuentes externas de compuestos orgánicos y nutrientes como fuente de energía. Algunas algas fotosintéticas, poseen la cualidad de ser mixotróficas, por lo que poseen la habilidad de obtener energía a través de la fotosíntesis y compuestos orgánicos externos (Lee, 1980). En las algas autótrofas, el mecanismo de la fotosíntesis es el componente clave para su supervivencia, crecimiento y reproducción, a través de la cual el CO₂ absorbido del ambiente se transforma en azúcares, por la energía captada por los cloroplastos de la radiación solar, produciendo oxígeno y adenosín trifosfato (ATP),

molécula la cual almacena la energía utilizable a nivel celular, para luego ser aprovechada en la respiración para producir la energía necesaria para el crecimiento (Falkowski, 1997).

1.4 SISTEMAS DE CULTIVO

En la producción de biocombustibles, es necesario disponer de sistemas de cultivo a gran escala (Chen *et al.*, 2011). Los principales sistemas de cultivo algal son los estanques abiertos y fotobiorreactores cerrados, en los cuales se entrará en detalle a continuación

1.4.1 Sistemas Abiertos

Existen diversos tipos de sistemas abiertos de cultivo para la producción de microalgas, los cuales pueden ser naturales o artificiales. Algas en sistemas abiertos ha sido usada desde los años 50 (Borowitzka, 1999). Estos sistemas pueden categorizarse en sistemas naturales (lagos, estanques y lagunas) y artificiales como los raceway (Jiménez *et al.*, 2003) (Fig. 1.1). Los raceway son generalmente fabricados en como un sistema de recirculación oval, que requiere poca energía para su movimiento y que puede ser no mezclado. Estos sistemas abiertos son utilizados para la producción comercial debido a la alta capacidad instalada que poseen a un bajo costo de operación. La cultivación de 50cm de profundidad, su mantenimiento y construcción económicos hacen que sea un sistema con una factibilidad mayor a la de los sistemas cerrados (Jiménez *et al.*, 2003).

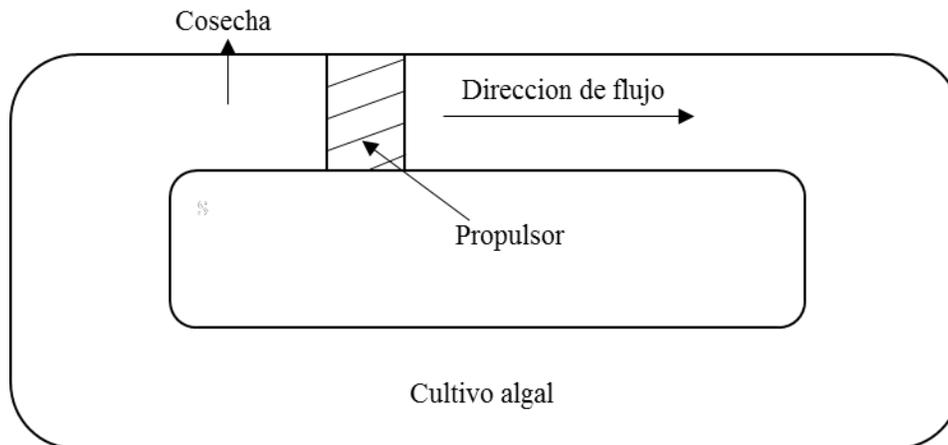


Figura 1.1. Sistema de cultivo tipo Raceway

Los raceway, han mostrado ser un sistema útil para el cultivo de ciertas especies de algas como *Chlorella*, *Spirulina*, *Tetraselmis*, *Prophyridium*, *Chaetoceros*, *Scenedesmus*, *Pleurochrysis* y *Dunaliella*, entre otras, donde su crecimiento ha resultado ser efectivo en este tipo de sistema abierto (Borowitzka & Moheimani, 2013).

En contraste, las desventajas que poseen los sistemas abiertos es la alta posibilidad a una contaminación, principalmente por otras microalgas, hongos, bacteria y protozoos (Sharma *et al.*, 2007). Dada la problemática anterior, es difícil mantener cultivos de manera confiable a través del tiempo. Debido a esto, las especies de microalgas usadas para este tipo de sistema, son aquellas capaces de crecer en condiciones extremas, como por ejemplo *D. salina* la cual crece a concentraciones altas de sal (Lee, 1986), lo que dificulta a especies contaminantes invadir el cultivo y crecer. Otras especies que aplican este mismo principio son *Spirulina* (alta alcalinidad) y *Chlorella* (alta concentración de nutrientes) (Borowitzka & Moheimani, 2013)

1.4.2 Sistemas Cerrados

La producción de microalgas basado en sistemas cerrados evitan los problemas asociados en la descripción de sistemas abiertos. Por ejemplo, en la producción de productos de alto valor agregado para la industria farmacéutica y cosmética a partir de microalgas, los sistemas abiertos no tienen la capacidad de controlar factores simples como la contaminación afectando los productos, que por su delicadeza requieren procesos inocuos que garanticen la pureza del metabolito producido (Ugwu *et al.*, 2008). En este sentido sistemas cerrados como los fotobiorreactores, permiten el monocultivo de especies específicas de microalgas por tiempo prolongados con un bajo riesgo de contaminación (Chisti, 2007). Los sistemas cerrados incluyen diversos diseños, encontrando sistemas tubulares, planos, en columna, entre otros, siendo los más apropiados para cepas sensibles, debido a que permite mantener la asepsia del cultivo evitando la contaminación, al mismo tiempo que el monitoreo constante de las condiciones del cultivo, permite generar altas productividades de biomasa. Sin embargo, el costo de los sistemas cerrados es sustancialmente superior al de los sistemas abiertos, estando todavía alejados del punto de equilibrio que permita la producción a gran escala de estos sistemas (Carvalho & Meireles, 2006).

1.4.2.1 Fotobiorreactor tubular

Este tipo de sistema, ha sido diseñado para atacar la limitación existente sobre la longitud de los tubos, recayendo la dependencia del diseño sobre la acumulación del O₂, el agotamiento del CO₂ y la variación del pH en el cultivo (Eriksen, 2008). Por este motivo, el escalado no es indefinido y las plantas de producción son basadas en la integración de múltiples unidades de reactores, que son usualmente tubos de plástico o vidrio acoplados a una bomba o sistemas airlift para mantener una circulación constante del cultivo (Tredici & Zlttelli, 1998). En este sentido, los sistemas tubulares

son considerados una forma útil de producción de biomasa en exteriores ya que pueden exponer un área considerable a ser expuesta a la luz solar.

1.4.2.2 Fotobiorreactor Plano

Este sistema ha recibido la atención de múltiples investigaciones debido a la gran área que puede ser expuesta a la iluminación (Ugwu *et al.*, 2008) y a la alta densidad celular que puede lograr en sistemas fotoautótrofos ($>80 \text{ gL}^{-1}$) (Hu *et al.*, 1998). Los reactores, son diseñados con materiales transparentes para permitir la captura de un máximo de energía solar por las células, que fluyen a altas concentraciones a través de la placa plana (Hu *et al.*, 1998; Richmond *et al.*, 2003). Los reactores planos son útiles para cultivos algales de altas concentraciones celulares, debido a la baja acumulación de oxígeno disuelto y la alta eficiencia lograda cuando se compara con versiones tubulares (Richmond, 2000).

1.4.2.3 Fotobiorreactor de Columna

Estos ofrecen el sistema de mezcla más eficiente, la mayor transferencia volumétrica de masa y el mejor de las condiciones de crecimiento del cultivo (Eriksen, 2008). Son de bajo costo, compactas y fáciles de operar, la aireación comienza desde el fondo y sirve a su vez para la agitación del cultivo, la iluminación es a través de las paredes transparentes (Eriksen, 2008) o internamente (Suh & Lee, 2003) y su desempeño se compara favorablemente con los reactores tubulares (Chisti *et al.*, 2002).

1.5 *Botryococcus braunii*

Botryococcus braunii es una alga verde colonial que habita en agua dulce y aguas salobres, embalses, estanques, o incluso lagos efímeros situados en zonas templadas, montañosas, o zonas tropicales (Wake and Hillen, 1980, 1981; Aaronson *et al.*, 1983; Vera *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1999; Metzger and Largeau, 1999; Volova *et al.*, 2003). Esta alga es caracterizada por su sobresaliente capacidad de sintetizar y acumular gran variedad de lípidos en una matriz externa (Ilustración 1.1), dentro de las cuales se incluyen numerosos hidrocarburos, es decir compuestos que solo comprenden carbón e hidrogeno como elementos constituyentes (Brown *et al.*, 1969; Knights *et al.*, 1970).

Botryococcus braunii promete ser una fuente renovable para la producción de hidrocarburos, para la cual se han reportado rendimientos por medio del hydrocracking del destilado en 67% gasolina,

15% combustible para turbinas de aviación, 15% combustible diésel, y un 3% de aceite residual (Hillen *et al.*, 1982). La especie de *Botryococcus braunii*, ha sido clasificada en 3 razas diferentes de acuerdo al tipo de hidrocarburos producidos. La raza A produce esencialmente *n*-alcadienos, mono, tri, tetra y pentaenos, C₂₃ – C₃₃, los cuales son derivados a partir de los ácidos grasos (Metzger *et al.*, 1985; Metzger *et al.*, 1990), la Raza B produce triterpenoides, hidrocarburos insaturados conocidos como *Botryococcenos* C₃₀–C₃₇, y una pequeña cantidad de metil escualenos (Metzger *et al.*, 1985; Huang and Poulter, 1989; Rager and Metzger, 2000; Sato *et al.*, 2003; Achitouv *et al.*, 2004; Metzger and Largeau, 2005a), y la raza L produce un único hidrocarburo tetraterpenoide llamado Licopadieno (Metzger & Casadevall, 1987; Metzger *et al.*, 1990).

Se ha reportado que *B. braunii* puede convertir el 3% de la energía solar en hidrocarburos (Bernard, *et al.*, 1986), su contribución neta de CO₂ después de quemar sus hidrocarburos es negativa y su potencial calorífico está en el rango de 30 – 40 MJ kg⁻¹ (Banerjee *et al.*, 2002). Generar 100MW de energía en una central térmica usando biocombustibles derivados de *Botryococcus braunii* puede reducir las emisiones de CO₂ en 1.5 x 10⁵ Ton año⁻¹ (Sawayama *et al.*, 1999)

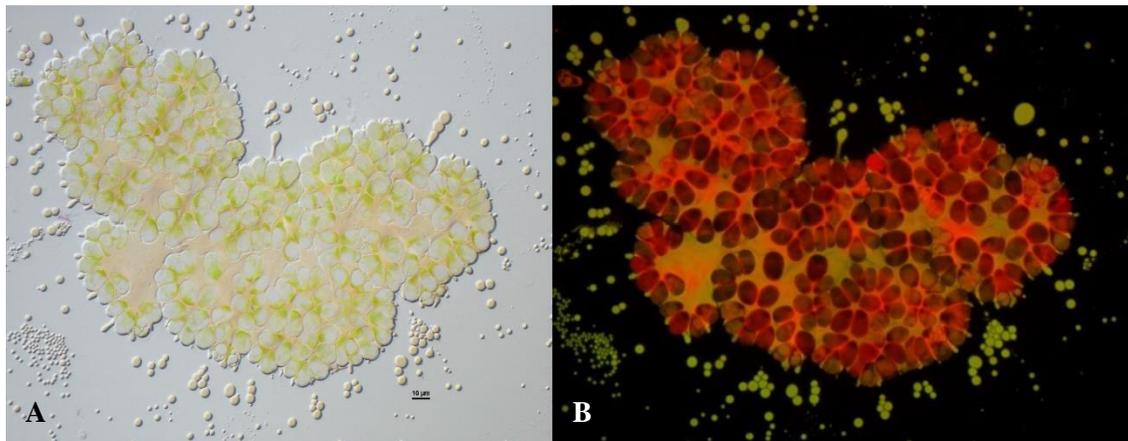


Ilustración 1.1. A. Colonia de *Botryococcus braunii* exudando material lipídico. Fotografía 40x contraste de fases de interferencia (DIC). B. Microscopia de fluorescencia. Trixi - Rojo Nilo

1.5.1 Medios de Cultivo para *Botryococcus braunii*

Múltiples medios con diferentes formulaciones son empleados para el cultivo de *B. braunii* (Tabla 1.1). Las diferencias normalmente se enfocan en la fuente y concentración de Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Hierro (Fe). Debido a que estos medios son utilizados para el cultivo de las diferentes cepas de *Botryococcus*, no está establecido cual es el mejor para fines específicos.

Tabla 1.1. Medio de cultivo usuales para *Botryococcus braunii* (Andersen, 2005b)

CHU-13	BG11	BBM	AF-6
--------	------	-----	------

	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
KNO₃	400			
NaNO₃		1500	250	140
NH₄NO₃				22
K₂HPO₄	80	40	74	5
KH₂PO₄			17.5	10
CaCl₂.2H₂O	107	36	24	10
MgSO₄.7H₂O	200	75	73	30
Citrato Férrico	20			2
Citrato Férrico de Amonio		6		
FeCl₂.6H₂O				196
Ácido Cítrico	100	6		2
NaCl			25	
Na₂CO₃		20		
FeSO₄			5	
EDTA		1	45	
Na₂EDTA.2H₂O				1000
CoCl₂	0.02			4
H₃BO₃	5.72			
MnCl₂.4H₂O	3.62			36
ZnSO₄.7H₂O	0.44			22
CuSO₄.5H₂O	0.16			
Na₂MoO₄.2H₂O	0.084			2.5
MES buffer				400
0.072N H₂SO₄	1 gota			

1.5.2 Factores Determinantes de Crecimiento

1.5.2.1 Luz

La luz es la principal fuente de vida sobre la tierra, transformando fotones en energía química utilizable a través del proceso de fotosíntesis (Brown & Richardson, 1968) y en cultivos externos la disponibilidad de la luz solar es el factor principal que limita el crecimiento y productividad de la biomasa (Brown & Richardson, 1968). Las microalgas son capaces de adaptar su aparato fotosintético de acuerdo a la luz disponible y su espectro (Yan *et al.*, 2016), manteniendo una eficiencia constante cuando la intensidad no llega a ser extrema o deficiente. En un estudio con diferentes cepas de *Botryococcus braunii* creciendo bajo diferentes irradiancias (Li & Qin, 2005), se encontró que la velocidad de crecimiento no era afectada cuando se trabajaba con irradiancias entre 60 – 300 Wm⁻², lo que indicaba que cada cepa se adaptaba su sistema para mantener una productividad similar sin depender de la cantidad de luz emitida. La influencia lumínica afectaba

directamente la producción de lípidos en donde el máximo contenido de lípidos se encontró a una intensidad de 100Wm^{-2} .

También se ha encontrado que la longitud de onda incidente tiene un efecto sobre la morfología de la célula, la composición de los hidrocarburos producidos y la fijación de carbono. Baba y colaboradores (Baba *et al.*, 2012) encontraron que la luz azul (470 nm), verde (525 nm) y roja (660 nm) poseían efectos heterogéneos sobre el cultivo de *Botryococcus braunii*. Cuando usaban la luz roja, la forma de la célula era más simétrica con una tendencia semicircular, por otro lado, la luz azul cambiaba la morfología de la célula alargándola hacia una forma ovoide. La concentración de hidrocarburos bajo luz verde era inferior a las encontradas bajo luz azul y roja. Además, la velocidad de fijación de carbono aumentaba casi el doble cuando se usaba la luz azul.

1.5.2.2 Temperatura

Como la mayoría de los microorganismos, cada especie de alga posee una adecuada temperatura de crecimiento, la cual afecta directamente su flujo metabólico, captación de nutrientes, y disponibilidad de estos en el medio. En varios estudios de *B. braunii*, se ha encontrado que la temperatura tiene un efecto sobre el crecimiento y contenido de lípidos del organismo. Yoshimura y colaboradores (Yoshimura *et al.*, 2013), realizaron un estudio del efecto de múltiples factores externos sobre el crecimiento de *B. braunii*, encontrando que la temperatura poseía un efecto significativo sobre el crecimiento de la microalga, en donde la cepa se veía favorecida a temperaturas de 30°C . En otro estudio Kalavecha (Kalacheva *et al.*, 2002), estudió el efecto de 3 temperaturas diferentes (18 , 25 y 32°C) sobre el crecimiento, contenido de lípidos e hidrocarburos en *Botryococcus braunii*, encontrando que, temperaturas de 32°C , favorecían significativamente el crecimiento, pero la cantidad de lípidos disminuía hasta 4 veces comparado con el cultivo a 25°C , lo cual indicaba que la acumulación durante el crecimiento aceleraba la producción de carbohidratos dentro de la célula, además el contenido de hidrocarburos no se vio afectado por la temperatura. Lo mismo ocurrió en otro estudio (Sushchik *et al.*, 2003) en donde la velocidad de crecimiento fue casi idéntica a 18 y 25°C , pero fue mayor a 32°C , pero se encontró que altas temperaturas afectaban negativamente la acumulación de lípidos intracelulares, pero sin afectar la composición de los hidrocarburos extracelulares

1.5.2.3 CO₂ y pH

El CO₂, es la fuente de carbono principal de los organismos fotosintéticos, siendo la materia prima ideal para la formación de azúcares necesarios para la producción de energía intracelular. Sin embargo, el CO₂ disuelto en el medio afecta el pH, en donde una adición no controlada puede resultar en una disminución tal del pH que afecte negativamente el crecimiento de la microalga o se pierda totalmente el cultivo (Brock, 1973).

1.5.2.4 Nitrógeno y Fosforo

El nitrógeno es un nutriente importante para el crecimiento de microalgas, debido a que es el principal elemento para la síntesis de proteínas. La fuente de nitrógeno puede ser orgánica o inorgánica dependiendo de las características de la especie en cuestión, debido a que algunas pueden crecer mejor con amonio, urea o nitratos (Peccia *et al.*, 2013). La fijación del nitrógeno también depende de diversas condiciones tales como temperatura (Priscu *et al.*, 1989) o iluminación (Hardison *et al.*, 2011). Es relevante mencionar que a través de altas concentraciones de nitrato se puede obtener altas densidades celulares, sin embargo, una excesiva concentración de nitrato en el medio puede resultar tóxica para el alga (Abeliovich & Azov, 1976).

El fósforo está más relacionado con la energía metabólica a nivel celular (ATP, ADP), además de ser necesario en la síntesis de ADN y ARN. Además, el principal constituyente de la membrana celular y plasmática son los fosfolípidos. Similar al nitrógeno, el fósforo depende de condiciones lumínicas para ser asimilado por la célula (Cembella *et al.*, 1984; Powell *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2014). Usualmente la relación N:P es más importante que la concentración individual de sus componentes, indicando que se debe hacer uso de sus componentes pensando en una concentración conjunta que beneficie el crecimiento del microorganismo (Grobbelaar, 2012)

1.6 BIOCOMBUSTIBLES DE MICROALGAS

La idea promisorio sobre el uso de la microalgas para la producción de combustibles tiene varias décadas (Hillen *et al.*, 1982), esta presenta múltiples ventajas sobre las materias primas convencionales, como son la no competencia por terrenos aptos para la producción de alimentos, forraje y otros productos de cosecha. Sin embargo, no todas las especies son adecuadas para la producción de biocombustibles

Las algas son reconocidas como una de las formas de vida más antiguas y también como los organismos fotosintéticos de más rápido crecimiento en el mundo (Chisti, 2007). Estos organismos fototróficos requieren para un óptimo crecimiento luz solar, CO₂ tomado del aire, agua y sales inorgánicas de sodio, potasio y fósforo (N, P, K), todo esto comprendido en condiciones de temperatura entre 20-30°C (Singh, 2015). Las microalgas pueden fijar CO₂ a partir de tres fuentes principales como lo son la atmósfera, descarga de gases a partir de las industrias y carbonatos solubles (Wang *et al.*, 2008). Para la producción de 100 t de biomasa algal, se fijan alrededor de 183 t de CO₂ (Sánchez *et al.*, 2003), conteniendo aproximadamente 50% de carbono en su peso seco, lo que conlleva a un alto almacenamiento de energía que puede ser utilizado para la producción de diferentes productos

1.6.1 Biomasa

La biomasa generada por las microalgas es una materia prima que puede ser usada para la producción de energía a partir de su transformación en combustibles sólidos, líquidos o gaseosos. La conversión de la biomasa algal a energía abarca diferentes procesos ordinariamente usados para biomasa terrestre, y la elección del proceso adecuado depende en gran medida del tipo y fuente de biomasa, proceso de conservación, así como el producto final esperado (Brown & Richardson, 1968). Las tecnologías de conversión para la utilización de la biomasa microalgal puede ser separada en dos categorías básicas de conversión, la termoquímica y la bioquímica (Fig. 1.2), además del uso de sus aceites después de un proceso de extracción para la producción de biodiesel.

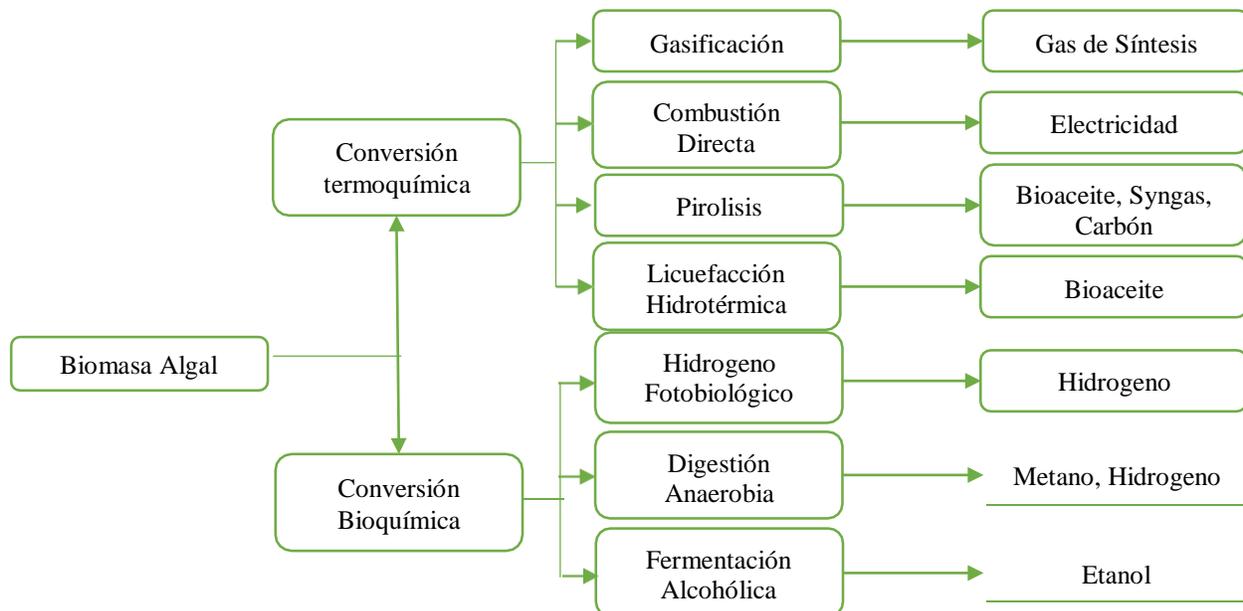


Figura 1.2. Procesos potenciales para la conversión de biomasa microalgal (Sukahara & Awayama, 2005)

1.6.1.1 Conversión Termoquímica

La conversión termoquímica, abarca una serie de descomposiciones térmicas de los componentes orgánicos de la biomasa para producir productos combustibles y es lograda a través de diferentes procesos como combustión directa, gasificación, licuefacción hidrotérmica y pirolisis (Sukahara & Awayama, 2005)

1.6.1.1.1 Gasificación

La gasificación, es un proceso el cual involucra la oxidación parcial de la biomasa a una mezcla de gases combustibles a altas temperaturas (800-1000°C) (Clark & Deswarte, 2015). En el proceso de gasificación normal, la biomasa reacciona con oxígeno y agua (vapor) para generar gas de síntesis o “syngas”, una mezcla de CO, H₂, CO₂ y CH₄ (Demirbas, 2001) . La mayor ventaja que posee la gasificación como una vía para transformar biomasa en energía, es que en esta se produce syngas a partir de una amplia variedad de materia primas (Clark & Deswarte, 2015). El syngas es un producto con un bajo poder calorífico (4 – 6 MJ m⁻³) que puede ser quemado directamente o usado como combustible para motores o turbinas (McKendry, 2002b).

La gasificación de microalgas ha sido ampliamente estudiada por diversos autores. Hirano y Coautores (Hirano *et al.*, 1998) investigaron la gasificación de *Spirulina* a diferentes temperaturas (850, 950 y 1000 °C) con presencia de O₂. El gas de síntesis generado estaba compuesto por CO, H₂, CH₄ y CO₂, con trazas de O₂, N₂ y C₂H₄ y un incremento en temperatura mejoraba la fracción de H₂ a costa de CO, CO₂ y CH₄.

Por otro lado Minowa (Minowa & Sawayama, 1999), investigaron la catálisis con Níquel sobre la gasificación de *Chlorella vulgaris*, en un sistema de N₂ en ciclo a 350°C para producir CH₄. Grandes cantidades de catalizador resultaron en altas concentraciones de CH₄ y bajas de H₂. En otro trabajo Stucki y colaboradores (Stucki *et al.*, 2009), usaron *Spirulina platensis* en una gasificación con agua súper crítica (SCWG) por sus siglas en inglés, para su transformación en combustible, obteniendo un gas de síntesis rico en CH₄ usando Ru como catalizador. En adición, Chakinala y Colaboradores (Chakinala *et al.*, 2010), analizaron *Chlorella Vulgaris* para SCWG con y sin catalizador, usando diferentes catalizadores. En su estudio ellos encontraron que el uso de Níquel como catalizador a altas cargas, resultaba en un gas de síntesis rico en H₂.

Otra investigación realizada en el 2013 fue hecha por Yang y colaboradores (Yang et al., 2013), en donde se realizó una co-gasificación a una biomasa torrefactada de *Spirulina platensis* y *Eucalyptus globulus* en un reactor de lecho fluidizado burbujeante de 30kW, obteniéndose altas cantidades de H₂ y CH₄ cuando la proporción de biomasa microalgal era elevada, caso contrario ocurría con el CO y LHV, los cuales disminuían al aumentar la cantidad de biomasa microalgal. Khoo y colaboradores (Khoo et al., 2013) realizaron una gasificación de *Nannochloropsis sp.* en un reactor de lecho fijo a 850°C. Este estudio obtuvo como resultados la caracterización de las fracciones de carbono, bioaceite y gas de síntesis en unos porcentajes de 58.18, 13.74 y 28.08% p/p respectivamente, además de sus HHV que fueron 17.5, 34.1 y 32.9MJ kg⁻¹ respectivamente.

En el 2014 Duman y colaboradores (Duman et al., 2014) usaron residuos de *Nannochloropsis oculata* para una gasificación en reactor de lecho fijo a temperaturas de 600-850°C con vapor de agua. Los resultados arrojaron una conversión de carbono del 70% y un gas de síntesis compuesto principalmente por H₂ (50%) y CO₂ (35%), también se encontró CH₄ y CO en proporciones de 10 y 6% respectivamente. En el 2015 Watanabe y colaboradores (Watanabe et al., 2015) realizaron una gasificación catalítica con Ni-Fe/Mg/Al a residuos de biomasa de *Botryococcus braunii* después de realizar la extracción de sus material lipídico a una temperatura de 750°C. Los resultados arrojaron una conversión del 91% de los alquitranes formados en la fase de pirolisis en gases monocarbonados CO, CO₂ y CH₄. El gas de síntesis estaba compuesto principalmente de CO y H₂ en una proporción H₂/CO de 2.4. Estos estudios demuestran la importancia que tiene este proceso dentro de la conversión energética de la biomasa de microalgas.

1.6.1.1.2 Pirólisis

La pirolisis es el proceso por el cual se da una conversión de la biomasa a bio-aceite (bio-oil), gas de síntesis (syngas) y carbón, con temperaturas que van desde 350 – 700 °C en la ausencia de oxígeno (Goyal et al., 2008). Para la conversión de biomasa a combustibles líquidos, se considera que existe el potencial para la producción a gran escala de biocombustibles que podrían reemplazar el combustible líquido a base de petróleo (Demirbas, 2006).

La Tabla 1.2, muestra características generales y rendimientos esperados de diferentes sistemas de operación de la pirolisis (Bridgwater, 2007). La pirolisis instantánea o flash pirolisis opera a temperaturas moderadas (500°C) con tiempos de residencia de alrededor de 1s, y es considerada una técnica viable para un futuro reemplazo de combustibles fósiles por combustibles líquidos

derivados de biomasa (Clark & Deswarte, 2015), debido a la alta eficiencia de conversión (95.5%) que puede ser lograda (Demirbas, 2006). Sin embargo, grandes desafíos deben ser superados, ya que los aceites de pirólisis son ácidos, inestables, viscosos, contienen sólidos y son químicamente solubles en agua (Suh & Lee, 2003).

Tabla 1.2. Características generales y rendimientos del proceso de pirólisis (Bridgwater, 2007)

Modo de Operación	Condiciones	% Líquido	% Gas	% Carbón
Pirólisis Instantánea	T 400°C, Tiempo de residencia Cortos (Aprox. 1 s)	30	35	35
Pirólisis Rápida	T 500°C, Tiempo de residencia moderados (10-20 s)	50	20	30
Pirólisis Lenta	T 400°C, Tiempo de residencia largo	75	2	13

El uso de microalgas para el proceso de pirólisis ha sido estudiado por diversos autores. En ese sentido, Miao y Wu (Miao & Wu, 2004) utilizaron pirólisis rápida para mejorar el rendimiento de aceite extraído a partir de una cepa modificada genéticamente de la microalga *Chlorella protothecoides*, logrando rendimientos de bioaceite de 18% con un poder calorífico superior (HHV) de 30 MJ kg⁻¹. Los resultados de los estudios han demostrado que el aceite de microalgas producido a través del proceso de pirólisis (Tabla 1.3) posee una mayor calidad un gran potencial a ser usado como fuente de energía (Miao and Wu, 2004; Miao *et al.*, 2004; Demirbas, 2006)

Tabla 1.3. Proceso de pirólisis en microalgas (1 atm)

Especie	Producción	Temperatura °C	Líquido		Gas Contenido (%bs)	Sólido Contenido (%bs)	Referencia
			Contenido (% bs)	HHV MJ kg ⁻¹			
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterótrofa	450	57.9	41	32	10.1	(Miao & Wu, 2004)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Autótrofa	450	16.6	30	----	----	(Miao & Wu, 2004)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Autótrofa	500	18	30	----	----	(Miao <i>et al.</i> , 2004)
<i>Chlorella protothecoides</i>	N/D	502	55.3	39.7	36.3	8.4	(Demirbas, 2006)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Autótrofa	500	24	29	----	----	(Miao <i>et al.</i> , 2004)

1.6.1.1.3 Licuefacción Hidrotérmica

La licuefacción hidrotérmica es un proceso que es empleado para transformar biomasa húmeda en combustibles líquidos (Patil *et al.*, 2008). Este proceso es realizado a bajas temperaturas si se compara con los otros procesos (300-350°C), altas presiones (5-20 MPa) y requiere de un catalizador en presencia de oxígeno para producir el bio-aceite (Goyal *et al.*, 2008). Los sistemas para la licuefacción hidrotérmica son complejos y costosos (McKendry, 2002a), pero poseen la

ventaja de convertir biomasa húmeda en energía (Clark & Deswarte, 2015). El proceso utiliza agua en condiciones sub-críticas para descomponer la biomasa en moléculas pequeñas con una alta densidad energética (Patil *et al.*, 2008).

El estudio de la licuefacción hidrotérmica en biomasa proveniente de algas, no es un acontecimiento reciente. Dote y colaboradores (Dote *et al.*, 1994) usaron licuefacción hidrotérmica a 300°C sobre *Botryococcus braunii* logrando un rendimiento máximo de aceite de 64% en base seca, con un HHV de 45.9 MJ kg⁻¹, declarando un balance de energía positivo para el proceso (relación salida/entrada, 6.67:1). En otro estudio, Minowa y colaboradores (Minowa *et al.*, 1995) estudiaron el proceso con *Dunaliella tertiolecta* obteniéndose un 42% de aceite con un HHV de 34.9 MJ kg⁻¹ y un balance energético positivo de 2.94:1, indicando que la licuefacción hidrotérmica es una opción viable para la conversión de biomasa algal a combustibles líquidos (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Licuefacción hidrotérmica en microalgas (30 atm)

Especie	Producción	Temperatura °C	Líquido		Gas Contenido (%bs)	Sólido Contenido (%bs)	Referencia
			Contenido (% bs)	HHV MJ kg ⁻¹			
<i>Botryococcus braunii</i>	N/A	300	64	45.9	----	----	(Dote et al., 1994)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	N/A	300	42	34.9	----	----	(Minowa et al., 1995)

1.6.1.1.4 Combustión Directa

El proceso de combustión directa es en el cual, la energía química almacenada en la biomasa es liberada a través de una reacción de combustión, en forma de gases calientes (Goyal, *et al.*, 2008), normalmente en una caldera, horno o turbina de vapor a temperaturas mayores a 800, usando biomasa con contenidos de humedad menores a 50%, aunque la efectividad aumenta al disminuir la humedad de la biomasa (McKendry, 2002a), y el calor producido debe ser usado inmediatamente sin posibilidad de almacenamiento (Clark & Deswarte, 2015). La combustión de la biomasa para la producción de energía es también una manera de usar el potencial energético que posee la biomasa, ya que puede suplir desde servicios domésticos hasta procesos industriales a gran escala (100-300 MW) (McKendry, 2002a).

La combustión directa de la biomasa posee desventajas generalmente en el hecho de requerir pretratamientos de secado, picado y molido que requieren un gasto energético adicional que afectan el costo (Goyal *et al.*, 2008). La eficiencia de la conversión de biomasa a energía en plantas

industriales se compara con la de las centrales eléctricas de carbón, aunque pueden incurrir en un gasto adicional por el contenido de humedad de la biomasa, en donde la energía obtenida está en un rango entre 20-40%, con altas eficiencias en sistemas grandes (>100 MW) o cuando la biomasa es co-combustionada en centrales eléctrica con carbón (Demirbas, 2001).

1.6.1.2 Conversión Bioquímica

La conversión bioquímica de biomasa para producir energía, incluye procesos como fermentación alcohólica, digestión anaerobia y producción fotobiológica de hidrogeno, los cuales a través de un proceso microbiológico-enzimático transforman biomasa en algún tipo de combustible con valor comercial, que puede ser usado como fuente de energía en industrias, motores y hogares.

1.6.1.2.1 Fermentación Alcohólica

La fermentación alcohólica es la conversión de los carbohidratos de la biomasa tales como azúcares, almidones y celulosa en etanol (McKendry, 2002a). En el caso de la biomasa microalgal, la cual está compuesta principalmente de almidón y celulosa, el proceso puede ser menos complejo que al trabajar con material agroindustrial de desecho normalmente con alta cantidad de lignocelulosa (Demirbas, 2001).

1.6.1.2.2 Digestión Anaeróbica

La digestión anaeróbica (AD) por sus siglas en inglés, es la conversión de residuos orgánicos en biogás, compuesto principalmente de metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2) (Chynoweth *et al.*, 2000). El proceso involucra 3 estados principales: hidrólisis, fermentación y metanogénesis. En la hidrólisis los compuestos complejos son transformados en azúcares solubles. Después las bacterias fermentativas convierten estos compuestos en alcoholes, ácido acético, ácidos grasos volátiles y gases como H_2 y CO_2 los cuales son metabolizados a través de la metanogénesis en CH_4 (60-70%) y CO_2 (30-40%) (Chynoweth, *et al.*, 2000). El gas producido contiene la energía de alrededor del 20-40% del poder calorífico inferior (LHV) de la materia prima utilizada, y el proceso es apropiado para biomasa con alto contenido de humedad (80-90%) (McKendry, 2002a), en donde la biomasa microalgal es totalmente apropiada para el proceso. Se ha estimado que la conversión de la biomasa microalgal en metano produce tanta energía neta como la generada por los lípidos celulares (Heaven *et al.*, 2011), con la ventaja de que el caldo rico en nutrientes inorgánicos de la fermentación puede ser usado para la producción de nuevas microalgas (Phang *et al.*, 2000).

1.6.1.2.3 Producción Fotobiológica de Hidrogeno

El hidrogeno (H_2) es una fuente de energía limpia y eficiente que se encuentra naturalmente en el ambiente (Clark & Deswarte, 2015). Las microalgas poseen la maquinaria genética, metabólica y enzimática necesaria para producir H_2 por vía fotoquímica (Ghirardi et al., 2000). Durante su crecimiento, las microalgas a través de la fotosíntesis constantemente están convirtiendo moléculas de agua en hidrogeno y oxígeno, el hidrogeno es usado como donante de electrones en el proceso de fijación del CO_2 transformándose en iones H^+ que son subsecuentemente convertidos por enzimas hidrogenasas en H_2 en condiciones anaerobias (Cantrell et al., 2008). El oxígeno producto de la fotosíntesis tiende a solubilizarse rápidamente en el medio causando una rápida inhibición de la enzima hidrogenasa, por lo que la producción de hidrogeno fotosintético es impedido (Akkerman et al., 2002; Cantrell et al., 2008; Fouchard et al., 2008; Ikuta et al., 1998). Existe un proceso que consiste de dos estados en donde la producción de oxígeno e hidrogeno son espacialmente separados (Ghirardi et al., 2000). En la primera etapa, el alga se somete a un crecimiento fotosintético normal. Durante la segunda etapa, las algas son privadas de azufre en donde son inducidas las condiciones anaerobias y se estimula la producción constante de hidrogeno (Melis & Happe, 2016). La producción de hidrogeno por este medio se ve limitada a través del tiempo, ya que el rendimiento de hidrogeno comienza a estabilizarse después de 60h de producción. El uso de este sistema no genera ningún tipo de residuos tóxicos o perjudiciales para el ambiente, además produce biomasa que puede tener múltiples fines alimenticios, cosméticos o en su defecto para generar energía a partir de otro proceso. Melis (Melis & Happe, 2016) encontró que usando el proceso fotosintético de dos etapas, teóricamente pueden alcanzarse rendimientos máximos de hidrogeno a partir de microalgas verdes de $198 \text{ kg } H_2 \text{ ha}^{-1}$ por día.

1.6.1.3 Biodiesel

El biodiesel, es un combustible liquido obtenido a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasa animales, con o sin uso previo (Sharma & Singh, 2009). Estos aceites son la materia prima necesaria para la producción del biodiesel a través del proceso llamado transesterificación la cual es una reacción química entre los triglicéridos y un alcohol en la presencia de un catalizador, obteniéndose como producto final mono-esteres a los cuales se les denomina biodiesel y glicerina como subproducto (Fig. 1.3).

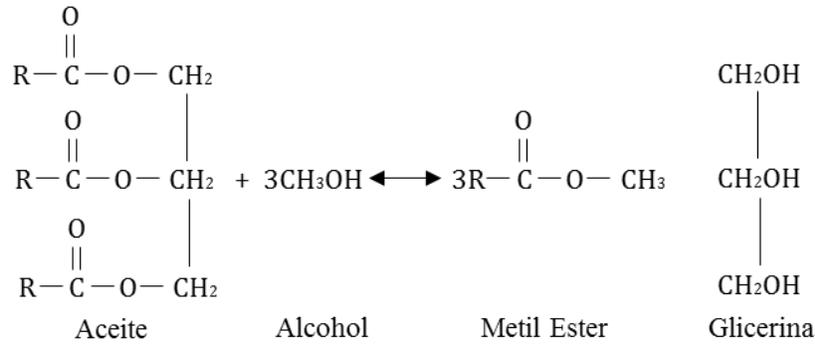


Figura 1.3. Reacción química para la producción de biodiesel

Todo el biodiesel producido a partir de aceites debe poseer propiedades iguales o mejores al Estándar Internacional de Biodiesel para Vehículos (EN14214) para ser aceptado. El biodiesel producido a partir de microalgas posee propiedades químicas y físicas similares al diésel de petróleo, el biodiesel de primera generación y se compara favorablemente con la norma EN14214 (Tabla 1.5). Sin embargo, el alto contenido de ácidos grasos polinsaturados que componen los triglicéridos del aceite microalgal, vuelven susceptible el producto a la oxidación en almacenamiento, por lo tanto, limita su utilización (Chisti, 2007).

