

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
ESCUELA DE POSGRADO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



UNS
ESCUELA DE
POSGRADO

**Optimización de un proceso biotecnológico para
producir bioetanol a partir de microalgas**
Porphyridium cruentum

**Tesis para optar el Grado de
Doctor en Ingeniería Agroindustrial**

Autor:

Mg. Jimenez Escobedo, Manuel José
DNI N° 32793485
Código ORCID: 0000-0002-6042-2358

Asesor:

Dr. Castillo Calderón, Augusto
DNI. N° 32931123
Código ORCID: 0000-0001-9237-8542

Línea de Investigación
Desarrollo Biotecnológico

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ
2024



UNS
ESCUELA DE
POSGRADO

CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR

OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUCIR BIOETANOL A PARTIR DE MICROALGAS *Porphyridium cruentum*

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
EN INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

.....
Dr. FERNANDO MERINO MOYA

PRESIDENTE

Código ORCID: 0000-0002-4848-3190

DNI N° 17909299

.....
Dr. GUILLERMO EVANGELISTA BENITES

SECRETARIO

Código ORCID: 0000-0002-1955-6565

DNI N° 17811823

.....
Dr. AUGUSTO CASTILLO CALDERÓN

VOCAL

(Asesor)

Código ORCID: 0000-0001-9237-8542

DNI N° 32931123



UNS
ESCUELA DE
POSGRADO

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

A los dos días del mes de agosto del año 2024, siendo las 10:00 horas, en el aula P-01 de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional del Santa, se reunieron los miembros del Jurado Evaluador, designados mediante Resolución Directoral N° 293-2024-EPG-UNS de fecha 23.05.2024, conformado por los docentes: Dr. Juan Fernando Merino Moya (Presidente), Dr. Guillermo David Evangelista Benites (Secretario) y Dr. Augusto Castillo Calderón (Vocal); con la finalidad de evaluar la tesis titulada **"OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUCIR BIOETANOL A PARTIR DE MICROALGAS *Porphyridium cruentum*"**; presentado por el tesista **Manuel José Jimenez Escobedo**, egresado del programa de **Doctorado en Ingeniería Agroindustrial**.


Sustentación autorizada mediante Resolución Directoral N° 409-2024-EPG-UNS de fecha 02 de agosto de 2024.

El presidente del jurado autorizó el inicio del acto académico; producido y concluido el acto de sustentación de tesis, los miembros del jurado procedieron a la evaluación respectiva, haciendo una serie de preguntas y recomendaciones al tesista, quien dio respuestas a las interrogantes y observaciones.

El jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como APROBADO, asignándole la calificación de 17.

Siendo las 11:15 horas del mismo día se da por finalizado el acto académico, firmando la presente acta en señal de conformidad.


Dr. Juan Fernando Merino Moya
Presidente


Dr. Guillermo David Evangelista Benites
Secretario


Dr. Augusto Castillo Calderón
Vocal/Asesor




Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega:	Manuel José Jimenez Escobedo
Título del ejercicio:	Informe final de tesis
Título de la entrega:	OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO BIOTECNOLÓGICO PARA PR...
Nombre del archivo:	TesisDoctoral_InformeFinal_MJJimenezE_2024.pdf
Tamaño del archivo:	6.36M
Total páginas:	134
Total de palabras:	36,512
Total de caracteres:	188,475
Fecha de entrega:	18-dic.-2024 12:01p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre...	2555086565

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA ESCUELA DE POSGRADO PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
 UNS ESCUELA DE POSGRADO
OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUCIR BIOETANOL A PARTIR DE MICROALGAS <i>Porphyridium cruentum</i>
Informe de Tesis para optar el grado académico de Doctor en Ingeniería Agroindustrial
Autor: Manuel José Jimenez Escobedo Magister en Ingeniería Química Código ORCID: 0000-0002-6042-2358
Asesor: Augusto Castillo Calderón Dr. en Ingeniería Bioquímica DNI N° 32931123 Código ORCID: 0000-0001-9237-8542
Línea de Investigación: Desarrollo biotecnológico
NUEVO CHIMBOTE – PERÚ 2024

OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUCIR BIOETANOL A PARTIR DE MICROALGAS

Porphyridium cruentum

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%	11%	2%	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	core.ac.uk Fuente de Internet	2%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
4	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	repositoriodemo.continental.edu.pe Fuente de Internet	<1%
6	dev.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1%
7	investigacion-bge.jimdo.com Fuente de Internet	<1%
8	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1%

Dedicatoria

A mi Madre, ¡ ... en su memoria y como testimonio de gratitud eterna ...!!!

Quien espiritualmente siempre nos acompaña en esta vida terrenal, seguimos su ejemplo de sacrificio para superar momentos difíciles y consolidar objetivos.

A la memoria de Carlos Lam Medina; por haber sido mi guía paterna, inculcando en mi persona valores con un sentido de responsabilidad y sin los cuales no hubiera logrado tener una sólida formación personal y profesional, sus enseñanzas de vida sirven para valorar el fruto de nuestro trabajo.

A Débora, Geraldine y Nicole; mi entorno familiar maravilloso, por creer y confiar siempre en mí, por su comprensión y motivación. Apoyando siempre en todas las decisiones que he tomado en mi vida y que siempre están conmigo en todo momento.

A la familia Lam Robles; Dora, Ysela y José Luis; por el apoyo incondicional recibido para mi formación profesional de pregrado, brindándome afecto y calor familiar. Además; un homenaje in memoriam para mis hermanos menores Jorge Carlos y César Arturo.

A todas las personas, familiares y amigos, que creen y confían en mí.

AGRADECIMIENTOS

Es oportuno reconocer que hubiese sido imposible terminar una tesis, trabajo arduo y con muchas dificultades imprevistas, sin la participación institucional y de personas que han colaborado y facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término de su desarrollo.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, mi Alma Mater, donde tuve el honor de estudiar y lograr una sólida formación académica profesional, de pregrado y posgrado, en conocimientos y valores.

A la Universidad Nacional del Santa, de mi natal Chimbote, donde tuve la oportunidad de iniciarme profesionalmente en la docencia Universitaria, fueron ocho años de trabajo y gratos recuerdos, y agradecido en este regreso para efectuar y culminar los estudios doctorales.

A la UNJFSC, la casa de Sánchez Carrión, donde asumí el reto desde hace veinticinco años para ejercer docencia Universitaria, transmitiendo conocimientos y experiencias a las nuevas generaciones de ingenieros químicos de la Facultad de Ingeniería Química y Metalúrgica.

Al Dr. Augusto Castillo Calderón; asesor de tesis, profesor, colega y amigo, por su tiempo y dedicación, a quien agradezco sus consejos y sugerencias, siendo fundamental su motivación y apoyo logístico en el laboratorio para desarrollar y concluir el presente trabajo de tesis.

Al Dr. Fernando Merino Moya; por apoyar el desarrollo del trabajo experimental, al facilitar el acceso al laboratorio, brindar facilidades y orientar en la etapa del cultivo de microalgas. Además, por sus valiosas observaciones y sugerencias para mejorar el contenido del informe.

Al Dr. Guillermo Evangelista Benites; profesor, colega y amigo, por su apoyo y sugerencias para optimizar el contenido formal del informe, sobretodo en la revisión de los cálculos estadísticos y de los métodos numéricos.

A mis colegas y amigos, pasados y presentes, que han vivido el día a día cada una de mis experiencias de vida, por alentar constantemente y estar siempre pendientes de los avances de los estudios de posgrado, Maestría y Doctorado, e investigaciones correlacionadas.

A los profesionales de la UNS, MSc. Gustavo Olivos Ramírez e Ing. Verónica Yanamango Chávez, por su valioso apoyo en las diferentes etapas del trabajo experimental; especialmente en la orientación para utilizar los equipos requeridos e interpretar los resultados obtenidos, en los Laboratorios de: Recursos Acuáticos y Cultivo de Especies Auxiliares de la EP Biología en Acuicultura, y, Química Orgánica y Bioprocesos de la Facultad Ingeniería, respectivamente.

ÍNDICE GENERAL

CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR	ii
APROBACIÓN DEL JURADO EVALUADOR	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1
Capítulo I: EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
1.1 PLANTEAMIENTO Y FUNDAMENTACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
1.2 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	4
1.2.1 Revisión bibliográfica especializada, literatura internacional	5
1.2.2 Revisión bibliográfica especializada, literatura nacional	7
1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	10
1.3.1 Problema General	11
1.3.2 Problemas Específicos	11
	11

1.4 DELIMITACIÓN DEL ESTUDIO	11
1.4.1 Alcances	12
1.4.2 Limitaciones	13
1.5 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	13
1.5.1 Justificación teórica	13
1.5.2 Justificación práctica	14
1.5.3 Importancia	15
1.6 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	15
1.6.1 Objetivo General	16
1.6.2 Objetivos Específicos	
 Capítulo II: MARCO TEÓRICO	 17
2.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN	17
2.2 MARCO CONCEPTUAL	19
2.2.1 Las microalgas	19
2.2.1.1 Aspectos generales	19
2.2.1.2 Clasificación de las microalgas	21
2.2.1.3 La microalga <i>Porphyridium cruentum</i>	22
2.2.1.4 El cultivo de microalgas, y factores influyentes en el crecimiento ...	23
2.2.1.5 La cosecha, o recolección, de biomasa microalgal	26
2.2.1.6 El pretratamiento de la biomasa microalgal	27
2.2.2 El bioetanol	30
2.2.2.1 Aspectos generales	30
2.2.2.2 El Bioetanol de tercera generación, producción biotecnológica	31
2.2.3 Los Biocombustibles	33
2.2.3.1 Aspectos generales	33
2.2.3.2 Tipos de biocombustibles	34
2.2.3.3 Biorrefinería, enfoque para la producción de biocombustibles	35
2.2.4 Modelos matemáticos de la fenomenología del proceso	36
2.2.4.1 Modelos matemáticos en la etapa del cultivo de microalgas	36
2.2.4.2 Modelos matemáticos en la etapa de hidrólisis enzimática	39

Capítulo III: MARCO METODOLÓGICO	41
3.1 HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN	41
3.1.1 Hipótesis General	41
3.1.2 Hipótesis Específicas	41
3.2 VARIABLES E INDICADORES DE LA INVESTIGACIÓN	42
3.3 MÉTODOS DE LA INVESTIGACIÓN	43
3.4 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	43
3.4.1 Factores y dominio experimental en el cultivo de microalgas	43
3.4.2 Diseño experimental codificado en el cultivo de microalgas	44
3.4.3 Factores y Dominio Experimental en la hidrólisis enzimática	45
3.4.4 Diseño experimental codificado en la hidrólisis enzimática	45
3.5 POBLACIÓN Y MUESTRA	46
3.6 ACTIVIDADES DEL PROCESO INVESTIGATIVO	46
3.6.1 Procedimiento Experimental	46
3.6.2 Cultivo de microalga <i>Porphyridium cruentum</i>	47
3.6.2.1. La cepa microalgal	47
3.6.2.2. Condiciones del cultivo microalgal	47
3.6.2.3. Dinámica del crecimiento celular	48
3.6.3 Hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal	49
3.6.3.1. Caracterización enzimática de la Celulasa	49
3.6.3.2. Hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal	49
3.6.4 Fermentación del hidrolizado, de la biomasa microalgal	50
3.6.5 Escalamiento del proceso	50
3.6.6 Identificación cualitativa y cuantitativa de los productos obtenidos ..	51
3.7 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN	51
3.8 PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS	52
3.9 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS	52
Capítulo IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1 EVALUACIÓN DEL CULTIVO MICROALGAL DE <i>Porphyridium cruentum</i>	53
4.1.1 Caracterización micrográfica de microalga <i>P. cruentum</i>	53

4.1.2	Caracterización del crecimiento poblacional de <i>P. cruentum</i>	54
4.1.3	Determinación del peso seco total y el contenido de carbohidratos en biomasa microalgal de <i>P. cruentum</i>	58
4.1.4	Determinación de condiciones óptimas de las variables controlables en cultivos de microalga <i>P. cruentum</i>	60
4.2	EVALUACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA BIOMASA MICROALGAL DE <i>P. cruentum</i>	75
4.1.1	Determinación de la Actividad enzimática de la Celulasa	75
4.1.2	El hidrolizado enzimático de la biomasa microalgal	77
4.3	EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE LA BIOMASA MICROALGAL DE <i>P. cruentum</i>	81
Capítulo V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		86
5.1	CONCLUSIONES	86
5.2	RECOMENDACIONES	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		89
ANEXOS		95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Resumen de la flora de algas marinas del Perú.	9
Tabla 1.2	Algas marinas comerciales y no comerciales del Perú con sus nombres comunes y usos o potenciales usos en el país.	10
Tabla 2.1	Características Taxonómicas y Morfológicas de algunas especies de microalgas.	21
Tabla 2.2	Características Taxonómicas de microalga <i>Porphyridium. cruentum</i> .	23
Tabla 2.3	Modos nutricionales de cultivo para algunas especies de microalgas.	24
Tabla 2.4	Factores influyentes en el cultivo de microalgas.	25
Tabla 2.5	Métodos de pretratamiento para biomasa de algunas especies de microalgas.	29
Tabla 2.6	Rendimiento de bioetanol, desde diferentes fuentes de cultivo.	31
Tabla 3.1	Definición de variables.	42
Tabla 3.2	Operacionalización de variables e Indicadores.	42
Tabla 3.3	Factores y dominio experimental en el cultivo de microalgas.	43
Tabla 3.4	Diseño Experimental Central Compuesto, en la evaluación del cultivo de microalga <i>P. cruentum</i> .	44
Tabla 3.5	Factores y dominio experimental en la hidrólisis enzimática.	45
Tabla 3.6	Diseño experimental para evaluar la hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal.	45
Tabla 3.7	Organización de las técnicas e instrumentos para la investigación.	51
Tabla 3.8	Organización de las técnicas de procesamiento y análisis de los datos	52
Tabla 4.1	Parámetros característicos, de la cinética del crecimiento poblacional, en cultivo microalgal de <i>P. cruentum</i> .	57
Tabla 4.2	Resultados experimentales, promedio, obtenidos en 200 mL de cultivo de microalga <i>P. cruentum</i>	61

Tabla 4.3	Resultados experimentales, promedio, obtenidos en 500 mL de cultivo de microalga <i>P. cruentum</i>	62
Tabla 4.4	Resultados experimentales, promedio, obtenidos en 1000 mL de cultivo de microalga <i>P. cruentum</i>	63
Tabla 4.5	Parámetros cinéticos y de correlación poblacional, calculados, para 200 mL de cultivo de microalga <i>P. cruentum</i>	64
Tabla 4.6	Parámetros cinéticos y de correlación poblacional, calculados, para 500 mL de cultivo de microalga <i>P. cruentum</i>	65
Tabla 4.7	Parámetros cinéticos y de correlación poblacional, calculados, para 1000 mL de cultivo de microalga <i>P. cruentum</i>	66
Tabla 4.8	Parámetros óptimos, variables controlables y de respuesta, y el modelo de Optimización N(t) para predecir crecimiento poblacional en cultivo microalgal	73
Tabla 4.9	Hidrólisis enzimática biomasa microalgal, sin y con pretratamiento mecánico	79
Tabla 4.10	Hidrólisis enzimática biomasa microalgal, con dilución de enzima variable	79
Tabla 4.11	Compendio comparativo de resultados, del proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal	84
Tabla A.1	Conteo celular en cultivo microalgal de <i>Porphyridium cruentum</i> .	105
Tabla A.2	Cálculos de parámetros cinéticos, característicos, de un cultivo de microalgas <i>P. cruentum</i> .	106
Tabla A.3	Modelos matemáticos de crecimiento poblacional, aplicados para evaluar un cultivo microalgal de <i>P. cruentum</i> .	106
Tabla A.4	Determinación de la Densidad Óptica de cultivo microalgal, y del peso seco total de biomasa, de microalgas <i>P. cruentum</i>	107
Tabla A.5	La Densidad Óptica y su correlación con la concentración celular microalgal de <i>P. cruentum</i>	107
Tabla A.6	Datos de calibración, para evaluar presencia de carbohidratos, en dilución de cultivo microalgas	107
Tabla A.7	Tabla de dilución enzima Celulasa (solución patrón 1:20).	108
Tabla A.8	Glucosa liberada por cóctel enzimático <i>Celulasa</i>	108
Tabla A.9	Hidrólisis enzimática de biomasa microalgal, con dos tipos de pretratamiento	109
Tabla A.10	Hidrólisis enzimática de biomasa microalgal, con tres tipos de dilución enzima <i>Celulasa</i>	109
Tabla A.11	Composición de nutrientes y de la solución de sales, utilizada en los medios de cultivo de fermentación para levadura <i>S. stipitis</i>	110
Tabla A.12	Regresión de superficie de respuesta, en volumen de cultivo 200 mL	111

Tabla A.13	Regresión de superficie de respuesta, en volumen de cultivo 500 mL	113
Tabla A.14	Regresión de superficie de respuesta, volumen de cultivo 1000mL	115
Tabla A.15	Composición de medios nutricionales, de Guillard y Ryther, para cultivo microalgal	117
Tabla A.16	Análisis composicional de biomasa algal seleccionada	118
Tabla A.17	Ventajas y limitaciones de estanques abiertos y fotobiorreactores	119
Tabla A.18	Enzimas utilizadas en la degradación de la pared celular de microalgas	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	(a) Curva acumulada de nuevas especies de algas marinas y nuevos registros (agrupados) del Perú entre 1914 y 2019; (b) especie <i>Rhodophyta</i> .	9
Figura 2.1	Microalgas y sus potenciales aplicaciones.	20
Figura 2.2	Sistemas para cultivo de microalgas: (A) estanques abiertos OP; (B) PBR tubular; (C) PBR plano; (D) PBR tipo biopelícula; (E) Fermentadores; (F) cultivo que utiliza aguas residuales.	26
Figura 2.3	(A) Diagrama de producción de almidón en microalgas; y (B) pared celular de microalgas.	28
Figura 2.4	Técnicas de pretratamiento para biodegradar biomasa microalgal.	28
Figura 2.5	Esquema conceptual para la producción de bioetanol y derivados.	30
Figura 2.6	Proceso biotecnológico para producir bioetanol y biodiesel de tercera generación.	32
Figura 2.7	Esquema conceptual de la clasificación de los biocombustibles.	34
Figura 2.8	Procesos integrados en una biorrefinería para producir combustibles 3G y coproductos.	35
Figura 2.9	Curva de crecimiento de microorganismos, en la etapa de cultivo.	36
Figura 2.10	Gráficas de linealización, (a) patrón de calibrado, (b) concentración de azúcar.	39
Figura 3.1	Flujograma para el procedimiento del trabajo experimental.	46
Figura 4.1	Micrografías x100 de la evolución de la densidad poblacional en el cultivo de microalgas <i>Porphyridium cruentum</i> .	53
Figura 4.2	Perfil evolutivo del crecimiento celular, en cultivo de microalgas <i>P. cruentum</i> , para condiciones ambientales controladas.	54
Figura 4.3	Modelos de crecimiento poblacional, de Gompertz-Makeham y Logístico, aplicados al cultivo de microalgas <i>P. cruentum</i> .	55
Figura 4.4	Análisis de dispersión, con factor de Pearson, de los modelos matemáticos de crecimiento poblacional en el cultivo microalgal.	56

Figura 4.5	Determinación del peso seco total, en biomasa microalgal de <i>P. cruentum</i>	58
Figura 4.6	Curva de calibración para evaluar presencia de Carbohidratos, en dilución de biomasa microalgal de <i>P. cruentum</i> .	59
Figura 4.7	Perfiles del crecimiento poblacional, sin agregar y agregando Carbono orgánico (glucosa) como complemento nutricional a los cultivos de <i>P. cruentum</i> .	67
Figura 4.8	Perfiles del crecimiento poblacional, para diferentes condiciones de las variables controlables, en cultivos de <i>P. cruentum</i> .	68
Figura 4.9	Descriptor estadístico de las variables controlables Iluminación (watts) y Flujo de aire (agitación por burbujeo, en LPM) en el cultivo microalgal.	69
Figura 4.10	Descriptor estadístico de la variable controlable dosificación carbono orgánico C (g/L) y variable respuesta población N (células/mL) en 200 mL de cultivo microalgal.	70
Figura 4.11	Descriptor estadístico de la variable respuesta población N (células/mL), en 500 mL y 1000 mL de cultivo microalgal.	71
Figura 4.12	Superficie de respuesta del crecimiento poblacional de cultivo microalga <i>P. cruentum</i> , en tres volúmenes de cultivo.	72
Figura 4.13	Gráfica de Pareto para el crecimiento poblacional, en cultivo microalgal de <i>P. cruentum</i> .	74
Figura 4.14	Evaluación de la Actividad Enzimática, (a) curva estándar de Glucosa, calibración DO; (b) Glucosa liberada con enzima Celulasa.	75
Figura 4.15	Perfiles: (a) Evolutivo de la reacción enzimática; (b) Linealidad de Pearson, al evaluar modelo de Monod.	77
Figura 4.16	Perfiles de hidrólisis enzimática de biomasa seca de <i>P. cruentum</i> , “in natura” y “molida”, con dilución enzima 1:200	78
Figura 4.17	Perfiles de hidrólisis enzimática de biomasa seca de <i>P. cruentum</i> , molida, dilución enzima 1:200 - 1:400	80
Figura 4.18	Evolución del proceso de fermentación del hidrolizado de la biomasa de <i>P. cruentum</i> , utilizando <i>S. stipitis</i> .	82
Figura 4.19	Espectros de masa del Etanol, a diferentes tiempos de fermentación del hidrolizado de biomasa microalgal de <i>P. cruentum</i> .	83
Figura A.1	Material de laboratorio, varios: (a) tubos Falcon; (b) tubos viales; (c) probeta y Erlenmeyer; (d) pipeta descartable, pipeta graduada y micropipeta.	96
Figura A.2	Instrumentos de laboratorio, varios: (a) cámara Neubauer; (b) pH-metro de mesa y portátil; (c) refractómetro de salinidad y termómetro digital; (d) flujómetro y válvulas.	96
Figura A.3	(a) cepa de microalga <i>Porphyridium cruentum</i> ; (b) medio nutriente F/2; (c) complejo enzimático <i>Celulasa</i> ; (d) Glucosa anhidra.	97

