

Nutrients effect on the performance of *Botryococcus braunii* biomass for the obtaining of biodiesel

Jimmy Oblitas^{1,2}, Karen Vilchez¹, Jordana Morales¹, Yuleicy Cieza², Wilson Castro³

¹ Universidad Privada del Norte, Perú. jimy.oblitas@upn.edu.pe

² Universidad Nacional de Cajamarca, Perú, yciezar16_1@unc.edu.pe

³ Universidad Nacional de Frontera, Perú, wcastro@unfs.edu.pe

Abstract– The idea of using microalgae as a biosource of biodiesel is being taken seriously because of the escalating price of fossil fuel. The objective the research was to determine the optimal levels of concentrations of sulfate, carbonate, nitrate and phosphate in the performance of biomass, by assessing the individual and combined effect of concentrations on the growing of the microalgae, through the application of a type-24 factorial experimental design in the performance of Botryococcus braunii biomass isolated in the high-Andean zone of Cajamarca-Perú. According to the results of the study of individual effects of these four salts, it was stated that carbonate and nitrate salts have significant effect on the growing of Botryococcus braunii ($p < 0.05$). This was characterized by using a chromatography equipment of gases adapted to mass and it was found that hydrocarbons generated have 26 to 32 carbons in their composition.

Keywords-- Microalgae, Botryococcus Braunii, biomass, chromatography, biodiesel.

Nutrients effect on the performance of *Botryococcus braunii* biomass for the obtaining of biodiesel

Efecto de nutrientes en el rendimiento de biomasa de *Botryococcus braunii* para la obtención de biodiesel

Jimmy Oblitas^{1,2}, Karen Vilchez¹, Jordana Morales¹, Yuleicy Cieza², Wilson Castro³

¹ Universidad Privada del Norte, Perú, jimy.oblitas@upn.edu.pe

² Universidad Nacional de Cajamarca, Perú, yciezar16_1@unc.edu.pe

³ Universidad Nacional de Frontera, Perú, wcastro@unfs.edu.pe

Abstract– *La idea de utilizar las microalgas como una fuente biológica de biodiésel se está tomando en serio debido al aumento del precio de los combustibles fósiles. El objetivo de la investigación fue determinar los niveles óptimos de las concentraciones de sulfato, carbonato, nitrato y fosfato en el rendimiento de biomasa, evaluando el efecto individual y combinado sobre el crecimiento de la microalga, mediante la aplicación de un diseño experimental factorial del tipo 2⁴ en el rendimiento de biomasa de *Botryococcus braunii* aislado de la zona alto andina de Cajamarca- Perú. De acuerdo con los resultados del estudio de efectos individuales de estas cuatro sales, se pudo establecer que las sales de carbonato y nitrato ejercen un efecto significativo en el crecimiento de *Botryococcus braunii* ($p < 0.05$), se caracterizó usando un equipo de cromatografía de gases acoplados a masas hallando que los hidrocarburos generados tienen 26 a 32 carbonos en su composición.*

Keywords– *Microalgas, Botryococcus Braunii, cromatografía de gases, biomasa, biodiesel.*

Abstract– *The idea of using microalgae as a biosource of biodiesel is being taken seriously because of the escalating price of fossil fuel. The objective the research was to determine the optimal levels of concentrations of sulfate, carbonate, nitrate and phosphate in the performance of biomass, by assessing the individual and combined effect of concentrations on the growing of the microalgae, through the application of a type-24 factorial experimental design in the performance of *Botryococcus braunii* biomass isolated in the high-Andean zone of Cajamarca-Perú. According to the results of the study of individual effects of these four salts, it was stated that carbonate and nitrate salts have significant effect on the growing of *Botryococcus braunii* ($p < 0.05$). This was characterized by using a chromatography equipment of gases adapted to mass and it was found that hydrocarbons generated have 26 to 32 carbons in their composition.*

Keywords– *Microalgae, Botryococcus Braunii, chromatography, biomass, biodiesel.*