Tabla 1.5. Comparación de las propiedades del diésel producido a partir de diferentes fuentes

Propiedades	Biodiesel 1 ^{ra} generación	Biodiesel Algal	Petrodiésel	Estándar Biodiesel EN14214
HHV (MJ kg ⁻¹)	31.8 – 42.3	41	45.9	----
Viscosidad Cinemática (mm ² s ⁻¹)	3.6 – 9.48	5.2	1.2 – 3.5	3.5 – 5.2
Densidad (g ml ⁻¹)	0.86 – 0.895	0.864	0.83 – 0.84	0.86 – 0.90
% Carbono	77	----	87	----
% Hidrogeno	12	----	13	----
% Oxigeno	11	----	0	----
% Sulfuro	0.0 – 0.0015	----	0.05	<10
Punto de Ebullición	315 – 350	----	180 – 340	----
Punto de Ignición	100 – 170	115	60 – 80	>101
Punto de Nube	-3 a 12	----	-15 a 5	----
Punto de Fluidez	-15 a 10	-12	-35 a -15	----
Numero de Cetano	45 – 65	----	51	>51

1.7 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

1.7.1 Objetivo General

- ❖ Establecer un sistema de producción de la microalga *Botryococcus braunii* a escala de reactor, que acople el uso eficiente de la luz, el Nitrógeno y el Fosforo, con el fin de obtener el potencial energético de esta especie.

1.7.2 Objetivos Específicos

- ❖ Desarrollar un modelo de consumo para el uso eficiente del Nitrógeno y el Fosforo en el crecimiento de la microalga *Botryococcus braunii*.
- ❖ Establecer las condiciones lumínicas del cultivo para el uso eficiente de energía lumínica.
- ❖ Comparar dos sistemas de producción en función de los flujos máxicos obtenidos.
- ❖ Caracterizar energéticamente a *Botryococcus braunii*.
- ❖ Realizar un análisis comparativo en contexto energético, entre los resultados obtenidos y los reportados para diversos combustibles convencionales y otras microalgas.

1.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

1.8.1 Cepa

La cepa usada en este trabajo fue la microalga *Botryococcus braunii* 572 de la colección de la Universidad de Texas (UTEX), Estados Unidos. Los cultivos stock fueron mantenidos medio BG-11, el cual se compone de (g/L): 1.5, NaNO₃ (nitrato de sodio); 0.04, K₂HPO₄ (fosfato ácido de potasio); 0.075, MgSO₄ (sulfato de magnesio); 0.0036, CaCl₂·2H₂O (cloruro de calcio dihidrato); 0.00286, H₃BO₃ (ácido bórico); 0.00188, MnSO₄·H₂O (sulfato de manganeso); 0.00022, ZnSO₄·7H₂O (sulfato de zinc); 0.00039, Na₂MoO₄·2H₂O (molibdato de sodio); 0.00008, CuSO₄·7H₂O (sulfato de cobre); 0.00004, CoCl₂·6H₂O (cloruro de cobalto); 0.0034, FeSO₄ (sulfato ferroso); 0.001, EDTA, a 100rpm y pH 8.

1.8.2 Cuantificación de Biomasa

La biomasa celular fue determinada como peso seco en unidades de concentración (g L⁻¹), como se explica a continuación:

Un vial de 2ml fue lavado con agua desionizada para luego ser secado a 70°C toda la noche. El tubo fue almacenado en desecador al vacío durante 1 hora, para luego ser pesado en balanza analítica de 4 cifras decimales. Luego fueron añadidos 2 ml de cultivo para ser centrifugado a

12000 rpm por 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y nuevamente se añaden 2ml de cultivo y se repite el mismo proceso de centrifugación. Luego el pellet se lava 3 veces con agua desionizada centrifugando a 10000 rpm por 5 minutos entre cada lavado para luego ser secado a 70°C toda la noche, luego es puesto en desecador al vacío durante una hora y se procede a pesar. Tres (3) réplicas son usadas para cada toma de datos. La concentración celular es calculada usando la siguiente ecuación

$$C_{\text{celular}} (\text{g l}^{-1}) = (A_{410\text{nm}} + A_{420\text{nm}} - A_{430\text{nm}}) \times 250 \quad (\text{ecuación 1.1})$$

1.8.3 Determinación de Nitrato (NO₃)

La determinación de Nitrato se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Cataldo y colaboradores (Cataldo *et al.*, 1975), que se basa en la nitración del ácido salicílico en medio ácido, generando un compuesto con un pico de absorbancia en 410nm. Después de la reacción, este pico puede ser observado con mayor nitidez cuando se hace un ajuste de pH a niveles mayores a 12.

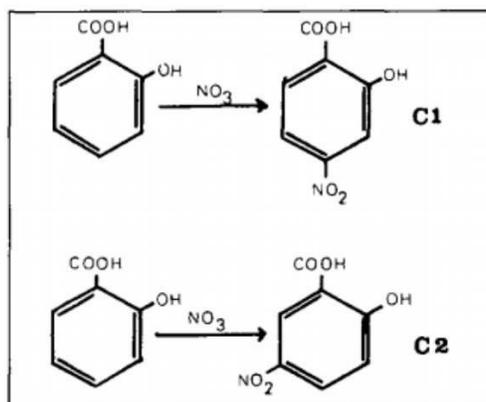


Ilustración 1.2. Compuesto formado por la nitración del ácido salicílico

Esta metodología es sencilla, libre de interferencia iónica de nitrito y amonio, y permite una rápida determinación del nitrato en extractos de plantas, usando espectrofotometría en el espectro visible (Sandoval, 2015).

1.8.4 Determinación de Fosfato (PO₄)

La determinación espectrofotométrica Fosfatos es llevada cabo usando el método del ácido ascórbico (Murphy & Riley, 1962; Pradhan & Pokhrel, 2013), el cual se compone de dos reacciones consecutivas. La primera reacción es la formación del heteropoliácido fosfomolibdico que es generado en por la reacción del molibdato de amonio y el tartrato doble de antimonio de potasio con el fosfato presente en la muestra a pH ácido. La segunda reacción es la reducción del

heteropoliácido formado, por acción del ácido ascórbico, formando un complejo con un pico de absorbancia de 880nm.

1.8.5 Viabilidad Celular

El uso de la hidrólisis del Díacetato de Fluoresceína (FDA), es un método ampliamente utilizado en estudios para determinar actividad celular en células vegetales como indicador de viabilidad (Saruyama et al., 2013; Widholm, 1972). La técnica se basa en la hidrólisis del compuesto apolar Díacetato de fluoresceína por diferentes enzimas intracelulares: Proteasas, lipasas y esterases.

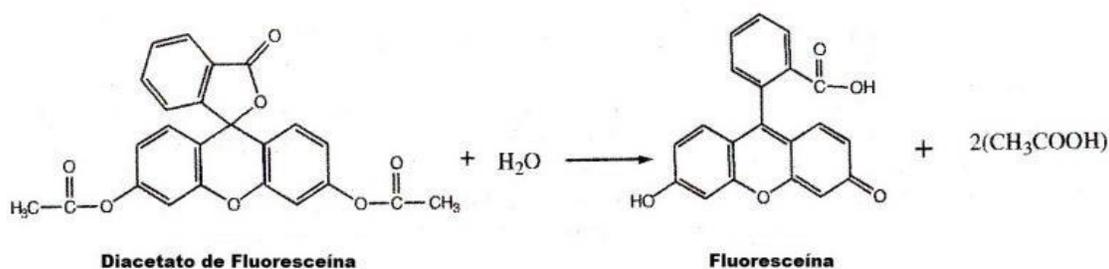


Ilustración 1.3. Reacción del Díacetato de Fluoresceína (Green, 2006)

El producto de la reacción enzimática es la fluoresceína (Fig. 1) un compuesto polar que es retenido intracelularmente debido a que su polaridad no permite que atraviese la membrana plasmática (Rotman & Papermaster, 1966), cuya fluorescencia al ser sometida longitudes de onda UV puede ser medida utilizando un microscopio (Nishida *et al.*, 1992; Saruyama et al., 2013; Yano *et al.*, 1998). En este caso, las células son sumergidas en una solución de medio de cultivo a 2.5ppm de FDA por 5 minutos, antes de ser analizadas en un microscopio de fluorescencia *Nikon eclipse 80i*, con modulo y lámpara de fluorescencia.

1.9 REFERENCIAS

- Aaronson, S., Berner, T., Gold, K., Kushner, L., Patni, N. J., Repak, A., & Rubin, D. (1983). Some observations on the green planktonic alga, *Botryococcus braunii* and its bloom form. *Journal of Plankton Research*, 5, 693–700. <https://doi.org/10.1093/plankt/5.5.693>
- Abeliovich, A., & Azov, Y. (1976). Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Applied Environmental Microbiology*, 31(6), 801–806.
- Achitouv, E., Metzger, P., Rager, M. N., & Largeau, C. (2004). C 31-C 34 methylated squalenes from a Bolivian strain of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 65, 3159–3165.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.09.015>

- Ahmad, A. L., Yasin, N. H. M., Derek, C. J. C., & Lim, J. K. (2011). Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *15*, 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.09.018>
- Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J., & Wijffels, R. H. (2002). Photobiological hydrogen production: Photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, *27*(11–12), 1195–1208. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00071-X)
- Alghurabie, I. K., Hasan, B. O., Jackson, B., Kosminski, A., & Ashman, P. J. (2013). Fluidized bed gasification of Kingston coal and marine microalgae in a spouted bed reactor. *Chemical Engineering Research and Design*, *91*(9), 1614–1624. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.04.024>
- Ali, A., Othman, M., Shirai, Y., & Hassan, M. (2015). Sustainable and integrated palm oil biorefinery concept with value-addition of biomass and zero emission system. *Journal of Cleaner Production*, *91*, 96–99. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.12.030>
- Alipour, R., Yusup, S., Uemura, Y., Lai, B., Chin, F., Loong, H., & Al, A. (2014). Syngas production from palm kernel shell and polyethylene waste blend in fluidized bed catalytic steam co-gasification process. *Energy*, *75*, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.04.062>
- Alvarez, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*, *359*, 63–89.
- Andersen, R. A. (2005b). Recipes for freshwater and sea water media. In *Algal Culturing Techniques* (pp. 430–532).
- Baba, M., Kikuta, F., Suzuki, I., Watanabe, M. M., & Shiraiwa, Y. (2012). Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*, *109*, 266–270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.059>

- Babich, I. V., van der Hulst, M., Lefferts, L., Moulijn, J. A., O'Connor, P., & Seshan, K. (2011). Catalytic pyrolysis of microalgae to high-quality liquid bio-fuels. *Biomass and Bioenergy*, *35*, 3199–3207. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.043>
- Balat, M., Balat, M., Kırtay, E., & Balat, H. (2009). Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals . Part 2 : Gasification systems. *Energy Conversion and Management*, *50*(12), 3158–3168. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2009.08.013>
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2002). *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, *22*, 245–279. <https://doi.org/10.1080/07388550290789513>
- Barneto, A. G., Vila, C., & Ariza, J. (2011). Eucalyptus kraft pulp production: Thermogravimetry monitoring. *Thermochimica Acta*, *520*(1–2), 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2011.03.027>
- Bernard, G. C., Thepenier, A., & Hardy, C. (1986). Direct Bioconversion of Solar Energy into Organic Chemicals by microalgae. *Adv Biotechnology Processes*, *6*, 73–110.
- Blasi, C. Di. (2009). Combustion and gasification rates of lignocellulosic chars. *Progress in Energy and Combustion Science*, *35*(2), 121–140. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.08.001>
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, *70*, 313–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
- Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2013). *Algae for Biofuels and Energy, Preface*, Springer Dordrecht Heidelberg New York London. Pages 288. <http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9>
- Bridgwater, A. V. (2007). IEA bioenergy 27th update: biomass pyrolysis. *Biomass & Bioenergy*, *31*, 7–18.
- Brock, T. (1973). Lower pH Limit for the Existence of Blue-Green Algae: Evolutionary and Ecological. *American Association for the Advancement of Science*, *179*(4072), 480–483.

- Brown, A. C., Knights, B. A., & Conway, E. (1969). Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 8(3), 543–547. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85397-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85397-2)
- Brown, T. E., & Richardson, F. L. (1968). the Effect of Growth Environment on the Physiology of Algae: Light Intensity. *Journal of Phycology*, 4(1), 38–54. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1968.tb04675.x>
- Brown, T. M., Duan, P., & Savage, P. E. (2010). Hydrothermal Liquefaction and Gasification of *Nannochloropsis* sp. *Energy Fuels*, 24(9), 3639–3646. <https://doi.org/10.1021/ef100203u>
- Cantrell, K. B., Ducey, T., Ro, K. S., & Hunt, P. G. (2008). Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities. *Bioresource Technology*, 99(17), 7941–7953. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.061>
- Carvalho, A. P., & Meireles, L. A. (2006). Microalgae reactors: A review of enclosed systems and performances. *Biotechnology Progress*, 3(1), 1490–1506.
- Cataldo, D., Maroon, M., Schrader, L., & Youngs, V. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6(1), 71–80.
- Cembella, A. D., Antia, N. J., & Harrison, P. J. (1984). The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 1. *Critical Reviews in Microbiology*, 10, 317–391. <https://doi.org/10.3109/10408418209113567>
- Chakinala, A. G., Brilman, D. W. F., Van Swaaij, W. P. M., & Kersten, S. R. A. (2010). Catalytic and non-catalytic supercritical water gasification of microalgae and glycerol. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49, 1113–1122. <https://doi.org/10.1021/ie9008293>
- Chen, Y., Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., & Sommerfeld, M. (2011). Life cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*, 102, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.017>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294–306.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>

Chisti, Y. (2010). Fuels from microalgae. *Biofuels*, *1*, 233–235.

Chisti, Y., Sánchez, A., Garc, M. C., Garc, F., & Grima, E. M. (2002). Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, *31*, 1015–1023.

Chisti, Y., Sánchez Mirón, A., Cerón García, M. C., Contreras Gómez, A., García Camacho, F., & Molina Grima, E. (2003). Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, *16*(3), 287–297.

[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00072-X)

Chynoweth, D. P., Owens, J. M., & Legrand, R. (2000). Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable Energy*, *22*(1–3), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0960-1481\(00\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S0960-1481(00)00019-7)

Clark, J., & Deswarte, F. (2015). *Introduction to chemicals from biomass*. Editorial John Wiley & Sons, Ltd. Pages 184. DOI:10.1002/9780470697474

Damartzis, T., & Zabaniotou, a. (2011). Thermochemical conversion of biomass to second generation biofuels through integrated process design—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *15*(1), 366–378. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.08.003>

Demirbas, A. (2001). Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Conversion and Management*, *42*(11), 1357–1378. [https://doi.org/10.1016/S0196-8904\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0196-8904(00)00137-0)

Demirbas, A. (2006). Oily products from mosses and algae via pyrolysis. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, *28*(10), 933–940. <https://doi.org/10.1080/009083190910389>

Demirbas, A. (2009). Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Conversion and Management*, *50*, 2239–2249. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2009.05.010>

- Demirbas, A. (2010). Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*, 51(12), 2738–2749. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.010>
- Demirbas, M. F. (2009). Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. *Applied Energy*, 86, S151–S161. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.04.043>
- Demirbas, M. F. (2011). Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*, 88, 3473–3480. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.01.059>
- Dorsey, J., Yentsch, C. M., Mayo, S., & McKenna, C. (1989). Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. *Cytometry*, 10, 622–628. <https://doi.org/10.1002/cyto.990100518>
- Dote, Y., Sawayama, S., Inoue, S., Minowa, T., & Yokoyama, S. ya. (1994). Recovery of liquid fuel from hydrocarbon-rich microalgae by thermochemical liquefaction. *Fuel*, 73(12), 1855–1857. [https://doi.org/10.1016/0016-2361\(94\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0016-2361(94)90211-9)
- Duman, G., Uddin, M. A., & Yanik, J. (2014). Hydrogen production from algal biomass via steam gasification. *Bioresource Technology*, 166, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.096>
- Eriksen, N. T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30(9), 1525–1536. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9740-3>
- Falkowski. (1997). Aquatic photosynthesis. *London: Blackwater Science*, 375.
- Fouchard, S., Pruvost, J., Degrenne, B., & Legrand, J. (2008). Investigation of H₂ production using the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in a fully controlled photobioreactor fitted with on-line gas analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(13), 3302–3310. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.03.067>
- Ghirardi, M. L., Zhang, L., Lee, J. W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E., & Melis, A. (2000). Microalgae: A green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology*, 18, 506–511. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01511-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01511-0)
- Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. M. (2014). The effect of light supply on microalgal

- growth, CO₂ uptake and nutrient removal from wastewater. *Energy Conversion and Management*, 85, 530–536. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2014.05.085>
- Goyal, H. B., Seal, D., & Saxena, R. C. (2008). Bio-fuels from thermochemical conversion of renewable resources: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12(2), 504–517. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2006.07.014>
- Greque de Morais, M., & Vieira Costa, J. A. (2007). Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 129(3), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.009>
- Grobbelaar, J. U. (2012). Microalgae mass culture: The constraints of scaling-up. *Journal of Applied Phycology*, 24, 315–318. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9728-6>
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45(2), 160–186. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>
- Han, W., Li, C., Miao, X., & Yu, G. (2012). A novel miniature culture system to screen CO₂ sequestering microalgae. *Energies*, 5, 4372–4389. <https://doi.org/10.3390/en5114372>
- Hardison, A. K., Anderson, I. C., Canuel, E. A., Tobias, C. R., & Veuger, B. (2011). Carbon and nitrogen dynamics in shallow photic systems: Interactions between macroalgae, microalgae, and bacteria. *Limnology and Oceanography*, 56, 1489–1503. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.4.1489>
- Heaven, S., Milledge, J., & Zhang, Y. (2011). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 29(1), 164–167. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.10.005>
- Hermesmeier, D., Mala, E., Schulz, R., Thielmann, J., Galland, P., & Senger, H. (1991). Antagonistic blue and red light regulation of cab-gene expression during photosynthetic adaptation in *Scenedesmus obliquus*. *Photochemistry and Photobiology*, 11(2), 189–202.
- Hillen, L. W., Pollard, G., Wake, L. V., & White, N. (1982). Hydrocracking of the oils of *Botryococcus braunii* to transport fuels. *Biotechnology and Bioenergy*, 24(1982), 193–205.

- Hirano, A., Hon-nami, K., Kunito, S., Hada, M., & Ogushi, Y. (1998). Temperature effect on continuous gasification of microalgal biomass: theoretical yield of methanol production and its energy balance. *Catalysis Today*, *45*, 399–404.
- Hu, Q., Kurano, N., Kawachi, M., Iwasaki, I., & Miyachi, S. (1998). Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *49*(6), 655–662. <https://doi.org/10.1007/s002530051228>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *54*(4), 621–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Huang, Y., Street-Perrott, F. A., Perrott, R. A., Metzger, P., & Eglinton, G. (1999). Glacial–interglacial environmental changes inferred from molecular and compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of sediments from Sacred Lake, Mt. Kenya. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *63*(9), 1383–1404. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(99\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00074-5)
- Huang, Z., & Dale Poulter, C. (1989). Tetramethylsqualene, a triterpene from *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, *28*(5), 1467–1470. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97766-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97766-5)
- Ikuta, Y., Akano, T., Shioji, N., & Maeda, I. (1998). Hydrogen production by photosynthetic microorganisms. *Biohydrogen*, 2–3.
- Jiménez, C., Cossío, B. R., Labella, D., & Niell, F. X. (2003). The feasibility of industrial production of Spirulina (Arthrospira) in Southern Spain. *Aquaculture*, *217*(1–4), 179–190. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00118-7)
- Kalacheva, G. S., Zhila, N. O., Volova, T. G., & Gladyshev, M. I. (2002). The effect of temperature on the lipid composition of the green alga *Botryococcus*. *Microbiology*, *71*, 286–293. <https://doi.org/10.1023/A:1015898426573>
- Khan, A. A., Jong, W. De, Jansens, P. J., & Spliethoff, H. (2008). Biomass combustion in fluidized bed boilers: Potential problems and remedies. *Fuel Processing Technology*, *90*(1), 21–50. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2008.07.012>

- Khan, S. A., Rashmi, Hussain, M. Z., Prasad, S., & Banerjee, U. C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *13*, 2361–2372. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.04.005>
- Khoo, H. H., Koh, C. Y., Shaik, M. S., & Sharratt, P. N. (2013). Bioenergy co-products derived from microalgae biomass via thermochemical conversion - Life cycle energy balances and CO₂ emissions. *Bioresource Technology*, *143*, 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.004>
- Knights, B. A., Brown, A. C., Conway, E., & Middleditch, B. S. (1970). Hydrocarbons from the green form of the freshwater alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, *9*, 1317–1324. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85325-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85325-X)
- Lasa, H. De, Salaires, E., Mazumder, J., & Lucky, R. (2011). Catalytic Steam Gasification of Biomass: Catalysts , Thermodynamics and Kinetics. *Chemical Reviews*, *111*, 5404–5433.
- Lee, R. (1980). Phycology. *New York: Cambridge University Press*.
- Lee, Y. K. (1986). Enclosed bioreactors for the mass cultivation of photosynthetic microorganisms: the future trend. *Trends in Biotechnology*, *4*(7), 186–189. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(86\)90243-X](https://doi.org/10.1016/0167-7799(86)90243-X)
- Li, Y., & Qin, J. G. (2005). Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. *Journal of Applied Phycology*, *17*, 551–556. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-9005-7>
- Liu, G., Liao, Y., Wu, Y., Ma, X., & Chen, L. (2017). Characteristics of microalgae gasification through chemical looping in the presence of steam. *International Journal of Hydrogen Energy*, *42*(36), 22730–22742. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.173>
- Lopez-Gonzales, D., Valverde, J. L., Fernandez-Lopez, M., & Sanchez-Silva, L. (2013). Thermogravimetric-mass spectrometric analysis on combustion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *143*, 562–574. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.052>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*, 217–232.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>

- McKendry, P. (2002a). Energy production from biomass (part 2): Conversion technologies. *Bioresource Technology*, 83(1), 47–54. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00119-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00119-5)
- McKendry, P. (2002b). Energy production from biomass (part 3): Gasification technologies. *Bioresource Technology*, 83(1), 55–63. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00120-1)
- Melis, A., & Happe, T. (2016). Hydrogen Production. Green Algae as a Source of Energy. *American Society of Plants Biologists*, 127(3), 740–748. <https://doi.org/10.1104/pp.010498.volves>
- Metzger, P., Allard, B., Casadevall, E., Berkaloff, C., & Couté, A. (1990). Structure and chemistry of a new chemical race of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae) that produced lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon. *Journal of Phycology*, 26, 258–266.
- Metzger, P., Berkaloff, E., Casadevall, E., & Coute, A. (1985). Alkadiene and botryococcene producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 24(10), 2305–2312. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83032-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83032-0)
- Metzger, P., & Casadevall, E. (1987). Lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon from new strains of the green alga *Botryococcus braunii*. *Tetrahedron Letters*, 28(34), 3931–3934. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96423-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96423-2)
- Metzger, P., & Casadevall, E. (1991). Botryococcoid ethers, ether lipids from *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 30(5), 1439–1444. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)84181-Q](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)84181-Q)
- Metzger, P., & Largeau, C. (1999). Chemicals of *Botryococcus braunii*. *Chemicals from Microalgae*, 205–260.
- Metzger, P., & Largeau, C. (2005). *Botryococcus braunii*: A rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 486–496. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1779-z>
- Miao, X., & Wu, Q. (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Biotechnology*, 110, 85–93.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.013>

- Miao, X., Wu, Q., & Yang, C. (2004). Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *71*, 855–863. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2003.11.004>
- Minowa, T., & Sawayama, S. (1999). A novel microalgal system for energy production with nitrogen cycling. *Fuel*, *78*, 1213–1215.
- Minowa, T., Yokoyama, S., & Kishimoto, M. (1995). Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel*, *74*(12), 1735–1738.
- Murphy, J., & Riley, J. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, *27*(C), 31–36.
- Naciones Unidas. (1998). Protocolo de kyoto de la convención marco de las naciones unidas sobre el cambio climático, *61702*.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 578–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Nazari, F. (2015). Genetic Engineering of Microalgae for Enhanced Biodiesel Production Suitable Fuel Replacement of Fossil Fuel as a Novel Energy Source. *American Journal of Life Sciences*, *3*(1), 32. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20150301.17>
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, *37*(1), 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
- Nishida, T., Ohnishi, H., Kodama, A., & Komamine, A. (1992). Establishment of synchrony by starvation and readdition of auxin in suspension cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *28*, 37–43.
- Onwudili, J. A., Lea-langton, A. R., Ross, A. B., & Williams, P. T. (2013). Catalytic hydrothermal gasification of algae for hydrogen production: Composition of reaction products and potential for nutrient recycling. *Bioresource Technology*, *127*, 72–80.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.020>

- Patil, V., Tran, K. Q., & Giselrød, H. R. (2008). Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, *9*, 1188–1195. <https://doi.org/10.3390/ijms9071188>
- Peccia, J., Haznedaroglu, B., Gutierrez, J., & Zimmerman, J. B. (2013). Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. *Trends in Biotechnology*, *31*(3), 134–138. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.010>
- Phang, S. M., Miah, M. S., Yeoh, B. G., & Hashim, M. a. (2000). Spirulina cultivation in digested sago starch factory wastewater. *Journal of Applied Phycology*, *12*, 395–400. <https://doi.org/10.1023/A:1008157731731>
- Pingle, S. D., & Landge, A. D. (2013). Comparative Account on Proliferation Rate of Microalgae Used in Biodiesel Production by Indigenously Prepared Bioreactors. *Advanced Laboratory Research in Biology*, *4*(1).
- Powell, N., Shilton, A. N., Pratt, S., & Chisti, Y. (2008). Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. *Environmental Science and Technology*, *42*, 5958–5962. <https://doi.org/10.1021/es703118s>
- Pradhan, S., & Pokhrel, M. (2013). Spectrophotometric Determination of Phosphate in Sugarcane Juice , Fertilizer , Detergent and Water. *Scientific World*, *11*(11), 58–62.
- Priscu, J. C., Palmisano, A. C., Priscu, L. R., & Sullivan, C. W. (1989). Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake and assimilation in Antarctic sea-ice microalgae. *Polar Biology*, *9*, 443–446. <https://doi.org/10.1007/BF00443231>
- Rager, M. N., & Metzger, P. (2000). Six novel tetraterpenoid ethers, lycopeners B-G, and some other constituents from the green microalga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, *54*, 427–437. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00118-7)
- Raheem, A., Wan Azlina, W. A. K. G., Taufiq Yap, Y. H., Danquah, M. K., & Harun, R. (2015). Thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *49*, 990–999. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.186>

- Ratledge, C., & Cohen, Z. (2008). Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils. *Lipid Technology*, 20, 155–160.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, 103, 444–467. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>
- Richmond, A. (2000). Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), 441–451. <https://doi.org/10.1023/A:1008123131307>
- Richmond, A., Cheng-Wu, Z., & Zarmi, Y. (2003). Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: Interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell-growth inhibition. *Biomolecular Engineering*, 20(4–6), 229–236. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00060-1)
- Rotman, B., & Papermaster, B. W. (1966). Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluoresceinic esters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55, 134–141.
- Saidina, N. A., Misson, M., Haron, R., & Ahmad, Mohd, Bunch, F. (2012). Bio-Oils and Diesel Fuel Derived from Alkaline Treated Empty Fruit Bunch (EFB). *Biomass & Renewables*, 1, 6–14.
- Sanchez Silva, L., López González, D., Garcia Minguillan, A. M., & Valverde, J. L. (2013). Pyrolysis, combustion and gasification characteristics of *Nannochloropsis gaditana* microalgae. *Bioresource Technology*, 130, 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.002>
- Sandoval, I. (2015). Avaliação da produtividade de biomassa e do conteúdo de óleo da microalga *Desmodesmus* sp. em diferentes condições de cultivo para aplicações industriais. *Brazilian Journal of Biosciences*, 11(2), 250–255.
- Saruyama, N., Sakakura, Y., Asano, T., Nishiuchi, T., Sasamoto, H., & Kodama, H. (2013). Quantification of metabolic activity of cultured plant cells by vital staining with fluorescein diacetate. *Analytical Biochemistry*, 441(1), 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.06.005>

- Sato, Y., Ito, Y., Okada, S., Murakami, M., & Abe, H. (2003). Biosynthesis of the triterpenoids, botryococcones and tetramethylsqualene in the B race of *Botryococcus braunii* via the non-mevalonate pathway. *Tetrahedron Letters*, *44*(37), 7035–7037. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)01784-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)01784-2)
- Sawayama, S., Inoue, S., Dote, Y., & Yokoyama, S.-Y. (1995). CO₂ fixation and oil production through microalga. *Energy Conversion and Management*, *36*(6–9), 729–731. [https://doi.org/10.1016/0196-8904\(95\)00108-P](https://doi.org/10.1016/0196-8904(95)00108-P)
- Sawayama, S., Minowa, T., & Yokoyama, S. Y. (1999). Possibility of renewable energy production and CO₂ mitigation by thermochemical liquefaction of microalgae. *Biomass and Bioenergy*, *17*, 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(99\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(99)00019-7)
- Sharma, N. K., Rai, A. K., Singh, S., & Brown, R. M. (2007). Airborne algae: Their present status and relevance. *Journal of Phycology*, *43*(4), 615–627. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00373.x>
- Sharma, Y. C., & Singh, B. (2009). Development of biodiesel: Current scenario. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *13*(6–7), 1646–1651. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.08.009>
- Shuping, Z., Yulong, W., Mingde, Y., Chun, L., & Junmao, T. (2010). Pyrolysis characteristics and kinetics of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* using thermogravimetric analyzer. *Bioresource Technology*, *101*(1), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.020>
- Sikarwar, V. S., ZHao, M., Fennell, P. S., Shah, N., & Anthony, E. J. (2017). Progress in biofuel production from gasification. *Progress in Energy and Combustion Science*, *61*, 189–248. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2017.04.001>
- Singh, S. P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *50*, 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*, 87–96.

<https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>

- Stenseng, M., Jensen, A., & Dam-Johansen, K. (2001). Investigation of biomass pyrolysis by thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 58–59, 765–780. [https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(00\)00200-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(00)00200-X)
- Stucki, S., Ludwig, C., Haiduc, G., & Brandenberger, M. (2009). Catalytic gasification of algae in supercritical water for biofuel production and carbon capture †. *Energy & Environmental Science*, 2, 535–541. <https://doi.org/10.1039/b819874h>
- Suh, I. S., & Lee, S. B. (2003). A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(2), 180–189. <https://doi.org/10.1002/bit.10558>
- Sukahara, K. T., & Awayama, S. S. (2005). Liquid Fuel Production Using Microalgae. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 48, 251–259. <https://doi.org/10.1627/jpi.48.251>
- Sushchik, N. N., Kalachova, G. S., Zhila, N. O., Gladyshev, M. I., & Volova, T. G. (2003). A temperature dependence of the intra-and extracellular fatty-acid composition of green algae and cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(3), 374–380. <https://doi.org/10.1023/A:1023830405898>
- Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A., Haik, Y., & Farid, M. (2015). Growth of microalgae using CO₂ enriched air for biodiesel production in supercritical CO₂. *Renewable Energy*, 82, 61–70. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2014.08.013>
- Tiong, L., Komiyama, M., Uemura, Y., & Thanh, T. (2016). Catalytic supercritical water gasification of microalgae: Comparison of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.10.009>
- Tredici, M. R., & Zittelli, G. C. (1998). Efficiency of sunlight utilization: Tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(2), 187–197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980120\)57:2<187::AID-BIT7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980120)57:2<187::AID-BIT7>3.0.CO;2-J)
- Uemura, Y., Saadon, S., Osman, N., Mansor, N., & Tanoue, K. (2015). Torrefaction of oil palm

- kernel shell in the presence of oxygen and carbon dioxide. *Fuel*, 144, 171–179.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.12.050>
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10), 4021–4028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>
- Vera, L., Huszar, D. M., & Reynolds, C. S. (1997). Phytoplankton periodicity and sequences of dominance in an Amazonian flood-plain lake (Lago Batata, Pará, Brasil): responses to gradual environmental change. *Hydrobiologia*, 346(1–3), 169–181.
- Volova, T. G., Kalacheva, G. S., & Zhila, N. O. (2003). Specificity of Lipid Composition in Two *Botryococcus* Strains, the Producers of Liquid Hydrocarbons. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50, 627–633. <https://doi.org/10.1023/A:1025636007023>
- Vunjak-Novakovic, G., Kim, Y., Wu, X., Berzin, I., & Merchuk, J. (2005). Air-lift bioreactors for algal growth on flue gas: mathematical modeling and pilot-plant studies. *Ind Eng Chem Res*, 44, 6154–6163.
- Wake, L. V, & Hillen, L. W. (1980). Study of a “bloom” of the oil- rich alga *Botryococcus braunii* in the Darwin River Reservoir. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 1637–1656.
<https://doi.org/10.1002/bit.260220808>
- Wake, L. V, & Hillen, L. W. (1981). Nature and hydrocarbon content of blooms of the alga *Botryococcus braunii* occurring in Australian freshwater lakes. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 32, 353. <https://doi.org/10.1071/MF9810353>
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008a). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008b). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 707–718.
- Wang, G., Li, W., Li, B., & Chen, H. (2008). TG study on pyrolysis of biomass and its three components under syngas. *Fuel*, 87(4–5), 552–558.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2007.02.032>

- Wang, H., Ji, C., Bi, S., Zhou, P., Chen, L., & Liu, T. (2014). Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp. *Bioresource Technology*, *172*, 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.032>
- Watanabe, H., Li, D., Nakagawa, Y., Tomishige, K., & Watanabe, M. M. (2015). Catalytic gasification of oil-extracted residue biomass of *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*, *191*, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.034>
- Widholm, J. M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, *47*, 189–194.
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J., & Wu, Q. (2008). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *78*(1), 29–36. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1285-1>
- Yan, C., Muñoz, R., Zhu, L., & Wang, Y. (2016). The effects of various LED (light emitting diode) lighting strategies on simultaneous biogas upgrading and biogas slurry nutrient reduction by using of microalgae *Chlorella* sp. *Energy*, *106*, 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.03.033>
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, *86*(12–13), 1781–1788. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013>
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Zheng, C., Lee, D. H., & Liang, D. T. (2006). In-Depth Investigation of biomass pyrolysis based on three major components: Hemicellulose, cellulose, and lignin. *Energy and Fuels*, (20), 388–393. <https://doi.org/10.1021/ie1025453>
- Yang, K. C., Wu, K. T., Hsieh, M. H., Hsu, H. Te, Chen, C. S., & Chen, H. W. (2013). Co-gasification of woody biomass and microalgae in a fluidized bed. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *44*(6), 1027–1033. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.06.026>
- Yano, A., Suzuki, K., Uchimiya, H., & Shinshi, H. (1998). Induction of Hypersensitive Cell Death by a Fungal Protein in Cultures of Tobacco Cells. *International Society for Molecular Plant-*

Microbe Interactions, 11(2), 115–123.

Yen, H. W., & Brune, D. E. (2007). Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, 98(1), 130–134.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.010>

Yoshimura, T., Okada, S., & Honda, M. (2013). Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: Optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. *Bioresource Technology*, 133, 232–239.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.095>

CAPITULO 2

PARAMETRIZACIÓN DE UN MODELO DE DISTRIBUCIÓN LUMÍNICA EN BIORREACTOR DE 10L, PARA OBTENER EL MÁXIMO RENDIMIENTO FOTOSINTÉTICO

2.1 RESUMEN

Las condiciones lumínicas durante el cultivo de microalgas poseen un gran impacto sobre la composición de la biomasa y la eficiencia con que se usa la energía lumínica, debido a que la luz es el parámetro más significativo para el crecimiento y su distribución dentro del cultivo es crítico para determinar la actividad fotosintética de la microalga. En este trabajo, fue desarrollado un modelo de distribución lumínica para un reactor de 10L con la microalga *Botryococcus braunii*, basado en las propiedades ópticas del microorganismo, el comportamiento del sistema fotosintético, la geometría de reactor y la fuente de luz utilizada. Se simuló la intensidad lumínica en cada punto del reactor al incrementar la concentración celular desde $0.1 - 1.0 \text{ gL}^{-1}$ cuando este era iluminado por 4 lámparas LED simultáneamente, dividiendo el área iluminada en 3 regiones (Saturación, Fotolimitación y oscuridad). Los resultados arrojaron que en *Botryococcus braunii* el fotosistema tiene un punto de saturación a intensidades de 850 y $420 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para células adaptadas a la luz y mantenidas en oscuridad respectivamente, soportando intensidades de 1500

$\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sin padecer un daño en su fotosistema. La simulación de la distribución lumínica en el reactor mostró que en concentraciones menores a 0.3 gL^{-1} la luz puede atravesar toda el área del reactor con intensidades por encima al punto de saturación del PSII. Entre $0.3 - 0.8 \text{ gL}^{-1}$ las regiones fotolimitadas aumentan rápidamente hasta cubrir gran parte del área del cultivo, en donde la zona oscura, aumenta hasta cubrir un área cerca al 39% cuando el cultivo llega a 1.0 gL^{-1} , por otro lado, la zona fotolimitada alcanza un 53% y solo un 9% se mantiene con intensidades de saturación. De acuerdo a la distribución lumínica obtenida, es posible determinar la concentración adecuada del cultivo para realizar el balance adecuado entre la concentración celular y la intensidad con la cual se ilumina el cultivo, para garantizar una adecuada irradiancia que permite mantener la célula en un estado foto-saturado que maximice la eficiencia fotosintética de *Botryococcus braunii*.

2.2 INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos unicelulares los cuales poseen una eficiencia fotosintética que puede ser de 10 a 50 veces mayor que las plantas superiores, cuando se expresa en términos de captura de dióxido de carbono (CO₂) (Vieira *et al.*, 2000), las algas usan el agua como fuente de electrones, el sol como fuente de energía y en el caso de las especies autótrofas, el dióxido de carbono como fuente de carbono (Janssen *et al.*, 2003). A través de la historia, las algas han ganado importancia como potenciales fuentes de energía renovable y en un futuro se espera que los biocombustibles producidos por las microalgas sean económicamente más eficientes que los biocombustibles producidos a partir de recursos alimenticios que ponen en riesgo la seguridad alimentaria del planeta (Mitchell, 2008).

Debido a que las microalgas son organismos fototróficos, la luz posee el mayor impacto sobre su crecimiento, por lo que la iluminación se vuelve uno de los aspectos más importantes a considerar en el diseño y operación de fotobiorreactores (Carvalho *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2003). A través de los años, múltiples esfuerzos se han enfocado en lograr unas condiciones lumínicas adecuadas para el cultivo de microalgas, en donde se estudian factores como la distribución espectral de la fuente de luz, intensidad y fotoperiodo, todo con el propósito de establecer una adecuada irradiación del cultivo, en donde se conoce que estos factores son determinantes en la velocidad de crecimiento de la biomasa, su composición bioquímica y la producción de metabolitos (Glemser *et al.*, 2016; Janssen *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2016)

Las microalgas poseen la habilidad de adaptar la organización molecular de su aparato fotosintético de acuerdo a la intensidad lumínica y su distribución espectral (Hermsmeier *et al.*, 1991; Yan *et al.*, 2016), estos procesos involucran cambios químicos que ocurren en cortos periodos de tiempo causados por los niveles de irradiancia y el espectro de la luz, conocidos como “foto-aclimatación” (Falkowski & LaRoche, 1991) e involucran la presencia de elementos mediadores de señales llamados foto-receptores (Rudiger & Lopez-Figueroa, 1992).