Figura A.4	Equipos de laboratorio: (a) microscopio electrónico MOTIC; (b) Espectrofotómetro SCIENTIFIC; (c) agitador vortex; (d) centrifuga digital; (e) agitador de plataforma Shaker.	98
Figura A.5	Cepa de microalga <i>P. cruentum</i> en medio Agar-Agar 3%, cultivada para su conservación en placas Petri y tubos viales.	99
Figura A.6	Cultivos microalgal en medios apropiados, a diferentes condiciones.	99
Figura A.7	(a) Conteo celular, del cultivo microalgal; (b) lectura de Densidad óptica.	99
Figura A.8	(a) Cosecha y centrifugado de biomasa microalgal cultivada; (b) Determinación del peso seco total de biomasa microalgal.	100
Figura A.9	(a) complejo enzimático <i>Celulosa</i> ; (b) buffer citrato de sodio, solución patrón de glucosa y reactivo DNS	100
Figura A.10	Evaluación de Actividad enzimática: (a) termorreacción de sustrato con <i>Celulasa</i> , a 50°C; (b) método de Miller, con DNS, análisis de Densidad óptica	100
Figura A.11	Método de Adney y Baker, (1998), para evaluar actividad de cóctel enzimático <i>Celulasa</i>	101
Figura A.12	Procedimiento para determinar carbohidratos en biomasa microalgal.	103
Figura A.13	(a) Biomasa pretratada; (b) incubación en Shaker, para hidrólisis enzimática con <i>Celulasa</i> ; (c) método de Miller, y Densidad óptica, evaluando azúcar liberada.	104
Figura A.14	(a) activación <i>S. stipitis</i> ; (b) hidrolizado; (c) proceso fermentación, hidrolizado + <i>S. stipitis</i> , a 30°C en shaker; (d) bioetanol.	104
Figura A.15	Curva estándar de calibración del cóctel enzimático <i>Celulasa</i> , para evaluar Actividad Enzimática.	108
Figura A.16	Curva estándar de calibración, para evaluar Etanol	110
Figura A.17	Diagrama de flujo con las principales materias primas y procesos utilizados para la producción de etanol 2G.	120

ÍNDICE DE ANEXOS

A.1. MATERIALES Y EQUIPOS	96
A.1.1. Materiales e instrumentos de laboratorio	96
A.1.2. Materia prima y reactivos químicos	97
A.1.3. Equipos de laboratorio y complementos varios	98
A.2. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	99
A.2.1. La cepa y el cultivo de microalga <i>Porphyridium cruentum</i>	99
A.2.2. Dinámica del crecimiento celular, conteo celular y densidad óptica	99
A.2.3. Cosecha de biomasa microalgal, método peso seco	100
A.2.4. Determinación de la Actividad de la enzima <i>Celulasa</i>	100
A.2.5. Determinación de Carbohidratos, en la biomasa microalgal	103
A.2.6. Hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal	104
A.2.7. Fermentación del hidrolizado enzimático, obtención de bioetanol 3G	104
A.3. INFORMACIÓN TÉCNICA	105
A.3.1. Tablas y Figuras, de datos experimentales	105
A.3.2. Tablas y diagramas estadísticos	111
A.3.3. Tablas técnicas y Figuras varias, complementarias	117

Resumen

El presente estudio ha demostrado que es viable producir bioetanol de tercera generación desde biomasa microalgal de *Porphyridium cruentum*. Este proceso fue desarrollado en tres etapas de trabajo experimental: cultivo microalgal controlado, hidrólisis enzimática de biomasa microalgal y la fermentación del hidrolizado. En el cultivo microalgal, cada muestra contenía un medio preparado con 50% de agua de mar esterilizada y 50% de inóculo de *P. cruentum*, solución de Guillard F/2 fue utilizado como nutriente; fueron evaluados volúmenes de 200 mL, 500 mL y 1000 mL, donde cada muestra se hizo crecer paralelamente con su respectivo duplicado. Los valores óptimos de variables, en ambiente controlado del cultivo microalgal *P. cruentum*, fueron determinados mediante el Método de Superficie de Respuesta. Los resultados óptimos obtenidos fueron: 500 mL de cultivo, población 27.84×10^6 (cél. /mL), rendimiento 1.419 g-biomasa seca/L, velocidad específica 0.3439 días^{-1} , productividad 9.978×10^6 (cél/mL-día), Intensidad de luz LED 27.97 W, 1.84 LPM de aire, dosificación de glucosa 0.67 g/L. Las variables Temperatura (22.0 - 27.5 °C), pH (7.0 - 9.0) y salinidad (37 - 38 %), dentro del rango de valores previstos en la literatura. El contenido de glucosa en la biomasa microalgal seca total fue 16% aprox. El cóctel de Celulasa alcanzó una actividad enzimática de 84.1 FPU/mL, para una dilución de enzima 1:250 y [Glucosa] = 2.0 mg/mL; obtenidos en condiciones operacionales óptimas de 50 °C, pH = 4.6 (buffer de Citrato sódico), y una hora de termorreacción. La etapa de la hidrólisis enzimática proporcionó 1.267 mg/mL y 1.353 mg/mL de azúcares reductores, desde la biomasa microalgal seca en su forma natural y molida respectivamente. La fermentación del hidrolizado sacarificado, con *Scheffersomyces stipitis*, alcanzó un contenido de 3.6356 g/L de etanol en 30 horas. Esta investigación destaca el potencial de utilizar microalgas *P. cruentum* para la producción de etanol.

Palabras clave: autotrófico, azúcares fermentables, cinética enzimática, densidad óptica, coctel enzimático., cepa microalgal.

Abstract

*The present study has demonstrated that it is feasible to produce third-generation bioethanol from microalgal biomass of *Porphyridium cruentum*. This process was developed in three stages of experimental work: controlled microalgal culture, enzymatic hydrolysis of microalgal biomass and fermentation of the hydrolysate. In the microalgal culture, each sample contained a medium prepared with 50% sterilized seawater and 50% *P. cruentum* inoculum, Guillard F/2 solution was used as nutrient; volumes of 200 mL, 500 mL and 1000 mL were evaluated, where each sample was grown in parallel with its respective duplicate. The optimal values of variables, in a controlled environment of the microalgal culture *P. cruentum*, were determined by the Response Surface Method. The optimal results obtained were: 500 mL of culture, population 27.84×10^6 (cells/mL), yield 1.419 g-dry biomass/L, specific rate 0.3439 days⁻¹, productivity 9.978×10^6 (cells/mL-day), LED light intensity 27.97 W, 1.84 LPM of air, glucose dosage 0.67 g/L. The variables Temperature (22.0 - 27.5 °C), pH (7.0 - 9.0) and salinity (37 - 38 ‰), within the range of values predicted in the literature. The glucose content in the total dry microalgal biomass was approx. 16%. The Cellulase cocktail reached an enzymatic activity of 84.1 FPU/mL, for a 1:250 enzyme dilution and [Glucose] = 2.0 mg/mL; obtained under optimal operational conditions of 50 °C, pH = 4.6 (Sodium Citrate buffer), and one hour of thermoreaction. The enzymatic hydrolysis step provided 1.267 mg/mL and 1.353 mg/mL of reducing sugars, from the dried microalgal biomass in its natural and ground form respectively. Fermentation of the saccharified hydrolysate, with *Scheffersomyces stipitis*, reached a content of 3.6356 g/L of ethanol in 30 hours. This research highlights the potential of using *P. cruentum* microalgae for ethanol production.*

Keywords: autotrophic, fermentable sugars, enzyme kinetics, optical density, enzyme cocktail, microalgal strain.

INTRODUCCIÓN

El acelerado crecimiento de la población mundial incrementa las necesidades energéticas, más del 80% de la energía requerida procede de fuentes fósiles agotables, cuyo uso excesivo genera un problema medioambiental preocupante por la emisión de gases contaminantes y de efecto invernadero en este escenario globalizado. La ciencia y la tecnología, en acelerado desarrollo continuo, vienen aportando nuevos conocimientos, como también reformulando los existentes, sobre la naturaleza y de los seres que la componen. La sostenibilidad de los recursos naturales requiere eficiencia operacional y aplicar estrategias para mitigar el impacto ambiental, en concordancia con el avance socioeconómico de la sociedad y del pensamiento humano; factores que son interdependientes.

Actualmente, según estudios realizados, los biocombustibles derivados de la biomasa de microalgas están siendo considerados como potencial alternativa energética renovable, dependiendo de sus condiciones de cultivo pueden acumular diferentes cantidades de lípidos, proteínas y carbohidratos; recursos necesarios para producir biodiesel, bioetanol y biogás. Una gran variedad de especies de microalgas ha sido utilizada para obtener biomasa con gran contenido de lípidos y poder producir biodiesel. La microalga *Porphyridium cruentum*, genera biomasa con alto contenido de carbohidratos y almidón, almacenados en su pared celular y en los plástidos respectivamente, sin lignina y con bajo contenido de hemicelulosas, los cuales son fácilmente convertibles en azúcares fermentables.

La tesis doctoral “**OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUCIR BIOETANOL A PARTIR DE MICROALGAS *Porphyridium cruentum***”, reporta los resultados de un estudio desarrollado a nivel de laboratorio para producir bioetanol de tercera generación, utilizando carbohidratos acumulados en la biomasa de *P. cruentum*. Es decir; evalúa una tecnología enfocada en el uso de microalgas, reporta valores de los parámetros operacionales óptimos obtenidos, desde el cultivo microalgal hasta alcanzar una buena producción de biomasa;

asimismo, las mejores condiciones de pretratamiento, de hidrólisis enzimática y la fermentación del hidrolizado. Por tanto, se desarrolla un proceso estandarizado, con valores óptimos de los parámetros operacionales controlables, para acceder cada vez más a la viabilidad de producir bioetanol de tercera generación.

El contenido del estudio realizado está organizado en cinco capítulos. En el capítulo I se desarrolla los aspectos formales del problema de investigación: la identificación, los antecedentes, la formulación, las delimitaciones, la justificación e importancia, y los objetivos del estudio. El capítulo II corresponde al Marco Teórico, proporciona una visión general del Estado del Arte, los fundamentos teóricos y el marco conceptual; con información obtenida de la revisión y análisis de la literatura especializada. El capítulo III describe el Marco Metodológico, incluye el diseño experimental, los materiales y métodos. El capítulo IV proporciona los resultados obtenidos y su discusión, contrastando y validando las hipótesis de investigación que permiten profundizar el conocimiento, con base científica. El capítulo V, en concordancia con los objetivos de la investigación, son presentadas las conclusiones del estudio desarrollado y las respectivas recomendaciones. Finalmente, son descritas las referencias bibliográficas consultadas.

Capítulo I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Este capítulo aborda los fundamentos del problema de investigación, relacionado con el uso de microalgas *Porphyridium cruentum* para producir bioetanol de tercera generación. Además; presenta un resumen conciso de antecedentes publicados en la literatura a nivel internacional y nacional, la formulación del problema de investigación, sus delimitaciones, la justificación e importancia del estudio, y los objetivos de la investigación.

1.1. PLANTEAMIENTO Y FUNDAMENTACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Un desarrollo energético sostenible considera primordial explotar fuentes de energía renovables, con baja emisión de gases que minimizan el impacto ambiental y no atentan contra la seguridad alimentaria, (Bibi *et al.*, 2017; Jimenez & Castillo, 2021). La biotecnología, usando diferentes tipos de biomasa, está aportando al desarrollo socioeconómico de la humanidad con procesos innovadores al producir biocombustibles, biocompuestos, alimentos, etc., (Bharathiraja *et al.*, 2015; Tiwari *et al.*, 2019; Jimenez & Castillo, 2021).

“La bioeconomía es un paradigma nuevo y esencial para reducir nuestra dependencia de los recursos naturales y responder a las amenazas ambientales que enfrenta actualmente la Tierra”, Acién *et al.*, (2021). Las microalgas ofrecen posibilidades casi ilimitadas para desarrollar una bioeconomía moderna dada su flexibilidad metabólica y altas tasas de producción de biomasa, incluso en condiciones duras de crecimiento, comparados frente a otras fuentes de cultivo energéticas, (Jimenez & Castillo, 2021; Acién *et al.*, 2021).

Las microalgas son microorganismos unicelulares y fotosintéticos que poseen una elevada capacidad de fijación de CO₂, que puede atraparse o reciclarse, dependiendo del tipo de microalgas y las condiciones de su medio de cultivo son capaces de producir grandes cantidades de biomasa microalgal, (Velázquez, 2018; Shokrkar *et al.*, 2018; Tiwari *et al.*, 2019). Esta biomasa contiene proteínas, lípidos

para producir biodiesel (Sing R.S. *et al.*, 2017; Das & Varanasi, 2019; Tiwari *et al.*, 2019; Jimenez & Castillo, 2021), también gran contenido de carbohidratos para obtener bioetanol (Bader *et al.*, 2020; Andreeva *et al.*, 2021; Singh y Dhar, 2011).

En base a los fundamentos expuestos, el problema de investigación estuvo orientado a evaluar experimentalmente los parámetros operacionales controlables, con diferentes condiciones a nivel laboratorio, de un proceso biotecnológico para producir bioetanol de tercera generación utilizando la microalga *Porphyridium cruentum*. Este recurso acuícola posee una composición atractiva del 22-40% de carbohidratos, (Agustini & Febrian, 2019; Chisti, 2007); además tiene la ventaja de no contener lignina, que facilita la hidrólisis y liberación de azúcares fermentables; razones por lo cual fue seleccionada como materia prima para este estudio. El diseño experimental Delineamiento Central Compuesto DCC fue utilizado para evaluar las condiciones operacionales, en el cultivo de *Porphyridium cruentum*, de los factores siguientes: luminosidad, agitación del cultivo mediante burbujeo de aire, suministro de CO₂ como suplementario nutricional, y alcanzar producción óptima de biomasa microalgal. Asimismo, es evaluada las condiciones operacionales del pretratamiento de la biomasa microalgal mediante hidrólisis enzimática (Shokrkar *et al.*, 2018) para obtener azúcares fermentables; finalmente se realiza la fermentación del hidrolizado utilizando levadura *Scheffersomyces stipitis* (Pappini *et al.*, 2012) para obtener bioetanol de tercera generación. Este proceso biotecnológico es una buena alternativa para viabilizar la producción altamente escalable de bioetanol; no compite con la industria de alimentos, no necesita de territorio terrestre para el cultivo, no depende de insumos agrícolas ni pesticidas, no contamina el suelo ni afluentes de agua, posee balance energético muy positivo, la producción primaria es controlable en laboratorio, con mínima huella ecológica en un análisis de ciclo de vida (Jimenez & Castillo, 2021; Tiwari *et al.*, 2019).

1.2. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Es verificable, mediante revisión de literatura especializada reciente, la existencia a nivel internacional de numerosos estudios de investigación con diferentes especies de microalgas, desde su cultivo en varias escalas hasta el diseño de procesos para obtener biocombustibles y diversos productos biotecnológicos. A continuación, se presenta un compendio breve y conciso, con la información más relevante de la revisión bibliográfica relacionada con la investigación realizada.

1.2.1. Revisión bibliográfica especializada, literatura internacional

Nägeli Carl (1849), describió los primeros estudios realizados sobre las algas, sistemáticamente aborda los aspectos teóricos y de la estructura taxonómica, afirma que “*las algas son especies vegetales unicelulares de gran interés científico, que están destinados a convertirse en la base de la fisiología de las plantas, pero no se ha intentado determinar qué géneros y especies realmente les pertenecen, ni se ha utilizado su estudio para obtener resultados generales. Por tanto, es momento de comenzar una nueva serie de estudios sobre las algas y examinarlas de manera excelente*”. Entre las microalgas estudiadas se encuentra *P. cruentum* (pp. 71).

Guillard & Ryther (1962, a-b-c), reportan resultados de un medio nutricional añadido en el cultivo de dos especies de microplancton marino (*Cyclotella nana hustedt* y *Detonula confervacea*), aislados de su hábitat natural, concluyendo que lograron adaptarse muy bien con buen rendimiento. Además; calculan la división diaria de los microorganismos mediante una ecuación empírica. Guillard (1975), describe nuevos métodos para cultivar fitoplancton marino con medio nutricional denominado F/2, que es una reformulación potenciada del medio primigenio.

Ho O. *et al.* (2009), estudiaron cuatro condiciones del cultivo de *P. cruentum* (en Erlenmeyer de 500 mL, a 30 °C, 150 rpm, 40 W de intensidad de luz, suministro de CO₂ a una velocidad 250 mL/min, medio de cultivo F/2), para producir lípidos. El nivel más alto de acumulación de lípidos, 19.3 (% p / p), se alcanzó a las 12:12 h del ciclo. En condiciones de cultivo oscuro con 10 g / L de glucosa, la acumulación de lípidos fue 10.9 (% p/p). Los lípidos de *P. cruentum* parecían factibles para producir biodiésel, con ventaja competitiva en aspectos económicos porque volumen producido (por unidad de área de cultivo) es alto.

Ho H-S. *et al.* (2013), evaluaron la microalga *Chlorella vulgaris*, como materia prima potencial para producir bioetanol a través de hidrólisis enzimática y procesos de fermentación. La hidrólisis enzimática dio un rendimiento de glucosa del 90,4% (0,461 g/g-biomasa). Los procesos SHF y SSF convirtieron el hidrolizado enzimático de microalgas en etanol con un rendimiento teórico del 79,9% y 92,3%, respectivamente. Estos resultados demuestran la viabilidad de utilizar microalgas productoras de alto contenido de carbohidratos en su biomasa, como materia prima para producir bioetanol fermentativo.

Diversos estudios realizados (Bharathiraja *et al.*, 2015; Bibi *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2018; Enamala M.K. *et al.*, 2018), consolidan la revisión de literatura especializada sobre tecnologías existentes para procesar biomasa algal, concluyen que “se ha realizado una gran investigación sobre la biomasa algal para evaluar su potencial como materia prima alternativa para producir biocombustibles de tercera generación y coproductos valiosos, por diversas vías tecnológicas, eliminándose las preocupaciones sobre la seguridad alimentaria. La producción de biomasa es potencialmente alta, la sostenibilidad económica del proceso biotecnológico depende del costo de producción que debe minimizar al producir paralelamente valiosos subproductos secundarios alimenticios y no-alimentarios. Por tanto; es un gran desafío que requiere abordarse para la viabilidad económica y por su alto insumo de capital, lo cual garantizará la rentabilidad de los biocombustibles renovables producidos”.

Bernaerts *et al.* (2018a, 2018b), caracterizaron biomazas secas de diez cepas de microalgas: *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Dicronema lutheri*, *Tisochrysis lutea*, *Nannochloropsis sp.*, *Odontella aurita*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*, *Schizochytrium sp.* y *Tetraselmis chuii*. Los lípidos, proteínas y las cenizas constituyen una gran fracción de las biomazas. Se observan bajas cantidades de polisacáridos (2-8%) en las microalgas citadas, mientras que las sustancias poliméricas extracelulares sólo estaban presentes en *P. cruentum*, *O. aurita*, *C. vulgaris* y *A. platensis*. Los polisacáridos de la pared celular contribuyen aproximadamente con el 10% de la biomasa y están compuestos de heteropolisacáridos, mostrando al menos cinco monosacáridos diferentes. Por tanto, estos polisacáridos muestran potencial para mostrar funcionalidades interesantes, sustancias bioactivas o tecnológicas. El principal desafío para la comercialización de polisacáridos extracelulares de *Porphyridium sp.* sigue siendo la purificación de estas fracciones para obtener extractos de polisacáridos con bajo contenido de proteínas y sal.

Agustini y Febrian (2019), caracterizaron el proceso de hidrólisis de biomasa de *P. cruentum* para producir bioetanol, usando 2 tipos de ácidos, HNO₃ y H₂SO₄, con concentraciones de 1%; 2% y 3%, a 100 °C durante 60 min. La fermentación se realizó durante 5 días utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. El contenido de carbohidratos, analizado con sulfato de fenol, es 22.82% aprox. La cantidad de

azúcar reductor, analizado mediante método de Miller (1959) con ácido Dinitrosalicílico DNS, fue proporcional a la concentración de ácido. El contenido de etanol, analizado mediante HPLC, alcanza un máximo de 34.5% en medio hidrolizado con 1% de H₂SO₄ en el cuarto día, y de 14.83% con el 1% de HNO₃ en segundo día. El uso de ácidos de baja concentración minimiza el impacto ambiental. Concluyen que el *P. cruentum* podría usarse como materia prima para la producción sostenible de bioetanol.

Vieira *et al.* (2021a), exponen que “*esta revisión de literatura presenta los problemas actuales de recursos que afectan a la Tierra y cómo se espera que las microalgas sean una parte importante de la solución, con la producción de energía renovable que puedan ayudar de manera integrada a mitigar diferentes problemas ambientales. Las microalgas pueden convertir aguas residuales, CO₂ y residuos orgánicos en biomasa comercializable para diferentes usos, incluidos los biocombustibles, convirtiendo los desechos en valor*”. También presentan un inventario actualizado de las biorrefinerías basadas en microalgas, en operación.