I. INTRODUCCIÓN

Las fuentes de energía convencionales como los combustibles fósiles, el petróleo, el carbón y el metano son fuentes no renovables. Estas son las principales fuentes de

energía en la actualidad [1]. De 1970 a 2015, el consumo de combustibles fósiles fue de alrededor del 86% a nivel mundial del consumo total. La producción de petróleo alcanzará un límite máximo para 2022 y también el consumo continuará aumentando, impulsado principalmente por China e India[2]

La búsqueda de una menor contaminación y menos contribución al calentamiento global son los factores clave que obligan a cambiar hacia una solución alternativa con respecto a combustibles, hoy en día varios países han enfatizado y alentado el uso de combustibles alternativos como el biodiesel por vías gubernamentales y regulatorias, tanto por incentivos como por necesidades volumétricas prescriptivas[3]

En la última década, el biodiesel se propuso como una opción de combustible alternativo, por ello ha tenido un mayor incremento en la producción de otros biocombustibles[4] y en esta tendencia de biocombustibles se ha generado la revolución de las materias primas de cuarta generación para Biodiesel, las cuales tienen como característica un alto contenido energético, fácil disponibilidad y menor costo basado en tecnologías de biología sintética. Las materias primas de biodiesel se vienen mejorando para aumentar la eficiencia de conversión a combustible con la ayuda de la mejora en la biotecnología de procesamiento de biomasa[5]

Las microalgas, como recursos de cuarta generación de producción de biodiesel, pueden contribuir positivamente en este objetivo, debido a los mayores rendimientos de energía por hectárea en comparación con la materia prima de primera y segunda generación de obtención de biodiesel.[6]. El cultivo de microalgas es un tipo de acuicultura para generar alimentos u otros productos de importancia que se pueden obtener de las mismas. Estos son organismos fotosintéticos microscópicos autotróficos y / o heterótrofos simples. Pueden ser de forma unicelular o multicelular, creciendo en hábitats acuáticos marinos y de agua dulce. Se estima que existen entre 200,000 y 800,000 especies, de las cuales se han encontrado y estudiado alrededor de 50,000 especies y que generan una gran cantidad de lípidos que son adecuados para la producción de biodiesel[7]

Las microalgas al ser organismos fotosintéticos pueden usar de manera eficiente CO₂ (fuente de carbono), luz (fuente de energía) y agua para sintetizar fosfolípidos, proteínas,

ácidos nucleicos y lípidos ricos en carbono, que pueden convertirse en biodiesel a través del proceso de transesterificación[8]

El biodiesel, es la mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos producidos por un proceso de transesterificación, se considera energía neutral en carbono y renovable y puede satisfacer la creciente demanda del consumo de energía mundial [9]

Actualmente, la producción de microalgas se realiza principalmente a escala de laboratorio y piloto, el sistema de cultivo de microalgas se ha desarrollado desde estanques abiertos tradicionales hasta diferentes fotobiorreactores modernos[10]

El crecimiento de microalgas requiere luz solar y nutrientes como agua, nitrógeno, carbono, fósforo y oligoelementos de metales pesados como nutrientes. El carbono y el nitrógeno se consideran los elementos más importantes en la ruta metabólica fotosintética. Los iones metálicos minerales juegan un papel importante en el crecimiento de microalgas, como la osmoregulación y la capacidad osmoadaptativa, así como la configuración molecular de los complejos fotosintéticos[11]

La microalga *Botryococcus braunii* está ampliamente distribuida en ambientes de agua dulce y es un productor de hidrocarburos, que se acumula en su matriz de colonias. El contenido de hidrocarburos en ellos es significativamente mayor en comparación con el de otras microalgas productoras de biodiesel, alcanzando un peso seco promedio del 75%[12]

Debido a su facilidad de adaptación, se ha detectado su presencia en varios lugares alrededor del mundo, entre ellos la ciudad de Cajamarca, lo cual brinda grandes facilidades para el cultivo y estudio de la especie nativa de *Botryococcus braunii*, con la ventaja de encontrarse ya adaptada a las condiciones climáticas de la región. El propósito de esta investigación fue determinar el efecto combinado de Nitrato de potasio, Fosfato ácido de potasio, Sulfato de magnesio heptahidratado y Carbonato ácido de sodio en el rendimiento de biomasa de *Botryococcus braunii* para la obtención de biodiesel.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima

Se utilizaron micro algas *Botryococcus braunii* aislada de las lagunas de Alto Perú en la zona de Cajamarca - Perú, en la figura 1 se muestra la zona de muestreo A, B y C a 3933 m.s.n.m., en la Zona 17M con coordenada este de 763334.99 m E y coordenada norte de 9236298.22 m S.