A pesar de que la luz es fundamental para el proceso de la fotosíntesis, una intensidad lumínica que sobrepase el nivel de adaptación del aparato fotosintético causa una reducción de la actividad fotosintética. Si la energía lumínica absorbida por los foto-receptores que llega a los centros de reacción, es mayor a la energía que puede utilizarse, se pueden generar daños en el aparato fotosintético (Demmig *et al.*, 1992; Horton *et al.*, 1994; Luciński & Jackowski, 2006)

Todo comienza cuando el microorganismo es expuesto a una fuerte iluminación o incluso bajas intensidades con condiciones desfavorables, tales como baja disponibilidad de CO₂ u otras deficiencias nutricionales, que limitan la capacidad de los procesos asimilatorios, para utilizar de manera eficiente la energía química (ATP) y el poder reductor (NADPH) producidos por la actividad fotosintética. Bajo estas condiciones, la luz absorbida por pigmentos tales como clorofilas o ficobiliproteínas, crean un exceso de excitación, el cual induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar daño al fotosistema, lo que conduce a una disminución de la actividad fotosintética, ampliamente denominada fotoinhibición (Triantaphylides et al., 2008), por lo tanto las células que crecen a intensidad lumínica alta pueden mostrar niveles significativos de fotoinhibición (Scott *et al.*, 2010).

En foto-autótrofos oxigénicos, el principal sitio de fotoinhibición es el centro de reacción (RC) del fotosistema II (PSII), el cual es el componente más sensible a la luz del aparato fotosintético (Vass, 2012). Un exceso de energía de luz absorbida por el PSII da lugar a la sobre-reducción del conjunto plastoquinona (PQ_A y PQ_B) en la fase hidrofóbica de la membrana tilacoide, lo que conlleva a la ausencia de plastoquinonas reducibles para formar el sitio de unión entre el centro de reacción del PSII y la plastoquinona Q_B, y por consiguiente se da un bloqueo en el transporte de electrones (Triantaphylides et al., 2008). Este bloqueo en el transporte de electrones es supremamente peligroso ya que pueden formarse moléculas como oxígeno singlete (¹O₂), el cual es la ROS más peligrosa para una célula fotosintética (Triantaphylides *et al.*, 2008), además otras ROS tales como O₂⁻, H₂O₂ y OH⁻ pueden producirse durante el transporte reducido de electrones al aceptor del PSII (Pospíšil, 2009).

Un mecanismo para balancear la entrada y utilización de la energía lumínica en la fotosíntesis para evitar un daño considerable, consiste en la disipación del exceso de energía absorbido a través de calor en el PSII, con una consecuente menor cantidad de energía canalizada al centro de reacción. Este mecanismo de disipación térmica de la energía lumínica absorbida, resulta en una disminución de la fluorescencia de la clorofila monitoreada, leyéndose como enfriamiento no fotoquímico (NPQ), debido a que es una foto-regulación del sistema fotosintético, el cual es rápidamente inducido y ocurre en escalas de tiempo similares a los ciclos de mezcla de las células circulando en los cultivos (Eliers & Peeters, 1988; García *et al.*, 2012; Zonneveld, 1998).

Los mecanismos de foto protección, así como el funcionamiento normal del proceso de fotosíntesis está ligado a la entrada de energía a través de partículas lumínicas llamadas fotones, expresadas como micromoles de partículas (Fotones) por metro cuadrado por segundo ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), las cuales se basan en el número de fotones de una cierta longitud de onda incidente por unidad de área y por unidad de tiempo y se usa comúnmente para describir la radiación fotosintéticamente activa (PAR) por sus siglas en inglés, que se encuentra en el rango entre 400 - 700 nanómetros. (Thimijan & Heins, 1983).

El camino óptico de estos fotones puede modelarse a través de ecuaciones matemáticas efectivas para la optimización y diseño de sistemas de producción microalgal. Béchet y colaboradores (Béchet *et al.*, 2013; Béchet *et al.*, 2015) realizaron un estudio donde se categorizo más de 40 modelos de productividad microalgal, basado en la importancia dada al tratamiento de la luz. Como parte de estos modelos, está el modelo de distribución lumínica de Lambert-Beer, el cual asume una caída exponencial de la intensidad lumínica a través de un cultivo, partiendo desde su superficie (Gao *et al.*, 2017).

En el presente trabajo se evaluó el comportamiento fotosintético de la microalga *Botryococcus braunii* al aumentar la intensidad lumínica, definiendo los flujos de fotones necesarios para mantener un estado de saturación del sistema fotosintético. Estos resultados fueron usados para desarrollar un modelo de distribución lumínica a través del cultivo de *Botryococcus braunii* en un reactor de 10L permitiendo predecir el estado fotosintético de la microalga en cada espacio radial del reactor cilíndrico, dependiendo de la concentración celular y la fuente de luz durante su crecimiento

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Cepa

La cepa usada en este trabajo fue la microalga *Botryococcus braunii* 572 de la colección de la Universidad de Texas (UTEX), Estados Unidos. Los cultivos stock fueron mantenidos en cultivos en suspensión en medio BG-11 modificado, el cual se compone de (g/L): 1.5, NaNO_3 (nitrato de sodio); 0.04, K_2HPO_4 (fosfato ácido de potasio); 0.075, MgSO_4 (sulfato de magnesio); 0.0036, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloruro de calcio dihidrato); 0.00286, H_3BO_3 (ácido bórico); 0.00188, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ (sulfato de manganeso); 0.00022, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de zinc); 0.00039, $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(molibdato de sodio); 0.00008, CuSO₄·7H₂O (sulfato de cobre); 0.00004, CoCl₂·6H₂O (cloruro de cobalto); 0.0034, FeSO₄ (sulfato ferroso); 0.001, EDTA, a 100rpm y pH7.5.

2.3.2 Fuente de Luz

La fuente de luz utilizada fue una lámpara *Life LEDs W120LDG 18W*, con temperatura de color de 6500K, un promedio de 50-70LM/W y un índice de color de 70.

2.3.2.1 Caracterización Fuente de Luz

Se utilizó un sensor *LP 471 RAD* acoplado a un equipo *HD 2302.0 Light Meter* para medir la intensidad en Wm⁻² de la lámpara. A su vez, se caracterizó espectrométricamente la luz mediante el uso de un equipo “*Ocean HDX spectrometers*” analizando las longitudes de onda emitidas en el intervalo PAR. La intensidad relativa arrojada por el equipo, fue procesada mediante análisis dimensional para hallar la longitud de onda energética de la lámpara y transformar las unidades a $\text{m}^2\text{s}^{-2}\text{m}^{-1}$ de fotones.

En primera instancia se calculó el porcentaje de intensidad (% λ_{ij}) aportado por cada longitud de onda:

$$\% \lambda_{ij} = \frac{\lambda_{ij} \cdot 100}{\sum_{i,j} \lambda_{ij}} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

Donde λ_{ij} es la intensidad relativa mostrada por el equipo para cada longitud de onda λ_{ij} y $\sum_{i,j} \lambda_{ij}$ es la sumatoria de las intensidades relativas en el espectro analizado.

Luego se calculó la energía que posee un fotón para cada longitud de onda λ_{ij} [J]:

$$E_{ij} = \frac{h \cdot c}{\lambda_{ij}} \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

Donde h es la constante de Planck [J s] y c es la velocidad de la luz [nm s⁻¹].

Al calcular la energía que debe aportar el fotón de cada λ_{ij} y el porcentaje de intensidad relativa que aporta cada longitud de onda en el espectro analizado, puede calcularse la energía total E_{total} aportada por la lámpara en el espectro PAR, a través de la sumatoria de las energías individuales aportadas por cada por cada longitud de onda:

$$E_{\text{total}} = \sum_{\lambda=1}^n \frac{E_{\lambda} \cdot \%_{\lambda}}{100} \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

Con el cálculo de la energía total, se puede reemplazar la Ecuación 2.2 y despejar la longitud de onda correspondiente a esta energía:

$$\lambda = \frac{h \cdot c}{E} \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

En este caso λ , es la longitud de onda que representa la composición espectral de la lámpara en términos energéticos, la cual puede utilizarse, para calcular el flujo de fotones fotosintéticamente activos de la lámpara:

$$[\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}] = \frac{I_{\lambda}}{h \cdot c \cdot \lambda} \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

Dónde I es la intensidad de la lámpara [$\text{Js}^{-1}\text{m}^{-2}$], λ es la longitud de onda energética de la lámpara [m], h es la constante de *Planck* [Js], c es la Velocidad de la Luz [ms^{-1}] y N_A es el número de Avogadro [μmol^{-1}]. De esta manera puede obtenerse las micromoles de fotones emitidas por la lámpara por unidad de área y de tiempo

2.3.3 Coeficiente de Extinción Másico

La distribución de la luz a través del cultivo, puede expresarse mediante la ecuación de atenuación exponencial de la luz conocida como la “Ley de Lambert-Beer”. Esta ecuación puede escribirse de la siguiente forma:

$$I(L) = I_0 \cdot e^{-\mu \cdot C \cdot L} \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

$$\mu = -\frac{\ln(I(L)/I_0)}{C \cdot L} \quad (\text{Ecuación 2.7})$$

Dónde I_0 es la intensidad de la luz incidente, $I(L)$ es la intensidad medida a una distancia L , μ es el coeficiente de extinción másico del cultivo en suspensión, C es la concentración del cultivo y L es la distancia desde la superficie externa del sistema hasta la posición de medida (Muller *et al.*, 2003).

En el cálculo del coeficiente de extinción másico μ se debe tener en cuenta la dependencia de

este al coeficiente de absorción y el coeficiente de dispersión de las especie, por lo cual el cálculo

no puede estar ligado al cambio de una sola variable dentro de la ecuación, debido al error de magnitud indeterminado, por lo que la manera más exacta de calcularlo es la representación de $\ln(I_0/I)$ frente a la concentración de biomasa, la cual da como resultado una línea recta de pendiente $-\mu \cdot L$. Al conocer la longitud que debe atravesar el haz de luz dentro del cultivo hasta el punto de medida, se puede calcular el coeficiente de extinción global μ del cultivo en suspensión para un λ determinado o en este caso para la fuente de luz LED.

En este caso se desarrolló un experimento que consta de un detector puesto sobre la superficie a 6 diferentes alturas de líquido (L) usando 5 diferentes concentración de cultivo (C), con una Irradiancia incidente constante ($I_0 = 47.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). El equipo usado fue un sensor *LP 471 RAD* acoplado a un equipo *HD 2302.0 Light Meter*

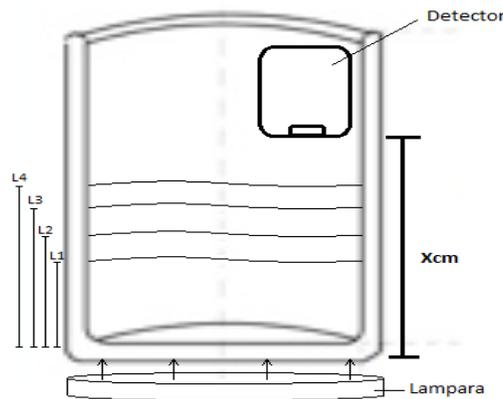


Ilustración 2.1. Esquema experimental para el cálculo del μ

Los resultados obtenidos serán comparados al modelo de Lambert-Beer a través de un análisis de varianza ANOVA, con un nivel de significancia del 5%.

2.3.4 Fotosíntesis vs Irradiancia

La fluorescencia de la clorofila en vivo asociada al fotosistema II (PSII), fue utilizada para evaluar la actividad fotosintética de la microalga *Botryococcus braunii* UTEX 572 con células adaptadas a la luz y a la oscuridad. La actividad fotosintética fue medida con el uso de un equipo simplificado basado en fluorescencia por pulso de amplitud modulada *Junior PAM* a través de una fibra óptica, con una longitud de onda de 450nm y un rango de irradiancia entre 0 - 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se comparan los datos obtenidos de las células mantenidas en oscuridad y las células adaptadas a la luz para observar la respuesta de la tasa de transporte electrónico relativo (rETR) determinando las

regiones de fotoinhibición, saturación y fotooxidación, que dependen directamente de la intensidad de la luz usada (Yarnold *et al.*, 2015).

Unas curvas de respuesta lumínica rápida fueron desarrolladas en alícuotas frescas de células de cada tratamiento. Esto provee curvas P-I basadas en tasas de transporte electrónico, las cuales en ausencia de foto-respiración y bajo condiciones adecuadas, han mostrado una buena correlación con las velocidades de producción y asimilación de O₂ y CO₂ (Beer *et al.*, 1998).

2.3.5 Distribución Lumínica

Se realizó una simulación de distribución lumínica en dos dimensiones a escala real, utilizando el software *Microsoft Office Excel 2016*® con la ayuda de la herramienta *Visual Basic 6.0*. El modelo se trabajó como una red nodal a través de un reactor circular con un diámetro de 24cm, utilizando cada celda como punto de medida con un área de 1mm². En la distribución fueron acoplados los resultados obtenidos en los apartados anteriores, indicando el grado de fotosíntesis presentada por la microalga en el reactor dependiendo del punto de localización, la densidad celular presentada y la fuente de luz utilizada.

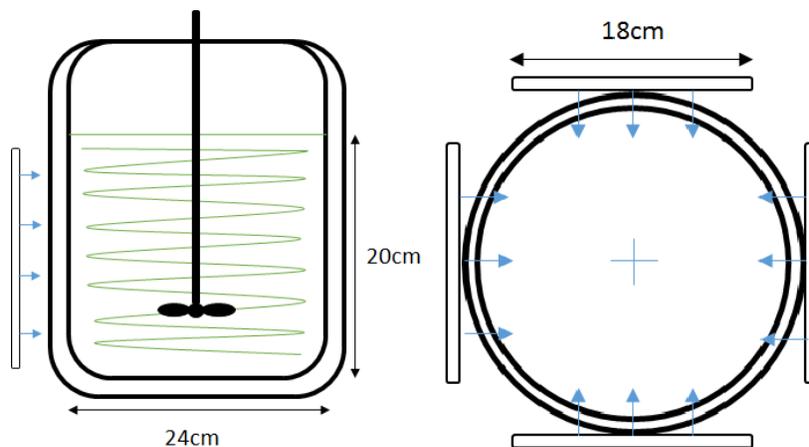


Ilustración 2.3. Esquema de la iluminación del biorreactor de 10L

Teniendo en cuenta la Ilustración 2.3, se debe tener en cuenta el camino óptico que presenta un flujo directo sobre una geometría cilíndrica, en donde se asume despreciable la caída de intensidad lumínica en el aire, comenzando su disminución al inicio de la pared de vidrio que está en contacto con el cultivo, así el camino óptico seguido por el haz de luz, dependerá exclusivamente de r y no del radio R (Ilustración 2.4).

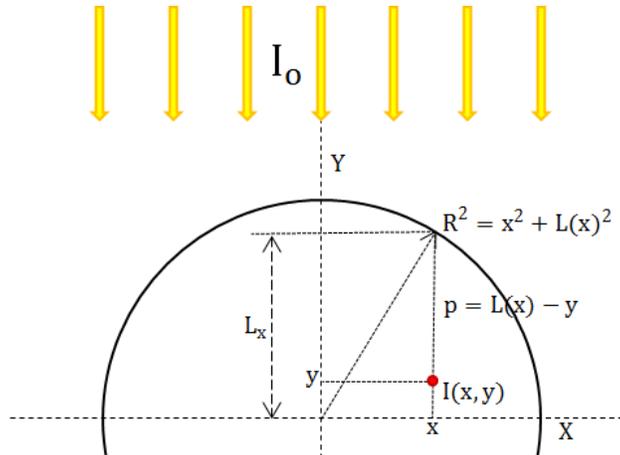


Ilustración 2.4. Flujo directo en geometría cilíndrica

En este caso, se deduce que la intensidad lumínica depende de dos coordenadas en el espacio, en donde $I(x, y)$ y el camino óptico viene dado por:

$$I(x, y) = I_0 \cdot e^{-\mu \cdot \sqrt{R^2 - x^2} - y} \quad (\text{Ecuación 2.8})$$

Por lo tanto, si reemplazamos la ecuación 2.8 en la ecuación 2.7 tenemos que:

$$I(x, y) = I_0 \cdot e^{-\mu \cdot \sqrt{R^2 - x^2} - y} \quad (\text{Ecuación 2.9})$$

Este modelo acoplado a una conversión de flujo molar de fotones, puede simular el comportamiento fotosintético del cultivo, a medida que la densidad celular dentro del reactor vaya aumentando conforme crece la biomasa.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Fuente de Luz

El espectro lumínico de la fuente de luz posee su mayor intensidad entre 400-700nm, región en donde la radiación es fotosintéticamente activa (PAR), lo que indica que la lámpara es adecuada para el cultivo de organismos fotosintéticos (Thimijan & Heins, 1983). En la Figura 2.1 puede observarse la distribución de intensidades relativas según la longitud de onda presentadas por la fuente luz.

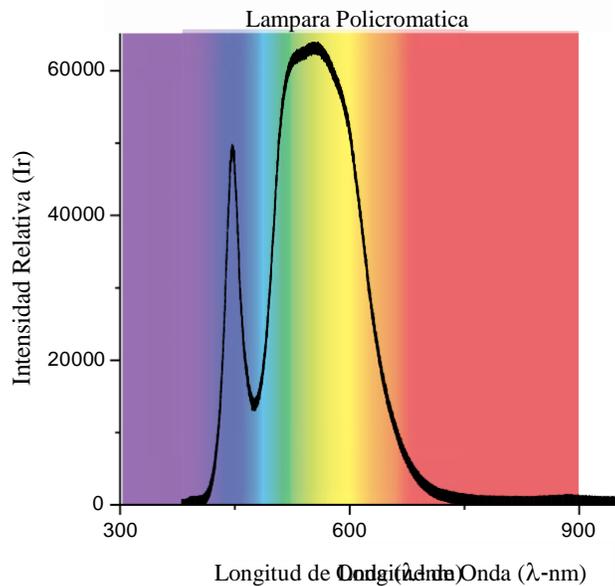


Figura 2.1. Distribución espectral de la lámpara *Life LEDs*

El espectro muestra una gran importancia de la luz amarilla y azul sobre el color emitido de la fuente LED, lo que implica que la mayor parte de los fotones emitidos hacen parte de la región PAR, lo que beneficia directamente al proceso de fotosíntesis de la microalga (Yan *et al.*, 2016).

En la pendiente de la gráfica (Fig. 2.2), se aprecia el factor de conversión calculado para estimar el número de $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ según sea la intensidad del haz de luz en Wm^{-2} , para una longitud de onda de 547nm (lámpara) y 450nm (*JuniorPam*).

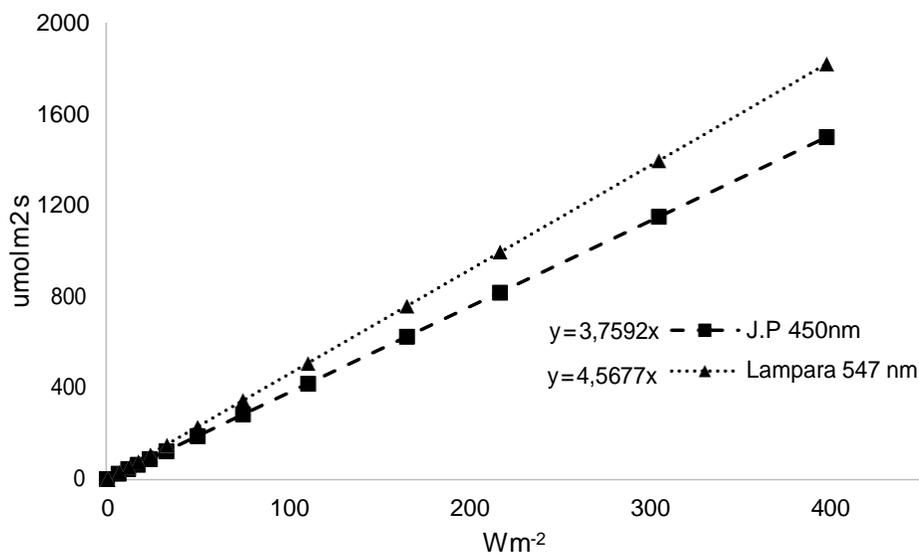


Figura 2.2. Relación de conversión entre $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y Wm^{-2} para la lámpara Led y el junior Pam

La Tabla 2.2 muestra las mediciones realizadas a la lámpara *Life LED* en 13 puntos diferentes sobre su área de iluminación, para calcular la intensidad incidente promedio emitida en W m^{-2}

Tabla 2.2. Intensidad promedio de la fuente de luz

Lámpara <i>Life Led</i>				
INTENSIDAD W/m^2	183.8	183.7	184.2	183.9
	208.3	208.8	208.4	208.5
	231.6	231.7	231.2	231.5
	211.5	211.7	211.1	211.4
	193.2	193.3	193.5	193.3
	226.7	226.7	226.7	226.7
	235.3	235.4	235.7	235.5
	214.5	214.7	214.9	214.7
	186.7	186.6	186.2	186.5
	217.0	217.0	217.0	217.0
	217.4	217.3	217.3	217.3
	207.2	207.2	206.9	207.1
	194.1	194.7	194.2	194.3
Promedio	209.5	210.6	209.4	209.8

Los puntos seleccionados muestran una leve variación entre las réplicas tomadas, lo cual puede ser debido al posicionamiento milimétrico sobre la base de la lámpara, además las variaciones entre los diferentes puntos no fueron mayores al 10%, por lo que el valor de intensidad de la fuente luz, fue trabajado como el promedio de todos los puntos medidos.

En la Tabla 2.1 pueden observarse los valores obtenidos y las constantes usadas para la caracterización de la fuente de luz.

Tabla 2.1. Parámetros calculados

h [J s]	6.63×10^{-34}
c [nm s^{-1}]	3×10^{17}
ϕ [J]	3.63×10^{-19}
λ [nm]	547
ϕ [W m^{-2}]	209.8
ϕ [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	958.3

2.4.2 Fotosíntesis

Maximizar el potencial fotosintético de microalgas es uno de los métodos para el mejoramiento de rendimientos. El entendimiento de las complejidades que abarcan el proceso de fotosíntesis, brinda mejores oportunidades para optimizar el ambiente de crecimiento de las especies fotosintéticas. La actividad fotosintética medida a partir de la fluorescencia de la *clorofila a* *in vivo* fue monitoreada en un cultivo en suspensión de la microalga *Botryococcus braunii* UTEX 572. Las curvas de respuesta lumínica rápida fueron determinadas por la tasa de transporte electrónico relativo (rETR) a 13 niveles de irradiancia, los cuales son valores predeterminados en el *Junior Pam*, variando las intensidades de los pulsos desde 0 hasta $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El rETR proviene de la eficiencia con la cual, el fotosistema usa los fotones absorbidos para el transporte de electrones lineal, comenzando con el producto entre el rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (Φ_{PSII}) y la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) a una determinada longitud de onda (Yarnold *et al.*, 2015), como se muestra en la Ecuación 2.8:

$$rETR = \Phi_{\text{PSII}} \cdot \text{PPFD} \quad (\text{Ecuación 2.8})$$

La Figura 2.3 muestra las curvas realizadas a cultivos mantenidos en iluminación y adaptados a la oscuridad, en donde estos, se mantuvieron en ausencia de luz por un periodo de 12 horas antes de la medición.

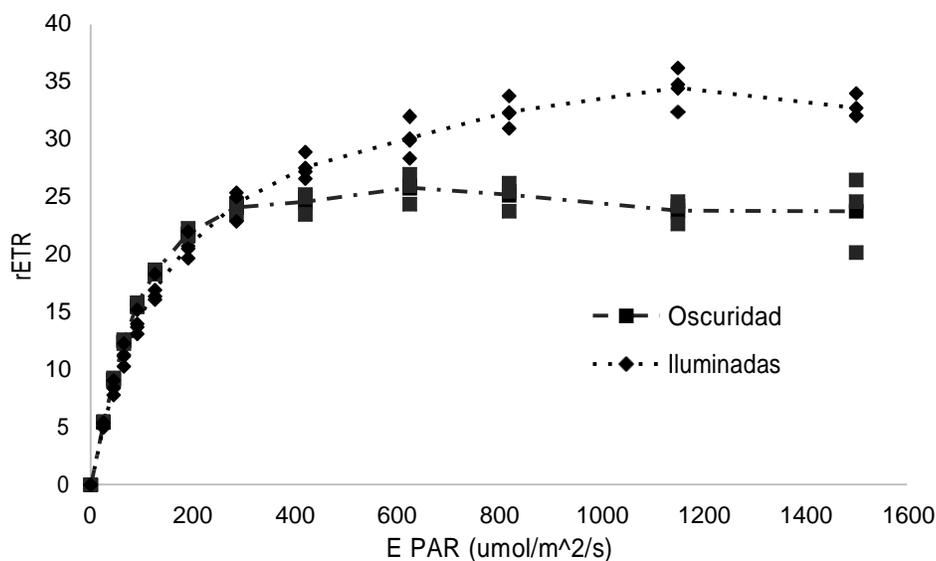


Figura 2.3. Curvas de tasa de transferencia de electrones relativo (rETR) vs intensidad PAR (0-1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), en cultivos adaptados a la oscuridad (negro) y adaptados a la luz (verde). Puntos de datos individuales son mostrados. Línea representa la media

Las curvas del transporte de electrones relativo (Fig. 2.3), muestran los resultados obtenidos para dos cultivos adaptados a diferentes condiciones lumínicas. Puede observarse que las células mantenidas en oscuridad, poseen un menor valor del rETR máximo ($rETR_{max}=24.2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) comparado con las células adaptadas a la luz ($rETR_{max}=37 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

La diferencia que se da entre los cultivos, es debido a la fotoaclimatación que toma lugar debido a las diferentes condiciones lumínicas establecidas, en donde una serie de cambios físicos, biofísicos, bioquímicos y fisiológicos interrelacionados entre sí, ayudan a las células de la microalgas a optimizar el uso de la luz disponible (Dubinsky *et al.*, 1995) .La tasa de transferencia de electrones aumenta rápidamente al incrementar las intensidades en niveles de irradiancia bajos cuando el cultivo está adaptado a la oscuridad. Cuando la luz aumenta a altas intensidades, la saturación del PSII se da debido a que el flujo de electrones excede la velocidad a la cual ocurre la reacción de la fotosíntesis, produciéndose una reacción no fotoquímica para disipar el exceso de energía absorbido y evitarse una fotoxidación o fotoinhibición (Rena, 2016), por lo cual las células adaptadas a la oscuridad requieren una menor intensidad de luz incidente para llegar al punto de la máxima transferencia de electrones (saturación). Entre diversas especies de *Botryococcus braunii* se ha reportado que *B. braunii* var Showa crece bajo condiciones óptimas cuando es irradiada con $850 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 30°C (Yoshimura , 2013)

Los resultados muestran que para las células adaptadas a la oscuridad ocurre la saturación lumínica alrededor de los $420 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con un valor de rETR de $26 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, y para las células adaptadas a la luz la saturación lumínica ocurre alrededor de los $820 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con una rETR de $37 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, este resultado indica que las células adaptadas a la luz soportan el doble de intensidad lumínica sin alcanzar el riesgo de una fotoinhibición y pueden aumentar la rETR en un 40% respecto a las células en oscuridad. Estos resultados son comparables con los obtenidos por (Yarnold *et al.*, 2015) en donde se estudió el comportamiento del rETR en células aclimatadas a la luz y células en deficiencia lumínica de *Clamydomonas reinhardtii*. En el estudio se encontró que las células aclimatadas a condiciones de deficiencia lumínica presentaban un valor 40% menor en su valor máximo de transporte de electrones relativo, que las células adaptadas a mayores intensidades lumínicas (251 y $152 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente), indicando que la eficiencia del PSII se reduce significativamente en las células adaptadas a poca luz, ya sea por el exceso de

electrones desde los primeros sistemas de antenas de los complejos recolectores de luz (LHC) del PSII, mayores niveles del PSII inactivos, o una combinación de ambos.

En células aclimatadas a altas intensidades lumínicas el Φ_{PSII} es alto pero la absorción de la luz es bajo, debido a la baja regulación de las proteínas antena; mientras en células aclimatadas a baja intensidad lumínica ocurre lo contrario, una alta regulación de las proteínas antena resulta en una alta absorción de luz, sin embargo, esta es usada con baja eficiencia por el fotosistema. Esto implica que gran parte de la energía proveniente de los fotones no entra en la cadena transportadora de electrones y debe ser perdida como fluorescencia o calor, o contribuirá a un foto-daño que pueda causar foto-inhibición (Yarnold *et al.*, 2015). En la Figura 2.4 puede apreciarse la curva de enfriamiento no fotoquímico que produce la microalga como medio de protección ante la sobre saturación de fotones

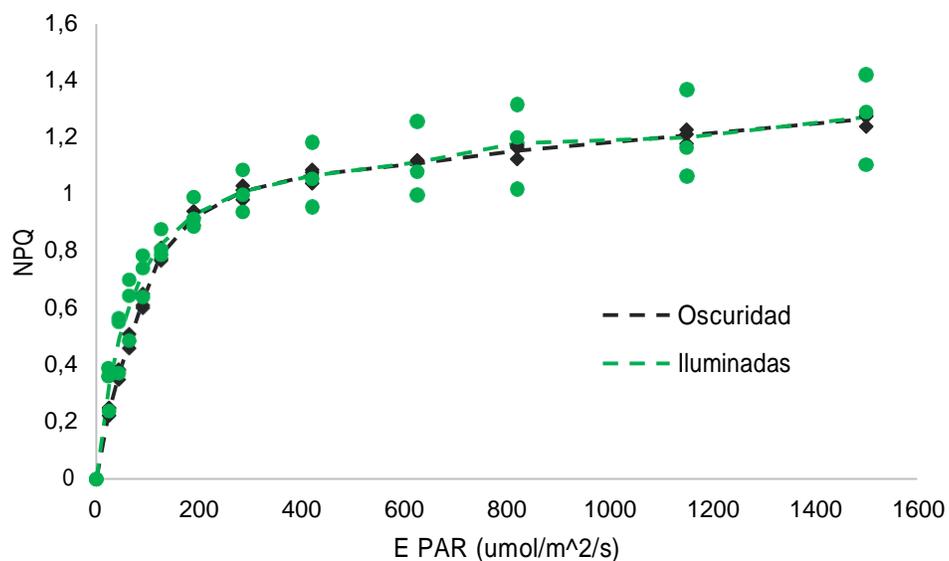


Figura 2.4. Curva de NPQ vs la irradiancia de células en oscuridad e iluminadas

Este mecanismo (NPQ) es esencial para proteger la célula contra un foto daño, al disipar la energía lumínica que excede la capacidad fotosintética (Eliers & Peeters, 1988; García *et al.*, 2012; Zonneveld, 1998). En esta curva (Fig. 2.4) se puede observar que el incremento del mecanismo no fotoquímico para liberarse del exceso de fotones es muy similar en las células en oscuridad y las iluminadas, en donde se exhibe un NPQ relativamente alto a intensidades bajas ($< 200 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$). Esto sugiere un rápido cambio en el pH luminal tilacoide en las transiciones de oscuridad a luz, y se ha demostrado que cultivos con gradientes lumínicos moderados son esenciales para el buen desarrollo de plantas y algas (Tikkanen *et al.*, 2012).

En este caso los cultivos iluminados se encuentran constantemente en fluctuaciones lumínicas con ciclos de luz/oscuridad en escalas de tiempo de segundos a minutos, de lo cual se ha reportado un rendimiento bajo en la productividad del cultivo (Barbosa *et al.*, 2003; Janssen *et al.*, 1999, 2000; Sforza *et al.*, 2012), debido a la fotoinhibición bajo altos flujos de fotones y la foto-limitación en zonas oscuras. Esto puede explicar el comportamiento similar que ocurre con el NPQ en los cultivos con y sin iluminación, ya que los cultivos iluminados pasan tiempo en zonas foto-limitadas, así los mecanismos de protección están continuamente activándose para evitar un daño en el fotosistema por un exceso de fotones, y a su vez están continuamente adaptando su aparato fotosintético para el procesamiento eficiente de fotones, lo que resulta en un rETR mayor que en los cultivos sometidos a oscuridad, e igual tasa NPQ que estos.

2.4.3 Propiedades Ópticas

Los resultados obtenidos bajo el experimento descrito en la Ilustración 2.1, pueden observarse en la Tabla 2.3, en donde puede apreciarse la disminución de intensidad lumínica, al aumentar o disminuir la concentración celular del cultivo o la columna de líquido entre la fuente y el detector.

Tabla 2.3. Intensidades locales dependientes de la Cb y L

Io = 47.5 (W m⁻²)	Concentración celular (Cb. g m⁻³)				
Longitud (m)	2000	1400	750	372	178
0.01	13.80	17.50	27.00	34.00	38.00
0.02	4.60	7.10	14.70	23.70	35.50
0.03	1.30	2.80	7.90	18.00	30.20
0.04	0.40	1.40	5.30	13.50	26.80
0.05	0.16	0.54	3.00	10.40	23.60
0.06	0.07	0.34	2.00	8.60	21.30

La variabilidad en las propiedades del cultivo tales como concentración celular y profundidad, puede afectar los coeficientes de absorción y dispersión lumínica en la región PAR, los cuales, influyen directamente la cantidad de luz que viaja a través del cultivo. La unificación de los dos coeficientes da como resultado un coeficiente de extinción global másico, el cual, al ser un parámetro intrínseco del cultivo en suspensión, su valor no depende de factores externos al cultivo. En la Figura 2.5 puede observarse la caída de la intensidad lumínica que experimenta un haz de luz dependiendo de la concentración del cultivo y la longitud atravesada desde la superficie.

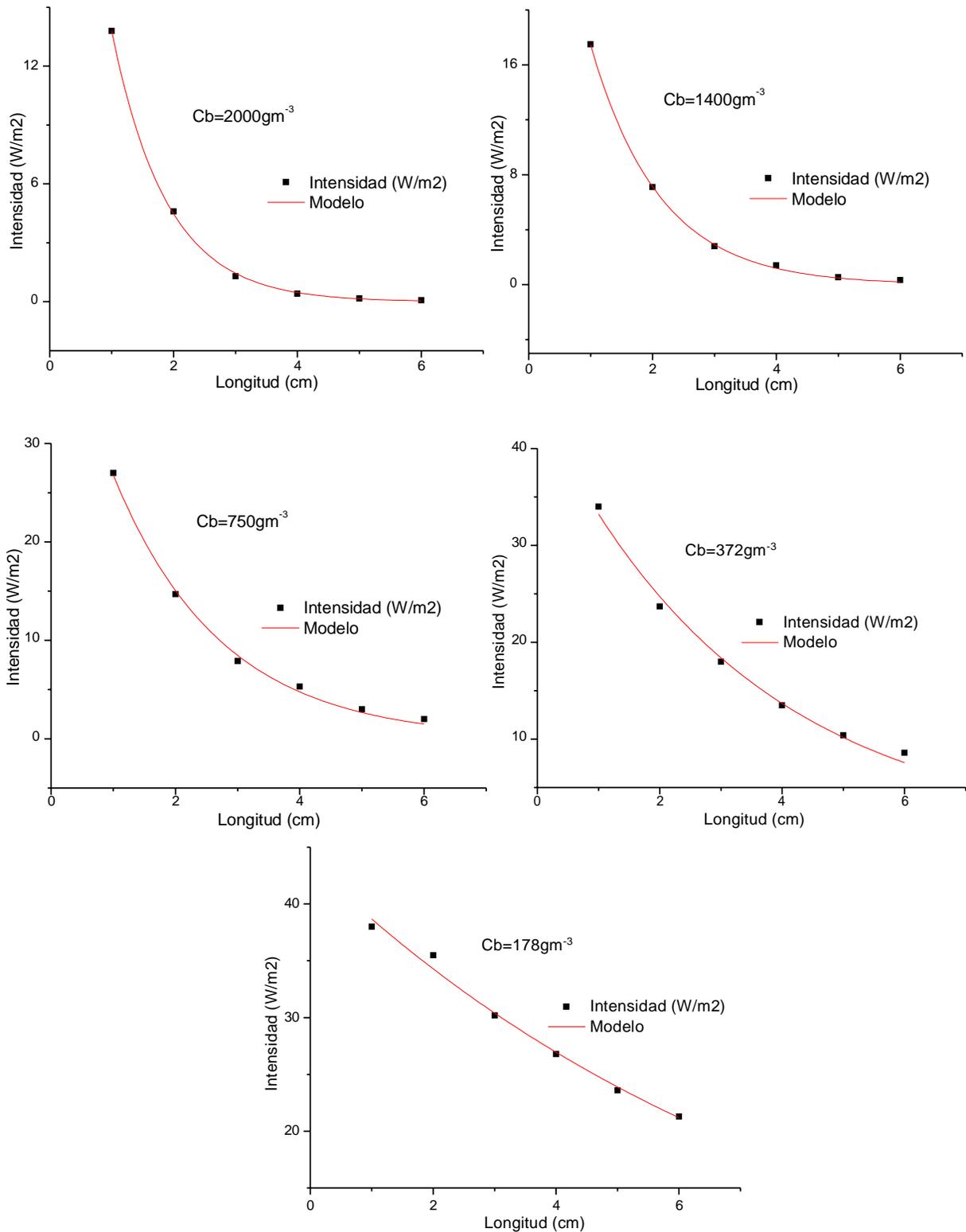


Figura 2.5. Curvas de atenuación lumínica para diferentes concentraciones del cultivo

En las gráficas presentadas puede observarse que los datos de las curvas se ajustan a la ecuación exponencial de Lambert-Beer en donde cada ajuste dio un valor $(\text{Prob}>F) < 0.05$, lo que indica que

el modelo se ajusta a los datos experimentales con una nivel de confianza de 95% (Tabla 2.4), en donde las caídas de intensidad más pronunciadas se ven en los cultivos que poseen mayor concentración celular ($C_b=2000$ y 1400 gm^{-3}) y los cultivos de menor concentración celular poseen una tendencia más lineal.