Wichmann J. *et al.* (2020), resumen la comprensión actual del metabolismo de los hidrocarburos de las algas, incluida la capacidad de partición del carbono, la localización y tamaño de los depósitos de precursores, efectos ambientales sobre la distribución del flujo y factores limitantes para la producción eficiente de hidrocarburos. Destacan el potencial de las microalgas como fuentes renovables.

Borovkov *et al.* (2023), investigaron las características de crecimiento, la acumulación de pigmentos y proteínas del cultivo de *Porphyridium purpureum*. Evaluaron patrones de cambios en la biomasa, pigmentos, contenido proteico y la productividad del cultivo, en función de la irradiancia específica. El contenido de compuestos se maximizó en el nivel más bajo de irradiancia (0,2–1,2 W/g), mientras que la mayor productividad se alcanzó entre (1,2–1,7 W/g). En general, los niveles de irradiancia más bajos favorecen al cultivo de *P. purpureum* en función del consumo energético y las características de producción de la especie.

1.2.2. Revisión bibliográfica especializada, literatura nacional

En nuestro país, Perú, son escasos los estudios realizados para obtener biocombustibles de tercera generación y otros coproductos valiosos, utilizando biomasa microalgal. La mayoría describen la morfología y taxonomía de diversas

especies, mejoras en las condiciones de cultivo algal, y ensayos de fitorremediación. Actualmente, con biomasa lignocelulósica se obtiene bioetanol, biocompuesto muy utilizado en la industria de bebidas alcohólicas, en fármacos, productos de belleza, como gasol (5% bioetanol mezclado con gasolina), etc.

Acleto y Endo, (1977), iniciaron los primeros estudios de especies peruanas de algas rojas *Rhodophyta*, afirmando que “Hasta la fecha, sólo una especie de *Porphyra* es conocida en la costa peruana: *Porphyra columbina*. Esta es una especie común en rocas lavadas por el oleaje y es utilizada como alimento en condiciones secas o frescas. Recolecciones recientes han revelado 3 especies adicionales en nuestra costa: *P. pseudolanceolata*, *P. tenera* y *P. thuretii*; su morfología, estructura vegetativa, reproducción, hábitat, distribución geográfica e ilustración se presentan en este estudio”. Távara C. (1992) y Franco-León et al. (1995), también reportan estudios sobre la morfología y reproducción de *Porphyra pseudolanceolata* K. y algas *Rhodophyta*, respectivamente.

Márquez-Corigliano et al. (2019), afirman “En Perú, los registros históricos reconocen cinco especies de *Porphyra*, sin embargo, su estatus taxonómico aún no ha sido contrastado profundamente con evidencia molecular. Explorando la diversidad local de *Porphyra* y *Pyropia* en Marcona-Perú, se caracterizan 11 especímenes. El análisis filogenético identificó una especie de *Porphyra* sp. y tres especies de *Pyropia*. No hubo coincidencias con los registros históricos de *Porphyra*. Tres de las cuatro especies encontradas tienen un rango de distribución que abarca Chile y Perú. Siendo un primer paso a la caracterización de diversidad específica del recurso algal conocido como <cochayuyo> en Perú”.

Ávila-Peltroche y Padilla-Vallejos (2020), reportan que “La costa peruana es una de las zonas marinas más productivas del mundo. La lista actualizada de algas marinas reporta un total de 260 taxones, liderando la *Rhodophyta* (185 especies), seguida de *Chlorophyta* (41 especies) y las *Phaeophyceae* (34 especies). Estas algas son recolectadas artesanalmente de lechos naturales, generalmente se consumen frescas o secas, o se exportan para la extracción de polisacáridos. La sobreexplotación de algas pardas es una amenaza constante. La biomasa de las granjas de algas representa máximo el 4% de los desembarques anuales totales, y existe una tendencia decreciente en su producción acuícola desde 2012. Sin embargo, actualmente se están llevando a cabo algunos proyectos de cultivo de

especies de *C. chamissoi* y *Porphyra/Pyropia*. Además, estudios recientes han comenzado a explorar nuevos usos de las algas comerciales y no comerciales. Descubrir la diversidad de algas peruanas y establecer proyectos de cultivo y manejo sostenible son esenciales para utilizar y preservar estos recursos”.

Tabla 1.1. Resumen de la flora de algas marinas del Perú

Phylum/Class							Numbers
	Classes	Orders	Families	Genera	Species	Sub-species	Varieties
Chlorophyta	1	4	11	14	39		2
Phaeophyceae	1	7	12	22	32	2	
Rhodophyta	4	21	35	90	182		3
Total	6	32	58	126	253	2	5

Ref.: Ávila-Peltroche y Padilla-Vallejos (2020).

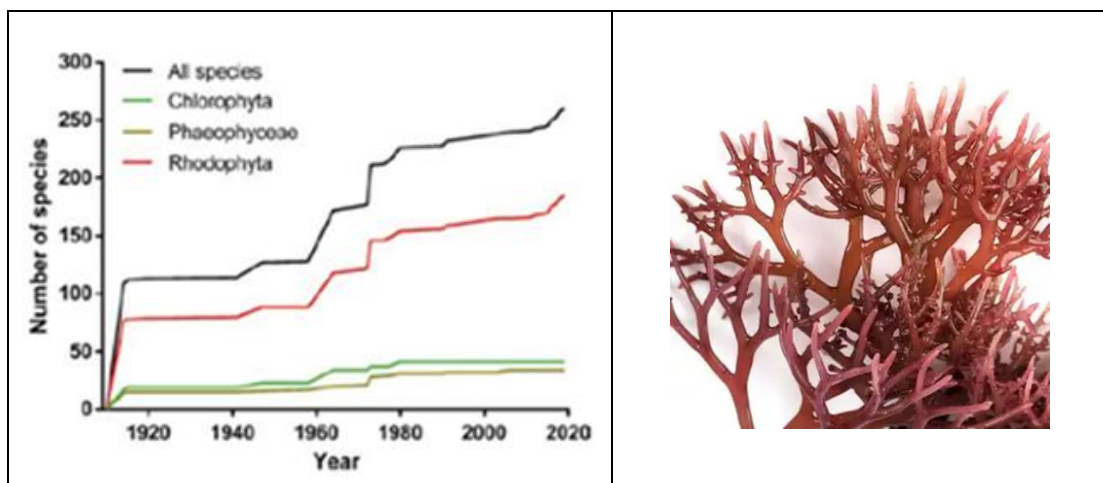


Figura 1.1. (a) Curva acumulada de nuevas especies de algas marinas y nuevos registros (agrupados) del Perú entre 1914 y 2019; (b) especie *Rhodophyta*. Ref.: Ávila-Peltroche y Padilla-Vallejos (2020).

Diversos estudios publicados, (Aguilar S., 2009; IMARPE, 2011; Silva *et al.*, 2011; Rodríguez A., 2016; Huayna *et al.*, 2017; Henríquez-Ramírez, 2018), exponen resultados para mejorar las condiciones del cultivo y maximizar el crecimiento poblacional de microalgas (*Tetraselmis suecica*, *Chlorella sp.*, *Nannochloropsis oceánica*, *Pediastrum sp.*, *Chlamydomonas sp.*, entre otras) que son diferentes a las especies *Rhodophytas*.

Jimenez & Castillo (2021), citando a Orrego-Moya (2021), discuten sobre el cuestionamiento a los biocombustibles líquidos, debido a riesgos en la seguridad alimentaria y a la conservación del ambiente, por los cambios del uso de tierra.

Tabla 1.2. *Algas marinas comerciales y no comerciales del Perú con sus nombres comunes y usos o potenciales usos en el país.*

Phylum/Class	Species	Common name	Use/Potential use
Chlorophyta	<i>Bryopsis plumosa</i>	None	Antibacterial
	<i>Caulerpa filiformis</i>	None	Photoprotective, antioxidant, spermicide
	<i>Ulva</i> sp.	Lechuga de mar	Human food, animal feed, compost
Phaeophyceae	<i>Eisenia cokeri</i>	None	Antioxidant
	<i>Lessonia nigrescens</i>	Aracanto negro, aracanto	Agricultural growth promoter, alginates, heavy metal removal
	<i>Lessonia trabeculata</i>	Aracanto palo, calatillo	Agricultural growth promoter, alginates, heavy metal removal
	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Aracanto huiro, huiro	Agricultural growth promoter, alginates, dermatocosmetic, heavy metal removal
Rhodophyta	<i>Petalonia fascia</i>	None	Antibacterial
	<i>Chondracanthus chamissoi</i> , <i>Gigartina paitensis</i>	Yuyo, mococho	Carrageenans, human food
	<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	Pelillo, pelo de mujer, pelo de indio	Forage
	<i>Neorubra decipiens</i>	Piscuchaqui	Human food
	<i>Porphyra/Pyropia</i> spp.	Cochayuyo*	Human food
	<i>Rhodymenia howeana</i>	None	Food supplement

Ref.: Ávila-Peltroche y Padilla-Vallejos (2020).

1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Este estudio pretende incentivar el uso racional y sostenible de diversos recursos acuícolas agroindustriales, particularmente la microalga *P. cruentum* como materia prima adecuada para obtener bioetanol de tercera generación. Jimenez-Escobedo y Castillo, (2021), manifiestan que para tener éxito en este tipo de estudio se requiere adaptación a las nuevas exigencias del conocimiento, de la formación profesional, de la investigación e innovación tecnológica. Por lo expuesto, identificamos que debe responderse las problemáticas siguientes:

1.3.1. Problema general

¿Será posible producir bioetanol de tercera generación, utilizando biomasa microalgal de *Porphyridium cruentum* hidrolizada enzimáticamente?

1.3.2. Problemas específicos

- a) ¿Cómo determinar los valores óptimos de los parámetros ambientales para cultivar adecuadamente las microalgas *Porphyridium cruentum*?
- b) ¿Cuáles serán las condiciones operacionales óptimas en el pretratamiento e hidrólisis enzimática, de la biomasa microalgal de *Porphyridium cruentum*, que permitan obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables?
- c) ¿Cuáles serán las condiciones operacionales y sus valores óptimos, en la fermentación de la biomasa microalgal hidrolizada de *Porphyridium cruentum*, utilizando levadura comercial para producir bioetanol de tercera generación?
- d) ¿Cómo establecer el modelado matemático de la fenomenología evolutiva del proceso, en sus diferentes etapas?
- e) ¿Los resultados del estudio de investigación, proveerá las bases biotecnológicas necesarias que justifiquen proponer el diseño de una planta piloto agroindustrial para producir bioetanol de tercera generación?

1.4. DELIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Aplicando los conceptos y la metodología de la investigación científica citados en la literatura (Hernández y Mendoza, 2018), que proporcionan mayor validez y rigurosidad al estudio, consideramos los alcances y las limitaciones siguientes:

1.4.1. Alcances

- Los alcances del estudio abarcan un entorno integrado de tipo exploratorio, correlacional, descriptivo y explicativo.
- El alcance exploratorio involucró una rigurosa revisión y clasificación de la literatura especializada, verificándose que en nuestro país no existen registros de datos operacionales estandarizados, con base científica, relacionados con el cultivo de microalgas para la producción de bioetanol. Sólo algunas especies son cultivadas para fines nutricionales.

- En base a los resultados obtenidos, está demostrado la correlación existente entre las condiciones óptimas del cultivo controlado de microalgas y la mayor producción de biomasa microalgal. Además, se interrelaciona los subsiguientes procesos operacionales como: el pretratamiento e hidrolizado enzimático de la biomasa, la fermentación de azúcares de la biomasa microalgal hidrolizada.
- Los fundamentos teóricos del estudio están consolidados con los alcances de tipo descriptivo y explicativo, que demuestran una investigación científica con perspectiva biotecnológica aplicada al área de recursos agroindustriales acuícolas, dando un valor agregado a la microalga *Porphyridium cruentum* mediante procesos operacionalmente óptimos y asequibles.

1.4.2. Limitaciones

- En nuestro país no existen registros de caracterización para la cepa microalgal *Porphyridium cruentum*, tampoco cuantificación estandarizada de parámetros operacionales bióticos y abióticos requeridos para el cultivo ni de cada etapa subsiguiente (pretratamiento, hidrólisis y fermentación de biomasa microalgal) del proceso de producción de bioetanol de tercera generación y coproductos. Debiendo recurrirse a la información publicada en la literatura internacional.
- La ejecución del trabajo experimental tuvo que ceñirse al horario laboral de la UNS, para poder tener las facilidades de apoyo en el uso de equipos disponibles y de algunos materiales requeridos.
- La cepa de microalgas *Porphyridium cruentum*, rigurosamente aislada para fines del estudio, no existe disponible en el Perú; fue adquirido junto con el medio nutriente F/2 de Guillard, directamente del Institute Algae Research Supply, CA. USA, (<https://algaeresearchsupply.com>).
- La inversión económica requerida en el estudio, para compra de algunos materiales y de los servicios de análisis fisicoquímicos y biológicos, fue sufragado íntegramente por el autor conforme al avance cronológico de las actividades programadas para desarrollar el trabajo de investigación.

1.5. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

1.5.1. Justificación teórica

Hernández y Mendoza, (2018), manifiestan que *“la integración simultánea de los conceptos filosóficos de la ciencia, la investigación y el conocimiento científico, conjugan un estudio reflexivo de la realidad; al interrelacionar el pensamiento crítico, la lógica racional y el método experimental que busca interpretar experiencias humanas, fundamentalmente con los elementos y criterios que generan este conocimiento y las herramientas que permitan validarlo”*.

Jimenez y Castillo, (2021), citando a Cook & Reichardt (2000), expresan *“...los métodos cuantitativos han sido desarrollados más directamente para la tarea de verificar o de confirmar teorías y que, en gran medida, los métodos cualitativos fueron deliberadamente desarrollados para la tarea de descubrir o de generar teorías. No es sorprendente entonces que cada tipo de método haya llegado a ser asociado con estas distintas posiciones paradigmáticas y que los métodos tengan también su mejor rendimiento cuando son empleados para esos fines específicos”*.

Un estudio debe sujetarse a la racionalidad instrumental, la verdad universal y comunicativa de las necesidades de la humanidad, (Hernández y Mendoza, 2018). Es decir, *“La evaluación es una actividad prioritaria, está enfocada a recopilar, analizar e interpretar, la información cualitativa y cuantitativa, necesaria y suficiente sobre los procedimientos y resultados”*, (Jimenez, 2019).

Los estudios fueron realizados en un contexto científico tecnológico dominado por las ciencias básicas y naturales, la ingeniería de procesos; ejes generadores del conocimiento que contribuyen a entender mejor un proceso biotecnológico que utiliza microalgas para producir biocombustibles y coproductos afines.

Finalmente, la justificación teórica está sustentada en la profundización del conocimiento científico en esta área de la ingeniería agroindustrial; aplicando una evaluación sistemática, rigurosa y crítica, de los procedimientos y resultados.

1.5.2. Justificación práctica

Herramientas metodológicas de la investigación científica fueron aplicadas en la evaluación de un proceso biotecnológico, para producir bioetanol de tercera generación utilizando biomasa microalgal de *Porphyridium cruentum*, a nivel de laboratorio. La justificación práctica se sustenta por las razones siguientes:

- a) Es factible el acceso, desde diversas plataformas virtuales, a las fuentes de literatura especializada y disponer de una base teórica sólida en esta área del conocimiento, requisito prioritario para abordar un tema de investigación.
- b) Es accesible el ingreso a los laboratorios especializados de la UNS, para realizar el estudio de acuerdo con el diseño experimental previsto y adquirir datos válidos; utilizando los recursos técnicos que aseguran la confiabilidad.
- c) Es posible disponer de las cepas de microalgas *Prophyridium cruentum*, las cuales provienen de un cepario internacional de gran prestigio. Asimismo, es factible utilizar los medios y recursos materiales para su inoculación y cultivo.
- d) Siguiendo los protocolos respectivos, fueron realizados los análisis de caracterización de la materia prima y de los productos obtenidos, antes y después de cada etapa del proceso.
- e) El producto obtenido, bioetanol de tercera generación, es una sustancia química utilizada como insumo para diversas aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, y otras conexas; también es utilizable como un importante complemento para obtener biocombustible ecológico, el gasol.
- f) Los resultados del estudio, con impacto positivo en el sector agroindustrial, ofrecen una base de datos experimentales asequibles, obtenidos al procesar un recurso natural acuático, unicelular y fotosintético; operacionalmente muy eficiente en la producción controlada de biomasa microalgal utilizable para producir bioetanol de tercera generación.
- g) Nuestro país posee tres grandes áreas geográficas (costa, sierra y selva), con gran biodiversidad y microclimas en los diferentes pisos altitudinales, que poseen riqueza de recursos hídricos y energía solar de diferente intensidad, que son las características esenciales y necesarias para cultivar diversas especies de microalgas, no requieren de grandes extensiones de suelo fértil, consumen menos cantidad de agua que algunos cultivos comerciales terrestres como la caña de azúcar, el maíz, etc.

1.5.3. Importancia

El trabajo de tesis doctoral está enfocado al estudio y evaluación rigurosa de las diferentes etapas del proceso biotecnológico, necesarias para alcanzar las

condiciones óptimas de producción de bioetanol de tercera generación, utilizando como materia prima la microalga *Porphyridium cruentum*. Para tal efecto, debe valorarse la importancia de un Diseño experimental apropiado que permita lograr el objetivo deseado, complementado con una buena base teórica para entender la fenomenología del proceso y analizar los resultados alcanzados.

El procedimiento experimental permite adquirir y acumular resultados del trabajo realizado a nivel laboratorio, usados para profundizar el conocimiento científico, dinámico y creciente en esta área de la Ingeniería agroindustrial. Además, de seguir desarrollando el pensamiento crítico, y contribuir con la innovación de herramientas tecnológicas y productos útiles para la sociedad.

Es relevante estandarizar y registrar los diversos resultados obtenidos, de las condiciones operacionales óptimas del proceso en sus diferentes etapas. Los resultados ratifican la potencialidad de los cultivos energéticos de microalgas, prometedora materia prima acuícola agroindustrial, y dependiendo de los fines de producción requerida, es posible cultivarlos en zonas no aptas para la agricultura, como los desiertos de la costa o las áreas pluviales o marinas, o en ambientes controlados como laboratorios o plantas pilotos.

El proceso biotecnológico propuesto, utiliza microalgas como materia prima, es asequible y permite adquirir datos experimentales confiables para realizar un escalamiento seguro, mediante procesos operacionales controlables y accesibles, los resultados y experiencias serán la base de datos, acumulativa, que puede utilizarse para proponer el diseño de una planta piloto con enfoque de biorrefinería.

1.6. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.6.1. Objetivo general

Optimizar las condiciones operacionales controlables que maximicen la densidad poblacional del cultivo de *Porphyridium cruentum* y maximizar el contenido de azúcares fermentables en la hidrolisis enzimática de la biomasa microalgal, generando conocimiento y estableciendo las condiciones para viabilizar la producción de bioetanol de tercera generación.

1.6.2. Objetivos específicos

- Determinar valores operacionales óptimos de las variables controlables, para maximizar la densidad poblacional del cultivo de las microalgas *Porphyridium cruentum*.
- Establecer las mejores condiciones operacionales controlables para optimizar el pretratamiento y la hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal de *Porphyridium cruentum*.
- Estandarizar las condiciones operacionales para optimizar la fermentación de la biomasa microalgal hidrolizada con levadura *Scheffersomyces stipitis* para obtener bioetanol de tercera generación.
- Caracterizar el bioetanol obtenido, siguiendo las normas técnicas establecidas.
- Evaluar el modelado fenomenológico del proceso, del crecimiento de la masa microalgal durante el cultivo y en la etapa de la hidrólisis enzimática.
- Alcanzar el conocimiento del proceso biotecnológico de producción de bioetanol, utilizando *Porphyridium cruentum* como materia prima; estableciendo una base de datos experimental confiable y que pueda servir como referencia para diseñar una planta piloto agroindustrial de producción de bioetanol de tercera generación.

Capítulo II

EL MARCO TEORICO

Este capítulo describe los fundamentos teóricos de la investigación y el marco conceptual que sustenta Estado del Arte, relacionado con el proceso biotecnológico de producir bioetanol utilizando microalgas *Porphyridium cruentum*.

2.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN

El conocimiento científico es un conjunto de información relevante y fidedigna, obtenido por la aplicación sistemática y rigurosa del método científico a un objeto de investigación. Es decir, busca resolver problemas específicos relacionados con la ciencia y la tecnología, evaluando sus atributos a favor y en contra, proyectar y generar las condiciones necesarias que permitan incorporar los resultados en el conocimiento humano, para poder explicar el fenómeno estudiado y responder a las interrogantes acerca del estudio, (Jimenez-Escobedo, 2019). Por tanto; es primordial conocer los fundamentos teóricos que sustentan la investigación sobre procesos biotecnológicos, actualmente esta área del conocimiento se encuentra en proceso de mejora continua e innovación, con la finalidad de tener sostenibilidad e incrementar su eficiencia, interrelaciona los factores energéticos, socioeconómicos, de salud, medioambientales y de seguridad alimentaria.