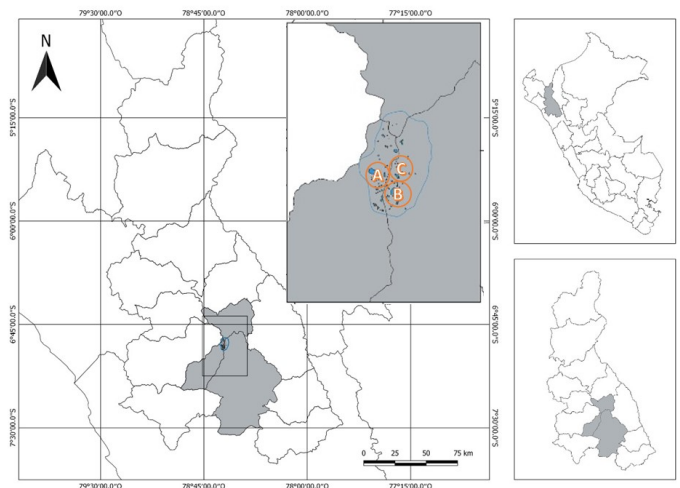


Fig. 1 Zona de muestreo de *Botryococcus braunii*

Para el aislamiento de la microalga se empleó la técnica de dilución y enjuague con medio CHU 13 mostrado en la Tabla I [13].

TABLE I
Composición del medio CHU 13

Nutriente	Cantidad
Nitrato de potasio	0.2 g/L
Fosfato ácido de potasio	0.04 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.1 g/L
Cloruro de calcio hexahidratado	0.08 g/L
Citrato de hierro	0.01 g/L
Acido cítrico	0.1 g/L
Carbonato ácido de sodio	0.4 g/L
Boro	0.50 ppm
Manganeso	0.50 ppm
Cinc	0.05 ppm
Cobre	0.02 ppm
Cobalto	0.02 ppm
Molibdeno	0.02 ppm
pH	7.5 – 7.7

Las características morfológicas observadas en la cepa obtenida de las lagunas de Alto Perú coinciden con lo reportado por Lozoya [14], una micrografía se muestra en la Figura 2.



Fig. 2. Botryococcus braunii aislado

2.2 Toma de muestra de medio de biorreactor

Se usaron frascos de plástico resistente, en los que la biomasa de microalgas no se adhiera a las paredes del recipiente, se usó una intensidad lumínica de 5000 luxes, temperatura entre 20 ± 2 °C y fotoperiodo 12:12 con 5% de inoculo. Luego del crecimiento por 20 días se realizó la filtración obteniendo la biomasa [15].

2.3 Procedimiento de cuantificación de biomasa

El contenido de hidrocarburo en la microalga se determinó por diferencia del peso seco antes y después de la extracción del hidrocarburo usando hexano, y su caracterización usando cromatografía de gases acoplados a masas (GC-MS) con una columna ultra inertes HP-1ms.

2.4 Análisis estadístico

Se usó un arreglo factorial completo del tipo 2^4 para las variables independientes: Nitrato de potasio, Fosfato ácido de potasio, Sulfato de magnesio heptahidratado y Carbonato ácido de sodio y como variable dependiente la biomasa (g/l). Se usó un análisis de Varianza (ANOVA) para determinar la influencia de los parámetros variables sobre las variables de respuesta, dentro del Análisis de Varianza se utilizaron los diagramas de Pareto como herramienta estadística. Se recurrió a la metodología de la Superficie de Respuesta, una herramienta estadística cuyo objetivo es optimizar la variable de interés, determinando las condiciones óptimas de operación del sistema. El planteamiento del diseño experimental y el análisis estadístico se desarrolló utilizando la herramienta informática STATISTIC 12.0.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efecto individuales de nutrientes en el rendimiento de biomasa de Botryococcus braunii

Para el crecimiento de Botryococcus braunii se usó como base el medio CHU 13, para una cinética de 20 días teniendo como insumos variables el Nitrato de potasio, Fosfato ácido de potasio, Sulfato de magnesio heptahidratado y Carbonato ácido de sodio.