Tabla 2.4. Análisis de varianza (ANOVA)

Cb=2000gm⁻³		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Intensidad	Regression	2	213,43703	106,71851	9819,59	6,21827E-8
	Residual	4	0,04347	0,01087		
	Uncorrected Total	6	213,4805			
	Corrected Total	5	144,59568			
Cb=1400gm⁻³		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Intensidad	Regression	2	366,78528	183,39264	8954,46	7,47736E-8
	Residual	4	0,08192	0,02048		
	Uncorrected Total	6	366,8672			
	Corrected Total	5	220,05013			
Cb=750gm⁻³		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Intensidad	Regression	2	1047,45216	523,72608	1841,12	1,76365E-6
	Residual	4	1,13784	0,28446		
	Uncorrected Total	6	1048,59			
	Corrected Total	5	450,58833			
Cb=372gm⁻³		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Intensidad	Regression	2	2403,13311	1201,56655	1642,10	2,21609E-6
	Residual	4	2,92689	0,73172		
	Uncorrected Total	6	2406,06			
	Corrected Total	5	454,85333			
Cb=178gm⁻³		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Intensidad	Regression	2	5343,09374	2671,54687	5122,16	2,28391E-7
	Residual	4	2,08626	0,52157		
	Uncorrected Total	6	5345,18			
	Corrected Total	5	217,65333			

Resultados similares fueron reportados por Singh y colaboradores (Singh *et al.*, 2018) en donde las caídas de luz frente a un cultivo de *Botryococcus braunii* a través de los días, mostraba que a

medida que la concentración celular aumentaba en el cultivo, las curvas de intensidad respecto a la distancia cambiaban de una disminución casi lineal, a una disminución exponencial. Resultados similares fueron reportados por Gao y colaboradores (Gao *et al.*, 2017) en donde la distribución lumínica en un cultivo de *Haematotoccus pluvialis*, poseía una caída exponencial en la intensidad lumínica, ajustándose adecuadamente a la ley de Lambert-Beer. En ese estudio el experimento realizado se basó en la medida de la caída de la intensidad lumínica de varios cultivos a diferentes concentraciones celulares a una misma distancia, con lo que teóricamente se podría despejar fácilmente el coeficiente de extinción de la ecuación de Lambert-Beer, pero bajo estas condiciones experimentales el problema resulta al no tener en cuenta la dispersión lumínica que generan las células al cambiar la longitud del paso de la luz, por lo que varias expresiones empíricas dentro de las cuales se encuentra un modelo hiperbólico basado en la ley de Lambert-Beer utilizado en ese estudio, han sido desarrollados para tener en cuenta la dispersión lumínica de las especies (Ación *et al.*, 1997).

En este caso el desarrollo experimental basado en la medida de varias concentraciones celulares relacionado con múltiples distancias de medida, permite minimizar el error en el cálculo de un coeficiente extinción másico que relacione los coeficientes de absorción y dispersión, y pueda explicar para este cultivo en específico el comportamiento de la luz a través del cultivo.

El resumen del ajuste de la ley de Lambert-Beer a los datos recolectados en el experimento (Tabla 2.5), muestran que las concentraciones mayores son las que poseen una mayor representación de los datos con R^2 mayores a 0.99.

Tabla 2.5. Resumen de los datos estadísticos

Modelo	a		b		Statistics		
	Value	Error	Value	Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. Square	R-
$y = a \cdot \exp(b \cdot x)$							
Cb=2000gm⁻³	42,62751	0,98644	-1,12636	0,0197	0,01087	0,99962	
Cb=1400gm⁻³	42,78543	0,84642	-0,89511	0,01526	0,02048	0,99953	
Cb=750gm⁻³	47,62697	1,63019	-0,57582	0,0206	0,28446	0,99684	
Cb=372gm⁻³	44,67829	1,46526	-0,29577	0,01347	0,73172	0,99196	
Cb=178gm⁻³	43,62868	0,86529	-0,12039	0,00609	0,52157	0,98802	

En la Figura 2.6 y la Tabla 2.6 se encuentra la representación y los coeficientes dados por $y = a \cdot \exp(b \cdot x)$ frente a la concentración de biomasa (x) la cual da como resultado una línea recta de pendiente $\ln(a) \cdot b$, las cuales pueden verse en la Tabla 6.

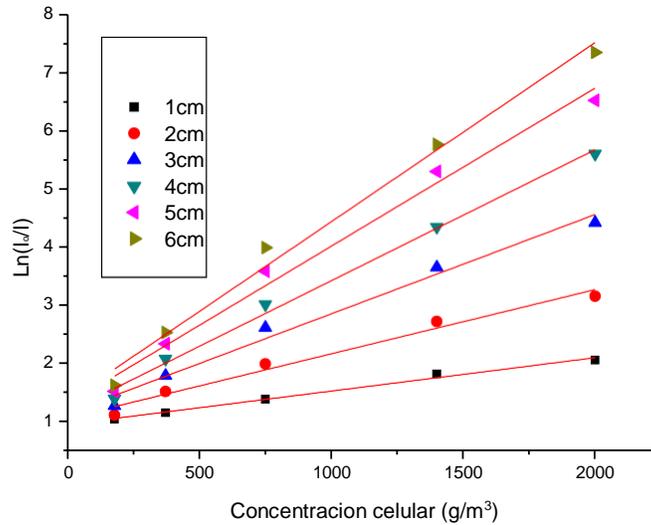


Figura 2.6. Gráfico de líneas que muestra el coeficiente de extinción másico del cultivo en suspensión en función de la concentración celular para diferentes espesores de luz.

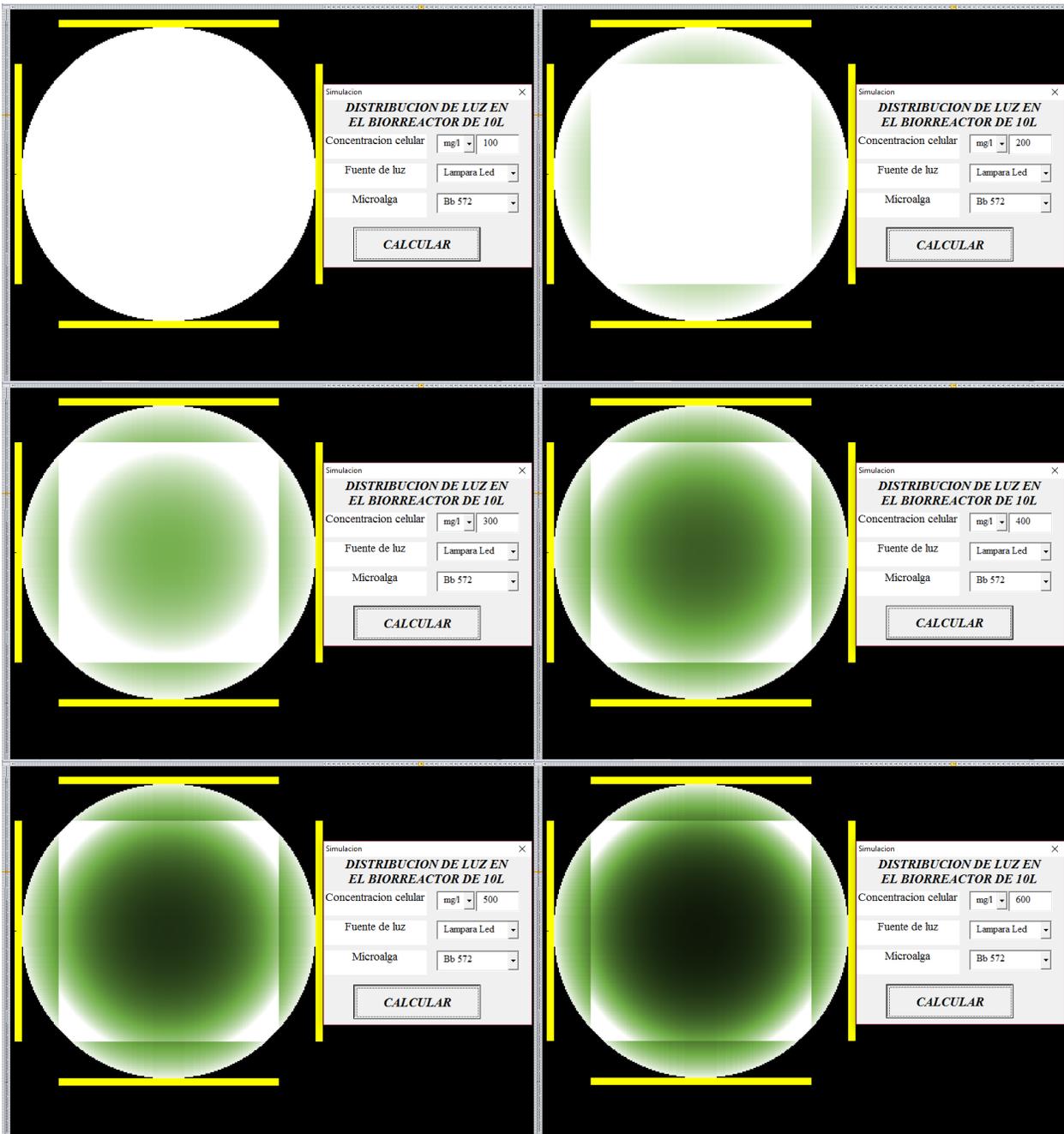
Tabla 2.6. Resumen del coeficiente de extinción másico del cultivo en suspensión

L (m)	Pendiente (m ² g ⁻¹)	Promedio	Desvest
0.01	0.00057253	0.057253128	0.9918
0.02	0.00110324	0.055162156	0.9787
0.03	0.00170559	0.056852987	0.9851
0.04	0.00224985	0.056246342	0.9942
0.05	0.00271424	0.054284893	0.9873
0.06	0.00307738	0.051289606	0.9897
		Promedio	Desvest
		0.055181519	0.00219866

Los resultados al despejar las pendientes de las líneas rectas, da como resultados un coeficiente de extinción másico $\mu_{\text{ext}} = 0.055 \pm 0.0021 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, que minimiza el error presentado por el efecto de dispersión y absorción al variar el camino óptico del haz de luz, el cual puede usarse para la distribución lumínica en el reactor usando la Ecuación 2.9.

2.4.4 Distribución lumínica en biorreactor de 10L

La anterior ecuación de distribución lumínica es aplicada en una simulación del biorreactor de 10L aumentando su concentración celular desde 0.1 gL^{-1} hasta 1 gL^{-1} , cuando se usan 4 lámparas planas para iluminarlo desde 4 puntos rectos con una intensidad de 958.3 W m^{-2} , dando como resultado una zona con intensidad de saturación (Zona blanca), área fotoinhibida dentro del cultivo iluminada con menos de 820 W m^{-2} (Zona Verde), y la zonas de oscuridad (Zona negra).



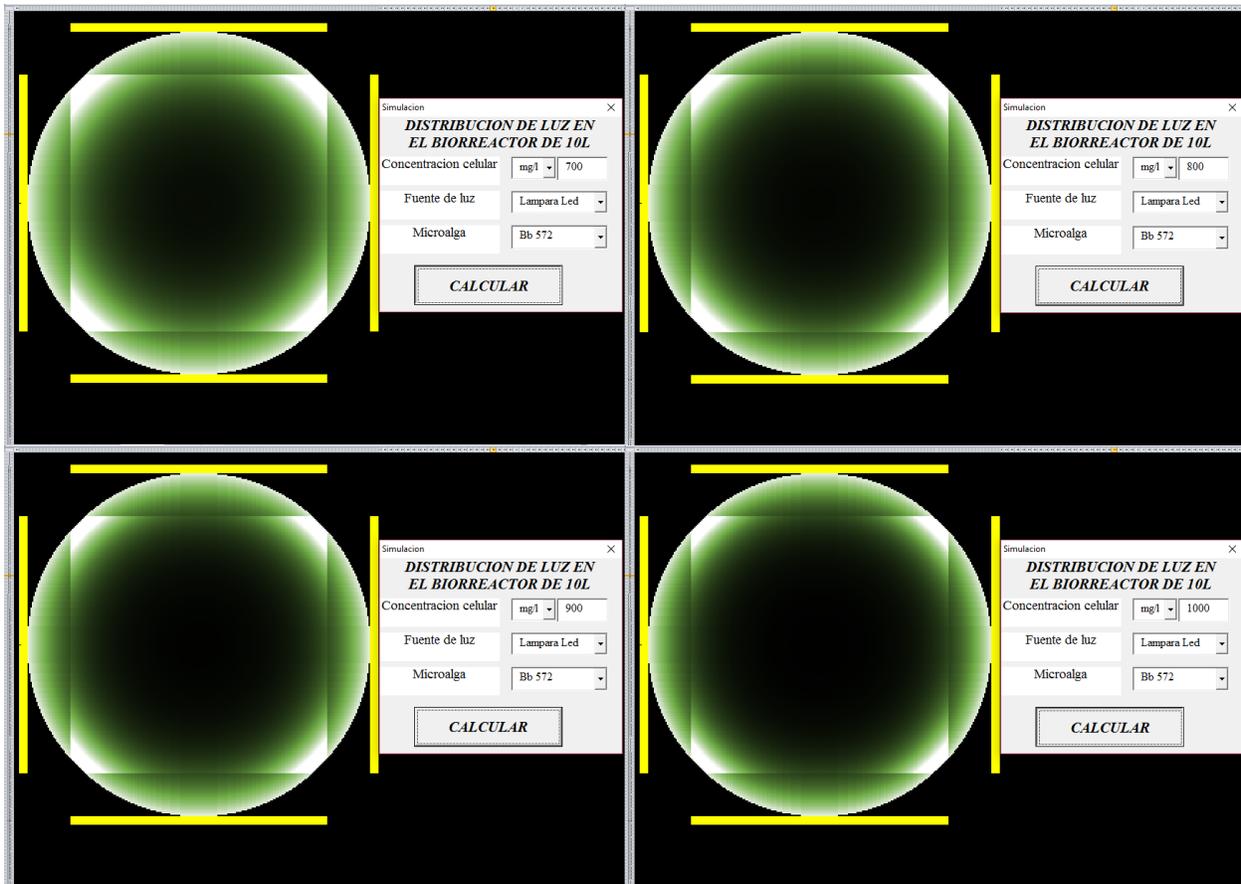


Ilustración 2.5. Simulación del reactor de 10L

En el primer recuadro de la Ilustración 2.5, puede observarse que a una concentración de cultivo de 100mgL^{-1} la luz incidente atraviesa completamente el cultivo, quedando iluminada toda el área del biorreactor con un flujo de fotones que asegura la saturación del aparato fotosintético de *Botryococcus braunii*. A medida que vamos aumentando la concentración del cultivo, el área de fotoinhibición ($I < 820 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) va apareciendo en el centro del reactor aproximadamente a 300mgL^{-1} , manteniéndose una región fotolimitada, pero sin oscuridad hasta los 800mgL^{-1} aproximadamente. Después de 800mgL^{-1} el área oscura aumenta rápidamente, y el área fotoinhibida cubre casi la totalidad del reactor a una concentración de 1gL^{-1} , en donde pequeñas áreas cerca a la pared del reactor tienen una intensidad lumínica dentro del rango de saturación (8%), la mayor parte del área presenta una iluminación limitada (53%) y gran parte del reactor está en oscuridad total (39%).

De acuerdo con (Singh *et al.*, 2018) una alta concentración de biomasa a altas intensidades lumínicas, reducen la efectiva penetración de la luz dentro del foto-biorreactor, resultando en bajos

rendimientos de biomasa. Similares resultados son reportados por (Zijffers *et al.*, 2010) quienes explican que un incremento en la biomasa a altas intensidades lumínicas puede disminuir la eficiencia de la microalga en la utilización de la luz. Se ha resaltado que cultivos con una alta concentración celular seguidos de un buen proceso de mezclado, están sujetos a un flujo dinámico de luz, en los cuales las células están constantemente repitiendo un ciclo entre altas intensidades lumínicas y zonas oscuras donde domina la respiración (Yarnold *et al.*, 2015). Ciclos rápidos luz/oscuridad en escalas de tiempo de milisegundos, resultan en el efecto “flashing light” el cual puede mejorar la eficiencia fotosintética (Grobbelaar *et al.*, 1996; Kok, 1956; Sforza *et al.*, 2012). En el caso del cultivo simulado en el biorreactor de 10L, los ciclos luz/oscuridad son de tiempos mayores dependiendo de la velocidad de agitación del cultivo, en donde se ha encontrado en otras microalgas que ciclos menores a 12 segundos resultan en mejores productividades que ciclos mayores a este tiempo (Takache *et al.*, 2015).

2.5 CONCLUSIONES

Botryococcus braunii posee una gran capacidad para soportar altas intensidades lumínicas sin sufrir daños en su sistema fotosintético, que puedan conllevar a una fotoinhibición celular. Puede soportar una irradiancia de $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ permaneciendo su PSII en estado de saturación, sin observarse una pérdida de eficiencia debido a una fotooxidación. Las células adaptadas a intensidades altas de luz pueden soportar el doble de intensidad que las células adaptadas a oscuridad antes de llegar al punto de saturación.

La tasa de transporte electrónico de *Botryococcus braunii* se ve afectado directamente por las condiciones lumínicas del cultivo, la adaptación a condiciones de alta intensidad o de oscuridad se ve reflejada en el valor de la tasa máxima cuando el PSII está saturado, cuyo valor puede llegar a ser de hasta un 40% menor en células adaptadas a oscuridad. *Botryococcus braunii* demostró en este estudio, que posee eficientes mecanismos de foto-protección a través de vías no fotoquímicas de disipación de electrones, las cuales mantienen su efectividad sin importar el entorno de adaptación a altas intensidades o a la oscuridad, mostrando que las células adaptadas a la luz poseen una mayor eficacia en el transporte electrónico, así como en las vías de disipación del exceso de estos a altas intensidades.

La simulación de la distribución lumínica a través del reactor cilíndrico mostro la gran dificultad que presenta la luz para atravesar el un cultivo denso de *Botryococcus braunii*. Una alta

concentración celular de *Botryococcus braunii* reduce considerablemente la penetración efectiva de la luz, y hace que las zonas oscuras y fotolimitadas abarquen casi toda el área del reactor. Con una variación de la concentración del cultivo desde 0.1 hasta 1.0 gL⁻¹, el reactor pasa de estar bajo una intensidad de saturación total, a una con tan solo un 9% de saturación y 39% de oscuridad total.

2.6 REFERENCIAS

- Acien Fernández, F. G., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M., & Molina Grima, E. (1997). A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(5), 701–714. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970905\)55:5<701::AID-BIT1>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5<701::AID-BIT1>3.0.CO;2-F)
- Barbosa, M. J., Janssen, M., Ham, N., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2003). Microalgae cultivation in air-lift reactors: Modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 170–179. <https://doi.org/10.1002/bit.10563>
- Béchet, Q., Chambonnière, P., Shilton, A., Guizard, G., & Guieysse, B. (2015). Algal productivity modeling: A step toward accurate assessments of full-scale algal cultivation. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(5), 987–996. <https://doi.org/10.1002/bit.25517>
- Béchet, Q., Shilton, A., & Guieysse, B. (2013). Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1648–1663. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014>
- Beer, S., Vilenkin, B., Weil, A., Veste, M., Susel, L., & Eshel, A. (1998). Measuring photosynthetic rates in seagrasses by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Marine Ecology Progress Series*, 174, 293–300. <https://doi.org/10.3354/meps174293>
- Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M., & Malcata, F. X. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1275–1288. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8>
- Demmig Adams, B., & Adams, W. (1992). Photoprotection and Other Responses of Plants to High

- Light Stress. *Plant Physiology*, 43, 599–626.
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R., & Karube, I. (1995). Photobiological aspects of algal mass culture. *Journal of Marine Biotechnology*, 2, 61–65.
- Eliers, P., & Peeters, J. (1988). A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling*, 42(3–4), 199–215.
- Falkowski, P. G., & LaRoche, J. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. *Phycology*, 27(1), 8–14.
- Gao, X., Wang, X., Li, H., Roje, S., Sablani, S. S., & Chen, S. (2017). Parameterization of a light distribution model for green cell growth of microalgae: *Haematococcus pluvialis* cultured under red LED lights. *Algal Research*, 23, 20–27. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.018>
- García Camacho, F., Sánchez Mirón, A., Molina Grima, E., Camacho Rubio, F., & Merchuck, J. C. (2012). A mechanistic model of photosynthesis in microalgae including photoacclimation dynamics. *Journal of Theoretical Biology*, 304, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.03.021>
- Glemser, M., Heining, M., Schmidt, J., Becker, A., Garbe, D., Buchholz, R., & Bruck, T. (2016). Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1077–1088.
- Grobbelaar, J. U., Nedbal, L., & Tichý, V. (1996). Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 8(4–5), 335–343. <https://doi.org/10.1007/BF02178576>
- Hermesmeier, D., Mala, E., Schulz, R., Thielmann, J., Galland, P., & Senger, H. (1991). Antagonistic blue- and red-light regulation of cab-gene expression during photosynthetic adaptation in *Scenedesmus obliquus*. *Photochemistry and Photobiology*, 11(2), 189–202.
- Horton, P., Ruban, A. V., & Walters, R. G. (1994). Regulation of Light Harvesting in Green Plants'

- Indication by Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence. *Plant Physiol*, 106(1 994), 41–5.
- Janssen, M., Janssen, M., De Winter, M., Tramper, J., Mur, L. R., Snel, J., & Wijffels, R. H. (2000). Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light/dark cycles. *Journal of Biotechnology*, 78(2), 123–137. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00233-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00233-3)
- Janssen, M., Kuijpers, T. C., Veldhoen, B., Ternbach, M. B., Tramper, J., Mur, L. R., & Wijffels, R. H. (1999). Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light/dark cycles: 13-87 s. *Progress in Industrial Microbiology*, 35(C), 323–333. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80124-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80124-6)
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L. R., & Wijffels, R. H. (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(2), 193–210. <https://doi.org/10.1002/bit.10468>
- Kok, B. (1956). Photosynthesis in flashing light. *Biochimica et Biophysica Acta*, 21, 245–258.
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2014). Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, 66, 204–213. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.010>
- Luciński, R., & Jackowski, G. (2006). The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II. *Acta Biochimica Polonica*, 53(4), 693–708.
- Mitchell, D. (2008). A Note on Rising Food Prices. Policy Research Working Paper. *World Bank*, Washington, DC, 4682.
- Muller-Feuga, A., Le Guédes, R., & Pruvost, J. (2003). Benefits and limitations of modeling for optimization of *Porphyridium cruentum* cultures in an annular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 103(2), 153–163. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00100-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00100-7)
- Pospíšil, P. (2009). Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(10), 1151–1160.

<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.05.005>

Rudiger, W., & Lopez-Figueroa, F. (1992). Photoreceptors in algae. *Photochemistry and Photobiology*, 55(6), 949–954.

Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: Challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.005>

Sforza, E., Simionato, D., Giacometti, G. M., Bertucco, A., & Morosinotto, T. (2012). Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038975>

Singh Khichi, S., Anis, A., & Ghosh, S. (2018). Mathematical modeling of light energy flux balance in flat panel photobioreactor for *Botryococcus braunii* growth, CO₂ biofixation and lipid production under varying light regimes. *Biochemical Engineering Journal*, 134, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.001>

Takache, H., Pruvost, J., & Marec, H. (2015). Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in conditions representative of photobioreactor cultivation. *Algal Research*, 8, 192–204. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.009>

Thimijan, R. W., & Heins, R. D. (1983). Photometric, radiometric, and quantum light units of measure: a review of procedures for interconversion. *HortScience*, 18(12), 818–822.

Tikkanen, M., Grieco, M., Nurmi, M., Rantala, M., Suorsa, M., & Aro, E. (2012). Regulation of the photosynthetic apparatus under fluctuating growth light. *Biological Science*, 1608, 3486–3493.

Triantaphylides, C., Krischke, M., Hoeberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., ... Mueller, M. J. (2008). Singlet Oxygen Is the Major Reactive Oxygen Species Involved in Photooxidative Damage to Plants. *Plant Physiology*, 148(2), 960–968. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125690>

- Vass. (2012). Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817(1), 209–217.
- Vieira Costa, J. A., Linde, G. A., Pires Atala, D. I., Martinez Mibielli, G., & Trapp Kruger, R. (2000). Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16(1), 15–18.
- Yan, C., Muñoz, R., Zhu, L., & Wang, Y. (2016). The effects of various LED (light emitting diode) lighting strategies on simultaneous biogas upgrading and biogas slurry nutrient reduction by using of microalgae *Chlorella* sp. *Energy*, 106, 554–561.
<https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.03.033>
- Yan, C., Zhu, L., & Wang, Y. (2016). Photosynthetic CO₂ uptake by microalgae for biogas upgrading and simultaneously biogas slurry decontamination by using of microalgae photobioreactor under various light wavelengths, light intensities, and photoperiods. *Applied Energy*, 178, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.06.012>
- Yarnold, J., Ross, I. L., & Hankamer, B. (2015). Photoacclimation and productivity of *Chlamydomonas reinhardtii* grown in fluctuating light regimes which simulate outdoor algal culture conditions. *Algal Research*, 13, 182–194. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.001>
- Zijffers, J. W. F., Schippers, K. J., Zheng, K., Janssen, M., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2010). Maximum Photosynthetic Yield of Green Microalgae in Photobioreactors. *Marine Biotechnology*, 12, 708–718. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9258-2>
- Zonneveld, C. (1998). Photoinhibition as affected by photoacclimation in phytoplankton: A model approach. *Journal of Theoretical Biology*, 193(1), 115–123.
<https://doi.org/10.1006/jtbi.1998.0688>

CAPITULO 3

PRODUCCIÓN EN LOTE Y EN CONTINUO DE *Botryococcus braunii* A ESCALA DE BIORREACTOR DE 10L

3.1 RESUMEN

La producción de microalgas como una fuente de energía renovable para la producción de biocombustibles, toma cada vez más fuerza entre los científicos del planeta. Un aspecto crítico en la actualidad sobre el cultivo de microalgas específicamente en *Botryococcus braunii*, es el cuello de botella generado por el costo de producción de este organismo unicelular que va ligado al precio de los medios de cultivo y baja efectividad en el proceso de escalamiento. En muchas producciones estos medios de cultivo utilizan grandes cantidades de nutrientes que no son consumidos por completo por la microalga, resultando en producciones ineficientes y costosas. Los nutrientes usados en mayor cantidad en los cultivos y que influyen directamente el costo del medio son las sales de Nitrato (NO_3) y Fosfato (PO_4), macronutriente relacionados directamente con el crecimiento de las microalgas, los cuales son variados en las formulaciones de medios tales como el BG11 y el Chu 13. Estos medios son generalmente utilizados para diferentes tipos de microalgas, con una incertidumbre ligada a la inespecificidad de la formulación a una especie en particular. En la búsqueda de la optimización sobre los sistemas de producción, debe existir una formulación específica que se adapte a las necesidades de la especie cultivada, que minimice el impacto económico negativo que genera el uso indiscriminado de nutrientes, y que sea adaptable a sistemas de producción a escala más grande. En este capítulo, se enfocó en encontrar las mejores condiciones a escala de laboratorio para el crecimiento de *Botryococcus braunii*, integrando modelos de consumo y crecimiento para predecir el comportamiento de los cultivos, y ser usados a escala de biorreactor implementando sistemas en lote y en continuo. Los resultados obtenidos muestran que tanto el crecimiento de *Botryococcus braunii* como el consumo de nitrato se ajustaron adecuadamente al modelo logístico, explicando el comportamiento de los datos en un 99% con valores $P < 0.05$, concluyendo que el comportamiento de los datos puede ser simulados a través de las ecuaciones planteadas. Por otro lado, el modelo exponencial usado para formular la concentración de nitrato no tuvo un ajuste estadísticamente significativo sobre el comportamiento de los datos, pero logro predecir con base en los parámetros iniciales, el tiempo de agotamiento

exacto del nitrato. Los montajes en lote y en continuo realizados en el biorreactor de 10L, mostraron altas productividades de biomasa alcanzando $0.16 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, con la cual se obtuvieron 50g de biomasa en un tiempo de 28 días en el cultivo en lote y 106 g de biomasa en 60 días de cultivo en continuo. La producción de lípidos obtuvo valores significativos entre la literatura, con productividades que alcanzaron los $0.070 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, debido a rendimientos de 44.2% p/p de material lipídico. El sistema en continuo logro ser más adecuado para el cultivo, debido a que el proceso permite producir durante meses sin tener que gastar tiempos operacionales en el lavado, montaje, esterilización e inoculación, como si se deben tener en cuenta en el sistema en lote.

3.2 INTRODUCCIÓN

Como todos los organismos fotosintéticos, *Botryococcus braunii* requiere CO_2 , luz, nutrientes inorgánicos y agua para poder desarrollarse y crecer. La evaluación de diversos medios de cultivos aptos para el cultivo de *Botryococcus braunii* ha sido motivo de estudio por largo tiempo (Dayananda *et al.*, 2007) en los cuales los nutrientes que presentan principales variaciones son el nitrógeno y el fosforo. El nitrógeno normalmente administrado en forma de nitrato proveniente de sales inorgánicas de sodio y potasio, es el principal componente para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas durante el crecimiento (Dean *et al.*, 2010; Yeesang & Cheirsilp, 2011), así como el regulador más efectivo dentro del metabolismo secundario de la microalga (Peccia *et al.*, 2013) en donde su efecto sobre el crecimiento y acumulación de lípidos han sido intensivamente estudiados para cultivos en suspensión (Allen *et al.*, 2015; Dayananda *et al.*, 2006; González *et al.*, 2014; Lupi *et al.*, 1994; Peccia *et al.*, 2013). Se ha encontrado que la deficiencia de nitrógeno puede incrementar el contenido de lípidos (Singh & Kumar, 1992) y la concentración de ácido oleico (Choi *et al.*, 2011; Zhila *et al.*, 2005) en *B. braunii*. Por otro lado, se ha encontrado que altas concentraciones de nitrógeno en el medio, pueden inhibir la síntesis de hidrocarburos (Ohmori, Wolf, & Bassham, 1984). Se ha encontrado que algunas fuentes de nitrógeno pueden ser tóxicas para el cultivo, por ejemplo, el uso de NH_4 puede disminuir el pH a niveles peligrosamente bajos, causando daños permanentes a las células (Lupi *et al.*, 1994).

Por otro lado, el fosforo, está ligado a la estructura de las membranas celulares membranas y a la producción de energía (Nalewajko *et al.*, 1981). Una cantidad extra de P puede aumentar la producción de hidrocarburos producidos, esto no resulta de una concentración excesiva del nutrientes en el medio, sino de una disminución en la relación N:P (Casadevall *et al.*, 1985).

Adicionalmente, se sabe que *Botryococcus braunii* puede tomar rápidamente todo el fosfato disponible y almacenarlo intracelularmente para utilizarlo posteriormente (Casadevall *et al.*, 1985), lo que debe ser tenido en cuenta cuando se estudian la velocidad de consumo de nutrientes.

Las concentraciones adecuadas de los nutrientes que componen mayoritariamente el medio, son vitales para las producciones a gran escala de las microalgas, debido a que su uso irracional encarece el costo de producción del microorganismo, afectando negativamente la comercialización de los productos de interés. Hay diversas maneras de cultivar microorganismos con fines extractivos, en particular para microalgas existen 3 métodos comúnmente usados para su producción, los cuales están compuestos por procesos de cultivo en lote, continuo y semi-continuo, de los cuales solo se trabajaron los dos primeros en este trabajo.

El cultivo en lote, es el método más simple y común que existe para la producción de microalgas. En este sistema, una cantidad limitada de nutrientes contenida en el medio de cultivo es inoculada con una cantidad establecida de células en un recipiente, e incubado en condiciones favorables de luz y temperatura y una mezcla homogénea del cultivo es necesaria para asegurar el intercambio de nutrientes y gases. Normalmente se divide en 4 fases: Fase I, las células se encuentran una fase adaptación al medio, el crecimiento es casi nulo y normalmente tarda poco tiempo. Fase II, las células ya adaptadas comienzan rápidamente a consumir los nutrientes del medio y a crecer, es aquí donde las células presentan su máxima velocidad de crecimiento. Fase III, los nutrientes en el medio están casi agotados y no alimentan adecuadamente la alta concentración celular que se ha alcanzado, por lo que el crecimiento cesa y las células comienzan una fase de latencia. Fase IV, esta fase se conoce como la muerte celular, en donde las células en latencia han alargado su existencia al máximo antes de morir, debido a la escasez de nutrientes en el medio (Doran, 2013). El cultivo acaba cuando los nutrientes en el medio se han agotado y el crecimiento del microorganismo se ve limitado, por lo que se procede a cosechar lo producido y realizar de nuevo todo el proceso para un nuevo montaje

Por otro lado, la técnica de cultivo en continuo permite al organismo dentro del cultivo, permanecer en un estado de máxima velocidad de crecimiento proporcionando las condiciones adecuadas de cultivo, asegurando la producción continua de nuevas células. Los cultivos en continuo han probado excepcionalmente ser una herramienta útil para el estudio de las cinéticas de crecimiento, así como de la fisiología y bioquímica de las microalgas (Doran, 2013). En sistemas en continuo,

una cierta cantidad de medio fresco es añadida continuamente al recipiente, a una velocidad de flujo de alimentación exactamente igual a la aplicada al flujo de salida del cultivo, lo que se denomina tasa de dilución. Esta tasa permite que el cultivo permanezca en un estado estacionario, en donde los nutrientes dentro del cultivo, así como la concentración de biomasa se mantienen constantes a través del tiempo (Doran, 2013).

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Parámetros Iniciales

3.3.1.1 Velocidad Específica de Crecimiento

La velocidad específica de crecimiento (μ) es el parámetro que relaciona la concentración celular con el tiempo. Es una medida de la capacidad de generación de biomasa que tiene la unidad de d^{-1} . Es decir, mide la cantidad de gramos de biomasa que es capaz de generar cada gramo de biomasa en la unidad de tiempo. Es calculada a través de la siguiente ecuación

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right)}{t_2 - t_1} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

Donde X_1 y X_2 son las concentraciones celulares (g L^{-1}) a un tiempo t_1 y t_2 (d) respectivamente

3.3.1.2 Caracterización Elemental

El cultivo de *Botryococcus braunii* fue cosechado y sometido a centrifugación a 15000 g por 4 minutos descartando el sobrenadante y realizando 3 lavados para reducir el contenido de sales. La biomasa cosechada se liofilizó. *Botryococcus braunii* se analizó por triplicado en un equipo CHNSO LECO Truspec Micro, mediante el método ASTM D-5373-08 (2012). El análisis CHNSO se realizó a 1050°C en una atmosfera de helio y los resultados fueron reportados en base seca.

A partir de los resultados obtenidos respecto al contenido de carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno y azufre, se calculó la formula molecular de la biomasa $C_nH_mO_pN_qS_r$, asumiendo $n=1$ con las siguientes expresiones:

$$m = \frac{\%C \cdot \text{MM}_C}{\%H \cdot \text{MM}_H}, \quad r = \frac{\%C \cdot \text{MM}_C}{\%S \cdot \text{MM}_S} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

$$\mu = \frac{\% \cdot \text{g/L}}{\text{g/L} \cdot \%}, \quad \mu = \frac{\% \cdot \text{g/L}}{\text{g/L} \cdot \%} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

3.3.2 Cinéticas Experimentales

3.3.2.1 Establecimiento del Inoculo

Para determinar un inoculo propicio para obtener una mayor productividad dentro de los cultivos, se evaluaron diferentes concentraciones de inoculo en un montaje experimental con una duración de 21 días, usando un medio de cultivo estándar reportado para el cultivo de *Botryococcus braunii*. El experimento fue diseñado con un solo factor categórico (concentración del inoculo) y 6 niveles del factor (Tabla 3.1), con corridas por triplicado para un total de 18 unidades experimentales con un nivel de significancia del 5%.

El experimento tuvo en cuenta los siguientes parámetros iniciales

- Todos los experimentos fueron realizados simultáneamente en un agitador orbital a 100rpm
- La iluminación fue la misma para todos los ensayos con una intensidad de 30Wm^{-2}
- La fuente de carbono suministrada fue NaHCO_3 añadida al inicio del experimento a una concentración de 5gL^{-1} , para evitar errores con la dosificación del $\text{CO}_{2(g)}$

Tabla 3.1. Concentraciones celulares iniciales evaluadas en cultivos de *B. braunii*

Factor	Niveles					
Concentración celular inicial (g/L)	0,15	0,3	0,5	0,6	0,8	1,0

Para cada ensayo se realizó una cinética de crecimiento de 21 días, tiempo durante el cual se compara la productividad global $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ entre los diferentes niveles de inoculo (Ec. 3.4)

$$\mu = \frac{\text{g/L} - \text{g/L}}{\text{d}} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

3.3.2.2 Evaluación del Consumo de Nutrientes

El consumo de nutrientes fue evaluado a través de dos cinéticas experimentales realizadas por triplicado en las cuales se analizó la cantidad y velocidad de consumo que posee *B. braunii* sobre algunos nutrientes del medio reportado en la Tabla 3.2 (Andersen, 2005b)

Tabla 3.2. Medio BG11

Soluciones	g/L
NaNO3	1,5
K2HPO4	0,04
MgSO4.7H2O	0,075
CaCl2.2H2O	0,036
H3BO3	0,00286
MnSO4.H2O	0,00188
ZnSO4.7H2O	0,00022
Na2MoO4.2H2O	0,00039
CuSO4.7H2O	0,00008
CoCl2.6H2O	0,00004
Citrato Férrico de NH4	0,006
Ácido Cítrico	0,006
Na2EDTA.2H2O	0,001

Las cinéticas fueron llevadas a cabo por un tiempo de 21 días con una concentración inicial calculada en el numeral anterior. La fuente de carbono fue suministrada como CO₂ con alimentación diaria con pulsos de 1 minuto. En el muestreo de la cinética se monitoreo el crecimiento celular por peso seco y la concentración de los nutrientes NO₃ y PO₄ en el medio. De los compuestos mencionados en la Tabla 3.2, fueron seleccionados el nitrato y el fosfato debido a que son los que poseen el mayor efecto sobre la producción de biomasa (Barsanti & Gualtieri, 2006; Richmond, 2007).

3.3.2.3 Cinéticas de Consumo

En el presente capítulo se busca la implementación de un modelo que permita identificar el tiempo de duración del Nitrato durante la cinética de crecimiento, basándose en la concentración inicial de la microalga en el cultivo. Para esto se plantea un modelo simple, que permita formular un medio de cultivo que dependa de la concentración inicial (X_0) y el tiempo (t), con el objetivo de poder usar el modelo para predecir el tiempo de duración del NO₃ dependiendo de X_0 .

El modelo para formular el medio se desarrolla con las siguientes suposiciones:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad \frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y} \quad S = S_0 e^{-\mu t} \quad (3.5)$$

Resolviendo la integral queda:

$$X_0 = X + \frac{X_0}{K} (e^{Kt} - 1) \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

Dónde, X_0 es la concentración inicial de NO_3 (g L^{-1}), X es la concentración de NO_3 (g L^{-1}) a un tiempo t , X_0 es la concentración inicial del cultivo (g L^{-1}) a un $t = 0$, K es el rendimiento estequiométrico de biomasa a partir de NO_3 (g g^{-1}), t es el tiempo de duración del montaje (d^{-1}) y μ es la velocidad máxima de crecimiento (d^{-1}).

A partir del modelo se formulan 5 medios diferentes dependientes de la concentración del inóculo y el tiempo establecido de consumo, los cuales se evalúan mediante cinéticas de crecimiento y consumo realizadas en matraces de 500ml con un volumen de trabajo de 200ml, a 22°C, con una agitación de 100rpm y una iluminación constante de 30W/m² en la superficie. La fuente de carbono usada fue CO_2 puro administrado en pulsos 2 veces al día por 10 segundos durante la duración de la cinética. La toma de muestras se realizó 3 veces por semana a todos los experimentos, asegurándose que se tomara precisamente en los días predichos para el agotamiento del NO_3 . El fósforo en cada medio fue añadido de acuerdo a la relación molar presentada entre el nitrógeno (N) y el fósforo (P) en la fórmula molecular de la microalga. Todos los resultados de los experimentos fueron obtenidos de cultivos individuales, llevados a cabo por triplicado para asegurar que las tendencias de los datos y las relaciones observadas en los parámetros medidos del cultivo son reproducibles.