En consecuencia, dentro de la variada lista de fundamentos teóricos requeridos es necesario subrayar la necesidad cognitiva de considerar los siguientes:

- a) En el cultivo de microalgas *P. cruentum*, debe evaluarse los factores controlables abióticos siguientes: el tiempo, la intensidad luminosa, nutrientes, concentración de CO₂ disuelto en cultivo, pH, temperatura, la agitación mediante burbujeo de aire, condiciones del agua, (Ho O-S. *et al.*, 2009; Singh & Dhar, 2011; Kim M-H. *et al.*, 2017; Tejido-Núñez *et al.*, 2020; Andreeva *et al.*, 2021). El proceso de fotosíntesis puede alcanzar rendimientos máximos, en el cultivo microalgal, cuando la intensidad de luz y la temperatura son utilizados de manera adecuada, (Singh & Dhar, 2011; Barten *et al.*, 2020).

- b) Durante la etapa de cultivo microalgal debe adecuarse las concentraciones de los nutrientes (Guillard & Ryther, 1963, 1975; Procházková *et al.*, 2014; Ho S-H. *et al.*, 2013; Altimari *et al.*, 2023); manipulando correctamente puede llegar a acumularse biomasa microalgal con óptima concentración de carbohidratos para producir bioetanol (Procházková *et al.*, 2014), almacenada intracelularmente y como componentes estructurales de su pared celular, (Suárez *et al.*, 2020).
- c) En la cosecha de la biomasa microalgal generalmente se utiliza centrifugación (Velázquez *et al.*, 2018). Es recomendable el pretratamiento de la biomasa, para modificar o eliminar impedimentos estructurales y de composición, (Yap *et al.*, 2015; Spiden *et al.*, 2013; Velázquez *et al.*, 2018), porque permite acceder mejor hacia los carbohidratos contenidos en la biomasa, (Mosier *et al.*, 2005).
- d) La hidrólisis de la biomasa microalgal para producir azúcares fermentables, es la etapa más importante y puede realizarse por procesos mecánicos (Spiden *et al.*, 2013), procesos químicos (Agustini *et al.*, 2019) o enzimáticos (Kim M-H. *et al.*, 2014; Shokrkar *et al.*, 2017-2018; Bader *et al.*, 2020). El proceso de hidrólisis enzimática es menos complejo, es ecoamigable porque no genera residuos que puedan inhibir la fermentación del hidrolizado microalgal, (Mussatto *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2017; Shokrkar *et al.*, 2018; Spiden *et al.*, 2013). Las estructuras de celulosa y hemicelulosas pueden hidrolizarse hasta glucosa y otros azúcares, mediante cócteles enzimáticos ricos en glicohidrolasas que promueven una mejor separación, entre fracciones lipofílicas e hidrofílicas del hidrolizado líquido, preservando la naturaleza bioquímica de los productos de la reacción, ofreciendo un proceso económico y muy ecoamigable (Shokrkar *et al.*, 2018; Costa, 2017; Kim *et al.*, 2017).
- e) Los azúcares liberados en la hidrólisis enzimática (glucosa, xilosa, manosa, galactosa, arabinosa y celobiosa) son utilizados en el proceso de fermentación alcohólica por levaduras comerciales, como la *S. stipitis*, para producir bioetanol como producto final de la metabolización de estos azúcares (Costa, 2017; Shokrkar *et al.*, 2018; Agustini *et al.*, 2019; De Souza *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2017; Suárez *et al.*, 2020).

Por lo expuesto; la fundamentación teórica de la investigación realizada acerca del **“proceso biotecnológico para producir bioetanol a partir de microalgas *Porphyridium cruentum*”**, sustenta que es una alternativa verde e intensificada que

aporta resultados tangibles, las variables operacionales controlables son evaluadas en sus diferentes etapas (desde el cultivo hasta la fermentación del hidrolizado de la biomasa microalgal) y estandarizadas, optimizar sus valores para maximizar los resultados esperados: incrementar productividad de la densidad celular del cultivo microalgal y obtener el producto final bioetanol, un biocompuesto con múltiples aplicaciones; demostrando que es factible utilizar y valorizar como materia prima a un recurso acuícola agroindustrial asequible, la microalga *P. cruentum*. Además, contribuir a la gestión sostenible de un procesos biotecnológico.

2.2. MARCO CONCEPTUAL

Esta sección, resumen conciso de la revisión de literatura, presenta el marco teórico relacionado con el concepto general de microalgas y su clasificación, los diferentes tipos de cultivo y los métodos de cosecha de la biomasa producida, pretratamiento e hidrólisis de biomasa microalgal. Además; aspectos generales de la microalga *Porphyridium cruentum*, su caracterización morfológica, taxonómica, fisicoquímica. Asimismo, aspectos generales de los biocombustibles, tipos y clasificación, las aplicaciones potenciales de las microalgas para obtener productos derivados, los métodos operacionales para producir biocombustibles de tercera generación. Finalmente, los modelos matemáticos requeridos para evaluar las diferentes etapas del proceso para obtener bioetanol a partir de microalga *Porphyridium cruentum*.

“Es evidente que la innovación y la tecnificación de los procesos agroindustriales es una de las herramientas que ayudan a mejorar la competitividad y productividad de los diferentes sectores económicos de un país, llevándolos hacia esquemas de desarrollo y crecimiento real”, (IICA, 2014).

2.2.1. LAS MICROALGAS

2.2.1.1. Aspectos generales

“Las microalgas pertenecen a un grupo diversificado de microorganismos, son especies unicelulares capaces de realizar la fotosíntesis, se reproducen por división celular”, Barsanti y Gualteri, (2014).

Las microalgas son organismos microscópicos de tamaño celular 2-200 μm , con alta capacidad para fijar CO_2 , se encuentran en ambientes marinos y de agua

dulce (Velázquez *et al.*, 2018; Fang *et al.*, 2020). Su mecanismo fotosintético es similar al de las plantas terrestres; poseen estructura celular simple, al estar confinadas en un medio acuoso con fácil acceso al CO₂ y otros nutrientes, por fotosíntesis convierten eficientemente la energía solar en biomasa (Singh R. *et al.*, 2011; Borowitzka *et al.*, 2016); por su elevado ratio superficie-volumen, absorben una mayor cantidad de nutrientes (Chisti, 2007; Basile & Dalena, 2019).

Desde inicios del nuevo milenio viene registrándose un gran incremento en la cantidad de estudios experimentales y de revisión de literatura sobre microalgas, (Patil V. *et al.*, 2008; Bibi *et al.*, 2017; Bharathiraja *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2018; Enamala M. *et al.*, 2018; Rempel *et al.*, 2019; Jimenez y Castillo, 2021, etc.), que están siendo consideradas como potencial materia prima para obtener una amplia gama de productos, desde biocombustibles líquidos y gaseosos, hasta una gran variedad de compuestos bioactivos para el consumo humano y de animales, con enfoque tecnológico de biorrefinería (Cuellar *et al.*, 2015; Enamala M. *et al.*, 2018; Velázquez *et al.*, 2018; Khoo C. *et al.*, 2019; Prétat N. *et al.*, 2020); sin embargo, solo unos pocos productos son elaborados industrialmente (Odjadjare E. *et al.*, 2015; Borowitzka *et al.*, 2016). Las diversas aplicaciones potenciales de las microalgas son mostradas en la Fig. 2.1.

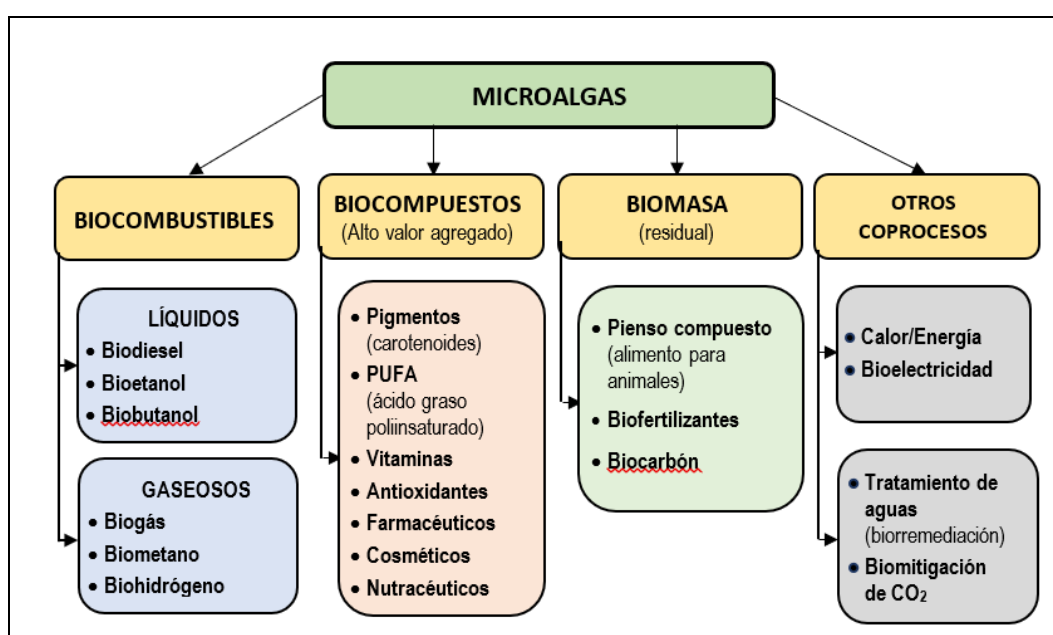


Figura 2.1. Microalgas y sus potenciales aplicaciones.

Ref.: Jimenez-Escobedo y Castillo, (2021).

2.2.1.2. Clasificación de las microalgas

Las características de algunas especies de microalgas son mostradas como sigue:

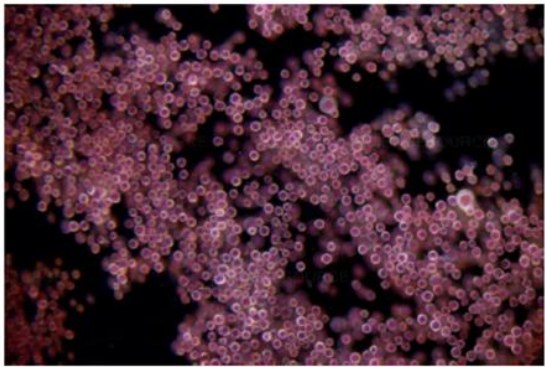
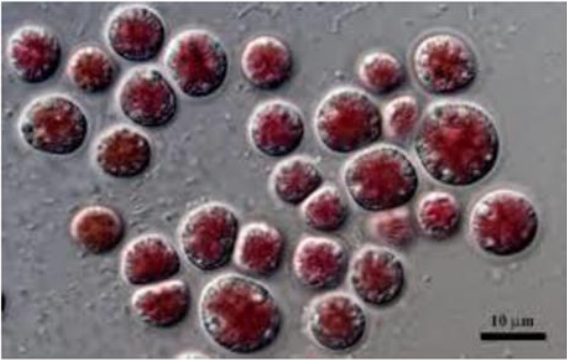
Tabla 2.1. Características Taxonómicas y Morfológicas de algunas especies de microalgas

DESCRIPCIÓN DE LA DIVISIÓN (Clase)	MORFOLOGÍA	ESPECIES M.O.	UTILIDAD DE M.O.
<p><i>Chlorophyta (Chlorophyceae)</i></p> <p>Algas verdes. Grupo mayoritario diverso, en forma y número. Son el origen de las plantas superiores. Por lo general es fotoautótrofo, pero puede ser heterótrofo. La mayoría crece en agua dulce, otros en hábitats marinos, y son adaptables a entornos.</p>	<p>Amplia gama de estructura celular: flagelados unicelulares a complejos arreglos multicelulares. Contiene celulosa en sus paredes celulares.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Chlamydomonas</i>, • <i>Chlorella</i>, • <i>Scenedesmus</i>, • <i>Spirogyra</i>, • <i>Volvox</i>. 	<p><i>Chlorella</i>; comercialmente es cultivada para elaborar alimento nutracéutico y acuícola.</p> <p><i>Haematococcus pluvialis</i> se usa para producir astaxantina.</p> <p><i>Dunaliella</i> en β-caroteno.</p>
<p><i>Cyanobacteria (Cyanophyceae)</i></p> <p>Algas verde-azul. No móviles, gram-negativas, eubacterias procariotas. Grupo de algas ampliamente distribuido, particularmente en los océanos. Componente importante del picoplancton.</p>	<p>Puede ser unicelular, filamentosos o colonial. Su diámetro mide sólo micrómetros (μm), pero es superior en longitud a las otras bacterias</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Spirulina (Arthrospira)</i>, • <i>Anabaena</i>, • <i>Oscillatoria</i>. 	<p><i>Spirulina</i>, comercialización de la biomasa, para el mercado de alimentos saludables y nutracéuticos.</p>
<p><i>Dinophyta (dinoflagelata)</i></p> <p>Grupo heterótrofo y fotosintético. La mitad de las especies conocidas son heterótrofos obligados. Es importante componente del microplancton.</p>	<p>Típicos flagelados unicelulares. Tiene una cubierta celular similar a una armadura debajo de la membrana celular.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Gymnodinium</i>, • <i>Cryptocodinium cohi</i>. 	<p>Conocido por producir flores y toxinas; muchos exhiben bioluminiscencia. Responsable de las mareas rojas. Algunas especies producen DHA.</p>
<p><i>Euglenophyta (euglenoidea)</i></p> <p>Crecen en agua dulce y/o salobre, ambientes marinos, suelos y lodo, en ambientes muy heterotróficos. Es mixotrófico, requieren de vitaminas B. Especies fagotróficas, mucho más relacionados con los tripanosomas.</p>	<p>Es eucariota flagelado unicelular, o colonial, con un núcleo, tiene uno a varios cloroplastos, y posee gran movilidad. Es de forma ovalada, y carecen de pared celular.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Euglena gracilis</i> 	<p>Célula única y características bioquímicas; puede tener aplicaciones farmacéuticas.</p>
<p><i>Haptophyta (Prymnesiophyta)</i></p> <p>Algas de organización monadal. Generalmente marinas. Mayormente fotosintéticas, pero pueden ser heterotróficas o fagotróficas.</p>	<p>Unicélulas muy móviles. Los <i>haptófitos</i> conocidos son cocolitóforos, poseen un exoesqueleto de placas calcáreas "cocolitos".</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pavlova lutheri</i>, • <i>Isochrysis galbana</i>, • <i>Prymnesium parvum</i> 	<p>Varias especies cultivadas como alimento para peces y otros organismos acuícolas como bivalvos y abalones.</p>
<p><i>Heterokontophyta</i></p> <p>Grupo grande que contiene las clases:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Chrysophyceae</i> (algas doradas), • <i>Xanthophyceae</i> (algas marrones) • <i>Eustigmatophyceae</i>, • <i>Bacillariophyceae</i> (diatomeas). <p>En gran parte son marinas, pero hay algunas variedades de agua dulce.</p>	<p>Células con dos flagelos diferentes (a diferencia de 2 isokont iguales). La <i>Bacillariophyceae</i> es unicelular; marrones con pared celular de sílice (tipo único de carcasa hecha de dos frustules, como tapas de una caja)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Amphora</i>, • <i>Nitzschia</i>, • <i>Thalassiosira pseudonana</i>, • <i>Phaeodactylum tricornutum</i>, • <i>Nannochloropsis</i> • <i>Chaetoceros</i> 	<p>Varias especies cultivadas como alimento para acuicultura; otros conocidos por la producción de EPA.</p>
<p><i>Rhodophyta (Porphyridiophyceae)</i></p> <p>Algas rojas. Uno de los grupos algales más grandes y antiguos. El color rojo se debe al pigmento ficobiliproteínas.</p>	<p>Vida libre, unicelular.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Porphyridium purpureum</i> 	<p>Algunas secretan CaCO_3; para secuestrar CO_2. Las algas más importantes, económicamente, son de esta familia: <i>Palmaria palmata</i>, <i>Porphyra</i> y especies para hacer agar, carragenina, aditivo de alimentos.</p>

2.2.1.3. La microalga *Porphyridium cruentum*

La microalga *Porphyridium cruentum* es un microorganismo unicelular esférico de 6 a 16 μm de diámetro, crece en ambientes acuáticos (marino y en agua dulce) formando semicolonias, el color rojo característico es por los pigmentos ficoeritrina y ficocianina, por fotosíntesis convierte eficientemente la energía absorbida en biomasa, (Jimenez y Castillo, 2021; Borovkov *et al.*, 2023); posee una pared celular constituida por polisacáridos sulfatados (galactosa, glucosa, xilosa, ácido glucurónico, y azúcares residuales: arabinosa, manosa y ramnosa) formando una matriz polimérica, (Borowitzka, 2016; Bernaerts *et al.*, 2018). Además, produce ácidos grasos poliinsaturados (omega-3 y omega-6). Los lípidos (20-60%) y el almidón (20-50%) son alojados intracelularmente, las proteínas (20-50%) también puede encontrarse, (Ho S-H. *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013). Es nula la presencia de lignina en la biomasa microalgal de *Porphyridium cruentum*, una gran ventaja para el pretratamiento y eficiente hidrólisis enzimática del contenido de almidón, (Chen *et al.*, 2013; Sánchez-Rizza *et al.*, 2017). En la Tabla 2.2 se reporta la descripción taxonómica de *Porphyridium cruentum*.

Tabla 2.2. Características Taxonómicas de la microalga *Porphyridium cruentum*

Dominio (Empire)	<i>Eukaryota</i>	
Reino (Kingdon)	<i>Plantae</i>	
Subreino (Subkingdom)	<i>Biliphyta</i>	
División (Phylum)	<i>Rhodophyta</i>	
Subdivisión (Subphylum)	<i>Proteorhodophytina</i>	
Clase (Class)	<i>Porphyridiophyceae</i>	
Orden (Order)	<i>Porphyridiales</i>	
Familia (Family)	<i>Porphyridiaceae</i>	
Género (Genus)	<i>Porphyridium</i>	
Especie (Specie)	<i>Porphyridium cruentum</i> <i>Porphyridium sp.</i> <i>Porphyridium purpureum</i>	

Ref.: Jimenez-Escobedo y Castillo, (2021), www.revistas.unitru.edu.pe

La biomasa microalgal de *P. cruentum* posee componentes activos muy valiosos para ser procesados dentro de una amplia gama de potenciales aplicaciones, y poder obtener productos alimentarios (pigmentos carotenoides), industriales (biocombustibles), farmacéuticos (polisacáridos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas y antivirales), nutricionales (ácido araquidónico, precursor PUFA), bioquímicos, cosméticos, acuícolas, etc., (Spiden *et al.*, 2013; Odjadjare *et al.*, 2015; Medina-Cabrera *et al.*, 2020; Taipabu *et al.*, 2021; Borovkov *et al.*, 2023; Tejido-Núñez *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2021).

2.2.1.4. El cultivo de microalgas, y factores influyentes en el crecimiento

Un compendio de los modos nutricionales de cultivo microalgal, para algunas especies de microalgas, son mostradas en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Modos nutricionales de cultivo para algunas especies de microalgas

MODO CULTIVO Y DESCRIPCIÓN	PRINCIPALES ESPECIES DE ALGAS Y POTENCIALES USOS
Autotrófico Emplean la luz solar como única fuente de energía (fotosíntesis autotrófica) y el CO ₂ como fuente de carbono, para acumular compuestos energéticos a través de reacciones fotosintéticas. Ejemplos: plantas, algas y diversas bacterias. Acumulan carbohidratos	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Spirulina</i>: (Nutrición humana, pigmento Ficobiliproteínas) • <i>Chlorella</i>: (Nutrición humana, Acuicultura, lípidos) • <i>Dunaliella</i>: (Betacaroteno) • <i>Haematococcus</i>: (Acuicultura; Astaxanthin)
Heterotrófico Utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía (p. ej.: glucosa, acetato, glicerol, metanol, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: (levadura) (pueden acumular lípidos y carbohidratos)
Mixotrófico (bitrófico) Estos organismos pueden usar mixotrofia obligatoria o facultativa, la energía se deriva de diferentes modos. Las combinaciones son: foto y quimiolitotrofia, lito y órganotrofia, auto y heterotrofia.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Euglena</i>: (nutrición humana, biomitigación del dióxido de carbono) • Chlamydomonas
Fotoheterotrófico Estos organismos tienen un metabolismo en el que se necesita luz para usar compuestos orgánicos como fuente de carbono. El fenómeno se conoce como fotoorganotrófico, fotoasimilación o fotometabolismo.	<ul style="list-style-type: none"> • Bacterias púrpuras sin azufre, • bacterias verdes sin azufre, • heliobacterias
Quimiolitotrófico Organismos oxidan compuestos inorgánicos (quimiolitotróficos) u orgánicos (quimioorganotróficos) como su principal fuente de energía. Los quimiolitotróficos pueden ser autótrofos o heterótrofos.	<ul style="list-style-type: none"> • Bacterias en “fumadores negros” que se alimentan de H₂S. • bacterias oxidantes de hierro y manganeso

Como se observa en la Tabla 2.3, las microalgas para su crecimiento y desarrollo bioquímico se cultivan en **modo nutricional autótrofo** (autogeneran alimento, por fotosíntesis y CO₂), **heterótrofo** (absorben carbono orgánico, como fuente de alimentación y energía) y **mixótrofo** (combina los modos autótrofo y heterótrofo); la mayoría de las microalgas son autótrofas, (Nigam 2011; Enamana *et al.*, 2018; Tiwari *et al.*, 2019; Lutz *et al.*, 2017; Hernández-P. y Labé, 2014; Zhu *et al.*, 2013).