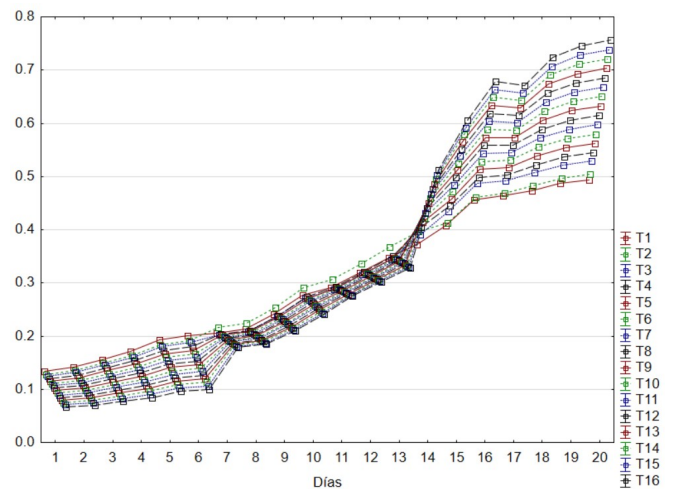


Fig. 3 Cinética de crecimiento de Botryococcus braunii

En la figura 3 se muestra los resultados obtenidos durante el seguimiento del cultivo para los 16 tratamientos aplicados, para una cinética de 20 días en donde se observan las diferentes fases de crecimiento de Botryococcus braunii. Inicialmente, una fase de latencia de aproximadamente 7 días de duración, que se caracteriza por un incremento mínimo en la biomasa debido a la necesidad de adaptación de la microalga, a partir del día 8 comenzó su fase exponencial, en donde la microalga crece a su máxima velocidad y finalmente entre los días 18 y 19 entra en la fase estacionaria. estos periodos concuerda con otras investigaciones donde muestra periodos similares [16].

En la figura 4 se muestra el diagrama de Pareto para los efectos que son significativos ($p < 0.05$) mostrando una línea vertical que representa el test del 95 % de nivel de significancia, se observa que el Carbonato ácido de sodio es quien tiene el efecto más significativo ($p = 0.0004$) seguido por el Sulfato de magnesio heptahidratado ($p = 0.0429$) con respecto al aumento de la producción de biomasa de Botryococcus braunii. Resultados parecidos en procesos de optimización son evaluados en más de una variedad de microalgas con fines de obtención de biodiesel [17].

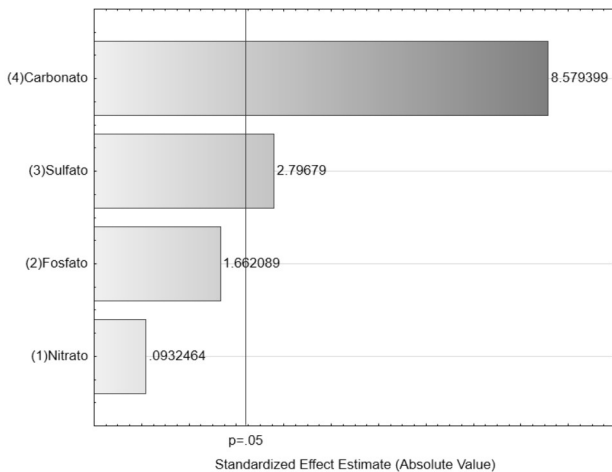


Fig. 4 Pareto de efectos del diseño experimental

La fuente de nitrógeno añadida fue la que menos efecto tuvo en el crecimiento, esto corrobora investigaciones donde se agregó nitritos y esta no afectó el crecimiento de *Botryococcus braunii*, pese a que fue la única fuente de nitrógeno añadida [18]. El nitrógeno en las plantas hace parte de las proteínas, se encuentra en las bases nitrogenadas y es uno de los componentes de la molécula de clorofila.