3.3.3 Modelo

Los modelos cinéticos que describen los procesos microbianos sobre un sustrato en particular suelen ser modelos no lineales, en donde a su vez se dificulta relativamente la estimación de sus parámetros. Aunque algunos modelos pueden ser linealizados, su uso es limitado debido al error asociado con la transformación de la variable dependiente, resultando en estimaciones poco precisas de los parámetros. Así, la regresión no lineal por medio de mínimos cuadrados es a menudo usada para estimar parámetros cinéticos a partir de expresiones no lineales. Los parámetros estimados a partir de la expresión cinética linealizada, puede ser usada como estimación inicial en la iteración de la regresión no lineal, usando un ajuste en la curva por mínimos cuadrados para ajustar el modelo desarrollado y estimar los parámetros (consumo de sustrato y producción de biomasa). El error entre los valores observados y predichos es minimizado estableciendo el número de iteraciones en el sistema. La herramienta “*Solver*” en el software *Microsoft office Excel 2016*®,

fue usada para estimar y evaluar los parámetros mediante el ajuste de los valores predichos por el modelo matemático sobre los datos experimentales. Cada experimento fue repetido 3 veces y los resultados fueron reportados como el promedio de sus valores. Para evaluar la precisión del modelo cinético, parámetros estadísticos como el coeficiente de correlación (Ec. 3.13) y la prueba de hipótesis a través de la distribución F (Ec. 3.12) fueron empleados.

El modelo planteado para el desarrollo del presente capítulo, es un modelo no estructurado ampliamente utilizado para describir el crecimiento de células microbianas a través de una ecuación logística, la cual usa un modelo independiente del sustrato (Vinayagam & Murty, 2015).

3.3.3.1 Biomasa

El modelo utilizado para explicar el crecimiento microalgal, se basa en un modelo de tipo logístico mostrado a continuación:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} x \left(1 - \frac{x}{x_{max}}\right) \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

Donde x es la concentración de biomasa ($g L^{-1}$), x_{max} es la máxima concentración de biomasa ($g L^{-1}$), μ_{max} es la velocidad máxima de crecimiento (d^{-1}) y t es el tiempo (d). La integración de la Ecuación 3.7 se describe a continuación con las condiciones iniciales de $x = x_0$ a una $t = 0$:

$$x = \frac{x_{max} x_0 e^{\mu_{max} t}}{\{1 - (x_0 / x_{max}) (e^{\mu_{max} t} - 1)\}} \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

3.3.3.2 Sustrato

El Nitrato fue utilizado como sustrato limitante para la producción de biomasa, el cual actúa como fuente de nitrógeno en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en las fases de división. La utilización del sustrato es usualmente representada por la siguiente ecuación:

$$-\frac{dx}{dt} = \mu \frac{x}{x_{max}} + m_s \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

Donde $\mu = \frac{1}{x_{max}}$, m_s es el coeficiente de mantenimiento (m_s). En este caso se hace la suposición de que todo el nitrógeno consumido es directamente utilizado para el crecimiento celular, debido a que la fuente de carbono (CO_2) es usada en exceso dentro del cultivo, haciendo que el nitrógeno sea utilizado para el crecimiento de la biomasa hasta su agotamiento, por lo que $\mu = 0$, quedando:

$$- \frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{dS}{dt} \quad (\text{Ecuación 3.10})$$

Sustituyendo la Ecuación 3.10 en la Ecuación 3.7 e integrando con las condiciones iniciales ($X = X_0$, a un $t = 0$), tenemos que:

$$X = X_0 - \frac{X_0}{\mu} \left(\frac{1 - \left(\frac{dS}{dt} \right)}{1 - \left(\frac{dS}{dt} \right)} - 1 \right) \quad (\text{Ecuación 3.11})$$

3.3.3.3 Análisis Estadístico

La validación estadística del ajuste del modelo se realizó sujeta a la prueba F, la cual es una distribución continua de muestreo de la relación de dos variables aleatorias independientes con distribuciones chi-cuadrada, cada una dividida entre sus grados de libertad.

Se plantea la siguiente hipótesis:

H₀: Los datos experimentales se ajustan estadísticamente al modelo planteado

H_a: Los datos experimentales No se ajustan estadísticamente al modelo planteado

$$F_{\text{calculada}} = \frac{\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / (n - 2)}{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (\text{Ecuación 3.12})$$

Donde X_i , \hat{Y}_i y \bar{Y}_i son los valores experimentales, calculados y promediados respectivamente de biomasa (X) o sustrato (S); $(n - 2)$ y $n(n - 1)$ son los grados de libertad del numerador y denominador respectivamente con $n = \#$ muestreos y $r = \#$ replicas

La $F_{\text{calculada}}$ se compara con la F_{tabla} (Ver Anexo) tomada directamente de la tabla de distribución estadística F 0.05. Para cada uno de los experimentos el valor F_{tabla} varía según el número de muestreos (n) y replicas (r), para el cual se calcula los grados de libertad del numerador $(n - 2)$ y del denominador $n(r - 1)$.

Si $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tabla}}$ se **ACEPTA H₀**, y se concluye que el modelo representa la distribución de los datos experimentales con un nivel de confianza de 95%, caso contrario $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tabla}}$ se **RECHAZA H₀**, y se concluye que el modelo **NO** representa la distribución de los datos experimentales

El coeficiente de correlación R^2 es calculado a través del cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson:

$$R^2 = \frac{(\sum_{i=1}^n \hat{y}_i \bar{y}_i)^2}{(\sum_{i=1}^n \hat{y}_i^2)(\sum_{i=1}^n \bar{y}_i^2)} \quad (\text{Ecuación 3.13})$$

Donde $\sum_{i=1}^n \hat{y}_i \bar{y}_i$ es la covarianza de (\hat{y}_i, \bar{y}_i) , $\sum_{i=1}^n \hat{y}_i^2$ es la desviación estándar de los valores calculados y $\sum_{i=1}^n \bar{y}_i^2$ es la desviación estándar del promedio de los valores experimentales. El Esquema 3.1, muestra el diagrama de flujo de la secuencia del proceso de Modelamiento matemático, análisis de regresión y validación del modelo planteado.

3.3.4 Cultivo en Reactor

Los resultados obtenidos en las cinéticas experimentales llevadas a cabo con volúmenes de trabajo de 200 ml, fueron la base para el escalado a volúmenes mayores, utilizando el análisis de los resultados para lograr igualar o mejorar las productividades al aumentar el volumen de trabajo. Con la elección del medio químicamente definido para el cultivo de *Botryococcus braunii*, los montajes experimentales del cultivo en biorreactor en lote y continuo fueron llevados a cabo en un reactor de tanque agitado con un volumen de trabajo de 10L, con una agitación constante de 100rpm a través de una turbina de flujo axial tipo *pitch blade*. La composición del gas suministrado fue automatizado a través de la estación *New Brunswick Bioflo Celligen 310* con programación en cascada a un flujo constante de 0.5L min^{-1} , estableciendo el pH como parámetro a controlar, en donde la mezcla de CO_2 y aire varía automáticamente para mantenerlo en un valor de pH 8 el cual esta reportado que favorece el crecimiento de *Botryococcus braunii* (Belcher, 1968). La iluminación fue aportada por 4 lámparas *Life LED W120LDG 18W* para un flujo de fotones de $958.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por cada lámpara.

3.3.4.1 Cultivo en Lote

Un cultivo en lote es un sistema cerrado iniciado por la inoculación de un microorganismo bajo ciertas condiciones ambientales (abierto o cerrado). En el cultivo en lote, medio fresco es añadido al inicio del proceso sin ser añadido ningún tipo de nutriente durante el tiempo del cultivo y durante todo el periodo el cultivo es mezclado a velocidad constante. Se realizó el montaje con la microalga *Botryococcus braunii* a una concentración inicial de 0.5g L^{-1} , un flujo de gases de 0.5L min^{-1} , y una mezcla de CO_2 – Aire automatizado para mantener un pH constante de 8, en un biorreactor

Bioflo 310 Celligen. La cuantificación de nutrientes y biomasa se realizó según la metodología descrita en los apartados 1.8.2, 1.8.3 y 1.8.4.

3.3.4.2 Cultivo en Continuo

Con la elección del medio químicamente definido se cultivó *Botryococcus braunii* en biorreactor de 14L con un volumen de trabajo de 10L en modo estacionario. Para seleccionar la tasa de dilución se tuvo en cuenta la máxima velocidad de crecimiento obtenida en lote, y de este valor se tomó el 90%, donde la máxima tasa de dilución (D_{max}) corresponde a la velocidad específica de crecimiento del microorganismo y la cual establece el tiempo de residencia (τ). Estos parámetros están relacionados de la siguiente forma:

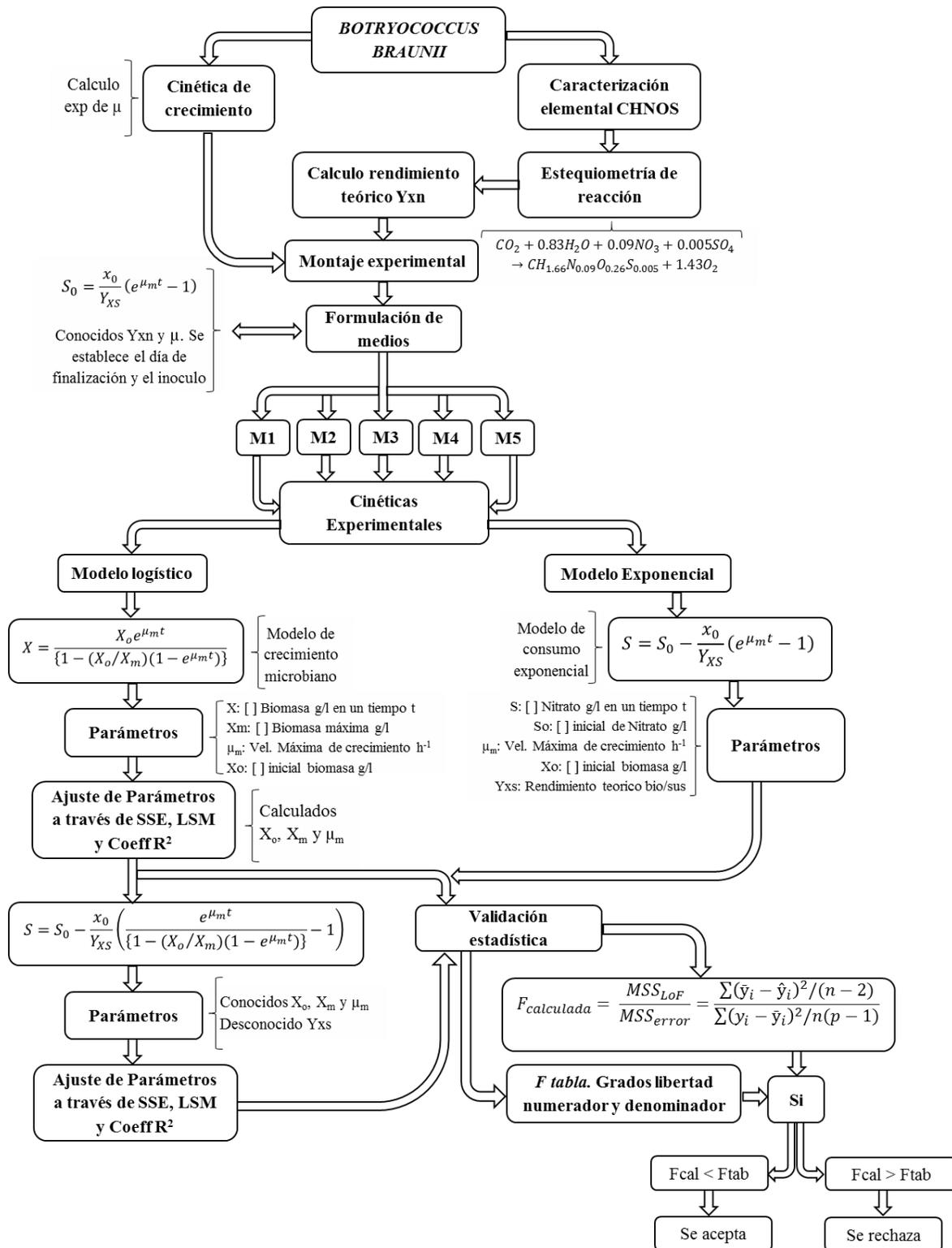
$$D_{max} = \frac{1}{\tau} = \frac{\mu_{max}}{\tau} \quad \therefore \quad \tau = \frac{1}{D_{max}} \quad \mu_{max} = 0.9 \mu_{max} \quad \text{Eq. 3.14}$$

Donde Q es el caudal volumétrico de entrada del medio de alimentación y de salida de medio de cultivo con células libres y V es el volumen de trabajo del reactor.

El sistema se operó en lote por un periodo de 6 días antes de iniciar la operación en continuo. El flujo de entrada de medio se hace mediante una manguera masterflex estéril, conectada a una bomba peristáltica que garantiza un flujo constante de trabajo; el flujo de salida es automatizado a través de un sensor de nivel puesto en la superficie del líquido en el reactor, el cual al ser sumergido activa una bomba peristáltica de salida, la cual remueve el volumen necesario para mantener solo la punta del sensor sumergida. El tiempo de residencia del proceso fue el correspondiente a la tasa de dilución evaluada (0.1 d^{-1}). La toma de muestras se realizó aleatoriamente a través del tiempo, hasta alcanzar notar variaciones grandes en el estado estacionario o alcanzar 50 días de cultivo.

3.3.4.3 Viabilidad del Microorganismo

La viabilidad celular de *Botryococcus braunii* durante el montaje en continuo se valoró al inicio y al final del cultivo después de 68 días en total, a través del protocolo de viabilidad celular estipulado en el Capítulo 1 numeral 8.5, para determinar si la viabilidad celular había disminuido a través del tiempo.



Esquema 3.1. Diagrama de flujo de la secuencia del proceso de Modelamiento matemático, análisis de regresión y validación del modelo planteado

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Determinación del Inoculo

Los resultados de las cinéticas experimentales, para estudiar el crecimiento y la productividad de *Botryococcus braunii* dependiendo de la concentración inicial del cultivo, pueden ser observados en la Figura 3.1.

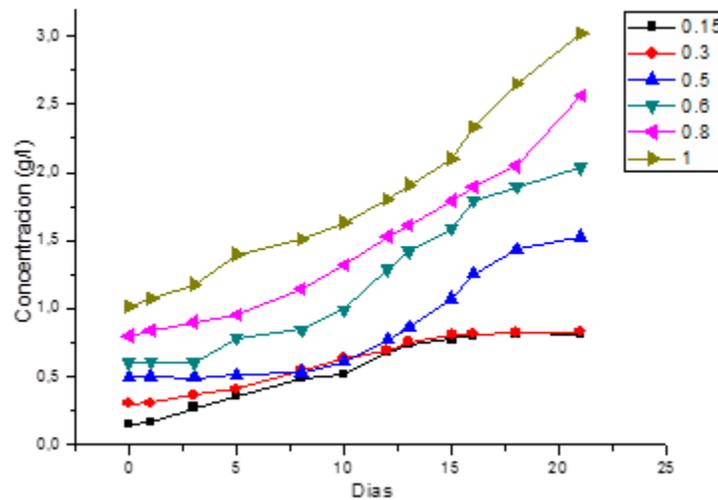


Figura 3.1. Concentración de biomasa a través del tiempo.

Estos resultados muestran, que el crecimiento de *Botryococcus braunii* posee tendencias diferentes al variar su variar la concentración inicial del cultivo. En concentraciones entre 0.15 – 0.5 gL⁻¹, se observa un tiempo de adaptación inicial antes de comenzar el crecimiento, resultado el cual está ausente en concentraciones iniciales entre 0.6 – 1.0 gL⁻¹, en donde el crecimiento microalgal comienza inmediatamente a partir del primer día de cultivo. En la ANOVA (Tabla 3.3) puede observarse que al menos uno de los niveles del experimento tiene resultados estadísticamente diferentes a los demás tratamientos en cuanto a la productividad del cultivo (Ecn 3.4), en donde se tiene un valor P<0.05.

Tabla 3.3. ANOVA de los niveles del factor

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr (>F)
Inoculo	5	0,012164	0,0024329	108,5	1,47e-09***
Residuals	12	0,000269	0,0000224		
Signif. codes:	0*** 0,001** 0,01* 0,05 . 0,1 " 1				

El análisis de varianza en este caso, es el soporte estadístico para determinar si el nivel donde se obtuvo una mayor productividad difiere de los demás significativamente. Los valores de productividad (Tabla 3.4) muestran valores muy similares por los reportados por Gouveia (Gouveia

et al., 2017), en donde se estudió la productividad de biomasa, contenido de hidrocarburos y carbohidratos en 16 cepas diferentes de *Botryococcus braunii*. Cepas con alta productividad llegaban a 0.18 gL⁻¹d⁻¹, mientras que el promedio se encontraba entre 0.07-0.10 gL⁻¹d⁻¹. Los resultados indican que la velocidad de crecimiento, se ve favorecida con el inoculo más bajo, lo cual resulta conveniente para cultivos en continuo debido a una mayor disponibilidad de la luz e incremento de la eficiencia del sistema fotosintético.

Tabla 3.4. Velocidad específica de crecimiento y productividad de *Botryococcus braunii*

Inoculo	0,15 g L⁻¹	0,3 g L⁻¹	0,5 g L⁻¹	0,6 g L⁻¹	0,8 g L⁻¹	1 g L⁻¹
μ (d⁻¹)	0,08054	0,04746	0,05323	0,05790	0,05555	0,05202
Productividad (g L⁻¹d⁻¹)	0,03162	0,02490	0,04897	0,06819	0,08411	0,09543

La productividad del cultivo es proporcional a la concentración del inoculo, esto se debe a que hay una mayor cantidad de células madre para replicarse, aumentando así la cantidad de biomasa producida. Esto debe llegar a un equilibrio entre inoculo inicial y paso de luz, puesto que no siempre un mayor inoculo representa mayor producción de biomasa debido a la dificultad de las células de absorber la luz para realizar el proceso de fotosíntesis. En la Figura 3.2, se puede observar los niveles que tienen diferencias significativas entre sí con un valor P<0.05, observando que solo existen dos pares de niveles que no presentan diferencias significativas entre sus medias, y el resto es estadísticamente diferente entre sí. En otras palabras, se entiende que la productividad para los inóculos de 0.3 y 0.15 g/l es estadísticamente igual, por lo que el resultado del tratamiento no tiene diferencias significativas, lo mismo pasa para las concentraciones de inoculo de 1 y 0.8g/l las cuales obtuvieron los mayores valores para productividad y son estadísticamente iguales, de resto entre todas las posibles combinaciones de inóculos existen diferencias significativas entre las medias de productividad.

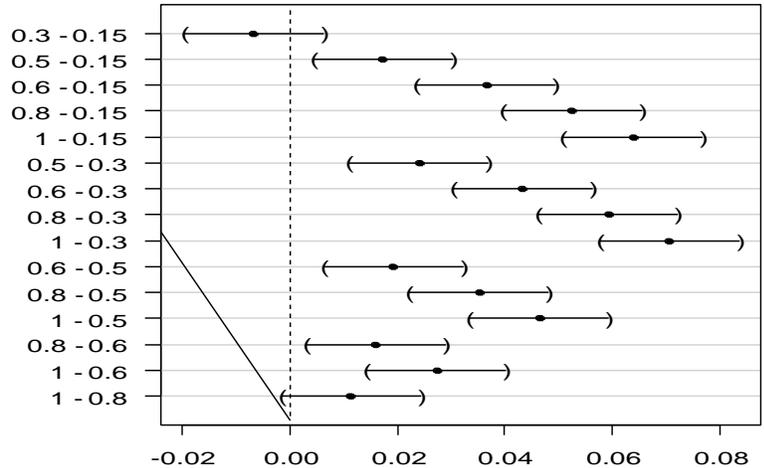


Figura 3.2. Niveles de confianza por familia de niveles. 95% confianza

El diseño estadístico arrojó que el mejor inóculo debía estar entre 0.8 y 1 g/l, sin obtener diferencias estadísticamente significativas entre ambas concentraciones. Un inóculo alto representa un número mayor de células iniciales para duplicarse, lo que se traduce en un aumento proporcional en la productividad del cultivo, sin embargo, esto puede ser un problema a escalas mayores, ya que densidades ópticas altas conllevan a un menor paso de la luz, provocando zonas oscuras en la cuales las células estarían fotolimitadas, y el crecimiento no sería el mejor. Con base en los resultados estadísticos obtenidos, se estableció que un inóculo entre 0.8 y 1 g/l, es el ideal para obtener altas productividades de biomasa a nivel de laboratorio

3.4.2 Consumo de Nutrientes

El consumo de nutrientes fue evaluado a través de un montaje experimental con el medio de cultivo descrito en la Tabla 3.2. El inóculo para el ensayo fue el determinado en el numeral anterior realizando los cálculos respectivos para un inóculo en el rango entre 0.8 – 1.0 gL⁻¹, donde el inóculo real fue de 0.86 gL⁻¹. La fuente de carbono usada fue CO₂ administrándola 3 veces al día con pulso de 1 minuto.

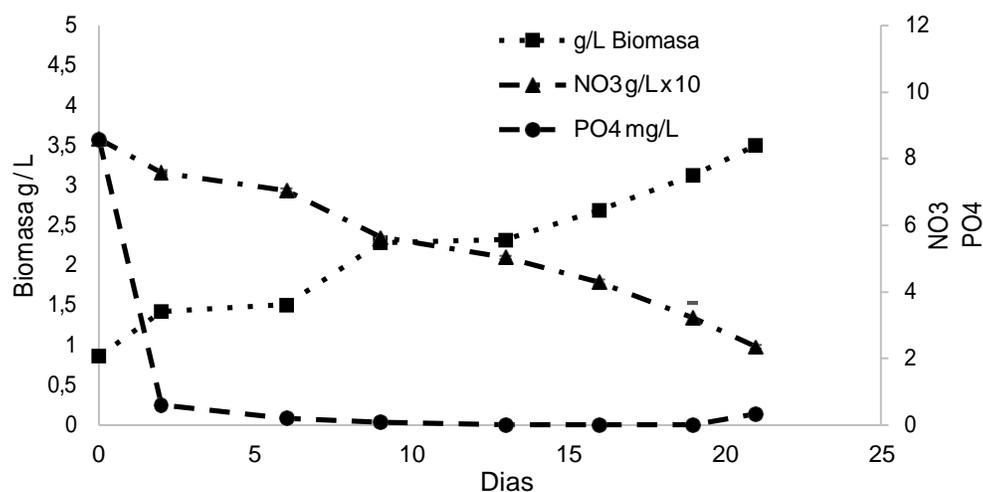


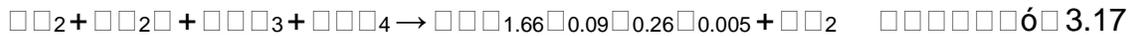
Figura 3.3. Cinética de crecimiento y consumo de la microalga *Botryococcus braunii*

Durante la cinética (Figura 3.3), se pudo observar que el consumo total de fosfato (PO_4) ocurría en unos pocos días después de iniciar la cinética, lo cual puede ser debido a que la abundancia de este nutriente estimula su propia acumulación, y la célula puede usarlo gradualmente a medida que lo vaya necesitando (Beuckels *et al.*, 2015). El fósforo tiene un papel estructural fundamental en muchas estructuras moleculares y celulares, como en el caso de los enlaces diéster presentes en los ácidos nucleicos y fosfolípidos, los cuales son indispensables en las estructuras membranosas (Azcon & Bieto, 2008). En los ensayos presentados con el fosfato, se identificó que sin importar la concentración de fosfato en el medio ($< 60 \text{ mg L}^{-1}$), la concentración de este llegaba a cero a más tardar el día 5, por lo que se optó por descartar el uso de un modelo para este, además de variar su concentración en el medio dependiendo del nitrógeno, estableciendo una relación molar N:P de 10:1 la cual es establecida en la basándose en la composición molecular de *B. braunii* (Grobelaar, 2012). Caso distante ocurre con el nitrato, cuyo uso y acumulación parece no tener relación con la disponibilidad de fosfato (Beuckels *et al.*, 2015). El nitrógeno está implicado en múltiples funciones celulares, es un componente necesario para la síntesis de pigmentos como la clorofila y por lo tanto posee un papel fundamental en el proceso de obtención de energía a través de la fotosíntesis. Además, es el principal componente de los aminoácidos, en donde su limitación influye en la traducción de mRNA y a su vez en la síntesis de proteínas; hace parte de la estructura de vitaminas y forma parte de coenzimas y enzimas (Barsanti & Gualtieri, 2006).

la fórmula molecular de la biomasa de *Botryococcus braunii*, usando el azufre en vez del fósforo debido a las especificaciones del equipo, dando como resultado la siguiente composición.



La fórmula molecular fue usada para el siguiente balance estequiométrico en la reacción de fotosíntesis necesaria para el crecimiento de la microalga



$$\text{C} \rightarrow 1 = \text{C} \quad \text{ó} \quad 3.18$$

$$\text{C} \rightarrow 2 = 1.66 \text{C} \rightarrow \text{C} = 0.83 \quad \text{ó} \quad 3.19$$

$$\text{C} \rightarrow \text{C} = 0.09 \text{C} \rightarrow \text{C} = 0.09 \quad \text{ó} \quad 3.20$$

$$\text{C} \rightarrow 2 + \text{C} + 3\text{C} + 4\text{C} = 0.26\text{C} + 2\text{C} \rightarrow \text{C} = 1.43 \quad \text{ó} \quad 3.21$$

$$\text{C} \rightarrow \text{C} = 0.005 \text{C} \rightarrow \text{C} = 0.005 \quad \text{ó} \quad 3.22$$



Con la ecuación balanceada, se procede a realizar el cálculo sobre el rendimiento teórico de biomasa a partir de nitrato Y_{XN}

$$Y_{\text{XN}} = \frac{1 \text{ C}_{1.66} \text{ H}_{0.09} \text{ O}_{0.26} \text{ S}_{0.005} \text{ N}_3}{0.09 \text{ N}_3} \cdot \frac{19.24 \text{ g N}_3}{1 \text{ C}_{1.66} \text{ H}_{0.09} \text{ O}_{0.26} \text{ S}_{0.005} \text{ N}_3} \cdot \frac{1 \text{ C}_{1.66} \text{ H}_{0.09} \text{ O}_{0.26} \text{ S}_{0.005} \text{ N}_3}{5.58 \text{ N}_3} \quad \text{ó} \quad 3.24$$

□

$$Y_{\text{XN}} = 3.45 \text{ g Biomasa/g N}_3 \quad \text{ó} \quad 3.25$$

Reemplazando en la Ecuación 3.6, se establecen las concentraciones iniciales de NO_3 en los 5 medios experimentales para validar el modelo, dependientes de la concentración inicial de biomasa en el cultivo y el tiempo establecido para el agotamiento del nutriente.

Tabla 3.6. Concentraciones de NO_3 en los medios

	X_0 (g/L)	Tiempo (d)	NO_3 (g/L)
Medio 1 (M1)	0.5	≈ 11	0,2512
Medio 2 (M2)	0.8	≈ 9.5	0,3166
Medio 3 (M3)	1.0	≈ 5.7	0,1869

Medio 4 (M4)	1.0	≈ 8.6	0,3324
Medio 5 (M5)	1.0	≈ 14.2	0,7648

3.4.4 Modelo y Ajuste

El interés de este, fue estudiar la factibilidad de su uso como predictor en los tiempos de consumo cuando se varia la concentración del sustrato y el inoculo inicial en el medio. Para lo cual se modelaron el sistema de ecuaciones diferenciales para la biomasa y el sustrato simultáneamente, estimando los parámetros que ajustan el modelo al perfil o tendencia experimental de los datos. La formulación del medio fue realizado a través de un modelo exponencial de consumo, el cual no está ligado a un modelo de crecimiento. Los resultados de las cinéticas pueden observarse en las Figuras 3.4 – 3.8.

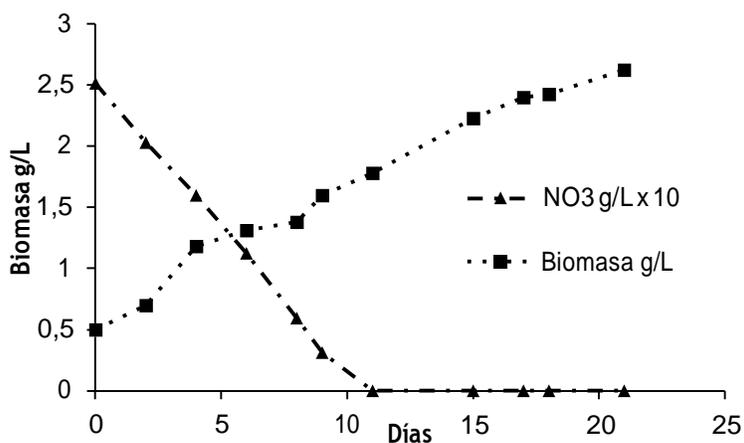


Figura 3.4. Cinética de *Botryococcus braunii* con el medio M1

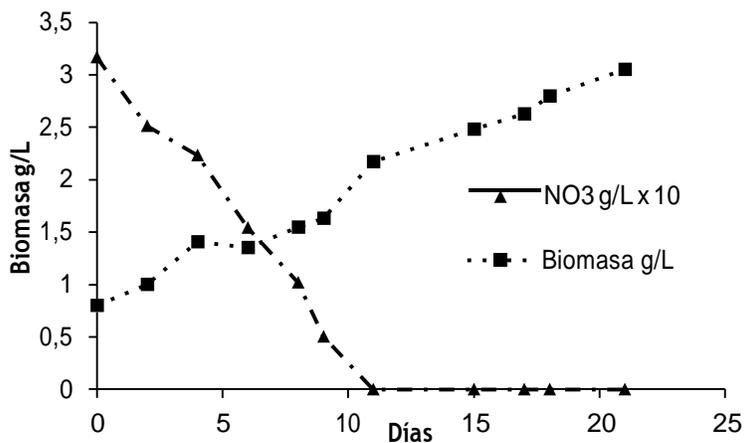


Figura 3.5. Cinética de *Botryococcus braunii* con el medio M2

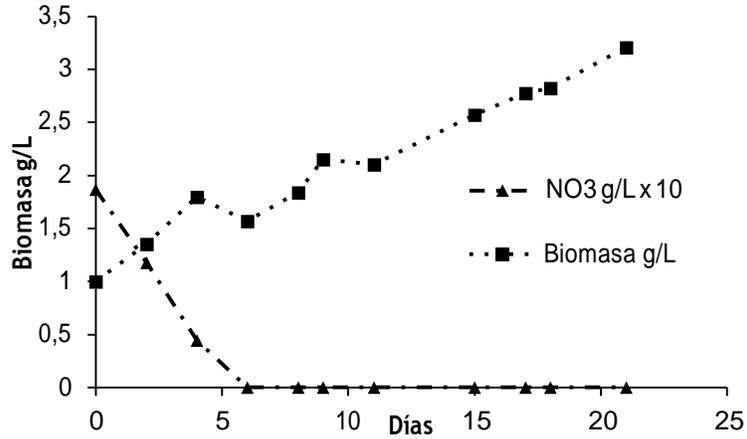


Figura 3.6. Cinética de *Botryococcus braunii* con el medio M3

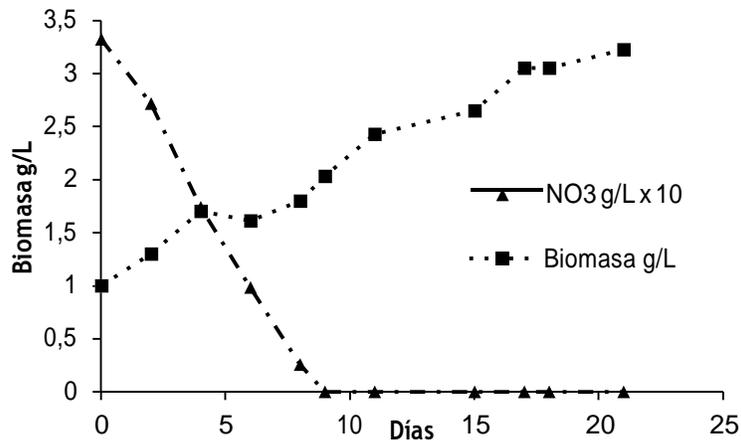


Figura 3.7. Cinética de *Botryococcus braunii* con el medio M4

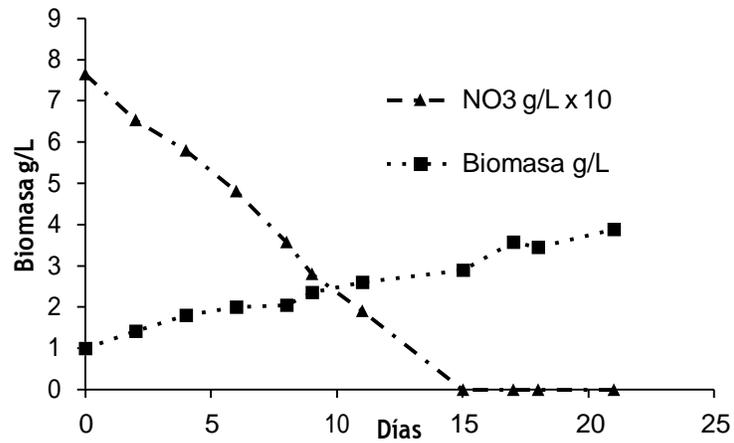


Figura 3.8. Cinética de *Botryococcus braunii* con el medio M5

El resumen de los parámetros de los parámetros obtenidos en las cinéticas puede verse en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Parámetros experimentales de las cinéticas

PARAMETROS	M1	M2	M3	M4	M5
X_0 (g L ⁻¹)	0,5000	0,8000	1,0000	1,0000	1,0000
X_{max} (g L ⁻¹)	2,6250	3,0500	3,2067	3,2250	3,8750
μ_{max} (d ⁻¹)	0,1020	0,1090	0,0966	0,1082	0,1316
Y_{XN} (gx gs ⁻¹)	5,0955	4,3267	3,0495	3,1291	2,4844
S_0 (g L ⁻¹)	0,2512	0,3166	0,1869	0,3324	0,7648
Productividad (gL ⁻¹ d ⁻¹)	0,1012	0,1071	0,1051	0,1060	0,1369
t finalización del NO ₃ (d)	11,0000	11,0000	6,0000	9,0000	15,0000

Adicionalmente, la productividad máxima de biomasa obtenida fue de 0.137 g L⁻¹d⁻¹, un valor de productividad alto respecto a otros valores reportados para esta especie (Gouveia *et al.*, 2017; Rao *et al.*, 2007a; Rao *et al.*, 2007b), en donde los valores máximos de productividad se encontraban entre 0.07 – 0.10 gL⁻¹d⁻¹

3.4.4.1 Modelo Logístico

Se estimaron los parámetros del modelo para los 5 medios formulados, en las Figuras 3.9 – 3.13 se presentan los datos experimentales y las curvas obtenidas de las ecuaciones cinéticas para el consumo de sustrato y el crecimiento de biomasa, los cuales presentan un buen ajuste con un coeficiente de correlación R² alto, el cual puede observarse en la Tabla 3.8.

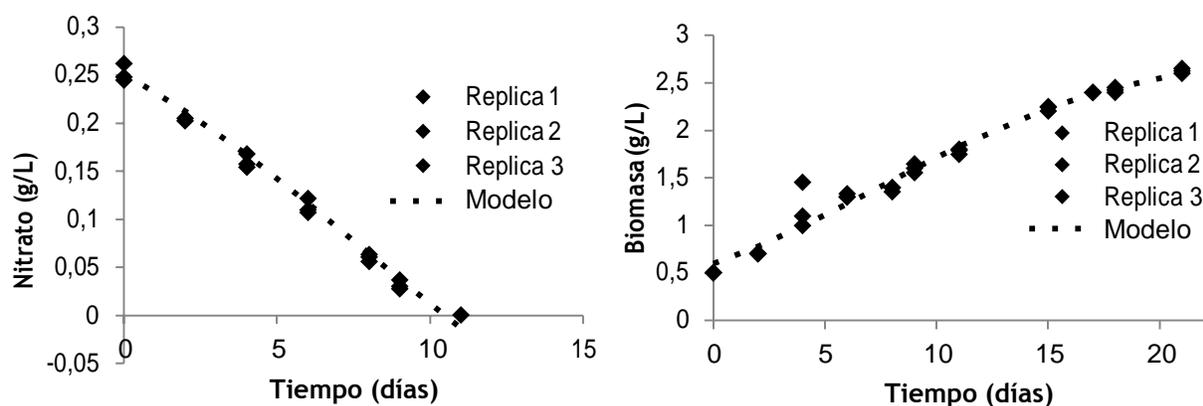


Figura 3.9. A. Cultivo en matraz con el medio M1, cinética de consumo B. Crecimiento en lote de *B. braunii*

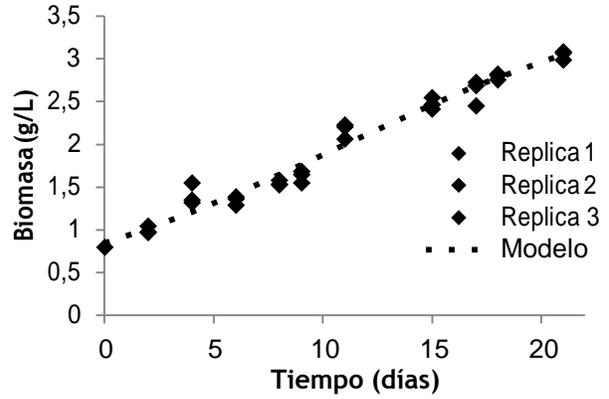
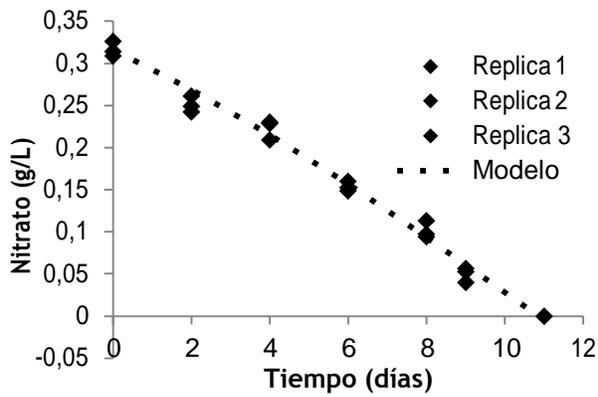


Figura 3.10. A. Cultivo en matraz con el medio M2, cinética de consumo B. Crecimiento en lote de *B. braunii*

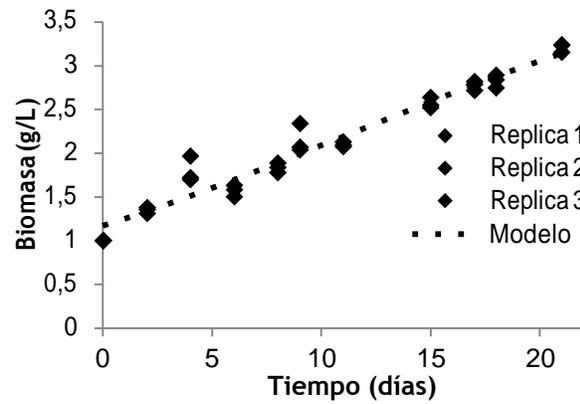
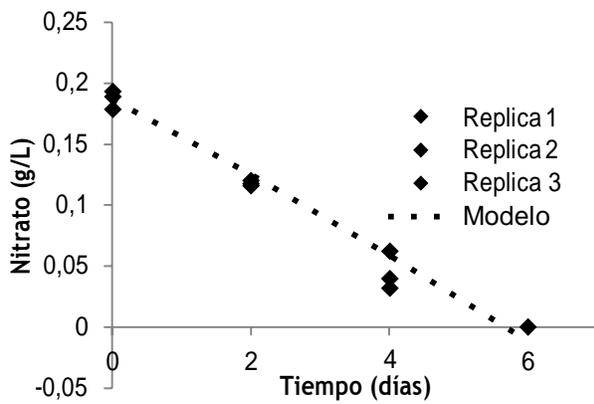


Figura 3.11. A. Cultivo en matraz con el medio M3, cinética de consumo B. Crecimiento en lote de *B. braunii*

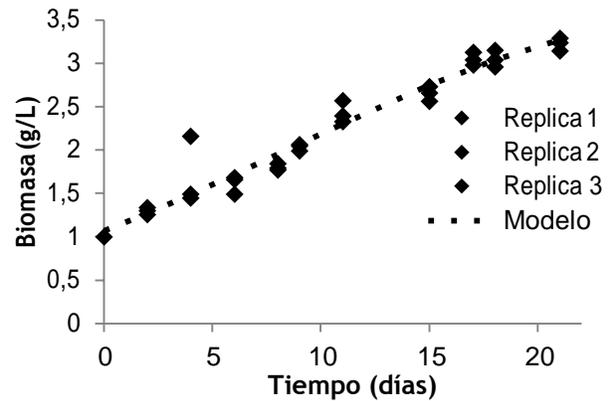
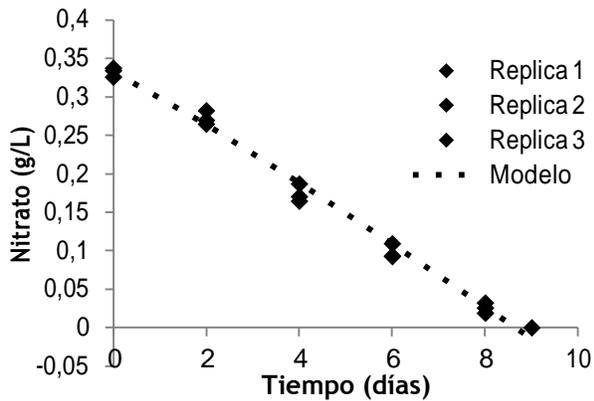


Figura 3.12. A. Cultivo en matraz con el medio 4, cinética de consumo B. Crecimiento en lote de *B. braunii*

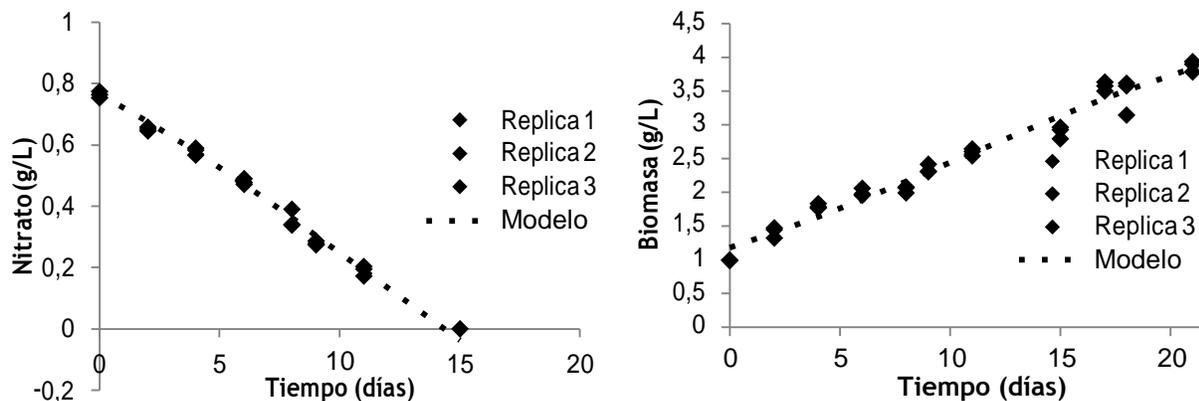


Figura 3.13. A. Cultivo en matraz con el medio M5, cinética de consumo B. Crecimiento en lote de *B. braunii*

En cada una de las Figuras presentadas anteriormente, se puede observar la dispersión de datos experimentales arrojada por las réplicas, las cuales, siguen la tendencia marcada por el modelo logístico propuesto, tanto para el modelo de crecimiento como para el modelo de consumo, en donde el modelo predice adecuadamente el tiempo de agotamiento del nitrato, sobre los 5 medios formulados.