Dependiendo de las especies de microalgas, y las condiciones de crecimiento, es posible inducir la generación de grandes cantidades de biomasa microalgal y alcanzar concentraciones extremadamente altas de sus compuestos bioquímicos; tales como carbohidratos, proteínas, lípidos, cenizas, pigmentos, ácidos nucleicos, entre otros compuestos, (Borowikzka *et al.*, 2016; Alam *et al.*, 2015; Singh K. *et al.*, 2017; Tiwari *et al.*, 2019; Velázquez *et al.*, 2018; Jimenez E. y Castillo, 2021). Cultivos exitosos de microalgas requieren condiciones ambientales controlables, que varían entre las diversas especies. En la Tabla 2.4, se detalla los principales **factores que influyen** durante etapa de crecimiento de la biomasa microalgal.

Tabla 2.4. Factores influyentes en el cultivo de microalgas

FACTORES INFLUYENTES	PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS
Factores ABIÓTICOS <ul style="list-style-type: none"> • Intensidad luminosa • Temperatura • Dióxido de carbono CO₂ • Nutrientes • pH • Salinidad 	<ul style="list-style-type: none"> • fuente básica de energía, junto con el fotoperiodo. • factor limitante clave • clave para el crecimiento y acumulación de carbohidratos • macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y minerales • determina solubilidad y disponibilidad de CO₂, y nutrientes • afecta el crecimiento y actividad metabólica, altos o bajos niveles no permitidos altera composición bioquímica celular.
Factores BIÓTICOS <ul style="list-style-type: none"> • microorganismos contaminantes • microalgas extrañas 	<ul style="list-style-type: none"> • bacterias, hongos, virus, etc. • competencia por los nutrientes.
Factores OPERACIONALES <ul style="list-style-type: none"> • Grado de mezcla y agitación • Factor de dilución • Frecuencia de cosecha • Dimensionamiento tanque cultivo 	<ul style="list-style-type: none"> • Influencia en la productividad. • Influye en velocidad de crecimiento • Influencia en rendimiento de cosecha • Capacidad de almacenamiento, densidad celular

Ref.: Singh & Dhar, (2011); Enamala *et al.*, (2018); Jimenez E. y Castillo, (2021); Borovkov *et al.*, (2023).

Los sistemas de cultivos para producir biomasa microalgal son muy variados, en función de las especies de microalgas a cultivar es muy importante efectuar una selección apropiada, que significativamente afecta en la eficiencia y rentabilidad del proceso productivo, (Jimenez E. y Castillo, 2021). Cualquiera que sea el uso final de la biomasa microalgal y el modo de cultivo utilizado, los pasos necesarios para producirla son los mismos: preparar el medio a ser introducido en los sistemas de cultivo donde es producido la biomasa, posteriormente cosechar y estabilizar (Ación F. *et al.*, 2021). Los sistemas de cultivo algal más usados son mostrados en la Fig. 2.2, y descritos de manera breve a continuación.

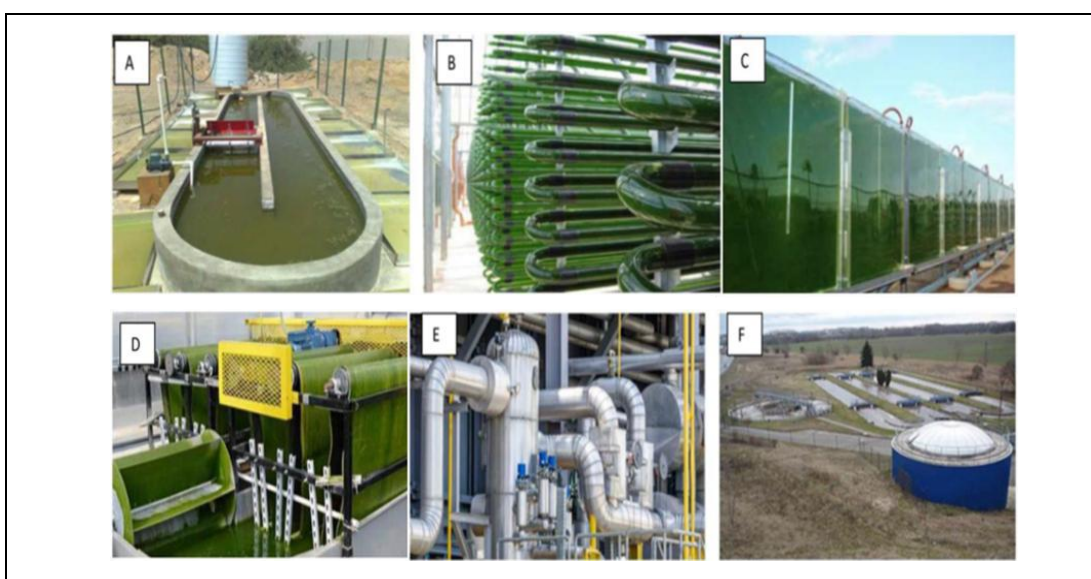


Figura 2.2. *Sistemas para cultivo de microalgas: (A) estanques abiertos OP; (B) PBR tubular; (C) PBR plano; (D) PBR tipo biopelícula; (E) Fermentadores; (F) cultivo agua residuales. Ref.: Bibi et al., (2017). OP: Open Ponds; PBR: Plug BioReactor.*

- a) Cultivo en estanques abiertos.-** sistemas abiertos al aire libre, establecidos para el cultivo a gran escala de algas y cianobacterias (Borowitzka et al., 2016; Singh & Dhar, 2011). Los estanques pueden ser excavados y usado sin forro o forrado con material impermeable o pueden construirse con paredes, son adecuados para albergar un reducido número de microalgas que pueden tolerar condiciones ambientales extremas, (*Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella*) prosperan en ambientes muy alcalinos o salinos, (Chisti, 2007; Borowitzka et al., 2016).
- b) Fotobiorreactores.-** los sistemas abiertos requieren una gran área de tierra y presentan diversos problemas asociados (idoneidad limitada de especies, la contaminación, ambientes no controlables, productividades volumétricas bajas),

estas ineficiencias son superadas con los fotobiorreactores, que tienen mejor control sobre la contaminación y otras condiciones; pueden ser ubicados interior o exteriormente, según diseño y método de recolección, (Bibi *et al.*, 2017; Singh & Dhar, 2011).

c) Fermentadores.- algunas algas tienen crecimiento mixotrófico, modo de cultivo que incluye la gran fermentación existente, proceso controlable con intensidad de luz mínima, aislado del medio ambiente, cosecha a bajo costo, etc. (Singh & Dhar, 2011; Bibi *et al.*, 2017). El cultivo mixotrófico requiere suficiente suministro de O₂ para catabolizar los sustratos orgánicos, ofrece rendimientos superiores en biomasa y productividad, frente a los fototrófico y heterotrófico, (Singh & Dhar, 2011; Borowitzka *et al.*, 2016; Tiwari *et al.*, 2019; Jimenez, 2021).

2.2.1.5. La cosecha, o recolección, de biomasa microalgal

La recolección o cosecha, de biomasa microalgal, consiste en una secuencia operacional para eliminar grandes volúmenes de agua del cultivo, utilizando variadas técnicas (Enamala *et al.*, 2018). El costo de recolección de biomasa es una proporción significativa del costo total de producción, tiene un rango 3.3-30%, (Singh & Dhar, 2011). Seleccionar la técnica de recolección debe tener en cuenta el tamaño y la densidad de las microalgas, para lograr un mayor rendimiento de biomasa a menor costo operativo, (Singh & Dhar, 2011; Enamala *et al.*, 2018). De manera concisa, se describe los procesos de floculación, centrifugación y filtración:

a) Floculación.- este método forma enormes unidades concentradas al aglutinar unidades coloidales dispersas, siendo fácil la decantación y filtración, (Jimenez y Castillo, 2021). Es inducible por floculación química, la biofloculación, electrofloculación y flotación en aire disuelto, (Singh & Dhar, 2011; Enamala *et al.*, 2018). En la floculación química, los floculantes inorgánicos como FeCl₃, Fe₂(SO₄)₃, AlCl₃, Ca (OH)₂ y el alumbre (Al₂ (SO₄)₃), neutralizan o reducen la carga superficial negativa de las células que causan la formación flocular. Los biofloculantes son más seguros, producen flóculos más estables, es un método atractivo, (Singh & Dhar, 2011; Enamala *et al.*, 2018; Jimenez *et al.*, 2021).

b) Centrifugación.- el tamaño de partícula, la densidad y morfología del cultivo a cosechar, son factores cruciales al centrifugar, porque afectan al recuperar la biomasa (y en los costos). Las células coloniales y las filamentosas, se asientan

más fácilmente que las pequeñas, (Jimenez E. y Castillo, 2021; Enamala *et al.*, 2018; Singh & Dhar, 2011). Existen reportes de una efectividad de cosecha microalgal del 90 al 100% mediante centrifugación, es la técnica más eficiente, consume mucha energía con estimaciones de 0,3 - 8 kWh-m³, y es muy costosa cuando se usa para la producción a escala comercial, limitado en el procesamiento de biocombustibles (Singh & Dhar, 2011; Enamala *et al.*, 2018; Jimenez E. y Castillo, 2021).

c) Filtración.- utilizado para separar sistemas bifásicos solido-líquido y solido-gas, interponiendo un microfiltro. La filtración requiere energía, consumos estimados son de 0.2 a 0,88 kWh m³ (sistema a presión) y de 0.1 a 5.9 kWh m³ (sistema en vacío). Aunque los costos asociados con la filtración son bajos, el principal inconveniente es el cambio constante de filtros y membranas haciendo que el proceso no sea económicamente viable, siendo limitada su idoneidad a mayor cantidad de especies de microalgas (Singh & Dhar, 2011). Esta técnica se usa generalmente para filtrar células grandes (filamentosas), no es apropiado para *Dunaliella*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, etc., (Enamala *et al.*, 2018).

2.2.1.6. El pretratamiento de la biomasa microalgal

El pretratamiento es muy importante, porque permite disponer de los componentes de la biomasa microalgal, como: las proteínas, carbohidratos, lípidos y coproductos (pigmentos, antioxidantes, oligosacáridos, etc), alojados en estructura celular y considerados materia prima importantes para producir biocombustibles y biocompuestos valiosos, (Bernaerts *et al.*, 2018; Velázquez *et al.*, 2018; Hernández *et al.*, 2015; Agustini & Febrian, 2019; Jimenez E. y Castillo, 2021).

Para producir etanol, es primordial el pretratamiento de la biomasa microalgal, mediante descomposición de la pared celular y estructura intracelular, libera los carbohidratos que es la reserva principal de azúcar acumulada. El carbohidrato se encuentra en la pared celular como celulosa y en los plástidos en forma de almidón, (Chen *et al.*, 2013; Velázquez *et al.*, 2018). La pared celular está compuesta de celulosa, polisacáridos sulfatados y pectina, que pueden impregnarse con CaCO₃, sílice y magnesio (Velázquez *et al.*, 2018; Basile & Dalena, 2015; Chen *et al.*, 2013), ver Fig. 2.3. La pared celular, dependiendo de su composición, puede tener una estructura rígida con grados de dificultad difíciles de romper, como es el caso de

Chlorella sp., contrario a los de *Scenedesmus sp.* y *Porphyridium cruentum* que no contienen lignina (Velázquez et al., 2018).

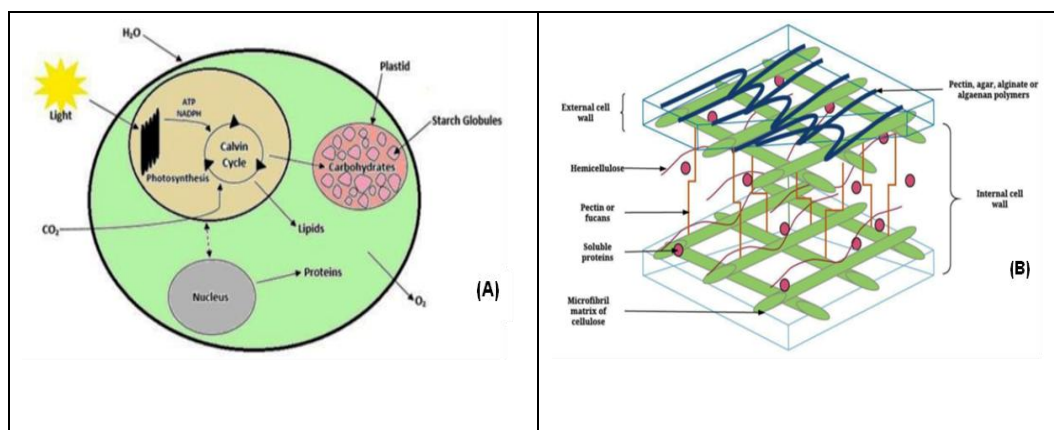


Figura 2.3. (A) diagrama de producción de almidón en microalgas, y (B) pared celular de microalgas. Ref.: Velázquez et al., (2018)

En la Fig. 2.4, puede visualizarse los pretratamientos más utilizados (métodos mecánicos, procesos hidrotérmico, químico y enzimático) para degradar la biomasa microalgal.

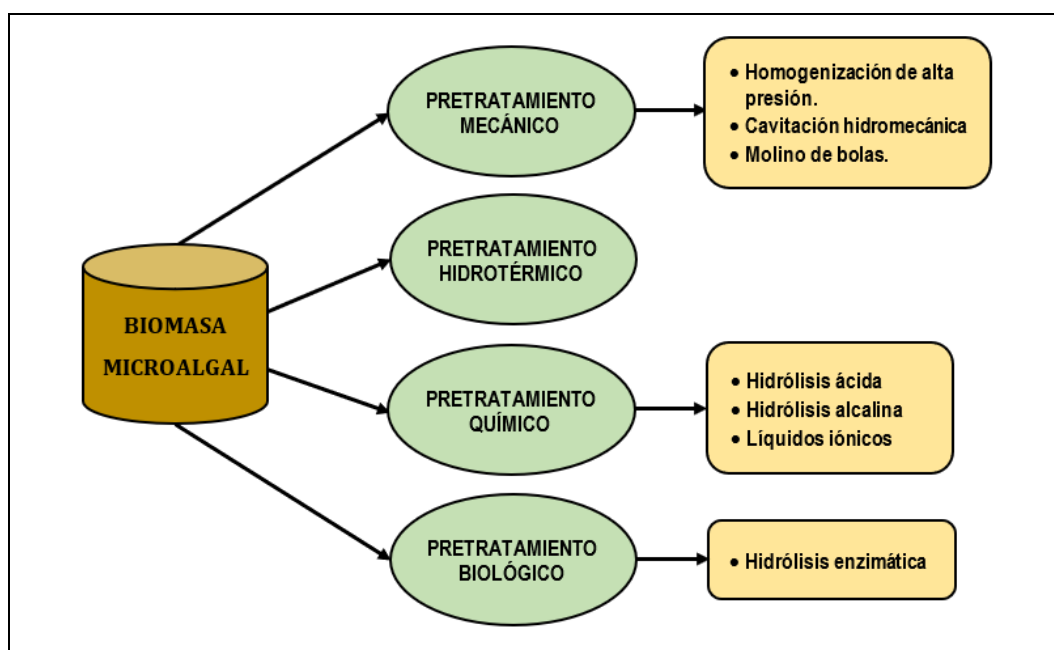


Figura 2.4. Técnicas de pretratamiento para biodegradar biomasa microalgal.

Ref.: Das & Varanasi, (2019); Jimenez E. y Castillo, (2021)

Estudios comparativos sobre diferentes pretratamientos, y sus características, realizados a diversas especies de microalgas, puede visualizarse en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Métodos de pretratamiento para biomasa de algunas especies de microalgas.

Biomasa	Método pretratamiento	Condiciones	Componentes extraídos	Referencia (*)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Hidrotérmico	Water 1:13 (w/v); 147 °C; 40 min	Glucosa	Yuan <i>et al.</i> (2016)
Mezcla de microalgas (<i>Scenedesmus</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Ankistrodesmus</i> , <i>Micromonas</i> , <i>Chlamydomonas</i>)	Hidrolisis ácida	H ₂ SO ₄ 1 M 80 - 90 °C 120 min	Carbohidratos	Castro <i>et al.</i> (2015)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Enzimático	Endogalacturonase 800 U/g Esterase 3600 U/g; Protease 90 U/g pH 6; 50 °C; 24 h	Carbohidratos	Ometto <i>et al.</i> (2014)
<i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Nitzschia</i> sp <i>Aphanthece</i> sp. <i>Desmodesmus spinosus</i> <i>Nitzschia palea</i>	Peróxido alcalino	H ₂ O ₂ 1 - 7.5 % (w/w) 50 °C; 1 h	Carbohidratos y subproductos.	Juárez <i>et al.</i> (2016)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Hidrolisis ácida	H ₂ SO ₄ 2 N; 120 °C; 30 min	Carbohidratos	Miranda <i>et al.</i> (2012)
<i>Chlorococcum</i> sp	Ultrasonido	65 - 130 W; 40 kHz; 25 min	Carbohidratos	Halim <i>et al.</i> (2012)
	Homogenización a alta presión	500 - 850 bar 15 min		
	Molino de bolas	bolas de vidrio 1 mm 1:2 ó 1:3 (v/v); 4 min		
	Hidrolisis ácida	H ₂ SO ₄ 3-8 % (v/v) 120-160 °C; 15-45 min		
<i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Porphyridium cruentum</i>	Homogeneización de alta presión	10mL cámara compresión 50 - 270 MPa; 3 °C bolas de vidrio (0.375, 0.625, 1.30, y 2.15 mm); bolas de Zirconio (0.20, 0.60, y 1.25 mm); velocidad rotación (8, 10, 14 m/s); 20 °C	Disrupción celular	Montalescot <i>et al.</i> (2015)
	Molino de bolas			
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Microondas	Acetona; 50 W; 56 °C; 5 min	Pigmentos	Pasquet <i>et al.</i> (2011)
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	Campo eléctrico pulsado y solventes	Distancia electrodos 1 cm; 45 kV/cm Etil acetato/metanol/agua	Lípidos	Zbinden <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Neochloris oleoabundans</i> <i>Tetraselmis suecica</i>	Molino de bolas	Tamaño bolas (0.3, 0.4, 0.65, 1 mm) 65 % (v/v); 25 °C	Carbohidratos y proteínas	Postman <i>et al.</i> (2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Líquido iónico y solvente	Líquido iónico; 1 h temperatura ambiente Adicionar hexano 30 g; 15 min	Disrupción celular y lípidos	Orr <i>et al.</i> (2016)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Enzimático	Celulasa 140 mg/m ² ; pH 4.6; 50 °C; 24 h	Carbohidratos y lípidos	Fu <i>et al.</i> (2010)
<i>Nannochloropsis salina</i>	Cavitación hidrodinámica	Plato de orificio, 13 agujeros x 0.5 mm diámetro; Presión aguas arriba / aguas abajo 4 y 0.4 bar; velocidad 26.21 m/s	Disrupción celular y lípidos	Lee y Han (2015)
<i>Arthrospira platensis</i>	Campo eléctrico pulsado	15 – 25 kV/cm; 60 – 150 µs; 10 – 40 °C	Pigmentos	Martínez <i>et al.</i> (2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Hidrotermal	Agua; 140, 160, 80 °C 3, 6, y 10 bar; 10 – 20 min	Solubilización de compuestos	Mendez <i>et al.</i> (2014)

Ref.: (*) referencias citadas por Velázquez *et al.* (2018); Jimenez-Escobedo y Castillo, (2021); Fernandes de Souza *et al.*, (2020).

2.2.2. EL BIOETANOL

2.2.2.1. Aspectos generales

El bioetanol es un tipo de alcohol, que se obtiene por la fermentación de materiales orgánicos ricos en azúcares y material celulósico; es un biocompuesto químico muy activo y utilizado como materia prima para elaborar diversos productos químicos, es también considerado un biocombustible líquido y fuente de energía renovable, (Devarapalli & Atiyeh, 2015; Sánchez-Rizza *et al.*, 2019). En función del origen de la materia prima empleada para su producción, el bioetanol obtenido es clasificado, (Bibi *et al.*, 2017; Chaudary *et al.*, 2014; Basile & Dalena, 2019), como sigue:

- **Bioetanol de primera generación**; producido a partir de fuentes vegetales ricas en carbohidratos, de plantaciones cultivadas expresamente (caña de azúcar, cereales, remolacha, etc.); desventaja: atentan contra la seguridad alimentaria.
- **Bioetanol de segunda generación**; es obtenido de biomasa lignocelulósica, (residuos agrícolas); desventajas: requiere mucha mano de obra, altos costos.
- **Bioetanol de tercera generación**, obtenido a partir de especies de microalgas que poseen buena capacidad productiva de carbohidratos, (Chen *et al.*, 2013); es producido con procesos biotecnológicos evolutivos e innovadores; la materia prima microalgal no compite con la seguridad alimentaria, alta reproducción del cultivo, periodos cortos de cosecha y no requiere uso de terrenos agrícolas, etc.

Los procesos para producir bioetanol (de primera, segunda y tercera generación) son similares entre sí, un esquema conceptual es mostrado en la Fig. 2.5.