De los resultados individuales obtenidos (figura 5) se aprecia un aumento progresivo en la concentración final de biomasa influenciada principalmente por el aumento en la concentración de carbonato de sodio. La disminución de la concentración de fosfato en el medio presenta un efecto negativo al limitar el crecimiento de la biomasa.

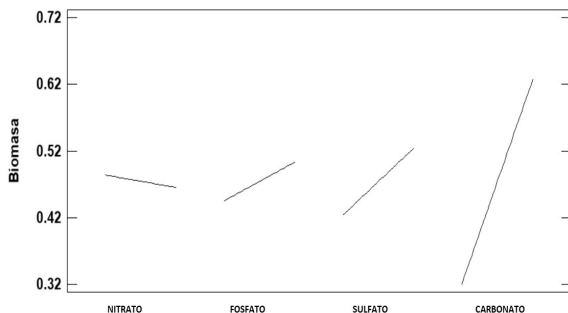


Fig. 5 Gráfico de efectos principales

Un efecto que se destaca en la matriz experimental es la disminución de nitrato en el medio de cultivo, la cual produjo un aumento inusual en la concentración de biomasa (0.80 g/L); este efecto contradice lo reportado en la literatura encontrado donde el proceso muchas veces aumenta la biomasa en sentido proporcional a este nutriente.[19]

3.2 Efecto asociados de nutrientes en el rendimiento de biomasa de *Botryococcus braunii*

Se generó una superficie de respuesta (figura 6 y 7), cuyo modelo seleccionado tuvo un R^2 de 94.2345% lo cual muestra un adecuado ajuste de los datos, la ecuación correspondiente es la siguiente:

$$\text{Biomasa (g/l)} = -0.751875 + 2.175*(N) + 0.725*(F) + 5.85*(S) + 2.65*(C) - 3.875*(N)*(F) - 2.5*(N)*(S) - 3.375*(N)*(C) - 0.75*(F)*(S) + 0.6875*(F)*(C) - 10.75*(S)*(C)$$

Dónde: (N)Nitrato de potasio, (F)Fosfato ácido de potasio, (S)Sulfato de magnesio heptahidratado y (C) Carbonato ácido de sodio.

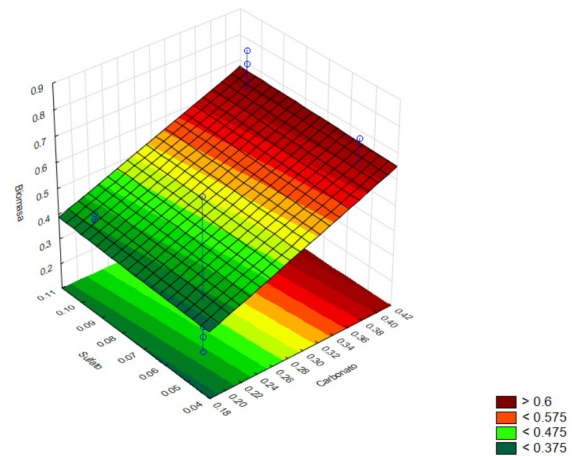


Fig. 6 Superficie de respuesta de la combinación significativa de Sulfato y Carbonato

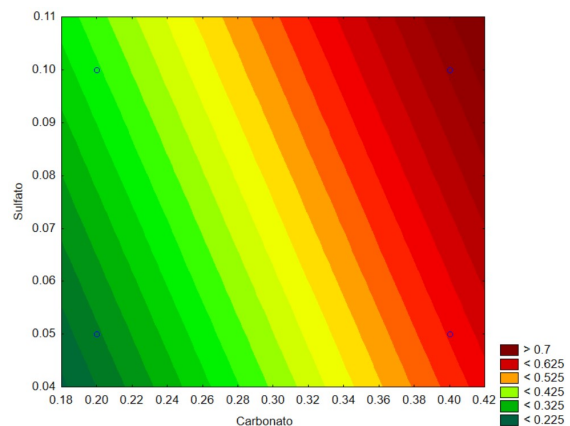


Fig. 7 gráfico de contorno de la combinación significativa de Sulfato y Carbonato

Resultados muestran que otras fuentes de carbono como CO_2 también son altamente eficientes para *Botryococcus braunii* en altas concentraciones mayores a 0,06v/v [16], lo

cual junto con los resultados de esta investigación podrían generar tecnologías viables para la producción de este tipo de microalga.