Tabla 3.8. Parámetros modelo logístico acoplado (Biomasa-Sustrato)

PARAMETROS DEL MODELO	M1	M2	M3	M4	M5
X_0 (g L ⁻¹)	0,6010	0,8437	1,1716	1,0732	1,1859
X_{max} (g L ⁻¹)	2,8600	3,9293	4,4605	4,0040	5,0537
μ_{max} (d ⁻¹)	0,1726	0,1210	0,0907	0,1190	0,1114
Y_{XN} (gx gs ⁻¹)	4,6390	3,5940	2,6469	2,8751	2,4259
S_0 (g L ⁻¹)	0,2512	0,3166	0,1869	0,3324	0,7648
Productividad (gL ⁻¹ d ⁻¹)	0,1076	0,1469	0,1566	0,1396	0,1842
t finalización del NO ₃ (d)	10,7	11	5,7	8,8	14,7
R ² Biomasa	0,9858	0,9819	0,9630	0,9782	0,9786
R ² Sustrato	0,9949	0,9932	0,9846	0,9932	0,9958

3.4.4.2 Modelo Exponencial

El modelo exponencial utilizado (Ec. 3.5), es de gran importancia en el desarrollo del presente trabajo, la simplicidad de este modelo permite despejar fácilmente sus variables, para ser utilizado en el desarrollo de las formulaciones experimentales, basado en la concentración inicial de la biomasa y el tiempo establecido de consumo. Los parámetros estimados, solamente fueron ajustados al consumo de sustrato, debido a que el crecimiento exponencial no fue evaluado en este trabajo. Fueron estimados los parámetros del modelo para el consumo de nitrato en los 5 medios formulados. En las Figuras 3.14 – 3.18 se presentan los datos experimentales y las curvas obtenidas

de las ecuaciones cinéticas para el consumo de sustrato, los cuales presentan un buen ajuste con un coeficiente de correlación R^2 alto.

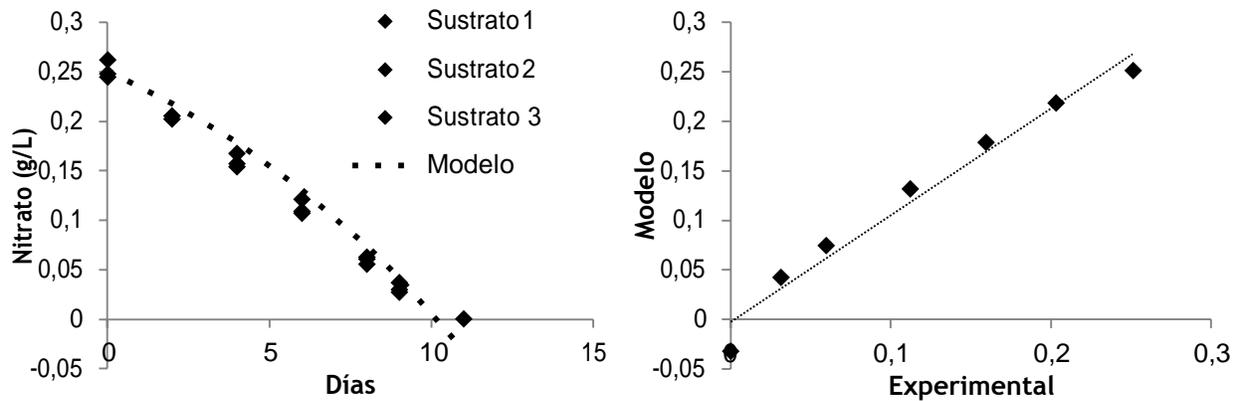


Figura 3.14. A. Cultivo en matraz con el medio M1, cinética de consumo. B. Relación de identidad del consumo – datos experimentales vs datos modelados de *Botryococcus braunii*

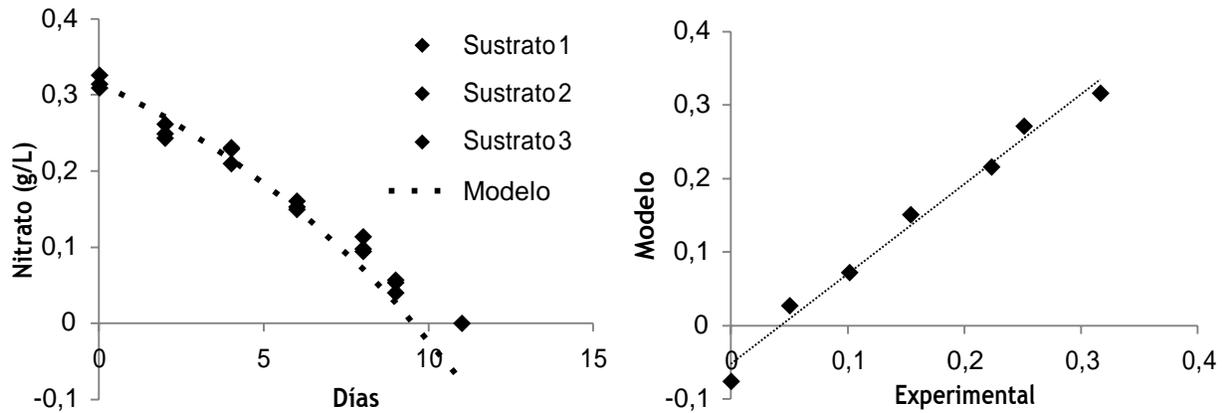


Figura 3.15. A. Cultivo en matraz con el medio M2, cinética de consumo. B. Relación de identidad del consumo – datos experimentales vs datos modelados de *Botryococcus braunii*

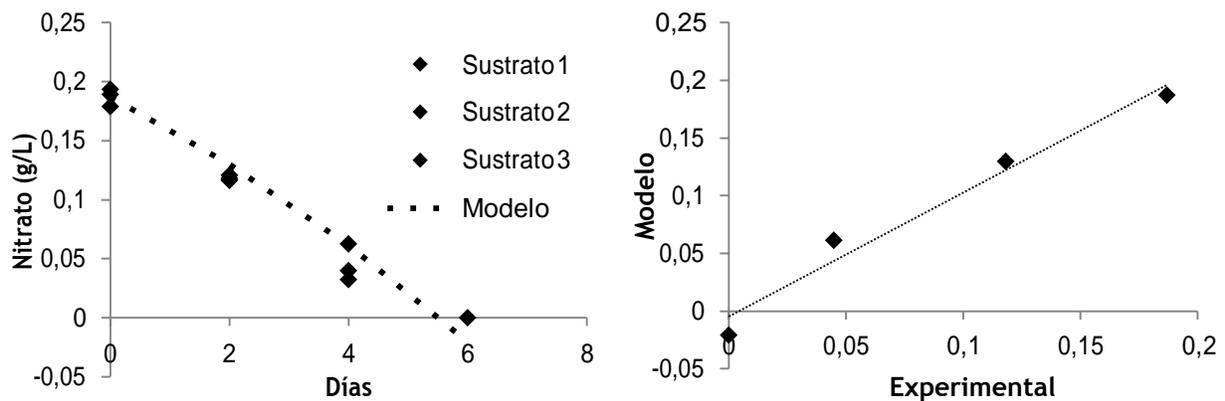


Figura 3.16. A. Cultivo en matraz con el medio M3, cinética de consumo. B. Relación de identidad del consumo – datos experimentales vs datos modelados de *Botryococcus braunii*

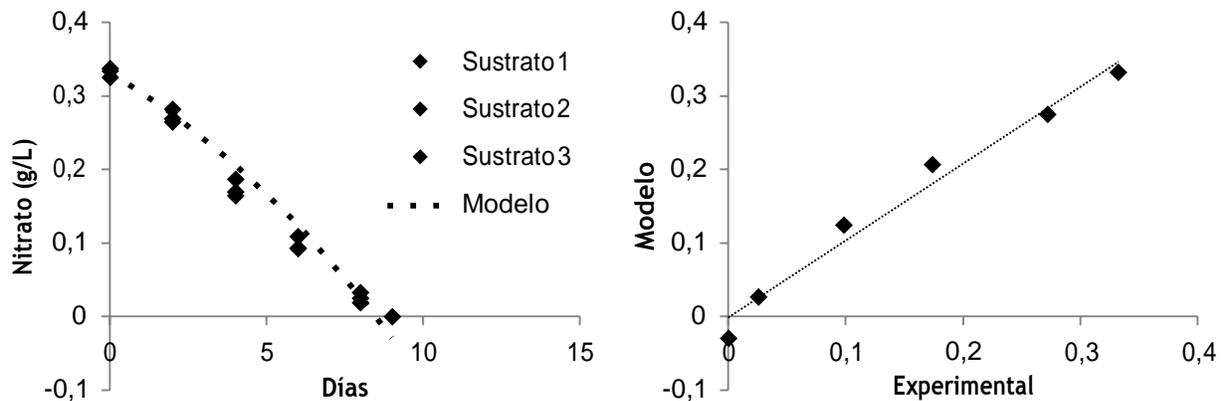


Figura 3.17. A. Cultivo en matraz con el medio M4, cinética de consumo. B. Relación de identidad del consumo – datos experimentales vs datos modelados de *Botryococcus braunii*

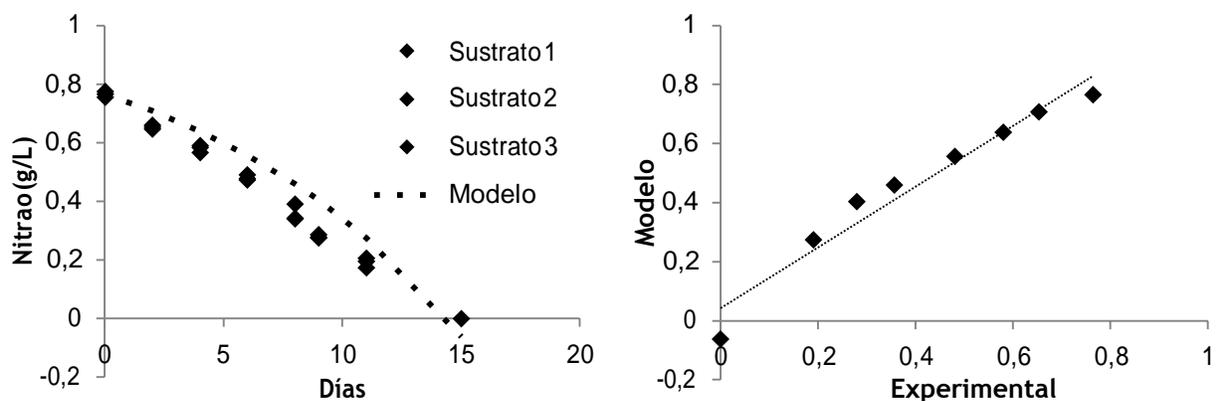


Figura 3.18. A. Cultivo en matraz con el medio M5, cinética de consumo. B. Relación de identidad del consumo – datos experimentales vs datos modelados de *Botryococcus braunii*

En cada una de las figuras presentadas anteriormente, se puede observar, que la dispersión de datos experimentales arrojada por las réplicas, posee una tendencia similar el modelo exponencial usado para la formulación de los medios, en donde el consumo total del nitrato se da en un tiempo real muy cerca al estimado. La comparación entre los datos experimentales y los parámetros usados en el modelo exponencial pueden observarse en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Parámetros modelo exponencial (Sustrato)

PARAMETROS DEL MODELO	M1		M2		M3		M4		M5	
	Real	Modelo	Real	Modelo	Real	Modelo	Real	Modelo	Real	Modelo
Y_{XN}	5,0955	3,4500	4,3267	3,4500	3,0495	3,4500	3,1291	3,4500	2,4844	3,4500
S_0	0,2512	0,2512	0,3166	0,3166	0,1869	0,1869	0,3324	0,3324	0,7648	0,7648
T finalización	11,0000	11,1722	11,0000	9,5666	6,0000	5,5295	9,0000	8,4879	15,0000	14,3507
R2	0,9723		0,9857		0,9702		0,9771		0,9508	

3.4.4.3 Prueba Estadística

La prueba de bondad y ajuste fue realizada a través de la prueba F (Ec. 3.12 y 3.13), en donde se calcularon los parámetros estadísticos correspondientes para comprobar la hipótesis nula (H_0) o confirmar la hipótesis alternativa (H_a). El estadístico se aplicó a cada uno de los modelos probados (logístico y exponencial).

Tabla 3.10. Análisis estadístico modelo logístico

Consumo de Sustrato					
	M1	M2	M3	M4	M5
Valor F Tabla	2,9582	2,9582	4,4590	3,2592	2,7413
Valor F Experimental	2,3723	1,5871	2,4904	2,4311	2,4023
Ajuste Estadístico	Se acepta	Se acepta	Se acepta	Se acepta	Se acepta
R2	0,9949	0,9932	0,9906	0,9932	0,9958
Crecimiento de Biomasa					
	M1	M2	M3	M4	M5
Valor F Tabla	2,3419	2,3419	2,3419	2,3419	2,3419
Valor F Experimental	1,4388	2,0092	2,8409	0,0014	2,1109
Ajuste Estadístico	Se acepta	Se acepta	No se acepta	Se acepta	Se acepta
R2	0,9857	0,9819	0,9630	0,9783	0,9786

El análisis estadístico (Tabla 3.10) muestra que el modelo de consumo logístico representa los datos obtenidos en más de un 99%, con un nivel de significancia de 0.05, en donde las cinéticas de consumo de cada uno de los medios evaluados poseen un ajuste estadísticamente significativo con el modelo, así mismo ocurre con el modelo logístico de crecimiento, en donde el modelo posee valores de correlación superiores a 96%. Sin embargo, solo en 4 de las 5 cinéticas de crecimiento fue estadísticamente ajustado el modelo, debido a que en el medio M3 el nivel de confiabilidad arroja un valor F experimental mayor al F encontrado en la tabla, rechazándose así la H_0 . En las cinéticas presentadas (Grafico 3.9 – 3.13) puede observarse que la toma del día 4 posee una alta variabilidad en todos los experimentos, lo cual puede ser debido a errores humanos en la toma de muestra, ya que en los otros días no se presentó un error que abarcara cada una de los medios. Debido a esto y con base en los resultados estadísticos mostrados para los demás experimentos, se puede asegurar que el modelo es adecuado para explicar el comportamiento del consumo del Nitrato y el crecimiento de la microalga *Botryococcus braunii*, lo cual ayuda a resolver los problemas contemplados en la formulación de medios de cultivo en sistemas en lote.

Tabla 3.11. Análisis estadístico modelo exponencial

Consumo de Sustrato					
	M1	M2	M3	M4	M5
Valor F Tabla	2,9582	2,9582	4,4590	3,2592	2,7413
Valor F Experimental	32,4347	20,4279	5,4587	10,3055	43,6119
Ajuste Estadístico	No se acepta				
R2	0,9723	0,9857	0,9702	0,9771	0,9508

El análisis estadístico arrojado para el modelo de consumo exponencial (Tabla 3.11), muestra que el modelo no posee un ajuste estadísticamente significativo, para explicar el comportamiento de los datos experimentales a través del tiempo, esto se ve reflejado en valores F experimentales mayores a los encontrados en la tabla F, además de valores de correlación no mayores a 97%. sin embargo, el modelo exponencial posee una importancia determinante en este estudio, debido a que su uso es enfocado a la formulación de medios que permitan predecir el tiempo final de consumo del nitrato; en este caso, si bien el ajuste estadístico nos indica que el modelo no es adecuado para simular el comportamiento del sustrato a través del tiempo, la Tabla 3.9 nos demuestra que predice acertadamente los tiempos de agotamiento del nitrato, con un error promedio no superior al 5%.

3.4.5 Cultivo en Reactor

3.4.5.1 Cultivo en Lote

El cultivo en lote realizado, fue un montaje integrando los resultados obtenidos hasta el momento para el mejoramiento del cultivo, teniendo en cuenta los hallazgos encontrados en el Capítulo 2 del presente trabajo. El montaje del reactor en lote puede observarse en la Ilustración 3.1.



Ilustración 3.1. A. Sistema en lote de *Botryococcus braunii* B. Sistema automatizado en cascada para pH 8.

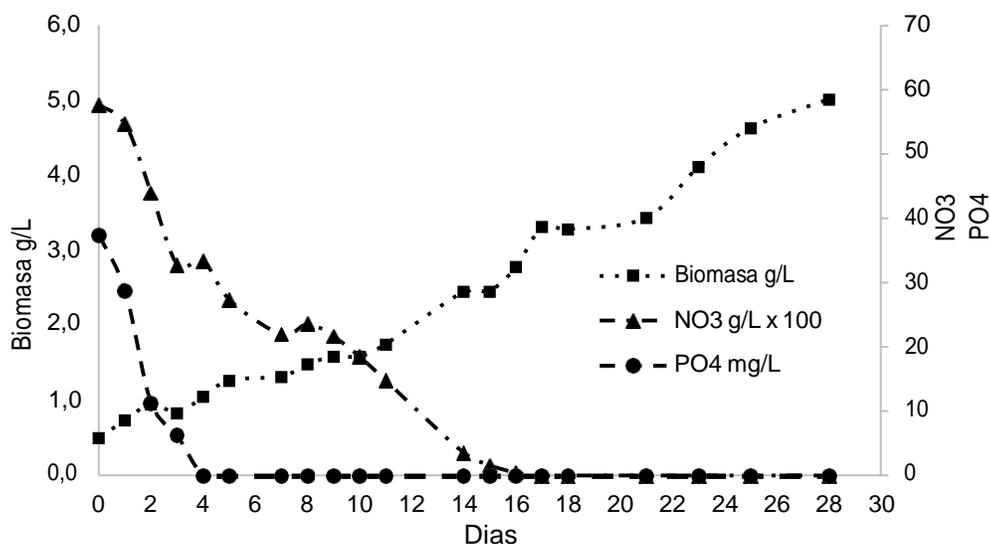


Figura 3.19. Cinética de cultivo en lote en biorreactor de 14 L

En la Figura 3.19 se muestra la producción realizada en el reactor de 14L (10L de trabajo) con la microalga *Botryococcus braunii*. La fuente de nitrógeno suministrada a una concentración inicial de $0.58 \text{ g L}^{-1} \text{ NO}_3$ fue consumido por completo al día 16, en donde al despejar el tiempo de la Ec. 3.6 encontramos que el tiempo de finalización estimado con las condiciones iniciales según el modelo, debió darse a los 16.05 días, validándose así una vez más el uso del modelo como indicador del tiempo de consumo total, mas no del comportamiento del sustrato a través del tiempo (Fig. 3.20). El consumo de fosfato tuvo la misma tendencia obtenida en la cinética de la Figura 3.3 sin importar que la concentración en el reactor fuera casi 5 veces mayor, obteniéndose un consumo total del nutriente al día 4, comprobando así que la abundancia de este nutriente estimula su propia acumulación, almacenando el fosfato disponible y utilizándolo gradualmente a medida que lo vaya necesitando la célula (Beuckels *et al.*, 2015). El crecimiento de biomasa fue variable a través de toda la cinética, obteniéndose un crecimiento de biomasa con una tendencia lineal, obteniéndose regiones con altas pendientes que luego son compensados con crecimientos más graduales. Cabe resaltar, que la máxima velocidad de crecimiento fue obtenida después del agotamiento de ambos nutrientes (NO_3 y PO_4), lo que puede deberse a que el organismo pasa de gastar energía en absorber y acumular los nutrientes que hay disponibles en el medio, a usarla toda para la división y crecimiento celular, obteniéndose un valor de μ_{max} de 0.15 d^{-1} y una velocidad media de crecimiento de 0.09 d^{-1} . La productividad lipídica obtenida en el cultivo logro un rendimiento de 44.2% del peso seco en aceite, alcanzando una productividad lipídica de $0.070 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

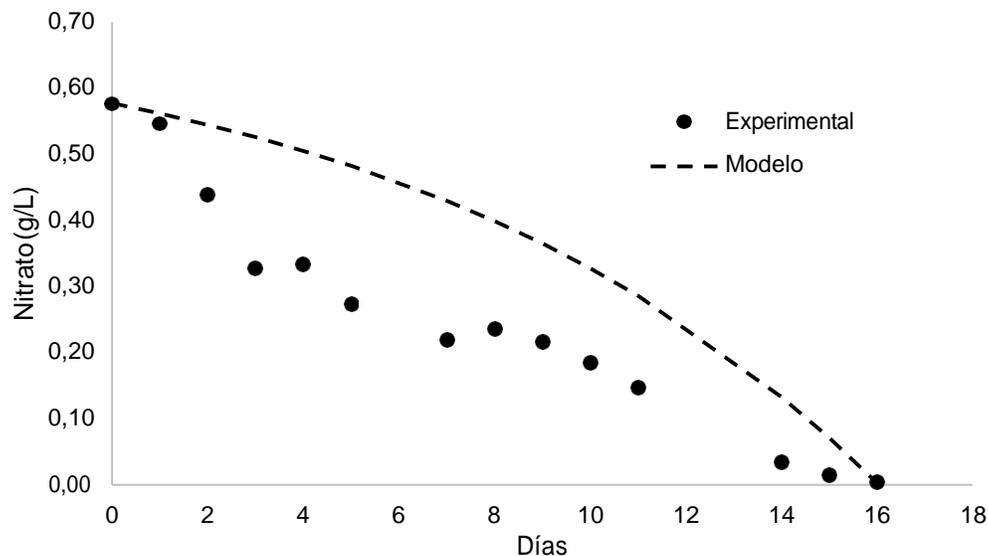


Figura 3.20. Cinética de consumo en el reactor

El inoculo establecido en el reactor, se determinó a través de la distribución observada en la Ilustración 2.5, en donde una concentración de 0.5gL^{-1} muestra un cultivo totalmente iluminado sin zonas oscuras para la iluminación establecida. El crecimiento de biomasa fue acelerado desde el inicio del proceso, lo que reitera que la concentración del inoculo y su iluminación son importantes para que la formación de biomasa se de en poco tiempo, en donde el inoculo establecido al inicio de este capítulo, debió ser reajustado debido al amplio diámetro del reactor (24cm) para asegurar una iluminación completa al inicio del proceso. La concentración máxima obtenida al final del proceso fue de 5.0gL^{-1} a los 28 días de cultivo, con una velocidad específica de crecimiento máxima de 0.15d^{-1} , mostrando un valor alto de productividad de $0.16\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, respecto al reportado por diversos autores para esta especie (Gouveia et al., 2017; Rao *et al.*, 2007a; Rao *et al.*, 2007b; Tasić *et al.*, 2016). En la Tabla 3.12, se muestran los valores obtenidos para los parámetros más importantes del cultivo en lote, realizada en biorreactor.

Tabla 3.12. Valores de parámetros experimentales del cultivo en lote del biorreactor

X_0 (gL^{-1})	0,50
X_{max} (gL^{-1})	5,02
Tiempo (d)	28
μ (d^{-1})	0.09
μ_{max} (d^{-1})	0,15
Td (d)	6,2
Productividad biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	0,16
Productividad lipídica ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	0.072
Y_{XP} (g g^{-1})	0,12

Y_{XN} (g g ⁻¹)	8,06
Producción total (g biomasa)	45,2
Formula molecular	$\square\square_{1.66}\square_{0.09}\square_{0.26}\square_{0.005}$
Peso Molecular (g mol⁻¹ biomasa)	18,12
Velocidad de fijación de CO₂ (g CO₂ L⁻¹ d⁻¹)	0,3918
Total CO₂ fijado (g)	109,70
g CO₂ g⁻¹ Biomasa	2,4287
t estimado agotamiento NO₃	16,05

En un estudio por Eroglu y colaboradores (Eroglu *et al.*, 2011) sobre 6 especies diferentes de *B. braunii* se encontró que las productividades máximas alcanzadas en los cultivos, estaban entre 0.06 – 0.195 gL⁻¹d⁻¹, en donde estos valores representan las productividades para las variedades Utex 2441 y 2629. Estos valores relacionados con su contenido de lípidos, fueron utilizados para calcular la productividad lipídica de cada variedad, cuyos resultados se encuentran en la siguiente tabla

Tabla 3.13. Productividad lipídica de diversas variedades de *Botryococcus braunii* (Eroglu *et al.*, 2011)

Cepa	Raza	Productividad Biomasa g L⁻¹ d⁻¹	Contenido de Lípidos (% p/p)	Productividad Lipídica g L⁻¹ d⁻¹
<i>B. braunii</i> var Showa	B	0.125	33.9	0.042
<i>B. braunii</i> Kawaguchi	B	0.080	28.4	0.023
<i>B. braunii</i> Yamanaka	A	0.135	18.0	0.024
<i>B. braunii</i> Utex 2441	A	0.060	16.7	0.010
<i>B. braunii</i> LB572	A	0.110	15.9	0.017
<i>B. braunii</i> Utex 2629	A	0.195	19.3	0.038
<i>B. braunii</i> (Presente estudio)	A	0.160	44.2	0.070

Los resultados mostrados en la Tabla 3.13, muestran los altos valores obtenidos en el presente estudio, en donde se obtuvo una productividad de biomasa superior a todas las especies reportadas por Eroglu, con excepción de la variedad *sudeticus* (Utex 2629), el contenido lipídico fue el más alto dentro de las cepas comparadas, obteniendo más del doble de su homóloga LB572. Esto puede ser debido la dinámica del montaje en el reactor, en donde los nutrientes principales (PO₄ y NO₃) tienen tiempos de agotamiento de 4 y 15 días respectivamente, quedando 13 días de cultivo con ausencia de estos nutrientes en el medio. Múltiples estudios han demostrado que el déficit de nitrógeno en el medio aumenta la acumulación de lípidos intracelulares, por lo que al agotarse el nitrógeno al día 15, la células usan el poco almacenado para su mantenimiento celular, y acumulan grandes cantidades de CO₂ en forma de lípidos (Breuer *et al.*, 2012; Klok *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Dhup & Dhawan, 2014), lo que puede traducirse en el incremento del peso seco, aun después

de agotarse dichos nutrientes, teniendo en cuenta que el CO₂ utilizado es administrado según la velocidad de variación del pH en el medio, manteniéndose este constante en todo momento con un valor de pH 8.

3.4.5.2 Cultivo en Continuo

El cultivo en continuo (Ilustración 3.2) fue realizado a una tasa de dilución D (Ec. 3.14) equivalente a dos terceras partes ($2/3$) de la velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) presentada por el cultivo en lote, arrojando así un flujo constante de entrada y salida de 0.7ml min^{-1} equivalente a 1.0Ld^{-1} , con un sistema en cascada para mantener un pH 8, con una proporción automatizada de la concentración del CO₂. El principal objetivo de este experimento fue determinar el cultivo de *Botryococcus braunii* podía mantener una estabilidad de producción en un sistema en continuo. El comportamiento del cultivo en estado estacionario puede observarse en la Figura 3.21.



Ilustración 3.2. Sistema en continuo de *Botryococcus braunii*

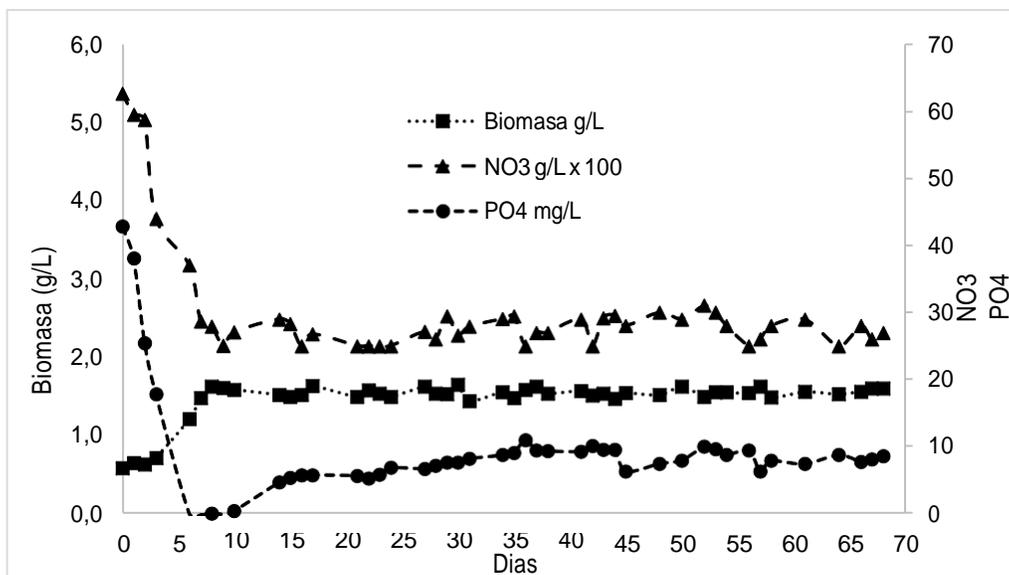


Figura 3.21. Cultivo en continuo en biorreactor

El cultivo microalgal fue iniciado con un inoculo de 0.58 gL^{-1} en un sistema en lote, en el cual se inició el modo quimiostato a una tasa de dilución de 0.10 cuando la concentración celular en el cultivo ascendiera aproximadamente a 1.6 gL^{-1} . Un incremento de biomasa hasta 1.7 gL^{-1} ocurrió dentro de los primeros 8 días, momento en el cual fue activada el flujo de alimentación y de salida para el sistema, cayendo la concentración celular a 1.55 gL^{-1} y manteniéndose a lo largo de la producción dentro de un rango de $\pm 0.1 \text{ gL}^{-1}$. El sistema en estado estacionario se mantuvo controlado durante un tiempo de 60 días sin poseer problemas de contaminación o variaciones que pusieran en peligro el montaje, y fue desmontado para darle continuidad a otros experimentos, lo que sugiere que el sistema posee un tiempo de operación estable de varios meses. A la tasa de dilución trabajada se obtuvo una producción diaria de *Botryococcus braunii* de $0.15 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ operando con un volumen de trabajo de 10L, y una producción total de biomasa en el término del montaje de 106g.

3.4.5.3 Viabilidad Celular y Control de Contaminación

La viabilidad celular del cultivo en continuo (Ilustración 3.3) evaluada a través de microscopia de fluorescencia con FDA, mostro que el cultivo no sufrió ningún cambio en relación con el día inicial y final del montaje, lo que muestra que fácilmente el cultivo pudo hacer seguido mucho más tiempo en el sistema en continuo, sin afectar su productividad.

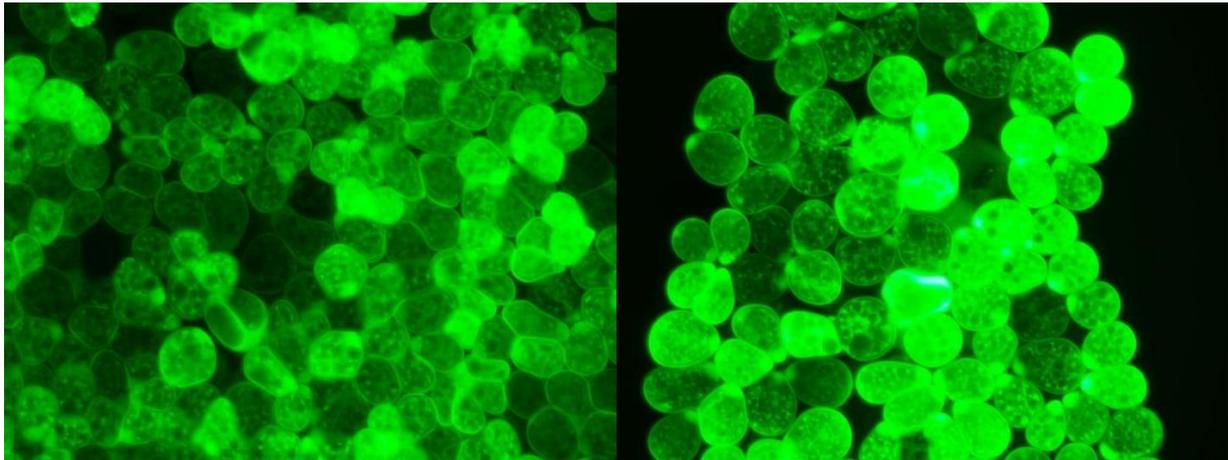


Ilustración 3.3. A. Viabilidad celular en el día 0 B. Viabilidad celular en el día 68. Fotografía tomada en 100X con microscopía de fluorescencia

El control de contaminación mostro que el cultivo en continuo mantiene controlado el crecimiento microbiano, debido a que no hay acumulación de material orgánico como polisacáridos o detritos celulares que pueden usar para crecer, por lo que el sistema demuestra una mayor eficiencia en el uso del tiempo muerto de operación, evitando el desmontaje, lavado y montaje continuo que demanda un sistema en lote.

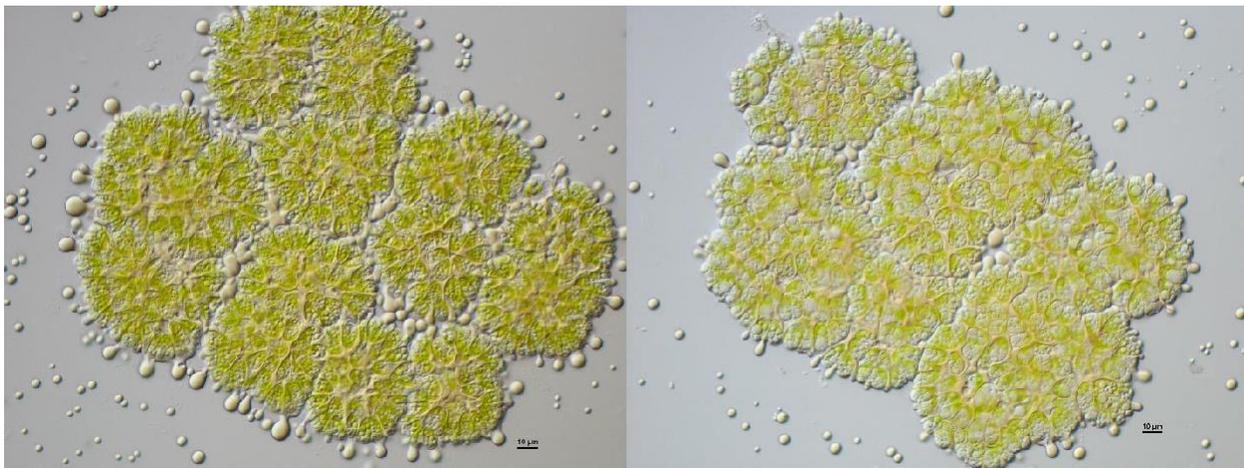


Ilustración 3.4. A. Células en fresco en el día 0 B. Células en fresco en el día 68. Fotografía 40X - contraste de fases de interferencia (DIC).

3.5 CONCLUSIONES

Se logró desarrollar un modelo que pudiera explicar el comportamiento a través del tiempo de la microalga *Botryococcus braunii* y el consumo del NO_3 , lo cual es una gran ventaja durante el monitoreo y control de los sistemas de producción. El modelo exponencial de consumo es lo

suficientemente confiable para decidir los tiempos de cultivo con base en las concentraciones de nutrientes, reflejando acertadamente los tiempos establecidos de consumo del NO₃ a través del tiempo.

El cultivo en biorreactor resulto ser altamente productivo en términos de biomasa, logrando altas productividades en poco tiempo trabajando con volúmenes a escala de laboratorio de 10L. El cultivo en continuo mostro ser mejor sistema que el cultivo en lote, debido a que el montaje no sufrió ninguna pérdida ni daño en 68 días de producción continua, ahorrando así tiempos operacionales de limpieza y montaje que no podría evitarse en los cultivos en lote.

Se logró obtener altas productividades tanto de biomasa, como de lípidos intracelulares, las cuales son superiores a diversas reportadas en la literatura, lo que muestra un avance significativo en el desarrollo e implementación de medios de cultivo y sistemas de iluminación adaptados a cultivos en lote y continuo sobre una especie en específico, lo que traduce en altos rendimientos durante el proceso.