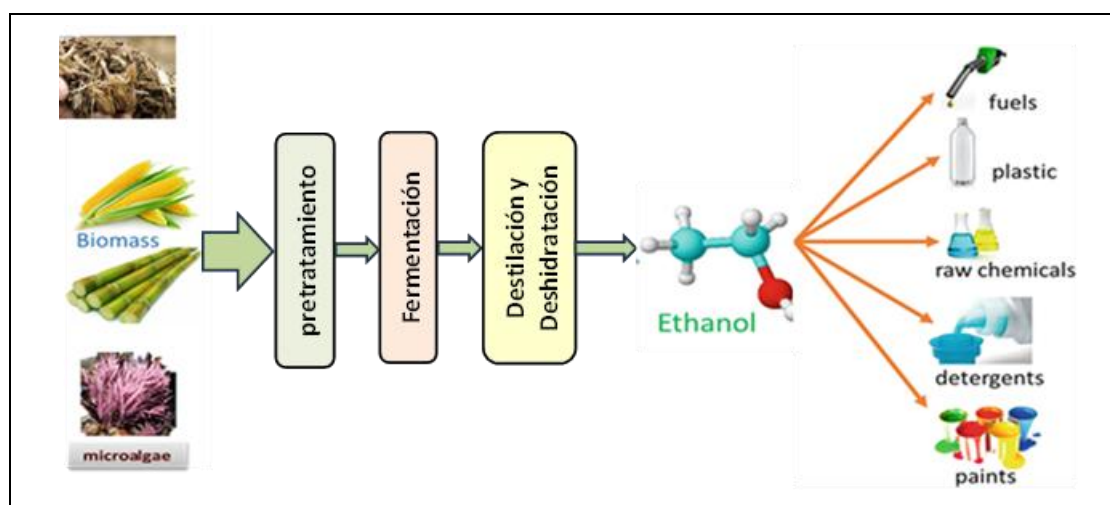


Figura 2.5. Esquema conceptual para la producción de bioetanol y derivados.

Ref.: Jimenez E. y Castillo, (2021); Devarapalli & Atiyeh, (2015).

La cantidad de etanol producido, desde diferentes fuentes de materia prima, es reportado en la Tabla 2.6; observándose que el rendimiento de las microalgas es mucho mayor que las fuentes celulósicas y lignocelulósicas (p. ej., la microalga *Porphyridium cruentum* tiene un rendimiento de etanol 16 veces más que el de la caña de azúcar, aprox.; siendo su tiempo de cultivo más rápido y eficiente.

Tabla 2.6. Rendimiento de bioetanol, desde diferentes fuentes de cultivo.

FUENTE DE BIOMASA	RENDIMIENTO BIOETANOL (L/kg masa seca)	REFERENCIAS
Arroz	0,48	Mat Aron <i>et al.</i> (2020)
Avena	0,41	Mat Aron <i>et al.</i> (2020)
Harina de maíz	9,67 ± 0,11	Mat Aron <i>et al.</i> (2020)
Sorgo dulce	0,44	Mat Aron <i>et al.</i> (2020)
Caña de azúcar	0,25 – 0,50	Mat Aron <i>et al.</i> (2020)
Rastrojo de maíz	5,85	Mat Aron <i>et al.</i> (2020)
Paja de cebada	0,054	Mat Aron <i>et al.</i> (2020)
<i>Chlorella vulgaris</i>	3,77 (85,0%)	Dass & Varanasi, (2019)
<i>Scenedesmus dimorphous</i>	3,90 (91,3%)	Dass & Varanasi, (2019)
<i>Porphyridium cruentum</i>	5,60 (46,0%)	Tiwari <i>et al.</i> (2019); Li <i>et al.</i> (2019)

2.2.2.2. El Bioetanol de tercera generación, **producción biotecnológica.**

“El bioetanol de tercera generación surgió para aprovechar la disponibilidad de nuevos recursos bioenergéticos de una biomasa no rígida y deslignificada, de las macroalgas o microalgas, para producir azúcares fermentables”, (Jimenez y Castillo, 2021; Chaudhary *et al.*, 2014). Existen diversas publicaciones, (Bibi *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2013; Ho S-H. *et al.*, 2013; Kim M-H. *et al.*, 2014; Shokrkar *et al.*, 2017-2018; Agustini & Febrian, 2019; Gallego *et al.* 2019; Tiwari *et al.*, 2019; Sánchez-Rizza, 2019; Bader *et al.*, 2020; Medina-Cabrera *et al.*, 2020; Sanz-Smachetti *et al.*, 2020; Andreeva *et al.*, 2021), reportando la obtención de bioetanol a partir de biomásas con alto contenido de carbohidratos, correspondientes a diversas especies de algas, (*Sargazo sp.*, *Laminaria sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Prymnesium parvum*, *Gelidium amansii*, *Gracilaria sp.*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Spirulina platensis*, *Porphyridium cruentum* y *Spirogyra sp.*).

Los carbohidratos (celulosa y almidón) acumulados en la biomasa microalgal son utilizados para producir bioetanol siguiendo un proceso constituido por tres

etapas principales: **i)** pretratamiento, **ii)** sacarificación y **iii)** fermentación, (Chen *et al.*, 2013; Chaudhary *et al.*, 2014, Velázquez-Lucio, 2018). Una de las etapas más importantes es el pretratamiento (mecánico o por hidrólisis enzimática), que se lleva a cabo para aumentar la accesibilidad a los azúcares intracelulares y, por lo tanto, juega un papel importante en la eficiencia general del proceso, (Velázquez-Lucio, 2018). Las paredes celulares de las microalgas tienen presencia insignificante o nula de lignina (una barrera física), que puede eliminarse fácilmente mediante hidrólisis enzimática (etapa de sacarificación) de la celulosa microalgal, (Chen *et al.*, 2013; Bibi *et al.*, 2017; Velázquez *et al.*, 2018; Chaudhary *et al.*, 2014).

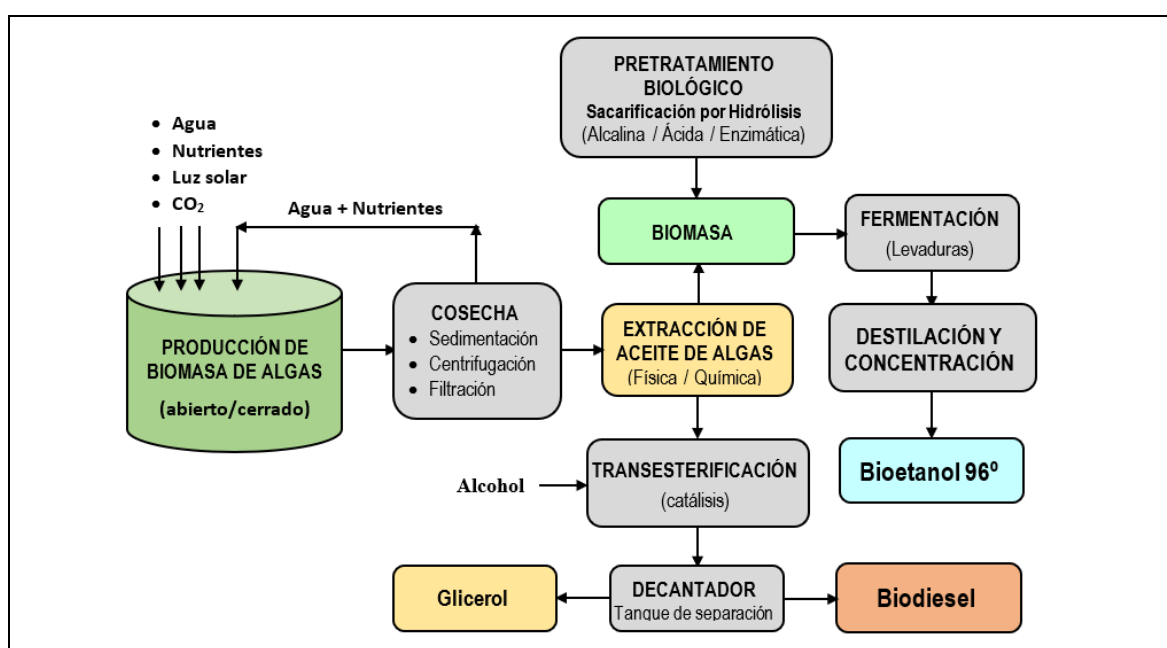


Figura 2.6. Proceso biotecnológico para producir bioetanol y biodiesel de tercera generación.
Ref.: Mussato *et al.*, (2010), Cuellar *et al.*, (2015); Jimenez E. y Castillo, (2021)

En la producción de bioetanol a partir de microalgas, para viabilizar el proceso, debe considerarse algunos aspectos muy importantes tales como: condiciones de cultivo que permitan acumular la mayor cantidad de compuestos de interés (lípidos, carbohidratos, proteínas, pigmentos, etc.), en el pretratamiento reutilizar el agua de cultivo, utilizar solventes o catalizadores ecoamigables, (Velázquez *et al.*, 2018). “A nivel molecular, desarrollar enzimas más baratas y cepas industriales robustas que no solo puedan mejorar los rendimientos de producción sino también sostener los ambientes fisicoquímicos hostiles”, (Ho S-H. *et al.*, 2013).

2.2.3. LOS BIOCOMBUSTIBLES

2.2.3.1. Aspectos generales

“Los biocombustibles son producidos a partir de biomasa o residuos de materias primas, principalmente están destinados al transporte. La Agencia Internacional de Energía-IEA trabaja con los gobiernos y la industria para dar forma a un futuro energético seguro y sostenible para todos; liderando una nueva era de cooperación energética internacional”, (<https://www.iea.org>).

En nuestro país, (www.osinergmin.gob.pe, Ley N° 28054 de la Promoción del Mercado de Biocombustibles, Art. 2), se afirma *“los biocombustibles son productos químicos que tienen las características técnicas requeridas por la normativa y que son obtenidos de insumos agropecuarios, agroindustriales, entre otros”*.

La civilización humana viene utilizando, desde sus inicios, biocombustibles sólidos como la madera, el carbón, el estiércol de vaca, etc., para cocinar y calentar (Jimenez E. y Castillo, 2021; citando a Webb y Coates, 2012). Luego, con el transcurrir de la vida y evolución de la sociedad, aparecieron fuentes energéticas basadas en combustibles fósiles, y, los biocombustibles líquidos y gaseosos (Jimenez E. y Castillo, 2021; Basile y Dalena, 2019).

Los biocombustibles exhiben un enorme potencial como fuente de energía renovable y sostenible, respetuosos con el medio ambiente, ayudan a reducir las emisiones netas de los gases de efecto invernadero. Además, el uso de biomasa contribuye a la gestión de residuos y mitigar los problemas de seguridad energética. El beneficio ambiental general, dependerá en gran medida del tipo de materia prima utilizada para producirlos, (Das y Varanasi, 2019; Jimenez E. y Castillo, 2021).

La Asociación Mundial de Bioenergía WBA, (2019), expresa *“la bioenergía es la mayor fuente de energía renovable y representa más de 2/3 del suministro. La biomasa domina el sector industrial (en procesos combinados de calor y energía, CPH), y los sectores residencial, comercial, agrícola, etc. (en calefacción y cocina), representa aproximadamente el 95% del uso de energía renovable”*.

El bioetanol y el biodiesel son los dos biocombustibles con mayor presencia en la industria mundial, son mezclados con otros combustibles según las políticas regulatorias de cada país, (Vásquez *et al.*, 2017).

2.2.3.2. Tipos de Biocombustibles

Los biocombustibles provienen de fuentes renovables y son clasificados por fuente, tipo y generación. Los biocombustibles primarios son utilizados directamente para obtener energía y calor, o pueden transformarse en biocombustibles secundarios: etanol, biodiesel, biogás o carbón vegetal, (Jimenez E. y Castillo, 2021; Dalena *et al.*, 2019). Los biocombustibles son sólidos (leña, carbón vegetal, astillas y pellets de madera), líquidos (bioetanol, biodiésel, biocombustible de pirólisis) y gases (biogás, biohidrógeno y gas de síntesis), producido y usados intensamente durante los últimos años (Guo *et al.*, 2015; Basile & Dalena, 2019; Das y Varanasi, 2019).

Los biocombustibles, conceptualmente pueden clasificarse según: su origen, la naturaleza, el tipo de materia prima y por la tecnología de conversión de la biomasa; visualizar la Fig. 2.7. Los biocombustibles secundarios están subdivididos en cuatro generaciones; por Ruta tecnológica existen tres tipos de conversión: termoquímica (combustión, gasificación y pirólisis); química (biomasa en combustibles líquidos); y bioquímica (fermentación), (Das y Varanasi, 2019; Dalena *et al.*, 2019). Por tanto, la industria de biocombustibles y bioenergía dependen de la cantidad y calidad de la biomasa disponible, de la tecnología para generar el combustible, y de la capacidad de utilizarlo de manera eficiente y rentable, (Jimenez E. y Castillo).

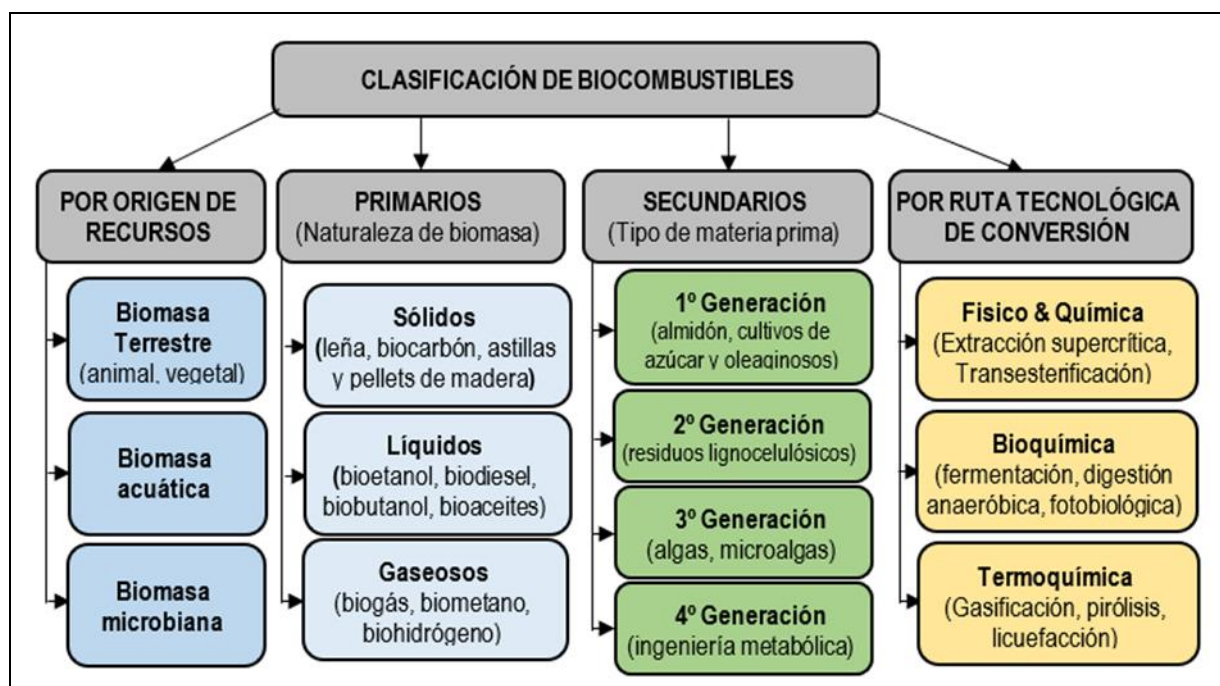


Figura 2.7. Esquema conceptual de la clasificación de los biocombustibles.

Ref.: Jimenez E. y Castillo, (2021); Das & Varanasi, (2019).

2.2.3.3. Biorrefinería, enfoque para la producción de biocombustibles

El concepto de biorrefinería es similar a las refinerías petroleras actuales que producen múltiples productos del petróleo crudo. La biorrefinería es especialmente atractiva para las comunidades rurales si todos los desechos generados se reciclan, (Devarapalli & Atiyeh, 2015). La producción de biocombustibles en un enfoque de biorrefinerías implica la integración de diferentes procesos de bioconversión para producir combustibles y productos químicos, ver Fig. 2.8, una posible solución para mejorar la economía del proceso (Velázquez *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2020). Por tanto; en el futuro desarrollo químico de las biorrefinerías, los métodos y técnicas utilizadas deben minimizar el impacto medioambiental, y los productos obtenidos sean ecológicos y sostenibles. “El uso de materia prima sostenible no es garantía suficiente para un futuro próspero de las nuevas generaciones”, (WBA-Asociación Mundial de Bioenergía, 2019; Préat *et al.*, 2020).

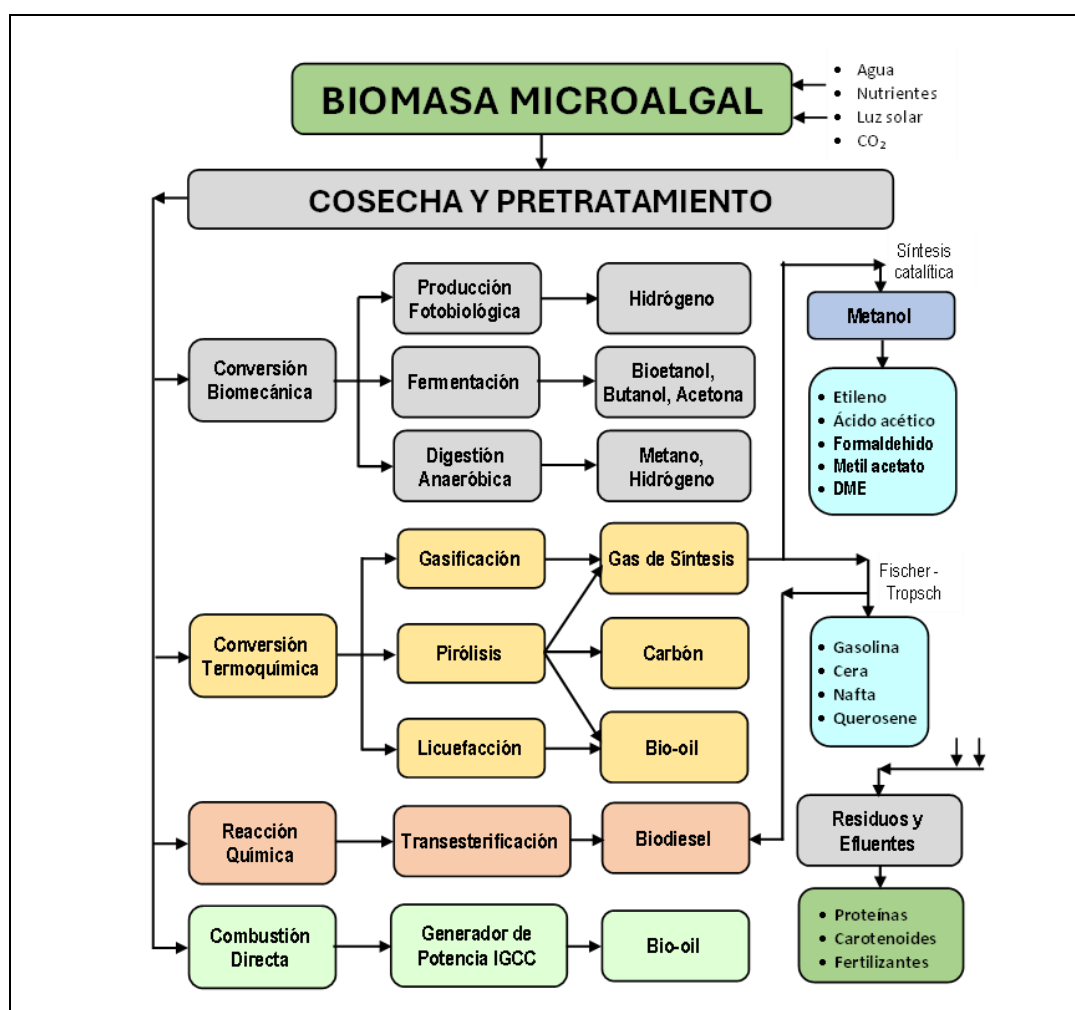


Figura 2.8. Procesos integrados en una biorrefinería para producir combustibles 3G y coproductos. Ref.: Velázquez *et al.*, (2018); Jimenez E. y Castillo, (2021).

2.2.4. MODELOS MATEMÁTICOS DE LA FENOMENOLOGÍA DEL PROCESO

Los modelos matemáticos, en el ámbito de microorganismos, han sido investigados y discutidos ampliamente en la literatura, desde modelos de crecimiento hasta los modelos cinéticos. Por tanto, en base a los fundamentos teóricos y metodológicos, son seleccionados y postulados los modelos matemáticos apropiados para evaluar la fenomenología del proceso para obtener bioetanol a partir de *P. cruentum*. Asimismo; mediante programas computacionales son realizados todos los cálculos requeridos, usando la data experimental adquirida a nivel de laboratorio, de las diferentes condiciones operacionales estipuladas en el Diseño Experimental.

2.2.4.1. Modelado matemático en la etapa del cultivo de microalgas

El crecimiento celular, en un cultivo de microorganismos, presenta cuatro fases definidas: fase de adaptación o latencia (lag), fase de crecimiento exponencial (log), la fase estacionaria, y la fase de muerte.

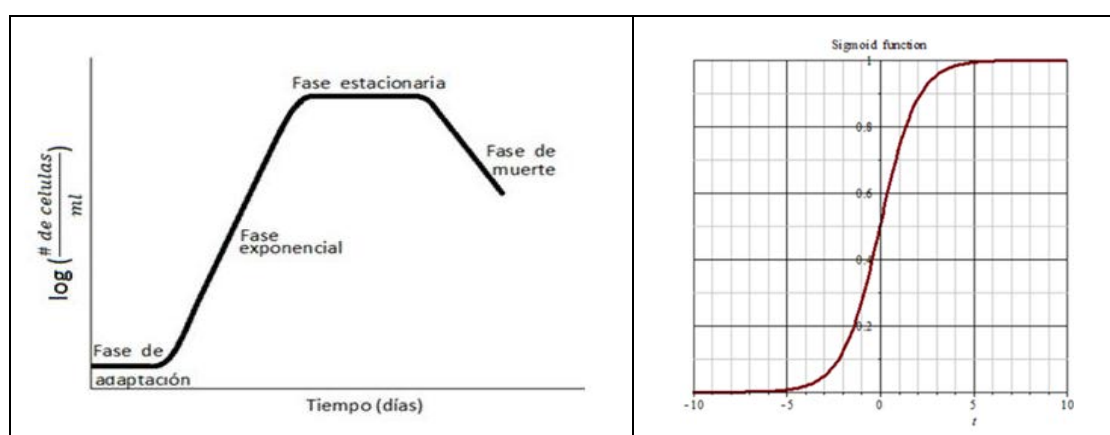


Figura 2.9. Curva de crecimiento de microorganismos, en la etapa de cultivo.