Al optimizar la respuesta de biomasa, obtenemos que el valor optimo a obtener sería de 0.735625 g/l de biomasa de *Botryococcus braunii* usando los nutrientes significativos (Carbonato ácido de sodio y Sulfato de magnesio heptahidratado)

3.3 Caracterización por cromatografía de gases acoplados a masas (GC-MS)

Del proceso de análisis por GC-MS se obtuvieron picos a tiempos de retención de 28.05 minutos que corresponden a un 91% del área total de la muestra, utilizando hexano como solvente y de acuerdo a la comparación con las muestras patrón (alcanos), la biomasa obtenida corresponde a carbonos en el intervalo C₂₆ - C₃₂. De acuerdo a la bibliografía esto corrobora a la variedad de *Botryococcus braunii* del tipo A que se caracteriza por formar n-alcadieno y / o N-trienos (C₂₃ - C₃₃) [20] pero por el número mayor de carbonos detectados que fueron 32 se puede prever que también generó botriococenos (C₃₀ - C₃₇) y escualenos metilados (C₃₁ - C₃₄) [21], [22]

Tal como se observa *Botryococcus braunii* puede acumular niveles inusualmente altos de hidrocarburos triterpenoides, lo que lo convierte en una fuente potencial de productos químicos de alto valor[23].

IV. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados del estudio de efectos individuales de estas cuatro sales, se puede establecer que el Sulfato de magnesio heptahidratado y Carbonato ácido de sodio ejercieron un efecto significativo en el metabolismo de la microalga *Botryococcus braunii*. Esto puede representar un hallazgo importante en la viabilidad económica del proceso de obtención de biodiesel a partir de este tipo de microalga y de acuerdo con los resultados se corroboró que tanto la biomasa como los lípidos tienen el potencial de ser utilizados como materia prima para biocombustibles.

REFERENCIAS

[1] E. Manoj Kumar, D. Jagadish, y R. Bharath Kumar, «A note on algae as potential source for alternate fuels – Biodiesel», *Int. J. PharmTech Res.*, vol. 6, n.º 6, pp. 1783-1793, 2014.

[2] D. Singh, D. Sharma, S. L. Soni, S. Sharma, P. Kumar Sharma, y A. Jhalani, «A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel», *Fuel*, vol. 262, p. 116553, feb. 2020, doi: 10.1016/j.fuel.2019.116553.

[3] N. Kumar, Varun, y S. R. Chauhan, «Performance and emission characteristics of biodiesel from different origins: A review», *Renew.*

Sustain. Energy Rev., vol. 21, pp. 633-658, 2013, doi: 10.1016/j.rser.2013.01.006.

[4] F. C. De Oliveira y S. T. Coelho, «History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: A review», *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 75, pp. 168-179, 2017, doi: 10.1016/j.rser.2016.10.060.

[5] O. Inganäs y V. Sundström, «Solar energy for electricity and fuels», *Ambio*, vol. 45, n.º 1, pp. 15-23, ene. 2016, doi: 10.1007/s13280-015-0729-6.

[6] Z. Yin *et al.*, «A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions», *Bioresour. Technol.*, vol. 301, p. 122804, abr. 2020, doi: 10.1016/j.biortech.2020.122804.

[7] P. T. Pienkos y A. Darzins, «The promise and challenges of microalgal-derived biofuels», *Biofuels Bioprod. Biorefining*, vol. 3, n.º 4, pp. 431-440, 2009, doi: 10.1002/bbb.159.

[8] M. K. Enamala *et al.*, «Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae», *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 94, pp. 49-68, 2018, doi: 10.1016/j.rser.2018.05.012.