3.6 REFERENCIAS

- Allen, J. W., DiRusso, C. C., & Black, P. N. (2015). Triacylglycerol synthesis during nitrogen stress involves the prokaryotic lipid synthesis pathway and acyl chain remodeling in the microalgae *Coccomyxa subellipsoidea*. *Algal Research*, *10*, 110–120. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.019>
- Andersen, R. A. (2005a). *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press (Vol. 336). <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.05.002>
- Andersen, R. A. (2005b). Recipes for freshwater and sea water media. In *Algal Culturing Techniques* (pp. 430–532).
- Azcon, & Bieto. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal: 2nd Edicion*.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. Ed. Taylor & Francis, Boca Raton
- Belcher, J. H. (1968). Notes on the physiology of *Botryococcus braunii* Kutzing. *Archiv Für Mikrobiologie*, *61*, 335–346. <https://doi.org/10.1007/BF00409670>

- Beuckels, A., Smolders, E., & Muylaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*, 77, 98–106. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>
- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., & Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.003>
- Casadevall, E., Dif, D., Largeau, C., Gudin, C., Chaumont, D., & Desanti, O. (1985). Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: Hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(3), 286–295. <https://doi.org/10.1002/bit.260270312>
- Choi, G., Kim, B., Ahn, C., & Oh, H. (2011). Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology*, 23, 1031–1037. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9636-1>
- Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. R., & Ravishankar, G. A. (2006). Influence of nitrogen sources on growth, hydrocarbon and fatty acid production by *Botryococcus braunii*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 5, 799–804. <https://doi.org/10.3923/ajps.2006.799.804>
- Dayananda, C., Sarada, R., Usha Rani, M., Shamala, T. R., & Ravishankar, G. A. (2007). Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass and Bioenergy*, 31, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.05.001>
- Dean, A. P., Sigeo, D. C., Estrada, B., & Pittman, J. K. (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 101, 4499–4507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.065>
- Doran, P. (2013). *Bioprocess Engineering Principles: 2nd Edition*.
- Eroglu, E., Okada, S., & Melis, A. (2011). Hydrocarbon productivities in different *Botryococcus*

- strains: Comparative methods in product quantification. *Journal of Applied Phycology*, *23*, 763–775. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9577-8>
- González-Garcinuño, Á., Tabernerero, A., Sánchez-Álvarez, J. M., Martín del Valle, E. M., & Galán, M. A. (2014). Effect of nitrogen source on growth and lipid accumulation in *Scenedesmus abundans* and *Chlorella ellipsoidea*. *Bioresource Technology*, *173*, 334–341. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.038>
- Gouveia, J. D., Ruiz, J., van den Broek, L. A. M., Hesselink, T., Peters, S., Kleinegris, D. M. M., ... Wijffels, R. H. (2017). *Botryococcus braunii* strains compared for biomass productivity, hydrocarbon and carbohydrate content. *Journal of Biotechnology*, *248*, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.008>
- Grobbelaar, J. U. (2012). Microalgae mass culture: The constraints of scaling-up. *Journal of Applied Phycology*, *24*, 315–318. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9728-6>
- Lupi, F. M., Fernandes, H. M. L., Tomé, M. M., Sá-Correia, I., & Novais, J. M. (1994). Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. *Enzyme and Microbial Technology*, *16*(7), 546–550. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90116-3)
- Nalewajko, C., Lee, K., & Shear, H. (1981). Phosphorus Kinetics in Lake Superior: Light Intensity and Phosphate Uptake in Algae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *38*(2), 224–232. <https://doi.org/10.1139/f81-029>
- Ohmori, M., Wolf, F. R., & Bassham, J. A. (1984). *Botryococcus braunii* carbon/nitrogen metabolism as affected by ammonia addition. *Archives of Microbiology*, *140*, 101–106. <https://doi.org/10.1007/BF00454910>
- Peccia, J., Haznedaroglu, B., Gutierrez, J., & Zimmerman, J. B. (2013). Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. *Trends in Biotechnology*, *31*(3), 134–138. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.010>
- Rao, R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. R., & Ravishankar, G. A. (2007a). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource*

- Technology*, 98, 560–564. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.007>
- Rao, R., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2007b). Influence of CO₂ on growth and hydrocarbon production in *Botryococcus braunii*. *Microbiology and Biotechnology*, 17(3), 414–419.
- Richmond, A. (2007). *Handbook of microalgae culture: Biotechnology and applied phycology. Analytical biochemistry* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1002/9780470995280>
- Singh, Y., & Kumar, H. D. (1992). Lipid and hydrocarbon production by *Botryococcus spp.* under nitrogen limitation and anaerobiosis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 8, 121–124. <https://doi.org/10.1007/BF01195829>
- Tasić, M. B., Pinto, L. F. R., Klein, B. C., Veljković, V. B., & Filho, R. M. (2016). *Botryococcus braunii* for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.009>
- Turpin, D. H., Elrif, I. R., Birch, D. G., Weger, H. G., & Holmes, J. J. (1988). Interactions between photosynthesis, respiration, and nitrogen assimilation in microalgae. *Canadian Journal of Botany*, 66, 2083–2097.
- Vinayagam, R., & Murty, R. (2015). Development of a Simple Kinetic Model and Parameter Estimation for Biomass and Nattokinase Production by *Bacillus subtilis* 1A752, 2(1), 6–10.
- Yeesang, C., & Cheirsilp, B. (2011). Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology*, 102(3), 3034–3040. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.013>
- Yoshimura, T., Okada, S., & Honda, M. (2013). Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. *Bioresource Technology*, 133, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.095>
- Zhila, N. O., Kalacheva, G. S., & Volova, T. G. (2005). Effect of Nitrogen Limitation on the Growth and Lipid Composition of the Green Alga *Botryococcus braunii* Kutz IPPAS H-252. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52, 311–319.

CAPITULO 4

POTENCIAL ENERGETICO DE LA MICROALGA *Botryococcus braunii*

4.1 RESUMEN

La biomasa microalgal ha sido ampliamente investigada como una fuente renovable de biomasa para la producción de biocombustibles, sin embargo, la mayoría de atención se ha enfocado en combustibles líquidos tales como el alcohol y biodiesel los cuales no son económicamente competitivos. Por otro lado, la conversión termoquímica de la biomasa es una vía alterna para transformar compuestos orgánicos en combustibles líquidos o gaseosos comenzando por la gasificación, uno de las tecnologías más prometedoras debido a su relación costo/beneficio. La gasificación transforma la biomasa en gas de síntesis (syngas) principalmente compuesto por una mezcla de hidrogeno, metano y monóxido de carbono, los cuales pueden ser luego transformados en diferentes tipos de combustibles líquidos. En este trabajo, fue evaluado el proceso pirolítico usando la biomasa una microalga productora de hidrocarburos, *Botryococcus braunii*, usando análisis termogravimétrico con métodos de estimación cinética, en orden a evaluar su energía de activación. Además, se desarrolló una simulación del proceso de gasificación con aire usando un modelo termoquímico para predecir la composición del gas de síntesis, de acuerdo a diferentes contenidos de humedad en la biomasa y la relación biomasa/aire para combustión. Los resultados mostraron que la biomasa de *Botryococcus braunii* esta principalmente compuesta de carbono (62.4%), con un material volátil que alcanza un 84% de su peso seco mientras su carbono fijo representa alrededor de un 7%. Adicionalmente, el poder calorífico (27.86 MJ kg^{-1}) y la energía de activación ($\sim 110 \text{ KJ mol}^{-1}$) difieren con respecto a otras microalgas, debido a la gran capacidad que posee *Botryococcus braunii* de acumular una gran variedad de hidrocarburos. La simulación del proceso de gasificación mostro que el contenido de humedad de la biomasa y la relación biomasa/aire, son parámetros claves en la temperatura de reacción y composición del gas de síntesis. De acuerdo con la combinación adecuada de estas variables (h , F_{rg}) es posible obtener un gas de síntesis compuesto de gases con alto contenido energético (18% CO, 17% H₂, 15% CH₄), los cuales pueden ser transformados a través de procesos como la licuefacción hidrotérmica en

combustibles líquidos tales como keroseno o gasolina, con un impacto ambiental menor que los procesos tradicionales basados en petróleo.

4.2 INTRODUCCIÓN

Los combustibles de origen fósil son la base de la infraestructura energética y productiva en el planeta, no obstante, son un recurso finito cuyo procesamiento, utilización y agotamiento representan problemáticas ambientales y sociales que actualmente son motivo de interés global. En consecuencia, el desarrollo de tecnologías de aprovechamiento de fuentes renovables de combustibles, constituye un paso clave en la transición del modelo basado en el petróleo a uno más diverso y responsable con el medio ambiente (Liu *et al.*, 2017). En el camino de esta transición, nuevas alternativas han sido alcanzadas, como el uso de la biomasa como materia prima para generar combustibles sólidos, líquidos y gaseosos, compatibles con la tecnología energética actual, ha resultado ser una alternativa (Alipour *et al.*, 2014; Saidina *et al.*, 2012; Uemura *et al.*, 2015). La biomasa, comprende una amplia diversidad de materiales derivados de plantas como madera, granos, forraje, residuos agroindustriales, como también la biomasa producida por microorganismos. Recientemente, la biomasa producida por microalgas ha atraído una especial atención, debido a la particularidad de ser microorganismos fotosintéticos acuáticos de rápido crecimiento, que pueden ser producidos de forma simple y económica. La biomasa microalgal, resulta interesante no solo por su potencial en términos energéticos, sino también por la posibilidad de establecer biorrefinerías que produzcan energía y productos de alto valor agregado, usados como materia prima en la industria alimentaria, cosmética, medica etc. (López *et al.*, 2014a).

Las microalgas poseen características propias que les confieren beneficios importantes como fuente de biomasa en comparación con otras fuentes convencionales. Al ser microorganismos fotosintéticos, su principal fuente de carbono es el dióxido de carbono; de este modo, para la síntesis de 1kg de biomasa se requieren aproximadamente 1,8Kg de CO₂ (Mata *et al.*, 2010; Rawat *et al.*, 2013). Adicionalmente, es posible obtener altas productividades en un amplio espectro de ambientes y sistemas de cultivo simples como estanques de agua dulce o agua salina, sin competir por terrenos cultivables ni poner en riesgo la seguridad alimentaria (Brown *et al.*, 2010; Pingle & Landge, 2013; Raheem *et al.*, 2015).

La conversión termoquímica de la biomasa, es una vía atractiva para la transformación de biomasa en diferentes formas de energía útil (Lopez *et al.*, 2013). Estos procesos principalmente incluyen

la combustión directa para generar calor y electricidad, pirolisis y gasificación, para producir combustibles líquidos y gaseosos, que son adecuados para alimentar eficientemente motores y turbinas (Blasi, 2009). La pirolisis juega un rol importante en los procesos de conversión termoquímica, siendo el inicio químico de los procesos de gasificación y combustión. Esto puede ser dividido en dos escenarios consecutivos, que involucran la descomposición térmica de la biomasa, a través de la volatilización de los compuestos más sensibles y una lenta conversión heterogénea a carbón (Blasi, 2009).

Un numero de autores, han reportado pirolisis en diferentes tipos de biomasa lignocelulósica, hemicelulósica, celulósica, (Yang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008) y microalgas (Barneto *et al.*, 2011; Stenseng *et al.*, 2001), mostrando grandes diferencias en el comportamiento pirolítico entre cada uno de los componentes. La hemicelulosa es fácilmente degradada a temperaturas entre 220-315 °C, celulosa requiere temperaturas más altas en un rango entre 315-400 °C, mientras que la pirolisis de las ligninas se produce en un amplio rango de temperaturas, que va desde los 150-900 °C.

Por otro lado, la gasificación de biomasa es considerada el proceso más prometedor y el que tiene la mejor relación costo/beneficio para la conversión de biomasa en energía (Lasa *et al.*, 2011). La gasificación es una tecnología que convierte materiales sólidos compuestos mayoritariamente por carbono (como la biomasa) en gas de síntesis mediante una conversión termoquímica. El gas de síntesis se compone principalmente por hidrogeno, monóxido de carbono, dióxido de carbono y metano (Balat *et al.*, 2009; Tiong *et al.*, 2016).

Durante el proceso de gasificación, la biomasa microalgal normalmente se calienta en condiciones deficientes de O₂, aire o una mezcla de ambas. Durante este proceso se da una combustión incompleta de la biomasa generando gas de síntesis, cuyo rendimiento depende de las condiciones de combustión aplicadas (Sikarwar *et al.*, 2017). Un gran número de autores han reportado el uso de microalgas como alternativa en la producción de bioenergía a través de procesos como licuefacción (Brown *et al.*, 2010; Minowa *et al.*, 1995), pirólisis (Babich *et al.*, 2011; Miao *et al.*, 2004; Shuping *et al.*, 2010) y gasificación (Chakinala *et al.*, 2010; Stucki *et al.*, 2009; Swanson *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se estudió el comportamiento pirolítico de la biomasa producida por la microalga *Botryococcus braunii* usando análisis termogravimétrico y termogravimetría diferencial (TGA/DTG), con métodos de estimación cinética, calculando las constantes cinéticas de reacción y sus energías de activación. Por otro lado, se realizó una simulación del proceso de gasificación con aire de la biomasa de *Botryococcus braunii* obtenida a través del cultivo en biorreactor de 10L, con el uso de un modelo termoquímico, en donde la reacción simula la composición de un gas de síntesis en porcentajes de metano, hidrogeno, monóxido y dióxido de carbono, variando el contenido de humedad de la biomasa y la relación biomasa/aire usado para la combustión.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Caracterización Físicoquímica de la Biomasa

4.3.1.1 Preparación de la Biomasa Microalgal

La cepa usada en este trabajo fue la microalga *Botryococcus braunii* 572 de la colección de la Universidad de Texas (UTEX). La cepa fue cultivada en un reactor de tanque agitado con un volumen de trabajo de 10L en modo continuo con una tasa de dilución $D=0.11d^{-1}$, con iluminación proveniente de lámparas LED blancas (*Life LEDs*) a una densidad de flujo de fotones promedio de $960 \mu mol m^{-2} s^{-1}$. La biomasa cosechada se sometió a centrifugación a 15000 g por 10 minutos descartando el sobrenadante y realizando 3 lavados para reducir el contenido de sales, para luego ser liofilizada a una presión barométrica de 5pa a $-50^{\circ}C$ por 1 día y almacenada al vacío.

4.3.1.2 Análisis Último

La biomasa liofilizada de *Botryococcus braunii*, se analizó por triplicado en un equipo CHNSO marca LECO modelo Truspec Micro, mediante el método ASTM D-5373-08 (2012). El análisis CHNSO se realizó a $1050^{\circ}C$ en una atmosfera de helio y los resultados fueron reportados en base seca. Basado en los resultados obtenidos respecto al contenido de carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno y azufre, se calculó la formula molecular de la biomasa $C_nH_mO_pN_qS_r$, asumiendo $n=1$ con las siguientes expresiones:

$$\frac{\%C \cdot \%O}{\%H \cdot \%O} , \quad \frac{\%C \cdot \%O}{\%N \cdot \%O} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

$$\frac{\%C \cdot \%O}{\%S \cdot \%O} , \quad \frac{\%C \cdot \%O}{\%N \cdot \%O} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

4.3.1.3 Análisis Proximal

El análisis proximal de la biomasa fue llevado a cabo usando un equipo TGA Q500 V20.13 Build 39, modificando la metodología usada por López *et al.*, 2014b. Se utilizó una muestra de 10.3 mg de biomasa liofilizada. La muestra se calentó en una primera etapa desde temperatura ambiente hasta 120°C, a una tasa de calentamiento de 40°C/min, manteniendo la isoterma por 12 min para eliminar la humedad de la biomasa. En la segunda etapa se incrementó la temperatura a la misma tasa de calentamiento hasta 800°C manteniendo la isoterma por 10 min. Se inyectó nitrógeno a un flujo constante de 60ml/min para asegurar una atmosfera inerte y así evitar la oxidación de la muestra. Luego se eliminó el nitrógeno y se inyectó aire durante la isoterma a 800°C para la combustión de la muestra. Con este análisis se calculó el contenido humedad, material volátil, carbono fijo y cenizas.

El análisis próximo se puede realizar usando las siguientes expresiones:

$$\% \text{Humedad} = \left(1 - \frac{m_1}{m_0}\right) \cdot 100 \quad (\%) \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

$$\% \text{Materia Volátil} = \left[\left(1 - \frac{m_2}{m_0}\right) \cdot 100\right] - \% \text{Humedad} \quad (\%) \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

$$\% \text{Carbono Fijo} = \left[\left(1 - \frac{m_3}{m_0}\right) \cdot 100\right] - \% \text{Humedad} - \% \text{Materia Volátil} \quad (\%) \quad (\text{Ecuación 4.5})$$

$$\% \text{Cenizas} = 100 - \% \text{Humedad} - \% \text{Materia Volátil} - \% \text{Carbono Fijo} \quad (\%) \quad (\text{Ecuación 4.6})$$

Dónde m_0 es la masa inicial del análisis, m_1 es la masa restante durante la isoterma a 120°C, m_2 es la masa restante durante la isoterma a 800°C y m_3 es la masa restante después de la inyección de aire a 800°C

4.3.1.4 Poder Calorífico

El poder calorífico superior (HHV), fue determinado a partir de 2g de biomasa seca, mediante un *Calorímetro Parr 1341 Mod 2901EB*, según las especificaciones del fabricante. El poder calorífico superior está relacionado con la energía liberada por la biomasa por unidad de masa teniendo en cuenta la energía liberada por la condensación del agua evaporada.

El poder calorífico inferior (LHV) que fue usado en este estudio, fue calculado a partir del HHV con la correlación presentada por Díez & Pérez 2017, como se muestra en la Ecuación 4.7

$$LHV = HHV - 2260 H - 20300 W \quad (\text{Ecuación 4.7})$$

Dónde HHV es el poder calorífico superior en base seca (kJ kg^{-1}), W es la humedad contenida en la muestra (% base seca) y H es el hidrogeno contenido en la muestra (% base seca).

4.3.2 Análisis Termogravimétrico

El análisis térmico de la muestra de biomasa fue llevado a cabo usando un equipo TGA Q500 V20.13 Build 39, modificando la metodología descrita por López *et al.*, 2014b. El proceso de pirólisis fue desarrollado por calentamiento después de un pretratamiento de las muestras a 110°C para eliminar la humedad, hasta llevar la temperatura a 800°C a 4 diferentes velocidades de calentamiento constantes de 10, 20, 30 y $40^\circ\text{C}/\text{min}$. Se suministró un flujo de nitrógeno a $60\text{ml}/\text{min}$ para desplazar el aire durante el proceso y evitar la oxidación la muestra. La pérdida de masa se expresó en función de la temperatura. La velocidad de pérdida de peso ($\frac{dm}{dt}$) de la biomasa se representó mediante una curva termogravimétrica derivativa (DTG).

4.3.2.1 Modelo Cinético de Pirólisis

En el experimento no isotérmico llevado a cabo en la termobalanza, la pérdida de masa se expresó en función de la temperatura. La velocidad de degradación o conversión térmica $\frac{dm}{dt}$, es una función lineal de una constante de velocidad k dependiente de la temperatura, con una función de conversión independiente de la temperatura $f(\alpha)$:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{m_0 - m}{m_0 - m_\infty} k \quad (\text{Ecuación 4.8})$$

Donde m_0 es la masa inicial de la muestra, m es la masa de la muestra a un tiempo t y m_∞ es la masa final al finalizar el análisis termogravimétrico.

$$f(\alpha) = g(\alpha) \quad (\text{Ecuación 4.9})$$

La velocidad de reacción k ha sido descrita por la expresión de Arrhenius:

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (\text{Ecuación 4.10})$$

Donde A es un factor pre-exponencial (min^{-1}), E_a es la energía de activación (J mol^{-1}), R es la constante de los gases ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta (K). Combinando las ecuaciones

4.9 y 4.10 se tiene:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) f(\alpha) \quad (\text{Ecuación 4.11})$$

Si además se tiene una velocidad de calentamiento constante, entonces tenemos que

$$\frac{d\alpha}{dt} = \beta \quad (\text{Ecuación 4.12})$$

En donde β expresa una tasa de calentamiento controlada, expresión la cual al insertarse en la Ecuación 4.11 obtenemos

$$\frac{d\alpha}{\beta} = \frac{A}{\beta} \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) f(\alpha) \quad (\text{Ecuación 4.13})$$

En este caso el interés está enfocado en la identificación de la energía de activación del proceso de pirólisis, por lo que se busca la linealización de la Ecuación 4.13 a través de la integración, la cual puede expresarse como:

$$\int_0^{\alpha} \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = \frac{A}{\beta} \int_{T_0}^T \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) dT \quad (\text{Ecuación 4.14})$$

Donde $\int_0^{\alpha} \frac{d\alpha}{f(\alpha)}$ es la forma integrada de la función $f(\alpha)$, quedando la forma integrada en la siguiente expresión

Ecuación Kissinger–Akahira–Sunose (KAS) (Kissinger, 1957)

$$\int_0^{\alpha} \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = \frac{A}{\beta} \int_{T_0}^T \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) dT$$

$$\ln\left(\frac{1}{\alpha^2}\right) = \ln \frac{1}{\alpha(\alpha)} \quad (4.15)$$

Ecuación Flynn-Wall-Ozaka (FWO) (Flynn & Wall, 1966)

$$\ln(\eta) = \ln\left(\frac{0.0048 \eta}{\eta^2}\right) - 1.016 \frac{1}{\eta} \quad (\text{Ecuación 4.16})$$

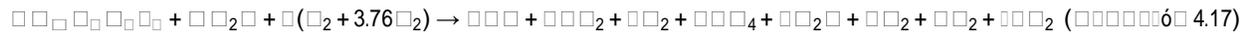
Con un valor de conversión designado, las gráficas de $\ln(\eta)$, $\ln(\eta)$ vs $\frac{1}{\eta}$ resultan en líneas rectas con pendiente $-\frac{0.0048}{\eta}$ y $-1.016 \frac{1}{\eta}$ respectivamente para cada método, a partir de estas se pueden estimar las energías de activación E_a .

4.3.3 Simulación del Proceso de Gasificación

En el presente trabajo, una simulación del proceso de gasificación fue desarrollada, usando el modelo desarrollado por Melgar *et al.*, 2007. Este modelo expresa las reacciones del proceso de gasificación en términos de balances de masa y energía. Este modelo permite predecir la composición del “Producer Gas” (PG) o gas de síntesis y la temperatura de reacción del proceso de gasificación. Por lo tanto, en función de las variables respuesta del modelo y la composición de la biomasa, es posible determinar otros parámetros importantes como poder calorífico inferior (LHV) y calidad del combustible de motor (EFQ) a partir de la composición de los productos de la gasificación (Melgar *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2016). Estos parámetros definen la calidad del combustible del PG para aplicaciones en motores de combustión interna. De esta manera, el modelo es útil para simular la composición del PG dependiendo de la composición de la biomasa, el contenido de humedad y la relación equivalente combustible-biomasa/aire (F_{rg}) (Melgar *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2016).

Los parámetros de entrada requeridos por el modelo son el análisis último de la biomasa, el contenido de humedad y el poder calorífico. Estos son usados para determinar la fórmula elemental de la biomasa ($C_nH_mO_pN_qS_r$), y su contenido molar de agua (Melgar *et al.*, 2007). A partir de lo anterior, la relación biomasa/aire puede ser estimada bajo condiciones estequiométricas, usando la Ecuación 4.18. De este modo, usando el parámetro estequiométrico calculado ($F_{stq,bms}$), la relación entre el aire real usado en la simulación y el aire estequiométrico de combustión puede ser establecido (F_{rg} , Ec. 19). Con estos dos parámetros, la cantidad molar de aire real es estimada (Ec.20). Un procedimiento detallado para la solución del modelo y las ecuaciones auxiliares se encuentra reportado por Pérez *et al.*, 2016)

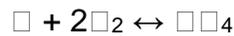
4.3.3.1 Modelo de Equilibrio Termoquímico



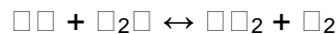
$$= \frac{1 \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot (1 + \text{C} + 16\text{H} + 14\text{O} + 32\text{O}) \cdot (\text{C}_2\text{H}_4/\text{C}_2\text{H}_4)}{(1 + 4 + 2^{-2}) \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{C}_2\text{H}_4 (\text{C}_2\text{H}_4/\text{C}_2\text{H}_4)} \quad (\text{Ecuación 4.18})$$

$$\text{C}_2\text{H}_4 = \frac{(\text{C}_2\text{H}_4/\text{C}_2\text{H}_4)}{\text{C}_2\text{H}_4} \quad (\text{Ecuación 4.19})$$

$$\text{C}_2\text{H}_4 = \frac{1}{\text{C}_2\text{H}_4} \quad (\text{Ecuación 4.20})$$



$$\therefore \frac{\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2/\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2}{(\text{C}_2\text{H}_4/\text{C}_2\text{H}_4)^2} = \frac{\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2}{\text{C}_2\text{H}_4^2} \quad (\text{Ecuación 4.21})$$



$$\therefore \frac{(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}/\text{C}_2\text{H}_4\text{O})(\text{O}_2/\text{O}_2)}{(\text{C}_2\text{H}_4/\text{C}_2\text{H}_4)(\text{O}_2/\text{O}_2)} = \frac{\text{C}_2\text{H}_4\text{O}}{\text{C}_2\text{H}_4} \quad (\text{Ecuación 4.22})$$

$$\text{C}_2\text{H}_4\text{O} = \text{C}_2\text{H}_4 + \frac{h_{\text{C}_2\text{H}_4\text{O}} - h_{\text{C}_2\text{H}_4}(\text{C}_2\text{H}_4)}{\text{C}_2\text{H}_4} \quad (\text{Ecuación 4.23})$$

En el presente estudio, una simulación fue llevada a cabo para evaluar como la composición del gas producido cambia en función de la relación equivalente Biomasa/aire (F_{rg}) y el contenido de humedad de la biomasa (h). Los principales parámetros a ser analizados en la simulación del proceso de gasificación, fueron la composición en % vol. (CH_4 , H_2 , CO_2 y CO), así como LHV_{PG} , calidad del combustible para motor (EFQ) y la temperatura de proceso

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Biomasa Bruta

El análisis proximal, ultimo y calorífico de la microalga *Botryococcus braunii* son presentados en

la Tabla 1. La biomasa liofilizada está compuesta principalmente de material volátil (VM), alcanzando un 84% de su peso seco, mientras que el carbono fijo (FC) representa alrededor de un 7%. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios con microalgas donde el VM

es alto comparado con el CF (López *et al.*, 2014b; Sanchez *et al.*, 2013; Shuping *et al.*, 2010; Vo *et al.*, 2017). Una relación alta entre VM/FC (12.72), indica que la temperatura requerida para comenzar con la volatilización y combustión es baja, por ende, la energía de activación requerida es baja, mientras que la tasa de pérdida de masa durante combustión debe ser relativamente alta (Zapata *et al.*, 2014), estos valores benefician procesos como pirolisis, gasificación, y combustión desde el punto de vista de la reactividad. El alto contenido de material volátil contenido en la microalga, tiende a disminuir la energía necesaria para volatilizar y transformarla en productos gaseosos energéticos, haciendo de este material un excelente candidato para los procesos termoquímicos mencionados.

Tabla 4.1. Caracterización de la biomasa bruta

Análisis Próximo (wt%)		Análisis Elemental (wt%, dry-ash-free)	
Material Volátil (VM)	84	C	62.4
Carbono Fijo (FC)	6.6	H	8.7
Humedad (M)	4.6	O	21.6
Ceniza (CN)	4.8	N	6.5
		S	0.8
		C:O molar ratio	3.85
		O/C mass ratio	0.345
		O:C molar ratio	0.26
Formula Molecular	$CH_{1.66}N_{0.09}O_{0.26}S_{0.005}$		
HHV (MJ kg⁻¹, dry basic)	27.86		
LHV (MJ kg⁻¹, dry basic)	24.73		

La composición elemental mostrada por *B. Braunii*, se compone principalmente de carbono (C 62.4%) y oxígeno (O 21.6%), cuyas relaciones son comparables con biomasa leñosa y carbón. La relación molar O:C (0.26), es menor que diferentes fuentes de biomasa forestales y puede ser comparada directamente con las relaciones O:C de combustibles naturales y fósiles tales como la turba (0.49), carbón sub-bituminoso (0.18), carbón bituminoso alto en volátiles (0.18) y lignito (0.38) (Spokas, 2010). López *et al.* 2014, reportaron la composición elemental de 3 microalgas usadas con fines energéticos, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis* y *Nannochloropsis gaditana*, las cuales poseen cantidades de carbono alrededor de 45% con relación molar O:C aproximadamente de 0,7 quedando clasificadas dentro del rango de biomasa forestal (Spokas, 2010). *B. braunii* posee un contenido de carbón más alto que otras especies de microalgas conocidas (Chen *et al.*, 2014a; Chen *et al.*, 2014b; Sanchez *et al.*, 2013; Shuping *et al.*, 2010) y biomasa forestal (Pérez *et al.*, 2016). El contenido de carbón en la microalga *B. braunii* puede ser

comparada con diferentes tipos de carbón (Zapata et al., 2014a), los cuales están en un rango entre 64-76% de carbono y tienen relaciones molares O:C entre 0.17 y 0.27. Lo anterior, puede ser debido a que la microalga *Botryococcus braunii* tiene la capacidad de acumular hidrocarburos similares al petróleo, susceptibles de ser transformados en diversos combustibles mediante procesos de hidrocracking (Metzger et al., 1990; Metzger et al., 1985; Prado & Antoniosi, 2009; Sang, 2003), lo que hace que las cadenas carbonadas estén en su mayoría compuestas por enlaces C-H, lo que se ve reflejado en el gran contenido de Hidrogeno en su composición molecular (H:C; 1.66). Para el caso de *Botryococcus braunii* 572 perteneciente a la raza A de la especie, esta acumula esencialmente *n*-alcadienos, mono, tri, tetra y pentaenos, C₂₃–C₃₃, los cuales son derivados a partir de los ácidos grasos (Metzger et al., 1990, 1985).

4.4.2 Poder Calorífico

La combustión es la ruta más directa para usar las microalgas como combustible (Chen et al., 2014). El poder calorífico es un indicador crucial que revela el potencial que posee la biomasa para aplicaciones industriales. Los resultados obtenidos de la microalga muestran un poder calorífico considerable de 27.86 MJ/kg (HHV) y 24.73 MJ/kg (LHV), el cual es superior a lo reportado en diversos estudios para otras especies de microalgas, como lo es el HHV para *Chlamidomonas JSC4*, *Chlorella sorokiniana*, y *Dunaliella tertiolecta* de 17.41, 20.4 y 14.24 MJ/kg respectivamente (Chen et al., 2014a; Chen et al., 2014b; Sanchez et al., 2013; Shuping et al., 2010).

En el 2016 Pérez y colaboradores realizaron una caracterización energética de 5 variedades de biomasa leñosa comúnmente usada como fuente de energía, en este estudio concluyeron que la especie *Pinus patula* poseía las mejores propiedades energéticas arrojando valores de % de carbono y poder calorífico inferior libre de humedad y cenizas (LHV_{daf}) de 55.70% y 19.15MJ/kg, que luego a través de la evaluación de diferentes condiciones de torrefacción (Ramos et al., 2017) se pudo establecer qué condiciones permitían obtener las mejores propiedades del material. El resultado fue que la especie *Pinus patula* bajo condiciones de torrefacción de 240°C - 30min obtuvo los mejores resultados, obteniéndose un material carbonoso con un poder calorífico inferior (LHV) de 23.9 MJ/kg, cuyo valor es inferior al resultado obtenido para la microalga en estudio (24.73 MJ/kg). El poder calorífico de la microalga estudiada es significativamente alto y puede ser comparado directamente con el poder calorífico de algunos carbones energéticos de uso industrial. Zapata y colaboradores (Zapata et al., 2014b), estudiaron un total de 10 carbones colombianos de

las principales minas del país, clasificando los carbones desde *Bituminoso alto en volátiles C* hasta *Semi-antracita*, los cuales arrojaron un HHV desde 27.5 hasta 33.8 MJ/kg, el cual representa un intervalo de valores en donde entraría el valor obtenido por la microalga en estudio (27.86 MJ/kg). En la Tabla 2 se encuentran las composiciones y el poder calorífico de algunas especies de microalgas, biomasa leñosa y carbones colombianos

Tabla 4.2. Composición elemental y calorífica de especies naturales de uso energético

	HHV (MJ/kg)	LHV (MJ/kg)	C	H	N	O	S	Ref
MICROALGAS								
<i>Botryococcus braunii</i> (Este estudio)	27.86	24.73	62.4	8.7	6.5	21.6	0.8	Presente estudio
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CW15	22		52	7.4	10.7	29.8		(Kebelmann, Hornung, Karsten, & Griffiths, 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> wild type	23		50.2	7.3	11.1	31.4		(Kebelmann et al., 2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	18		43.9	6.2	6.7	43.4		(Kebelmann et al., 2013)
<i>Chlamydomonas</i> sp	17.41		40.32	7.38	2.61	44.5		(Bui et al., 2015)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	20.4		45.07	7.64	3.88	35.52		(Bui et al., 2015)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	19.8		53.3	5.2	9.8	31.7		(Minowa et al., 1995)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	14.24		39	5.37	53.02	1.99	0.62	(Shuping et al., 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	22		53.01	8.67	3.26	35.05		(Bach & Chen, 2017)
<i>Spirulina</i>	16.9		47.6	7.4	7.1	37.4	0.5	(Hirano, Hon-nami, Kunito, Hada, & Ogushi, 1998)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	17.9		57.8	8	8.6	25.7		(Biller et al., 2011)
BIOMASA LEÑOSA								
<i>Pinus maximinoi</i>		19.03	54.84	7.09		38.06		(Pérez et al., 2016)
<i>Pinus patula</i>		19.15	55.7	7.13		37.18		(Pérez et al., 2016)
<i>Eucalyptus grandis</i>		19.08	53.68	6.79		39.53		(Pérez et al., 2016)
<i>Acacia mangium</i>		18.76	53.35	6.75		39.9		(Pérez et al., 2016)
<i>Gmelina arborea</i>		18.9	53.37	7.04		39.59		(Pérez et al., 2016)
<i>Guazuma ulmifolia</i>		16.8	49.1	5.8		45.1		(Díez & Pérez, 2017)
<i>Cordia alliodora</i>		18.2	49.2	5.8		45		(Díez & Pérez, 2017)
<i>Eucalyptus grandis</i>		17.8	51	6.1		42.9		(Díez & Pérez, 2017)
<i>Pinus patula</i>		17.6	47.2	6.2	0.3	46.3		(Díez & Pérez, 2017)
Mustard stalk	17.57		43.87	4.58	0.76	42.75	0.06	(Maiti et al., 2007)
Mangle	25.34		66.46	4.37	0.03	29.14		(Adnan, Susanto, Binous, & Muraza, 2017)
cascarilla de arroz	14.6		49.2	2.2	0.44	48.02	0.06	(Adnan et al., 2017)
Hojas de palma	18.11		43.6	4.76	0.57	50.56	0.51	(Adnan et al., 2017)
CARBONES COLOMBIANOS								
Cauca	31.94		75.88	5.43	0.16	17.34	1.19	(Zapata et al., 2014)
Santander	33.3		74.31	3.91	0	20.88	0.9	(Zapata et al., 2014a)

Cesar	27.39	74.56	6.07	0.05	17.41	1.91	(Zapata et al., 2014a)
Cundinamarca	26.59	66.82	5.76	0.1	26.38	0.94	(Zapata et al., 2014a)
Antioquia	25.23	70.78	6.13	0.02	22.63	0.44	(Zapata et al., 2014a)

4.4.3 Pirólisis de biomasa microalgal

4.4.3.1 Proceso de Degradación Térmica

El inicio de la degradación térmica de la biomasa está ligado a la descomposición de los materiales más susceptibles al calor, lo cual se ve reflejado en un cambio en la masa de la muestra. La Figura 4.1 presenta la pérdida de masa respecto a la temperatura (TGA), en donde se puede apreciar la estabilidad térmica de la biomasa, hasta temperaturas aproximadas a los 200°C, comenzando a partir de esta temperatura, la disminución de la masa ligada a la volatilización y descomposición del material, sin importar la velocidad de calentamiento. En la Figura 4.1, se aprecia que, al aumentar la tasa de calentamiento, la pérdida de masa se retrasa respecto a la temperatura, haciendo que las curvas se desplacen hacia la derecha, esto es debido a que las velocidades menores poseen mayores tiempos de residencia entre cada intervalo de temperatura, lo cual no está representado en la gráfica, incurriendo en errores de análisis.

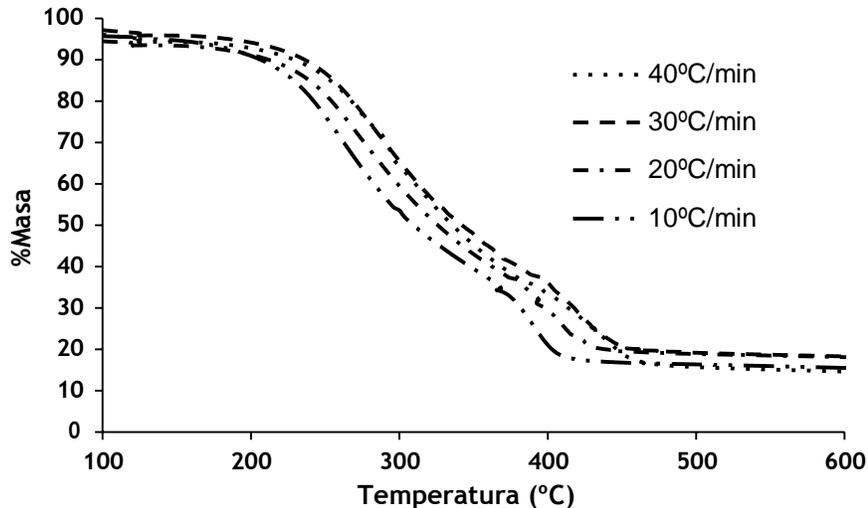


Figura 4.1. Curvas termogravimétricas para cada velocidad de calentamiento (TGA). Pérdida de masa en función de la temperatura (°C)

La Figura 4.2, muestra las curvas en forma derivativa de la velocidad de conversión (DTG) respecto a la temperatura, en un rango entre 100 y 700°C. Se puede observar que sin importar la velocidad de calentamiento las curvas están divididas en dos etapas, la primera reacción en cadena ocurre entre los 250-350°C y la segunda entre los 400-500°C. El primer pico corresponde la primera

reacción en cadena, en donde los compuestos como la celulosa, hemicelulosa y proteínas padecen de diferentes mecanismos de descomposición como despolimerización, descarboxilación y craqueo (Peng *et al.*, 2001a; Peng *et al.*, 2001b). En la segunda reacción, a la cual pertenece el segundo pico del DTG, se atribuye la reacción a componentes lipídicos (Kebelmann *et al.*, 2013). Bui y colaboradores (Bui *et al.*, 2015), realizaron un estudio cinético de pirolisis de dos microalgas *Chlorella sorokiniana* y *Chlamydomonas sp.*, con el cual se encontró que las velocidades máximas de conversión ocurrían a 300°C, con un segundo pico poco pronunciado a 400°C. A partir de esto concluyeron que el primer pico se debe a los carbohidratos y proteínas y el segundo a los lípidos. En comparación con los resultados obtenidos en este estudio, la intensidad del segundo pico (relacionado con la velocidad de reacción de los lípidos), se puede explicar considerando que la microalga *Botryococcus braunii* está compuesta en una gran proporción de material lipídico, especialmente constituido por hidrocarburos de cadena lineal con algunas insaturaciones (Metzger & Largeau, 2005).