El conocimiento de cómo se multiplica una población celular en un cultivo de microorganismos es fundamental para el modelado, el **crecimiento celular es considerado como una reacción autocatalítica de primer orden**, expresado así:

$$\left(\frac{dN}{dt} \right) = \mu N \quad (2.1)$$

Siendo;

μ : velocidad específica de crecimiento celular; **N**: número de células en el cultivo (densidad celular; N° células/volumen); **t**: tiempo evaluativo del crecimiento.

Considerando μ **constante**, que sólo ocurre en la fase de crecimiento exponencial, la integración de la Ec. (2.1) queda como sigue:

$$\int_{N_0}^N \left(\frac{dN}{N} \right) = \mu \int_0^t dt \quad (2.2)$$

Evaluando entre los límites, finalmente se obtiene:

$$Y(t) = \ln(N_t / N_0) = \mu t \quad (2.3)$$

a) Modelos matemáticos para evaluar la función de crecimiento celular Y(t); la función completa de crecimiento celular tiene forma sigmoideal, ver Fig. 2.9, en la literatura diferentes modelos matemáticos poblacionales han sido propuestos y correlacionados para simular el crecimiento celular de microorganismos, en este estudio se considera evaluar los siguientes:

Modelos para evaluar función de crecimiento celular,

$$Y(t) = \log(N / N_0)$$

$$\textbf{Gompertz : } Y(t) = a \exp(b \exp(-c t))$$

$$\textbf{Gompertz - Makehan : } Y(t) = a (\exp(-\exp(b - c t)))$$

$$\textbf{Logístico : } Y(t) = \frac{a}{1 + b e^{-c t}} \quad (2.4)$$

$$\textbf{Monomolecular : } Y(t) = a (1 - b * \exp(-(b - c t)))$$

$$\textbf{Mitcherlich : } Y(t) = a - b * c t$$

b) Conteo celular de un cultivo; técnica directa y tradicional, visualiza un volumen predefinido de cultivo colocado en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) a través del microscopio, se cuentan las células utilizando un contador manual. Existen protocolos y fórmulas (Arredondo *et al.*, 2017), para este procedimiento:

$$N_b = \left(\frac{\sum C_b}{4} \right) F_D \cdot 10^4; \quad (\text{células / mL}) \quad (2.5)$$

Siendo;

N_b: número total de células; **C_b**: número de células por cada cuadrante de la cámara Neubauer; **F_D**: factor de dilución.

c) **Los parámetros cinéticos en el cultivo de microalgas**; datos experimentales obtenidos del conteo celular diario de un cultivo, son procesados para predecir la velocidad específica de un crecimiento celular y sus parámetros inherentes usando las correlaciones propuestas por Guillard (1973).

- **Velocidad de crecimiento μ** ; el modelo de Monod establece:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{k_s + S}; \quad \rightarrow \quad \left(\frac{\mu}{\mu_{\max}} \right) \approx 0.5 \quad (2.6)$$

Asimismo; la **velocidad específica de crecimiento celular**, en la fase de crecimiento exponencial, se deduce a partir de la Ec. (2.3) como sigue:

$$\mu = \frac{\ln(N_f / N_o)}{t_f - t_o} = \frac{\ln(N_f) - \ln(N_o)}{t_f - t_o} \quad (2.7)$$

donde;

N_o: Número inicial de células; **N_f**: Número final de células; **t_o**: tiempo inicial; **t_f**: tiempo final.

- **División celular, D**; es el número de divisiones que puede realizar una célula, en una unidad de tiempo.

$$D = \left(\frac{\mu}{\ln(2)} \right) \quad (2.8)$$

- **Tiempo de duplicación celular, TD**; tiempo requerido para que una célula se divida (o para que la población de un organismo se duplique en número).

$$TD = \left(\frac{\ln(2)}{\mu} \right) = \left(\frac{1}{D} \right) \quad (2.9)$$

- **Producción celular diaria, PD:** concentración celular producida por día:

$$PD = \left(\frac{C_{i+1} - C_i}{t_{i+1} - t_i} \right) \quad (2.10)$$

donde;

C_i : concentración celular en tiempo i -ésimo; t_i : tiempo i -ésimo.

2.2.4.2. Modelado matemático en la etapa de hidrólisis enzimática

Las **enzimas** han sido motivo de diferentes estudios (Adney y Baker, 1996; Agustini y Febrian, 2019; Bader A. *et al.*, 2020; Costa P., 2017; Fernandes de Souza *et al.*, 2020; Hernández D. *et al.*, 2015; Kim M-H. *et al.*, 2014; Shokrkar *et al.*, 2018; etc.), demostrando ser valiosas herramienta biotecnológicas y que tienen gran aplicación para facilitar la liberación de los componentes encerrados dentro de células.

En este estudio, es utilizado un cóctel de **enzimas Celulasa** derivados de *Trichoderma reesei*; inicialmente se evalúa la condiciones óptimas requeridas para alcanzar la máxima **Actividad enzimática**; posteriormente, con esta información se efectúa la **hidrólisis enzimática** de la biomasa microalgal de *Porphyridium cruentum* para liberar los carbohidratos (como azúcares reductores) contenidos en la pared celular y estructura intracelular. Finalmente, el hidrolizado enzimático es llevado a **fermentación** con levadura para obtener el bioetanol correspondiente.

Según la literatura citada, los procedimientos enzimáticos siguen similares métodos experimentales y de cálculos. Así tenemos:

- **Método de linealidad**; es utilizado para evaluar el rango de linealidad (Adney y Baker, 1996) de la enzima *Celulasa* y su correspondiente **Actividad**.

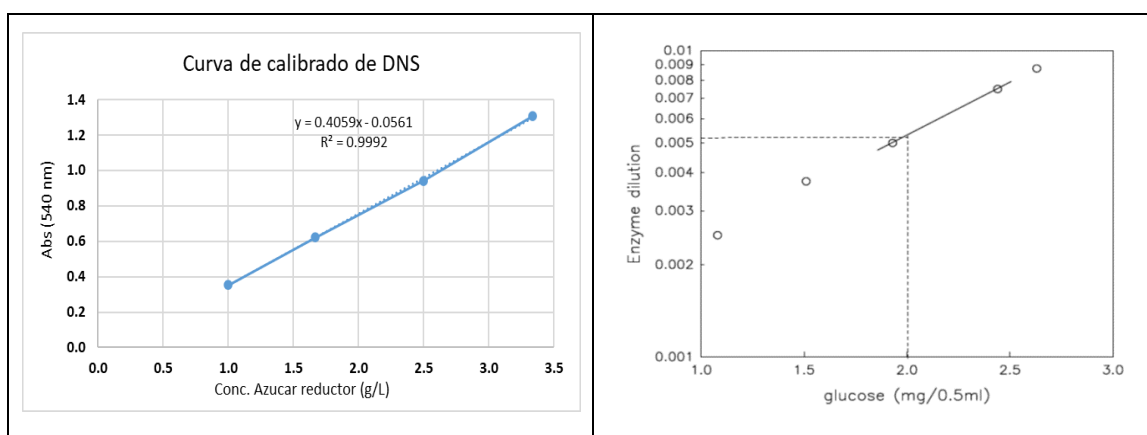


Figura 2.10. Gráficas de linealización: (a) patrón de calibrado, (b) concentración de azúcar.

- **Actividad enzimática;** según Adney y Baker (1996), es calculado mediante:

$$FPU = \frac{0.37}{[enzyme]_{releasing \ 2.0 \ mg \ glucose}}; \quad (units / mL) \quad (2.11)$$

- **Rendimiento de la hidrólisis;** Shokrkar *et al.* (2018), y Fernandes de Souza *et al.* (2020), establecen que puede calcularse mediante:

$$Glucosa_{rendimiento} = \frac{Glucosa_{extraída} (g)}{Carbohidrato_{total, \ en \ algas} (g)} \times 100; \quad (\%) \quad (2.12a)$$

$$Glucosa_{rendimiento} = \frac{([Glucosa]_{final} - [Glucosa]_{inicial}) V_{líquido}}{Masa_{total} * [sólidos] * F_{glucosa}} \times 100; \quad (\%)$$

$$V_{líquido} = \frac{(Masa_{total} - Masa_{sólidos})}{\rho_{agua}}; \quad (L) \quad (2.12b)$$

$$Masa_{total} = Masa_{sólidos} + Masa_{enzimas} + Masa_{buffer}; \quad (g)$$

$$Productividad = \frac{[Glucosa]_{final} (g/L)}{tiempo_{reacciones} (h)} \times 100; \quad (g/L-h) \quad (2.14)$$

$$Etanol_{rendimiento} = \frac{Etanol_{producido} (g)}{Glucosa_{Extraída, \ de \ algas} (g)} \times 100; \quad (\%) \quad (2.13)$$

donde;

[Glucosa]: concentración de glucosa, en hidrólisis, (g/L);

[sólidos]: concentración, en la carga, (%);

F_{glucosa}: fracción másica inicial de glucosa, (g-glucosa/g-biomasa)

MARCO METODOLÓGICO

El presente estudio desarrolla un método operacional orientado a optimizar un proceso biotecnológico para producir bioetanol a partir de biomasa microalgal de *P. cruentum*; el cual incluye evaluar las diversas etapas del proceso, desde el cultivo de la cepa, el pretratamiento de la biomasa cosechada, la hidrólisis de la biomasa, la fermentación de azúcares para obtener bioetanol 3G.

3.1. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.1 Hipótesis general

Mediante una estrategia de optimización para las condiciones controlables de cultivo e hidrólisis enzimática de la biomasa, de la microalga *Porphyridium cruentum*, es posible determinar las condiciones operacionales más adecuadas para la producción de bioetanol de tercera generación.

3.1.2 Hipótesis específicas

- Las microalgas *Porphyridium cruentum*, pueden cultivarse adecuadamente en un ambiente terrestre controlado.
- En condiciones operacionales óptimas, la hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal de *Porphyridium cruentum*, permite obtener azúcares fermentables.
- Las condiciones apropiadas para la fermentación de la biomasa algal hidrolizada, puede estandarizarse utilizando una levadura comercial conocida.
- La caracterización del bioetanol de tercera generación puede determinarse con las normas técnicas referenciadas en la literatura.

- Es posible interpretar la fenomenología evolutiva del proceso, mediante el modelado matemático del crecimiento de las microalgas en la etapa de cultivo, en la etapa de la hidrólisis enzimática y la etapa de fermentación, relacionando la interacción de los diversos parámetros y variables operacionales.
- Los resultados del estudio sentarán las bases tecnológicas para proponer la elaboración del diseño de una planta piloto agroindustrial, con enfoque de biorrefinería, que utilice la microalga *Porphyridium cruentum*.

3.2. VARIABLES E INDICADORES DE LA INVESTIGACIÓN

3.2.1. Definición de variables

Tabla 3.1. Definición de variables

VARIABLES	Etapa I Cultivo de microalgas	Etapa II Hidrólisis enzimática de biomasa microalgal
Independientes	Iluminación, agitación con burbujeo aire, dosificación de carbono orgánico.	temperatura, concentración del sustrato, y la concentración de enzima
Dependientes	Crecimiento celular, Productividad de biomasa	tiempo de reacción, hidrolizado enzimático, masa de carbohidratos liberados (azúcares reductores).
Intervinientes	Medio nutricional, temperatura, pH, salinidad	Biomasa algal seca, buffer citrato sódico.

3.2.2. Definición operacional e Indicadores

Tabla 3.2. Operacionalización de variables e Indicadores

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	PARÁMETROS	INSTRUMENTO
➤ microalga	Disponibilidad	<ul style="list-style-type: none"> • Calidad • Cantidad 	✓ Propiedades biológicas	
➤ Biomasa algal	Grado de pureza	• Logro de objetivos	✓ Rendimiento	Normas Técnicas y Manual de procedimientos
➤ Bioetanol		• Trabajo aplicable	✓ Tiempo operacional	
➤ Tecnología operacional	Organización	• Factibilidad Técnico	✓ Tecnología apropiada	
	Eficacia	Económico		

3.3. MÉTODOS DE LA INVESTIGACIÓN

En concordancia con los lineamientos Metodológicos de la Investigación Científica, (Hernández-Sampieri y Mendoza, 2018), el **objeto de estudio** es de naturaleza científico-experimental, integra métodos cualitativo y cuantitativo, debido a las características fenomenológicas y operacionales del proceso. Estos métodos permiten observar, recolectar y procesar datos, formular y responder preguntas para comprobar la Hipótesis. Mediante un análisis riguroso, y sistemático, de los resultados llegar a conclusiones para poder explicar el comportamiento de las variables del objeto de estudio. Además, generar y ampliar el conocimiento y fortalecer la teoría planteada. Para tal efecto, se ha efectuado una selección y análisis crítico de literatura publicada, para conocer el estado del arte, conjugando los principios teóricos y experimentales del estudio.

3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El diseño estadístico experimental contempla una amplia variedad de estrategias necesarias para generar la información óptima que se busca del objeto de estudio. En este estudio se determinan los valores óptimos de los parámetros operacionales, tanto para el cultivo microalgal, la hidrólisis de su biomasa y en la fermentación de los azúcares producidos. Por tanto; para el Diseño Experimental y la Optimización con método de Superficie de respuesta, se utiliza el software estadístico Minitab.

3.4.1. Factores y dominio experimental en el cultivo de microalgas

En la Tabla 3.3 se muestran los factores seleccionados y su dominio experimental, con sus valores máximo y mínimo, aplicados en la evaluación de las variables operacionales del cultivo microalgal de *P. cruentum* en un ambiente controlado.

Tabla 3.3. Factores y dominio experimental en el cultivo de microalgas.

FACTORES	DOMINIO EXPERIMENTAL		REFERENCIA
	Nivel (-1)	Nivel (+1)	
X ₁ : Iluminación (watt)	10	32	Friedman <i>et al.</i> (1991); Kim, <i>et al.</i> (2017); Agustini y Febrian, (2019)
X ₂ : Flujo de aire (LPM)	0,5	1,5	Reboloso <i>et al.</i> (2000); Kim, <i>et al.</i> (2017).
X ₃ Dosificación C (g/L)	0,0	0,5	Andreeva <i>et al.</i> (2020); Kim, <i>et al.</i> (2017)

3.4.2. Diseño experimental codificado en el cultivo de microalgas

El Diseño Experimental Central Compuesto es utilizado en la planificación del procedimiento experimental, en la etapa de cultivo de la microalga *P. cruentum*. Los factores de evaluación son mostrados en la Tabla 3.4, variables codificadas y decodificadas, distribuidos con software Minitab. Las variables operacionales ambientales no controlables (pH, Temperatura, salinidad) se mantienen constantes dentro de los valores recomendados en la literatura, (Wang *et al.*, 2007; IMARPE, 2011; Kim H. *et al.*, 2017; Shokrkar *et al.*, 2018). Fueron evaluados volúmenes de 200, 500 y 1000 mL, cada tratamiento se hizo por duplicado.

Tabla 3.4. Diseño Experimental Central Compuesto, en la evaluación del cultivo de microalga *Porphyridium cruentum*.

Tto Nº	Variables codificadas			Variables decodificadas		
	x_1	x_2	x_3	Iluminación (Watt)	Flujo de aire (LPM)	Dosificación C (g/L)
1	1	1	1	32.00	1.50	0.50
2	0	0	0	21.00	1.00	0.25
3	0	α	0	21.00	1.84	0.25
4	-1	-1	1	10.00	0.50	0.50
5	α	0	0	39.50	1.00	0.25
6	1	1	-1	32.00	1.50	0.00
7	0	0	0	21.00	1.00	0.25
8	-1	1	1	10.00	1.50	0.50
9	0	0	$-\alpha$	21.00	1.00	-0.17
10	$-\alpha$	0	0	2.50	1.00	0.25
11	-1	1	-1	10.00	1.50	0.00
12	0	0	0	21.00	1.00	0.25
13	0	0	α	21.00	1.00	0.67
14	0	0	0	21.00	1.00	0.25
15	1	-1	-1	32.00	0.50	0.00
16	1	-1	1	32.00	0.50	0.50
17	-1	-1	-1	10.00	0.50	0.00
18	0	$-\alpha$	0	21.00	0.16	0.25
19	0	0	0	21.00	1.00	0.25
20	0	0	0	21.00	1.00	0.25
	$\alpha = 1.68179$					

3.4.3. Factores y dominio experimental en la hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal

Los factores, en su dominio experimental con valores máximo y mínimo, requeridos para evaluar las condiciones óptimas en la hidrólisis enzimática son mostrados en la Tabla 3.5, según se indica:

Tabla 3.5. Factores y dominio experimental en la hidrólisis enzimática de biomasa microalgal.

FACTORES	DOMINIO EXPERIMENTAL		REFERENCIA
	Nivel (-1)	Nivel (+1)	
X ₁ : Temperatura (°C)	40	60	Kim, <i>et al.</i> (2017); Shokrkar (2018)
X ₂ : concentración de enzima (dilución)	1:400	1:200	Kim, <i>et al.</i> (2017); Shokrkar (2018)
X ₃ : concentración de sustrato (g/100 mL)	1	5	Kim, <i>et al.</i> (2017); Shokrkar (2018)

3.4.4. Diseño experimental codificado en la hidrólisis enzimática de biomasa

En la Tabla 3.6 son mostrados los factores, codificados y decodificados, según diseño Factorial elaborado con software Minitab, utilizados para evaluar las condiciones operacionales óptimas de la hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal de *P. cruentum*.

Tabla 3.6. Diseño experimental Factorial, en la evaluación de la hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal.

Tto Nº	Variables codificadas			Variables decodificadas		
	X ₁	X ₂	X ₃	Temperatura (°C)	Concentración de sustrato (g/100 mL)	Concentración de enzima (dilución)
1	-1	-1	-1	40	1	1:400
2	-1	-1	+1	40	1	1:200
3	-1	+1	-1	40	5	1:400
4	-1	+1	+1	40	5	1:200
5	+1	-1	-1	60	1	1:400
6	+1	-1	+1	60	1	1:200
7	+1	+1	-1	60	5	1:400
8	+1	+1	+1	60	5	1:200

3.5. POBLACIÓN Y MUESTRA

- ✓ **Población**, densidad poblacional celular obtenida mediante el cultivo controlado de la cepa *P. cruentum*.
- ✓ **Muestra**, cantidad de biomasa microalgal cultivada necesaria para realizar el estudio, según diseño experimental establecido, seleccionadas aleatoriamente para evitar el sesgo y reducir la incertidumbre.

3.6. ACTIVIDADES DEL PROCESO INVESTIGATIVO

El trabajo experimental fue ejecutado en la Universidad Nacional del Santa. El **cultivo de microalgas *Porphyridium cruentum*** fue realizado en el Laboratorio de Recursos Acuáticos y Cultivo de Especies Auxiliares de la Facultad de Ciencias; mientras que la **hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal y fermentación del hidrolizado** se realizó en el Laboratorio de Química Orgánica y Bioprocesos de la Facultad de Ingeniería. Asimismo; para el soporte analítico se requirió los servicios del Instituto de Investigación de Tecnologías Agroindustriales IITA-UNS.

3.6.1. Procedimiento experimental

La Fig. 3.1 muestra el flujograma del procedimiento experimental, proceso biotecnológico para producir bioetanol a de nivel laboratorio.

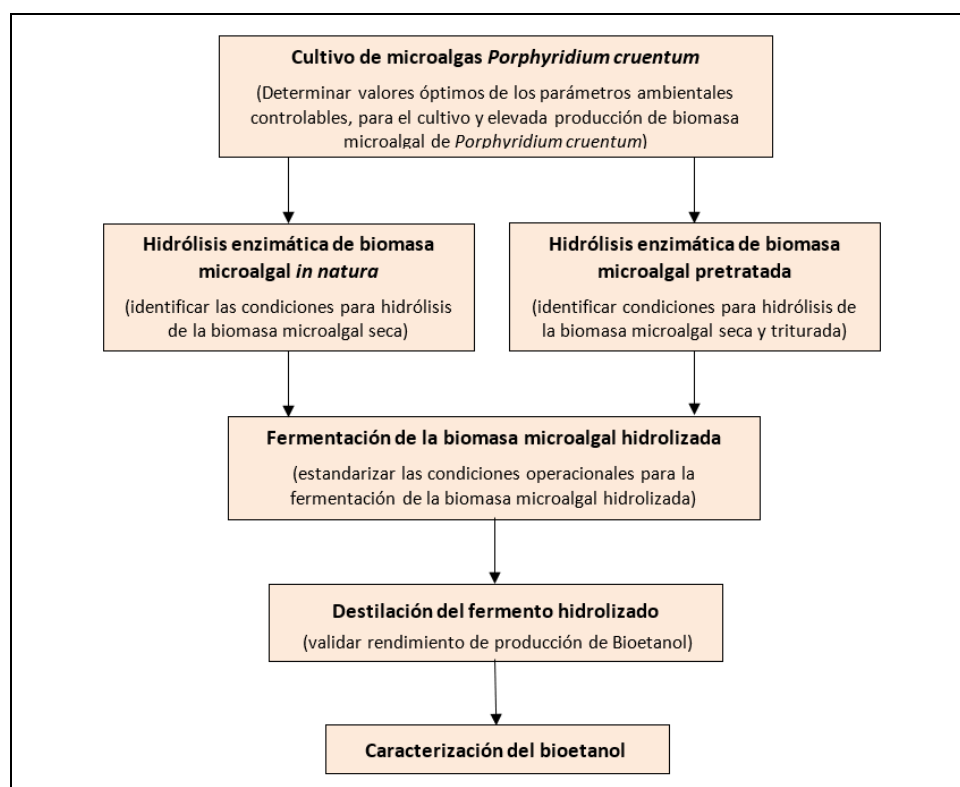


Figura 3.1. Flujograma para el procedimiento del trabajo experimental.