[9] A. Abo Markeb *et al.*, «The use of magnetic iron oxide based nanoparticles to improve microalgae harvesting in real wastewater», *Water Res.*, vol. 159, pp. 490-500, ago. 2019, doi: 10.1016/j.watres.2019.05.023.

[10] T. Mathimani y N. Mallick, «A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel - Key challenges and future directions», *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 91, pp. 1103-1120, 2018, doi: 10.1016/j.rser.2018.04.083.

[11] P. M. Schenk *et al.*, «Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production», *Bioenergy Res*, vol. 1, pp. 20-43, 2008.

[12] Y. Chisti, «Biodiesel from microalgae», *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, n.º 3, pp. 294-306, 2007, doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.

[13] K. Furuhashi, K. Saga, S. Okada, y K. Imou, «Seawater-Cultured *Botryococcus braunii* for Efficient Hydrocarbon Extraction», *PLOS ONE*, vol. 8, n.º 6, p. e66483, jun. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0066483.

[14] E. Lozoya-Gloria, X. M. la Cruz, y T. A. Ozawa-Uyeda, «The Colonial Microalgae *Botryococcus braunii* as Biorefinery», *Microalgae - Physiol. Appl.*, sep. 2019, doi: 10.5772/intechopen.88206.

[15] T. J. McGenity, K. N. Timmis, y B. N. Fernandez, Eds., *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols, Texto original: Bioproducts, Biofuels, Biocatalysts and Facilitating Tools*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2017.

[16] N. A. J. Villareal y V. Kafarov, «Desarrollo preliminar de una metodología de suministro de CO₂ a cultivos de *Botryococcus Braunii* para la producción de biocombustibles», *Rev. ION*, vol. 28, n.º 2, pp. 33-50, 2015.

[17] A. Kumar, C. Guria, y A. K. Pathak, «Optimal cultivation towards enhanced algae-biomass and lipid production using *Dunaliella tertiolecta* for biofuel application and potential CO₂ bio-fixation: Effect of nitrogen deficient fertilizer, light intensity, salinity and carbon supply strategy», *Energy*, vol. 148, pp. 1069-1086, abr. 2018, doi: 10.1016/j.energy.2018.01.042.

[18] S. Yang, J. Wang, W. Cong, Z. Cai, y F. Ouyang, «Utilization of Nitrite as a Nitrogen Source by *Botryococcus Braunii*», *Biotechnol. Lett.*, vol. 26, n.º 3, pp. 239-243, feb. 2004, doi: 10.1023/B:BILE.0000013722.45527.18.

[19] J. G. Qin y Y. Li, «Optimization of the Growth Environment of *Botryococcus braunii* Strain CHN 357», *J. Freshw. Ecol.*, vol. 21, n.º 1, pp. 169-176, mar. 2006, doi: 10.1080/02705060.2006.9664110.

[20] P. Metzger, C. Berkaloff, E. Casadevall, y A. Coute, «Alkadiene- and botryococcene-producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*», *Phytochemistry*, vol. 24, n.º 10, pp. 2305-2312, 1985, doi: 10.1016/S0031-9422(00)83032-0.

[21] M. Kawachi, T. Tanoi, M. Demura, K. Kaya, y M. M. Watanabe, «Relationship between hydrocarbons and molecular phylogeny of *Botryococcus braunii*», *Algal Res.*, vol. 1, n.º 2, pp. 114-119, oct. 2012, doi: 10.1016/j.algal.2012.05.003.

- [22] P. Metzger y E. Casadevall, «Lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon from new strains of the green alga *Botryococcus braunii*.», *Tetrahedron Lett.*, vol. 28, n.º 34, pp. 3931-3934, 1987, doi: 10.1016/S0040-4039(00)96423-2.
- [23] K. A. Al-Hothaly, E. M. Adetutu, B. H. May, M. Taha, y A. S. Ball, «Towards the commercialization of *Botryococcus braunii* for triterpenoid production», *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 42, n.º 10, pp. 1415-1418, oct. 2015, doi: 10.1007/s10295-015-1658-x.