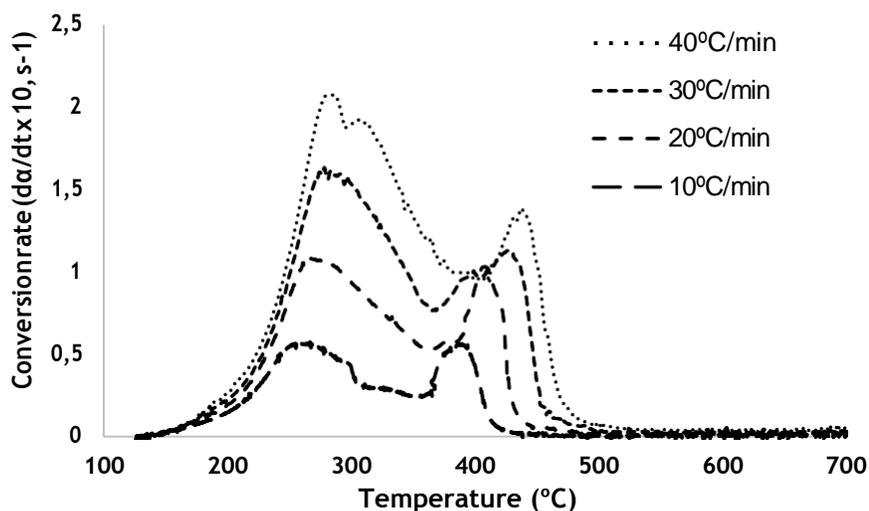


Figura 4.2. Curvas termogravimétricas diferenciales para cada velocidad de calentamiento (DTG). Velocidad de reacción en función de la temperatura (°C)

Es bien conocido que la máxima velocidad de conversión se ve afectada por la velocidad de calentamiento (Ceylan & Kazan, 2015; Sanchez *et al.*, 2012). Como se ve en la Figura 4.2, las mayores velocidades de conversión fueron obtenidas con las tasas de calentamiento más altas. Así, la máxima velocidad de conversión incrementa al aumentar la tasa de calentamiento (Vo *et al.*, 2017), debido a que una mayor energía térmica facilita la transferencia de calor entre la superficie y el interior de la muestra, debido a la diferencia de temperaturas que se presenta (Li *et al.*, 2011;

Park *et al.*, 2009). Lo anterior se debe a la limitada capacidad que posee la biomasa microalgal para conducir el calor, produciéndose gradientes de temperatura a través del radio de la biomasa (Shuping *et al.*, 2010), generando diferencias sustanciales en el perfil de temperatura a altas tasas de calentamiento, provocando una descomposición inicial en la superficie del material y luego una reacción en cadena que descompone el resto del material interno a altas velocidades debido a la energía acumulada (Maiti *et al.*, 2007).

4.4.3.2 Constantes de reacción cinética

Diferentes velocidades de conversión a diferentes tasas de calentamiento y temperaturas fueron elegidas para determinar la energía de activación de la muestra. A partir de las ecuaciones (15-16), al graficar una expresión del tipo $\ln\left(\frac{1-x}{x^2}\right)$, $\ln(x)$ vs $\frac{1}{T}$ se debe observar una tendencia lineal. A partir de estas líneas rectas se puede estimar la energía de activación de la degradación dinámica a diferentes grados de conversión (x) (Shuping *et al.*, 2010). La Figura 4.3 muestra las gráficas obtenidas por el método KAS y el método FWO, en donde se puede visualizar la familia de líneas aparentemente paralelas para cada grado de conversión analizado.

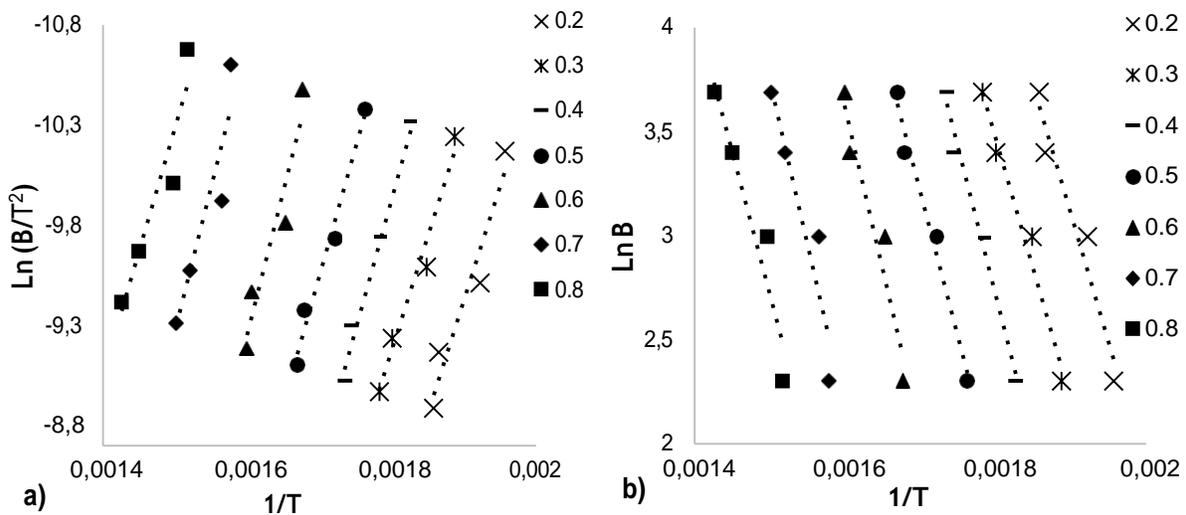


Figura 4.3. Gráficas para la determinación de energías de activación a diferentes valores de conversión x por los métodos KAS (a) y FWO (b).

Tabla 4.3. Energías de activación obtenidas para diferentes valores de conversión

Grado de Conversión (□)	Método KAS				Método FWO			
	Pendiente	Energía Activación (KJ mol ⁻¹)	Coef. Corr (R ²)	Factor Pre-exponencial Ln A (min ⁻¹)	Pendiente	Energía Activación (KJ mol ⁻¹)	Coef. Corr (R ²)	Factor Pre-exponencial Ln A (min ⁻¹)
0,2	-11289	93,86	0,933	19,28	-12339	97,55	0,943	20,13
0,3	-11480	95,44	0,970	19,24	-12570	99,38	0,975	20,10
0,4	-13009	108,16	0,977	21,26	-14133	111,74	0,980	22,02
0,5	-12706	105,64	0,976	19,92	-13872	109,67	0,979	20,75
0,6	-14307	118,95	0,914	21,37	-15529	122,77	0,926	22,11
0,7	-14316	119,02	0,861	20,10	-15615	123,45	0,880	20,91
0,8	-12385	102,97	0,898	17,14	-13745	108,67	0,915	18,13
Media		106,29				110,46		

La Tabla 4.3 muestra la distribución de energías de activación y los coeficientes de correlación (R²) obtenidos por el método KAS y FWO para varios grados de conversión de la biomasa microalgal, así como cada uno de los factores pre-exponenciales respectivos. Se observa que las energías obtenidas son comparables entre los métodos usados, y que el intervalo de energías va desde 90-120 KJ/mol dependiendo del grado de conversión requerido y el factor pre-exponencial es similar en ambos. Una energía de activación baja, significa que la biomasa requiere poca energía para romper los enlaces químicos entre sus átomos e iniciar una reacción en cadena, incrementando la eficiencia termoquímica del proceso (Ceylan & Kazan, 2015). Las energías de activación, encontradas en este estudio para *Botryococcus braunii*, son menores a las reportadas en otros trabajos para otras microalgas y materias primas empleadas para la producción de bioenergía. (Wu *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2015).

Li y colaboradores (Li *et al.*, 2011), investigaron las características cinéticas y pirolíticas de 3 tipos de algas rojas *Pophyra yezoensis*, *Plocamium telfairiae* Harv y *Corallina pilulifera*, encontrando las energías de activación de 154, 244 y 250KJ/mol respectivamente. Por otro lado, Ceylan y colaboradores en 2015 (Ceylan & Kazan, 2015) investigaron el comportamiento y la cinética del proceso de pirolisis en las microalgas *Nannochloropsis oculata* (NO) y *Tetraselmis sp* (TS) a través de un estudio termogravimétrico no isotérmico. Encontraron que se requieren altas energías de activación para ambas microalgas con valores de 152.2 KJ/mol (NO) y 334KJ/mol (TS). Estos valores son mayores a los presentados en este estudio. Lo anterior implica que esta diferencia podría esperarse teniendo en cuenta las características bioquímicas de la biomasa de las microalgas comparadas. En 2009 Park y colaboradores (Park *et al.*, 2009), estudiaron la cinética de reacción

pirolítica del *Roble*, encontrando que la energía de activación estaba entre 216.4KJ/mol hasta 461KJ/mol dependiendo del grado de conversión, en donde las energías de activación disminuían lentamente desde un grado de conversión de 5% hasta un 60%. A partir de este punto y hasta un 85% de conversión, las energías de activación se elevaban rápidamente hasta más de dos veces la energía requerida a conversiones bajas.

Botryococcus braunii posee menores valores de energía de activación ($\sim 110 \text{ KJ mol}^{-1}$) en comparación con otras microalgas y biomasa lignocelulósica. Esto puede explicarse como resultado del alto contenido de material volátil que posee (84%), provocando que sus componentes a base de carbono posean menor resistencia térmica comparados con la biomasa leñosa (Yuan *et al.*, 2015). Otros resultados encontrados en la literatura (Li *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2012), sugieren que la cinética pirolítica esta principalmente influenciada por el tipo y composición de la biomasa usada como materia prima.

4.4.4 Proceso de Gasificación con Aire

Usando un modelo validado para gasificación de biomasa leñosa, de forma teórica se estudió la influencia del contenido de humedad y la relación biomasa/aire, sobre la composición de un gas de síntesis. En dicha simulación no se tuvieron en cuenta las pérdidas de calor a la entrada, ni a la salida, ya que como supuestos del modelo esta establecer el proceso como adiabático

4.4.4.1 Temperatura de Reacción

En la Figura 4.4, se puede apreciar como la temperatura del proceso tiende a disminuir al aumentar F_{rg} , esto se debe a que, al aumentar esta relación disminuye la cantidad de aire que entra en el proceso produciéndose una reacción de combustión incompleta en la cual aumenta el desequilibrio estequiométrico. También es observado que la temperatura se ve levemente afectada por el cambio de humedad en la biomasa, esto puede deberse a la energía necesaria para evaporar el agua contenida en la muestra lo que afecta de forma negativa la temperatura de proceso (Melgar *et al.*, 2007).

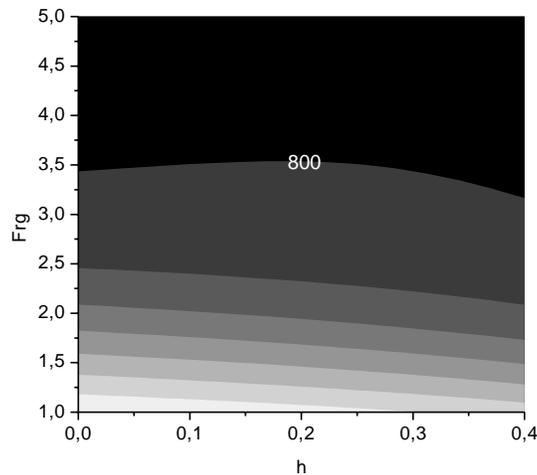


Figura 4.4. Distribución de temperatura de proceso en función del contenido de humedad de la biomasa y la relación biomasa/aire (F_{rg}). Tad.800:200:2000 (K)

En condiciones reales, la temperatura del proceso es crítica para el auto sostenimiento de la reacción y sus productos, pues temperaturas que no son suficientemente altas, pueden causar que las moléculas volátiles tales como alquitranes, puedan pasar a través del proceso y luego condensarse cuando el proceso enfrié. Tal fenómeno puede ocasionar diversos problemas en motores de combustión interna, debido a que altos valores de F_{rg} no son viables en el proceso por las temperaturas relativamente bajas que desarrolla, a menos que se use un equipo apropiado que sostenga el proceso en estas condiciones (Henriksen *et al.*, 2006; Melgar *et al.*, 2007)

4.4.4.2 Composición del PG

La composición teórica estimada del gas producido se puede observar en la Figura 4.5, allí se encuentra la variación en contenido volumétrico de cada uno de los componentes principales los cuales son el CO(a), H₂(b), CH₄(c) y CO₂(d).

La composición del gas producido está en función del contenido de humedad de la biomasa h y la relación biomasa/aire F_{rg} . La distribución de la concentración de la diferentes especies químicas en la composición del gas producido depende principalmente del equilibrio químico entre las especies, el cual es controlado indirectamente por la temperatura de reacción, que depende a su vez del F_{rg} (Melgar *et al.*, 2007).

El contenido de monóxido de carbono (Fig. 4.5(a)) en el gas producido, se ve afectado tanto por el F_{rg} como por la h . La tendencia a aumentar su rendimiento a bajo contenido de humedad de la biomasa y altos valores de F_{rg} , es debido a que el contenido de aire suministrado es muy limitado

y la combustión cada vez se aleja más de la estequiométrica, favoreciendo la producción de CO; además un bajo contenido de humedad, favorece la reacción debido a que una disponibilidad mayor de agua, inclina la reacción a la producción de hidrogeno y dióxido de carbono (Melgar *et al.*, 2007). Este resultado es comparable con lo reportado por (Sanchez *et al.*, 2013), quienes encontraron que al aumentar la cantidad de agua en el vapor de alimentación en el proceso SCWG, se obtenían mayores rendimientos de Hidrogeno y se reducía la producción de metano.

El contenido de hidrogeno (Fig. 4.5(b)) por su parte, se ve afectado mayormente por el cambio de F_{rg} , en donde valores de 2.5 dan un máximo de rendimiento en su contenido independientemente del contenido de humedad de la biomasa. Esto se debe a que la reacción para la producción de hidrogeno se ve mayormente afectada por la temperatura de reacción, la cual se relaciona con el F_{rg} , esto causa que al aumentar la relación biomasa/aire, se llegue a un punto de inflexión en una temperatura crítica relativamente baja. Esto se traduce en el favorecimiento de la producción de metano en vez de hidrogeno (Melgar *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2017).

El contenido de metano (Fig. 4.5(c)) aumenta ante altos valores F_{rg} , que se reflejan en una temperatura de reacción relativamente baja. Esto obedece a la ventaja de la reacción entre el hidrogeno y el monóxido de carbono producidos para formar metano (Tian *et al.*, 2017). Estos resultados concuerdan con lo reportado por (Hirano *et al.*, 1998) quienes encontraron que la fracción de H₂ producida en la gasificación de *Spirulina*, mejora cuando aumenta la temperatura de reacción a 1000°C. Esta temperatura fue alcanzada en la simulación a un F_{rg} aproximado de 3.5, valor en el cual se observó un alto rendimiento en la producción de hidrogeno en la simulación.

El dióxido de carbono (Fig. 4.5(d)) por su parte, muestra dos comportamientos respecto a las variables. En la primera se observa un incremento en su rendimiento al disminuir el F_{rg} , esto es debido a que se acerca a la estequiometria de la reacción, produciéndose una reacción completa en donde los principales productos son el CO₂ y el agua. Por otro lado, se aprecia un rendimiento máximo a altos valores de F_{rg} y alto contenido de humedad, en donde parte contenida en la biomasa reacciona con el monóxido de carbono para formar dióxido de carbono e hidrogeno.

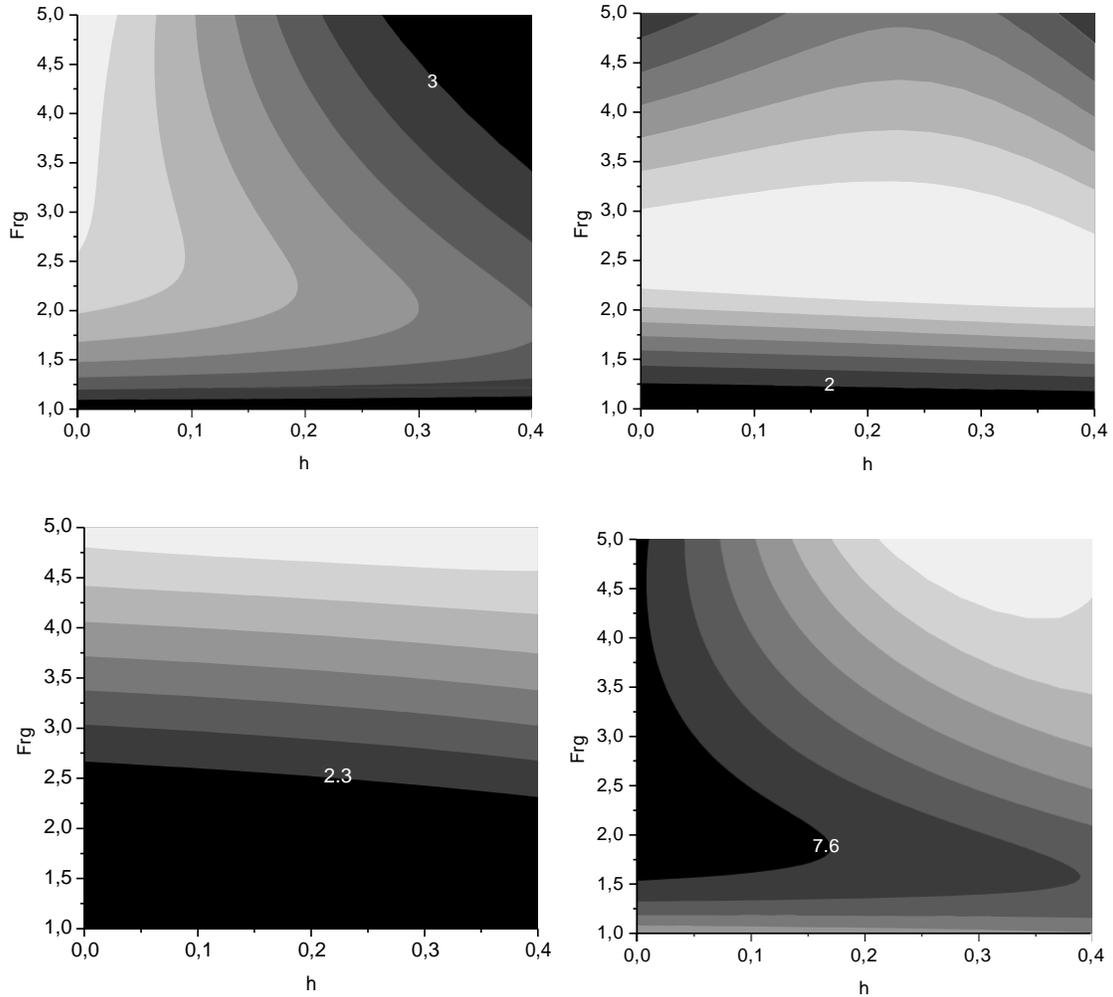


Figura 4.5. Distribución volumétrica de los componentes del gas de síntesis en función del contenido de humedad y el F_{rg} . (a) CO 3:3:21; (b) H₂ 2:2.5:17; (c) CH₄ 2.3:2.5:17.3; (d) CO₂ 7.6:1.9:19

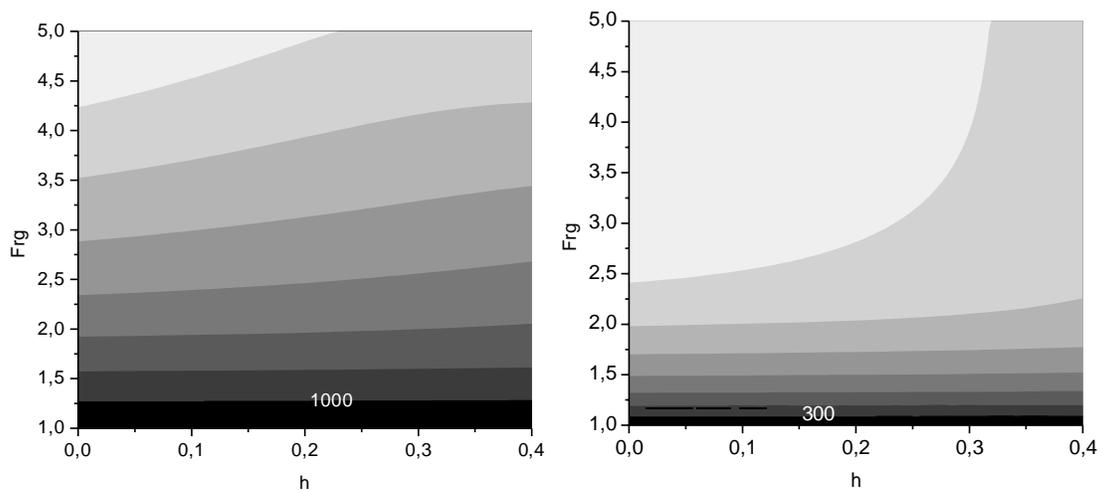


Figura 4.6. LHV y EFQ en función del contenido de humedad y el F_{rg} . (a) LHV 1000:1050:7300; (b) EFQ 300:300:2100

El poder calorífico inferior LHV (Fig. 4.6(a)) tiende a incrementar a altos valores de F_{rg} y bajo contenido de humedad pues bajo estas condiciones la producción de gases con alto poder calorífico como el CH_4 y CO incrementa, por lo tanto, el aumento en el contenido de humedad de la biomasa esta inversamente relacionada con el LHV. A fin de evaluar la calidad del PG como combustible para motores de combustión interna alternativa (MCIA), el parámetro EFQ nos indica el poder calorífico de la mezcla aire-combustible, y es el punto de partida para la comparación energética de combustibles (Lapuerta *et al.*, 2001). La distribución del EFQ (Fig. 4.6 (b)) tiene una tendencia similar al obtenido por el LHV, pues solo se ve afectado por los cambios en la humedad a F_{rg} altos ($F_{rg}>2.5$), en donde los mayores valores de EFQ se encuentran en los intervalos de mayor concentración de CO y H_2 . En condiciones de alta humedad y F_{rg} , la molécula predominante es el CH_4 , el cual tiene un efecto negativo sobre el EFQ cuando se compara con el efecto del CO , debido a que el metano requiere una cantidad mayor de aire en una combustión estequiométrica para producir la misma cantidad de energía que el CO (Melgar *et al.*, 2007).

4.5 CONCLUSIONES

El análisis sobre la composición de *Botryococcus braunii* mostro características propias de biomasa algal, con un alto porcentaje de carbón y material volátil. La cantidad de carbón en *Botryococcus braunii* (62%), sobrepasa al presentado por una gran variedad de biomasa forestal, con valores alrededor de 55%

Botryococcus braunii posee un potencial energético con diferentes carbones colombianos, lo que indica que con el adecuado proceso de producción se podría tener una fuente renovable y sostenible de energía, que no compite con terrenos destinados para agricultura y mitiga el impacto del CO_2 en el ambiente. El poder calorífico encontrado en este estudio (27.86MJ/kg-HHV), sugiere idóneamente su uso como una fuente alternativa de energía, presentando valores mayores que varía especies de microalgas, biomasa forestal o lignocelulósica y carbón. Adicionalmente, la biomasa leñosa requiere varios años en alcanzar la masa requerida para los procesos mencionado y se debe garantizar la sostenibilidad de esta materia prima en caso de que se requiera para la producción de energía. Contrario, la microalga aunque crece relativamente lenta, su velocidad es mayor a la de las plantas superiores y se puede producir en estanques abiertos, teniendo una producción más sostenible y amigable con el medio ambiente.

La energía de activación requerida es baja comparada con diferentes fuentes de combustibles sólidos comúnmente usados tales como carbón y biomasa leñosa, además de ser menor a los valores presentados por diversas microalgas, en el cual *Botryococcus braunii* obtuvo un valor que no excede los 120KJ/mol de biomasa. Se encontró que, a valores de conversión altos, mayor es la energía de activación requerida para el proceso de pirolisis.

El alto contenido de material volátil, contenido de carbono, HHV, energía de activación bajas y el gran poder calorífico, demuestran que *Botryococcus braunii* es una materia prima con un alto potencial para la producción de biocombustibles a través de procesos termoquímicos como la gasificación. La simulación mostro, que la correcta combinación de variables (h , F_{rg}) hace posible obtener un gas de síntesis con un alto contenido energético, el cual a través de procesos como la licuefacción hidrotérmica, pueden ser transformados en combustibles líquidos como keroseno o gasolina, con un impacto ambiental menor al presentado hoy por los combustibles de origen fósil.

El EFQ obtenido, arroja valores promisorios para el uso de PG directamente en MCI, arrojando valores calóricos (2100 kJ kg^{-1}), muy cercanos a los obtenidos por mezclas pura de metano de aire durante la combustión (2500 kJ kg^{-1}), lo que se traduce en la producción de un gas de síntesis apto para usar en motores convencionales a partir de microalgas, a través de procesos termoquímicos tales como la gasificación.

Los resultados mostrados a lo largo de este trabajo, pueden ser acoplados en términos de productividad energética, con los flujos máxicos producidos a escala de laboratorio relacionados con su potencial energético, extrapolando los resultados a procesos a escala industrial de producción de microalgas, o en este caso de *Botryococcus braunii*. Los resultados obtenidos muestran que el sistema de producción obtuvo una productividad energética de $3 \times 10^{-4} \text{ kWh L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, lo que traduce en la posibilidad de generación de energía a gran escala.

4.6 REFERENCIAS

Adnan, M. A., Susanto, H., Binous, H., & Muraza, O. (2017). Feed compositions and gasification potential of several biomasses including a microalgae: A thermodynamic modeling approach. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(27), 17009–17019. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.187>

- Alipour, R., Yusup, S., Uemura, Y., Lai, B., Chin, F., Loong, H., & Al, A. (2014). Syngas production from palm kernel shell and polyethylene waste blend in fluidized bed catalytic steam co-gasification process. *Energy*, 75, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.04.062>
- Babich, I. V, van der Hulst, M., Lefferts, L., Moulijn, J. A., O'Connor, P., & Seshan, K. (2011). Catalytic pyrolysis of microalgae to high-quality liquid bio-fuels. *Biomass and Bioenergy*, 35, 3199–3207. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.043>
- Bach, Q., & Chen, W. (2017). A comprehensive study on pyrolysis kinetics of microalgal biomass. *Energy Conversion and Management*, 131, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.10.077>
- Balat, M., Balat, M., Kirtay, E., & Balat, H. (2009). Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals . Part 2 : Gasification systems. *Energy Conversion and Management*, 50(12), 3158–3168. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2009.08.013>
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2002). *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(3), 245–279. <https://doi.org/10.1080/07388550290789513>
- Barneto, A. G., Vila, C., & Ariza, J. (2011). Eucalyptus kraft pulp production: Thermogravimetry monitoring. *Thermochimica Acta*, 520(1–2), 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2011.03.027>
- Biller, P., Riley, R., & Ross, A. B. (2011). Catalytic hydrothermal processing of microalgae: Decomposition and upgrading of lipids. *Bioresource Technology*, 102, 4841–4848. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.113>
- Blasi, C. Di. (2009). Combustion and gasification rates of lignocellulosic chars. *Progress in Energy and Combustion Science*, 35(2), 121–140. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.08.001>
- Brown, T. M., Duan, P., & Savage, P. E. (2010). Hydrothermal Liquefaction and Gasification of *Nannochloropsis sp* . *Energy Fuels*, 24(9), 3639–3646. <https://doi.org/10.1021/ef100203u>

- Bui, H. H., Tran, K. Q., & Chen, W. H. (2015). Pyrolysis of microalgae residues - A Kinetic study. *Bioresource Technology*, *199*, 362–366. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.069>
- Ceylan, S., & Kazan, D. (2015). Pyrolysis kinetics and thermal characteristics of microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis sp.* *Bioresource Technology*, *187*, 1–5. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.081>
- Chakinala, A. G., Brilman, D. W. F., Van Swaaij, W. P. M., & Kersten, S. R. A. (2010). Catalytic and non-catalytic supercritical water gasification of microalgae and glycerol. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *49*, 1113–1122. <https://doi.org/10.1021/ie9008293>
- Chen, W.-H., Huang, M.-Y., Chang, J.-S., & Chen, C.-Y. (2014). Thermal decomposition dynamics and severity of microalgae residues in torrefaction. *Bioresource Technology*, *169*, 258–264. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.086>
- Chen, W. H., Lin, B. J., Huang, M. Y., & Chang, J. S. (2014). Thermochemical conversion of microalgal biomass into biofuels: A review. *Bioresource Technology*, *184*, 314–327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.050>
- Díez, H. E., & Pérez, J. F. (2017). Physicochemical Characterization of Representative Firewood Species Used for Cooking in Some Colombian Regions. *International Journal of Chemical Engineering*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/4531686>
- Flynn, J. ., & Wall, L. . (1966). A quick, direct method for the determination of activation energy from thermogravimetric data. *Journal Polym. Sci. Polym*, (4), 323–328.
- Henriksen, U., Ahrenfeldt, J., Jensen, T. K., Gøbel, B., Bentzen, J. D., Hindsgaul, C., & Sørensen, L. H. (2006). The design, construction and operation of a 75 kW two-stage gasifier. *Energy*, *31*(10–11), 1542–1553. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2005.05.031>
- Hirano, A., Hon-nami, K., Kunito, S., Hada, M., & Ogushi, Y. (1998). Temperature effect on continuous gasification of microalgal biomass: theoretical yield of methanol production and its energy balance. *Catalysis Today*, *45*, 399–404.
- Kebelmann, K., Hornung, A., Karsten, U., & Griffiths, G. (2013). Intermediate pyrolysis and

- product identification by TGA and Py-GC/MS of green microalgae and their extracted protein and lipid components. *Biomass and Bioenergy*, 49(0), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.006>
- Kissinger, H. . (1957). Reaction kinetics in differential thermal analysis. *Analytical Chemistry*, (29), 1702–1706.
- Lasa, H. De, Salaiques, E., Mazumder, J., & Lucky, R. (2011). Catalytic Steam Gasification of Biomass: Catalysts , Thermodynamics and Kinetics. *Chemical Reviews*, 111, 5404–5433.
- Lapuerta, M., Hernandez, J., Tinaut, F., Horrillo, A. (2001). Thermochemical behavior of producer gas from gasification of lignocellulosic biomass in SI engines. *SAE Technical Papers*. 2001-01-3586. <https://doi.org/10.4271/2001-01-3586>.
- Li, D., Chen, L., Zhang, X., Ye, N., & Xing, F. (2011). Pyrolytic characteristics and kinetic studies of three kinds of red algae. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1765–1772. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.011>
- Liu, G., Liao, Y., Wu, Y., Ma, X., & Chen, L. (2017). Characteristics of microalgae gasification through chemical looping in the presence of steam. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(36), 22730–22742. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.173>
- López-González, D., Fernandez-Lopez, M., Valverde, J. L., & Sanchez-Silva, L. (2014a). Comparison of the steam gasification performance of three species of microalgae by thermogravimetric–mass spectrometric analysis. *Fuel*, 134, 1–10. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.05.051>
- López-González, D., Fernandez-Lopez, M., Valverde, J. L., & Sanchez-Silva, L. (2014b). Pyrolysis of three different types of microalgae: Kinetic and evolved gas analysis. *Energy*, 73, 33–43. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2014.05.008>
- Lopez Gonzales, D., Valverde, J. L., Fernandez Lopez, M., & Sanchez Silva, L. (2013). Thermogravimetric-mass spectrometric analysis on combustion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 143, 562–574. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.052>

- Maiti, S., Purakayastha, S., & Ghosh, B. (2007). Thermal characterization of mustard straw and stalk in nitrogen at different heating rates. *Fuel*, 86(10–11), 1513–1518. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.11.016>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Melgar, A., Perez, J. F., Laget, H., & Horillo, A. (2007). Thermochemical equilibrium modelling of a gasifying process. *Energy Conversion and Management*, 48(1), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2006.05.004>
- Metzger, P., Allard, B., Casadevall, E., Berkaloff, C., & Couté, A. (1990). Structure and chemistry of a new chemical race of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae) that produced lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon. *Journal of Phycology*, 26, 258–266. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00258.x>
- Metzger, P., Berkaloff, E., Casadevall, E., & Coute, A. (1985). Alkadiene and botryococcene producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 24(10), 2305–2312. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83032-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83032-0)
- Metzger, P., & Largeau, C. (2005). *Botryococcus braunii*: A rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 486–496. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1779-z>
- Miao, X., Wu, Q., & Yang, C. (2004). Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 71, 855–863. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2003.11.004>
- Minowa, T., Yokoyama, S., & Kishimoto, M. (1995). Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel*, 74(12), 1735–1738.
- Park, Y. H., Kim, J., Kim, S. S., & Park, Y. K. (2009). Pyrolysis characteristics and kinetics of oak trees using thermogravimetric analyzer and micro-tubing reactor. *Bioresource Technology*, 100(1), 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.040>

- Peng, W., Wu, Q., & Tu, P. (2001a). Pyrolytic characteristics of heterotrophic *Chlorella protothecoides* for renewable bio-fuel production. *Journal of Applied Phycology*, *13*(1), 5–12.
- Peng, W., Wu, Q., Tu, P., & Zhao, N. (2001b). Pyrolytic characteristics of microalgae as renewable energy source determined by thermogravimetric analysis. *Bioresource Technology*, *80*, 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00072-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00072-4)
- Pérez, J. F., Melgar, A., & Horrillo, A. (2016). Thermodynamic methodology to support the selection of feedstocks for decentralised downdraft gasification power plants. *International Journal of Sustainable Energy*, *36*(10), 1010–1028. <https://doi.org/10.1080/14786451.2016.1162792>
- Pingle, S. D., & Landge, A. D. (2013). Comparative Account on Proliferation Rate of Microalgae Used in Biodiesel Production by Indigenously Prepared Bioreactors. *Advanced Laboratory Research in Biology*, *4*(1).
- Prado, C. M. R., & Antoniosi Filho, N. R. (2009). Production and characterization of the biofuels obtained by thermal cracking and thermal catalytic cracking of vegetable oils. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *86*(2), 338–347. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2009.08.005>
- Raheem, A., Wan Azlina, W. A. K. G., Taufiq Yap, Y. H., Danquah, M. K., & Harun, R. (2015). Thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *49*, 990–999. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.186>
- Ramos-Carmona, S., Delgado-Balcázar, S., & Pérez, J. F. (2017). Physicochemical characterization of torrefied wood biomass under air as oxidizing atmosphere. *BioResources*, *12*(3), 5428–5448. <https://doi.org/10.15376/biores.12.3.5428-5448>
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, *103*, 444–467. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>
- Saidina, N. A., Misson, M., Haron, R., & Ahmad, Mohd, Bunch, F. (2012). Bio-Oils and Diesel Fuel Derived from Alkaline Treated Empty Fruit Bunch (EFB). *Biomass & Renewables*, *1*, 6–14.

- Sanchez Silva, L., López González, D., Garcia Minguillan, A. M., & Valverde, J. L. (2013). Pyrolysis, combustion and gasification characteristics of *Nannochloropsis gaditana* microalgae. *Bioresource Technology*, *130*, 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.002>
- Sanchez Silva, L., Lopez Gonzalez, D., Villaseñor, J., Sanchez, P., & Valverde, J. L. (2012). Thermogravimetric-mass spectrometric analysis of lignocellulosic and marine biomass pyrolysis. *Bioresource Technology*, *109*, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.001>
- Sang, O. Y. (2003). Biofuel Production from Catalytic Cracking of Palm Oil. *Energy Sources*, *25*(9), 859–869. <https://doi.org/10.1080/00908310390221309>
- Shuping, Z., Yulong, W., Mingde, Y., Chun, L., & Junmao, T. (2010). Pyrolysis characteristics and kinetics of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* using thermogravimetric analyzer. *Bioresource Technology*, *101*(1), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.020>
- Sikarwar, V. S., ZHao, M., Fennell, P. S., Shah, N., & Anthony, E. J. (2017). Progress in biofuel production from gasification. *Progress in Energy and Combustion Science*, *61*, 189–248. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2017.04.001>
- Spokas, K. A. (2010). Review of the stability of biochar in soils: predictability of O:C molar ratios. *Carbon Management*, *1*(2), 289–303. <https://doi.org/10.4155/cmt.10.32>
- Stenseng, M., Jensen, A., & Dam-Johansen, K. (2001). Investigation of biomass pyrolysis by thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *58–59*, 765–780. [https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(00\)00200-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(00)00200-X)
- Stucki, S., Ludwig, C., Haiduc, G., & Brandenberger, M. (2009). Catalytic gasification of algae in supercritical water for biofuel production and carbon capture †. *Energy & Environmental Science*, *2*, 535–541. <https://doi.org/10.1039/b819874h>
- Swanson, R. M., Platon, A., Satrio, J. A., & Brown, R. C. (2010). Techno-economic analysis of biomass-to-liquids production based on gasification. *Fuel*, *89*(SUPPL. 1).

<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.07.027>

Tian, T., Li, Q., He, R., Tan, Z., & Zhang, Y. (2017). Effects of biochemical composition on hydrogen production by biomass gasification. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(31), 19723–19732. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.06.174>

Tiong, L., Komiyama, M., Uemura, Y., & Thanh, T. (2016). Catalytic supercritical water gasification of microalgae: Comparison of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.10.009>

Uemura, Y., Saadon, S., Osman, N., Mansor, N., & Tanoue, K. (2015). Torrefaction of oil palm kernel shell in the presence of oxygen and carbon dioxide. *Fuel*, 144, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.12.050>

Vo, T. K., Ly, H. V., Lee, O. K., Lee, E. Y., Kim, C. H., Seo, J. W., ... Kim, S. S. (2017). Pyrolysis characteristics and kinetics of microalgal *Aurantiochytrium sp.* KRS101. *Energy*, 118, 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.12.040>

Wang, G., Li, W., Li, B., & Chen, H. (2008). TG study on pyrolysis of biomass and its three components under syngas. *Fuel*, 87(4–5), 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2007.02.032>

Wu, K., Liu, J., Wu, Y., Chen, Y., Li, Q., Xiao, X., & Yang, M. (2014). Pyrolysis characteristics and kinetics of aquatic biomass using thermogravimetric analyzer. *Bioresource Technology*, 163, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.162>

Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86(12–13), 1781–1788. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013>

Yang, H., Yan, R., Chen, H., Zheng, C., Lee, D. H., & Liang, D. T. (2006). In-Depth Investigation of biomass pyrolysis based on three major components: Hemicellulose, cellulose, and lignin. *Energy and Fuels*, (20), 388–393. <https://doi.org/10.1021/ie1025453>

- Yang, X., Zhang, R., Fu, J., Geng, S., Cheng, J. J., & Sun, Y. (2014). Pyrolysis kinetic and product analysis of different microalgal biomass by distributed activation energy model and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Bioresource Technology*, *163*, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.040>
- Yuan, T., Tahmasebi, A., & Yu, J. (2015). Comparative study on pyrolysis of lignocellulosic and algal biomass using a thermogravimetric and a fixed-bed reactor. *Bioresource Technology*, *175*, 333–341. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.108>
- Zapata, R. B., Bayer, J. F. P., & Jiménez, C. S. (2014a). Carbones colombianos: clasificación y caracterización termoquímica para aplicaciones energéticas Colombian coals: classification and thermochemical characterization for energy applications Carvões colombianos: classificação e caracterização para aplica, *27*(2), 43–54.
- Zapata, R. B., Bayer, J. F. P., & Jiménez, C. S. (2014b). Carbones colombianos: clasificación y caracterización termoquímica para aplicaciones energéticas Colombian coals: classification and thermochemical characterization for energy applications Carvões colombianos: classificação e caracterização para aplica, *27*(2), 43–54.