3.6.2. Cultivo de microalga *Porphyridium cruentum*.

3.6.2.1 La cepa microalgal; la microalga *Porphyridium cruentum*, empleada en el estudio, fue adquirida del Institute Algae Research Supply USA, ver Fig. A.3; esta cepa para su buena conservación y desarrollo es mantenida en un medio de cultivo sólido de Agar-Agar 3%, ver Fig. A.5. Asimismo; su crecimiento en pequeña escala para mantener su vitalidad y ser utilizado como inóculo, es realizado en un medio nutricional compuesto por agua marina esterilizada y nutriente F/2 de Guillard y Ryther (1962, 1975; ver en anexos Tabla A.15), en relación (1mL nutriente/1000 mL agua).

3.6.2.2 Condiciones del cultivo microalgal; las condiciones de seguridad, buenas prácticas de laboratorio y salubridad están sujetos a los protocolos establecidos en la literatura (IMARPE, 2011; Arredondo *et al.*, 2017).

En el cultivo, la cepa de *P. cruentum* es inoculada en un medio nutricional (agua marina esterilizada y nutriente F/2 de Guillard y Ryther) a temperatura ambiente de 20-25 °C, pH 6.5-8.5 (Kim, *et al.*, 2017) y fotoperiodo de luz continua con iluminación LED color blanco. En general, para el cultivo de microalgas son utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL, que contiene 100 mL de inóculo y 100 mL de medio nutricional, a diferentes condiciones ambientales controlables (iluminación, flujo de aire, adición de C orgánico), según diseño experimental establecido (Tabla 3.4).

El sistema de iluminación consiste en fluorescentes LED color blanco, la potencia eléctrica y lux es regulado por el número de elementos que se requiera implementar, para cada rango del trabajo experimental.

El flujo de aire, suministrado por un ventilador mecánico que absorbe del medio ambiente, es distribuido a los recipientes de cultivo, sirve como transportador del CO₂ y también como medio de agitación para evitar la sedimentación del cultivo.

La adición de Carbono orgánico, como suplemento nutricional, es para aprovechar su potencial de inducción y lograr mayor acumulación de carbohidratos en las microalgas *P. cruentum*; para tal efecto se utiliza glucosa (fuente de carbono orgánico) como suplemento del nutriente F/2

en un rango experimental 0-0.5 g/L, conforme está estipulado en el Diseño experimental, Tablas 3.3 y 3.4.

El dióxido de carbono CO₂, contenido en aire burbujeante en el cultivo, es fijado por las microalgas y acumulado principalmente en forma de carbohidratos, (Shokrkar H. *et al.*, 2017). *“Para la producción económica de bioetanol a partir de microalgas se requiere un contenido de carbohidratos suficiente y una cosecha de biomasa eficiente. Muchos estudios han informado sobre el aumento del contenido de carbohidratos a través del control de los nutrientes, así como de los métodos de cosecha para reducir los costos y el consumo de energía. En uno de estos estudios, la suplementación con bicarbonato para microalgas aumentó la biomasa y el contenido bioquímico”*, (Kim M-H. *et al.*, 2017). Andreeva *et al.*, (2021), hicieron estudios con tres especies de microalgas (*Arthrospira platensis* Gomont, *Chlorella vulgaris* Beijer y *Dunaliella salina* Teod) con la finalidad de controlar la acumulación de carbohidratos y determinar su potencial para producir biocombustibles. Utilizaron azúcares (fructosa, sacarosa, maltosa y glucosa) como fuentes de carbono orgánico y complemento del medio nutritivo, evaluando un rango de 0,05 – 5,0 (g/L).

“Los resultados experimentales muestran que la concentración de biomasa microalgal aumenta a medida que la adición de Carbono orgánico, al cultivo, se incrementa”, (Shokrkar H. *et al.*, 2018; Andreeva *et al.*, 2021).

3.6.2.3 Dinámica del crecimiento celular; desde inicio de cultivo y cada 24 horas, se efectúa medición directa de variables controlables (iluminación, flujo de aire, adición de C orgánico) y variables ambientales (Temperatura, pH, salinidad). Asimismo; se toma muestras de 5 mL de cada cultivo, una pequeña alícuota es para efectuar el conteo de la densidad celular; en una cámara de Neubauer bajo microscopio electrónico, y la porción excedente es utilizado para efectuar lecturas de su densidad óptica (Absorbancia a 640 nm) en espectrofotómetro. Esta etapa del cultivo tiene una duración de seis a diez días, dependiendo del diseño experimental, hasta llegar a la cosecha de la biomasa que debe centrifugarse durante 10 min a 4000 rpm (Kim, *et al.*, 2017), el precipitado es guardado para evaluar el **peso seco**. Estos procedimientos siguen los protocolos de Arredondo *et al.* (2017).

3.6.3. Hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal

3.6.3.1 Caracterización enzimática de la Celulasa; medición de la actividad enzimática aplicando método de Adney & Baker (1996); que se rige por las pautas establecidas de la IUPAC, diseñado para medir la actividad celulasa en términos de "**unidades de papel de filtro**" (FPU) por mililitro de solución enzimática original (sin diluir); se determinaron las condiciones ambientales óptimas para obtener la **máxima Actividad de la Celulasa**.

3.6.3.2 Hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal; se estudiaron las condiciones operacionales óptimas necesarias y obtener mayor cantidad de hidrolizado de la biomasa microalgal de *Porphyridium cruentum*. Este proceso de hidrólisis enzimática es realizado por acción del complejo enzimático *Celulasa*, que actúa sobre la biomasa microalgal seca en su forma *in natura* (sólo seca) y también pretratada (seca y molida). Las condiciones del cóctel enzimático (dilución máxima y mínima), temperatura, pH, velocidad de agitación; son los valores óptimos establecidos en la evaluación de su *Actividad enzimática*, ejecutado previamente.

Las metodologías de hidrólisis enzimática desarrolladas por Shokrkar *et al.* (2018) y Kim *et al.* (2017), fueron adaptadas para este proceso. Es decir, descripción breve y concisa, biomasa microalgal seca (en escamas y molida, separadamente) con una concentración 5g/L en un tampón de citrato de sodio, pH 4.5 – 5.0, es adicionada en un Erlenmeyer. Estas muestras son esterilizadas a 120 °C durante 15 min; luego es mezclada con 15 mL de enzima *Celulosa* (con diluciones 1:10, 1:15, 1:20; obtenidas desde la solución patrón óptima 1:20 de celulasa) en un matraz Erlenmeyer de 150 mL; para un volumen total de trabajo de 50 mL, por cada muestra. Estos matraces Erlenmeyer, fueron incubados en un agitador Shaker a 150 rpm y 50°C durante un periodo de tiempo 9-12 horas continuas. Las muestras de análisis, 1 mL, se tomaron en diferentes tiempos de reacción, luego centrifugados y el sobrenadante recogido para verificar los carbohidratos liberados (azúcares reductores) que son medidos con el método de Miller (1959), usando reactivo DNS, empleando glucosa como estándar. La absorbancia, densidad óptica, se determina a 540 nm mediante un espectrofotómetro.

3.6.4. Fermentación del hidrolizado, de la biomasa microalgal

El hidrolizado enzimático de biomasa microalgal de *P. cruentum*, conteniendo azúcares liberados por acción de la *Celulasa*, es fermentada por la levadura *S. stipitis* (*pichia stipitis*), verificándose la existencia de bioetanol producido, analizado mediante cromatografía de gases.

Para la fermentación del hidrolizado microalgal, metodologías propuestas en la literatura (Castillo A., 1994; Costa *et al.*, 2014; Shokrkar *et al.*, 2017), son adaptadas para este proceso. En primer lugar, las células de levadura *S. Stipitis* es colocada como pre-inóculo dentro de un matraz de 250 mL que contiene 50 mL de un medio de activación (Castillo, 1994), e incubadas dentro de un Shaker con agitación de 200 rpm y a 28 °C, durante 12 horas, para activar la levadura (Costa *et al.*, 2014), es un crecimiento aeróbico. Posteriormente, se inocula la levadura activada (2% aprox.) al medio de fermentación que contiene el hidrolizado enzimático microalgal y de una concentración definida. En la fermentación aeróbica, se utiliza Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio fermentativo, incubado en shaker con agitación 150-200 rpm y a 28-30 °C, se regula el pH a 6,5 que es un valor adecuado para la producción de bioetanol. Luego, muestras de 1 mL son retiradas en los tiempos de 0h, 2h, 4h, 6h, 8h 10h y 12 horas de fermentación, para evaluación de su Densidad Óptica (a 540 nm en espectrofotómetro) y verificar velocidad de crecimiento específica para cada cultivo. Finalmente, las muestras son centrifugadas, el sobrenadante es reservado para analizar el consumo de azúcar del cultivo, y la cantidad producida de bioetanol es por cromatografía de gases. El precipitado es reservado para cuantificación del peso seco.

3.6.5. Escalamiento del proceso

Aplicado en la etapa del cultivo microalgal, para cuantificar la velocidad de crecimiento de la biomasa. En el primer escalamiento, inicial, se trabaja con volúmenes de 100 mL de medio y 100 mL de inóculo, en matraz Erlenmeyer de 250 mL, circulando aire atmosférico como medio de agitación. El segundo escalamiento, manteniendo la misma relación, es realizado con volúmenes de 250 mL de medio y 250 mL de inóculo, en recipientes de plástico de 1 L. El tercer escalamiento utiliza relación volumétrica análoga, 500 mL de medio

y 500 mL de inóculo, en recipientes de plástico de 3 L, con ambiente más controlado en términos de pH, luminosidad, temperatura y velocidad del aire atmosférico burbujeante. Los niveles de reproducción alcanzados permiten generar datos previsibles, pueden considerarse para un futuro escalamiento industrial, al cual deben concatenarse la evaluación técnico-económica.

3.6.6. Identificación cualitativa y cuantitativa de los productos obtenidos

Los productos obtenidos en las diferentes etapas del proceso (cultivo, hidrólisis, fermentación) fueron caracterizados mediante análisis proximal e instrumental, siguiendo las Normas establecidas. Este trabajo analítico fue realizado en el Laboratorio de Química orgánica, y complementado con los servicios del Instituto de Investigación y Tecnologías Agroindustriales UNS;

3.7. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

Las técnicas, instrumentos, indicadores y procedimientos, empleadas en el estudio, organizadamente están descritos en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Organización de las técnicas e instrumentos para la investigación

TÉCNICA	INSTRUMENTO	INDICADOR	PROCEDIMIENTOS
Revisión Documental	Ficha resumen. Matriz de categorías	Registro de información, académica y tecnológica. Estado del Arte.	Elaborar instrumentos para registrar datos de Revisión Sistemática de Literatura.
Observación	Guía de observación Lista de Cotejo Escala observación	Estado físico y equipamiento material, del lugar asignado para trabajo experimental. Antes, durante y después, de trabajos.	Elaborar instrumentos para registros de datos visuales, (fotos y videos) Elaborar formatos para registros de evaluación física.
	Ficha de registro.	Condiciones en las que se desarrolla el trabajo experimental.	
Experimentación	Ficha de registro de la información.	Registro de valores paramétricos operacionales, según el diseño experimental formulado y el procedimiento metodológico.	Elaborar formatos técnicos, para registrar datos, cualitativos.
		Instrumentos técnicos utilizados.	Elaborar formatos técnicos, para registrar datos, cuantitativos.
	Ficha de registro de la información.	Registro de resultados, análisis de la caracterización cualitativo-cuantitativo de los diferentes productos obtenidos.	Elaborar formatos para registros de eventos imprevistos.

Ref.: Hernández-Sampieri y Mendoza, (2018); Jimenez-Escobedo, (2019).

3.8. PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

En la recolección de datos, es necesario y fundamental, seguir un procedimiento que consta de lo siguiente: **clasificación, registro, tabulación y codificación**. Para tal efecto; en la adquisición de la data experimental se utilizan diversos instrumentos digitales, equipos de laboratorio con la instrumentación confiable. Es decir, estos datos deben ser confiables, validados para su registro y almacenados en un ordenador portátil para su uso en los cálculos pertinentes.

3.9. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos recolectados son analizados, procesados y los resultados evaluados con indicadores; siguiendo las técnicas y procedimientos descritos en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Organización de las técnicas de procesamiento y análisis de los datos

RUBRO	TÉCNICA	INDICADOR	PROCEDIMIENTOS
PROCESAMIENTO DE DATOS	Recolección de Datos	Plan detallado de procedimientos para recolectar datos Inventario de datos adquiridos	Clasificar, ordenar y codificar los datos recolectados. Validar su registro, garantizando confiabilidad de la información.
	Procesamiento de la Información	Data experimental, recolectada, y evaluada Modelos matemáticos, relacionados con la fenomenología bajo estudio.	Aplicar técnicas de cálculos estadísticos, matemática analítica, técnicas numéricas, gráfica, etc. Utilizar software aplicativo apropiados; según sea el caso.
	Presentación y Publicación de Resultados	Reporte documentado. Tablas numéricas, lógicas. Gráficas: 2D y 3D, circulares, barras,	Elaborar los instrumentos de información, legible, y entendible por parte del grupo académico interesado en el estudio. Validar la información presentada, garantizando confiabilidad de la información
ANÁLISIS DE DATOS	Análisis Descriptivo	Análisis Lógico-Matemáticas, de los modelos matemáticos y correlaciones.	Interpretar las relaciones entre las variables y los datos. Establecer el grado de generalizar los resultados de la investigación.
	Análisis Estadístico	Evaluación de hipótesis Niveles de medición de variables	Describir estadísticamente, el tratamiento de los datos. Validar o rechazar hipótesis

Ref.: Hernández-Sampieri y Mendoza, (2018); Jimenez-Escobedo, (2019).

Capítulo IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente capítulo proporciona los resultados de la investigación, experimentales y los calculados con modelos matemáticos, son reportados como Tablas y Figuras. A continuación, de cada resultado presentado, estos son interpretados y discutidos, considerando los fundamentos teóricos e información de la literatura especializada.

4.1 EVALUACIÓN DEL CULTIVO MICROALGAL DE *Porphyridium cruentum*

4.1.1 Caracterización micrográfica de microalga *Porphyridium cruentum*

Utilizando un microscopio electrónico MOTIC, y cámara fotográfica, se obtienen micrografías que revelan el aumento de la densidad poblacional durante el conteo celular diario, evaluación cada 24h, del cultivo microalgal *Porphyridium cruentum*.

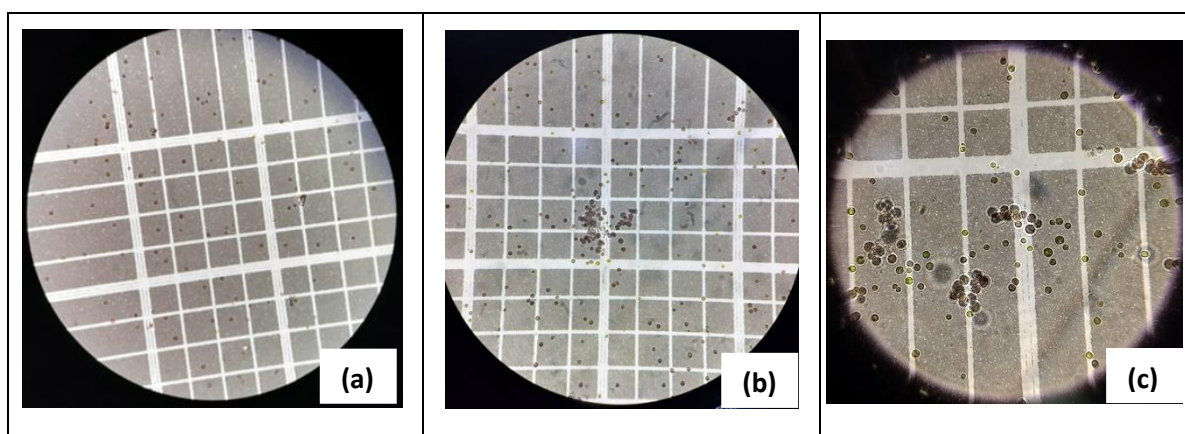


Figura 4.1. Micrografías x40 de la evolución de la densidad poblacional en el cultivo de microalgas *P. cruentum*: (a) día inicial; (b) después de 48 horas; (c) foto ampliada, x100.

Ref.: fotos de autor, obtenidos en el laboratorio de Cultivo de Especies Auxiliares de la UNS.

La Fig.4.1a es una imagen del día cero, observándose densidad poblacional mínima. La Fig. 4.1b es la densidad celular en el cultivo después de 48 horas. La Fig. 4.1c foto ampliada x100, muestra la típica estructura semicolonial que tienden a formar las microalgas *Porphyridium cruentum*, al reproducirse poblacionalmente.

4.1.2 Caracterización del crecimiento poblacional de *Porphyridium cruentum*

Los resultados más relevantes del crecimiento poblacional de un cultivo microalgal de *P. cruentum*, en condiciones ambientales controladas, son mostrados en esta sección. En la sección Anexos están descritos los aspectos técnicos operacionales (secciones A.2.1 – A.2.3), data experimental adquirida a nivel de laboratorio y los cálculos correspondientes (secciones A.3.1 y A.3.2).

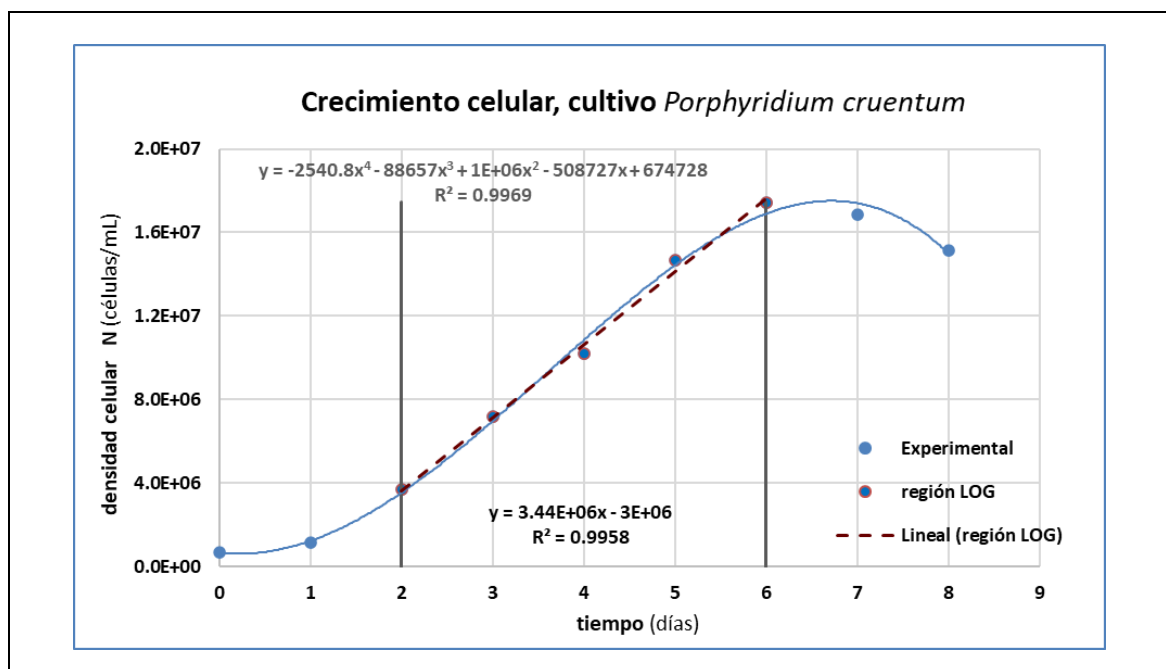


Figura 4.2. Perfil evolutivo del crecimiento celular, en cultivo de microalgas *P. cruentum*, para condiciones ambientales controladas.

En la Fig. 4.2 se muestra el perfil típico sigmoideal del crecimiento poblacional de un cultivo de microorganismos; específicamente para la microalga *P. cruentum*. Puede observarse las Fases características: Fase de latencia (lag, días 0-2), Fase exponencial (log, días 2-6), Fase estacionaria (días 6-7) y finalmente la Fase de muerte (a partir del día-7). El cultivo inicia con una población $N_0 = 6.8E05$ células/mL y alcanza una máxima concentración $N_{Max} = 1.743E07$ células/mL en el día-6, con velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.3885$ días⁻¹ y una productividad diaria **PD** = 3.44E06 células/mL-día. El valor de la pendiente de Fig. 4.2 representa la Productividad diaria. Asimismo; la pendiente de Fig. 4.3b representa la velocidad específica de crecimiento constante. Los datos experimentales son correlacionados con un polinomio de 4º orden para mejor visualización gráfica, ref. Tabla A.2.

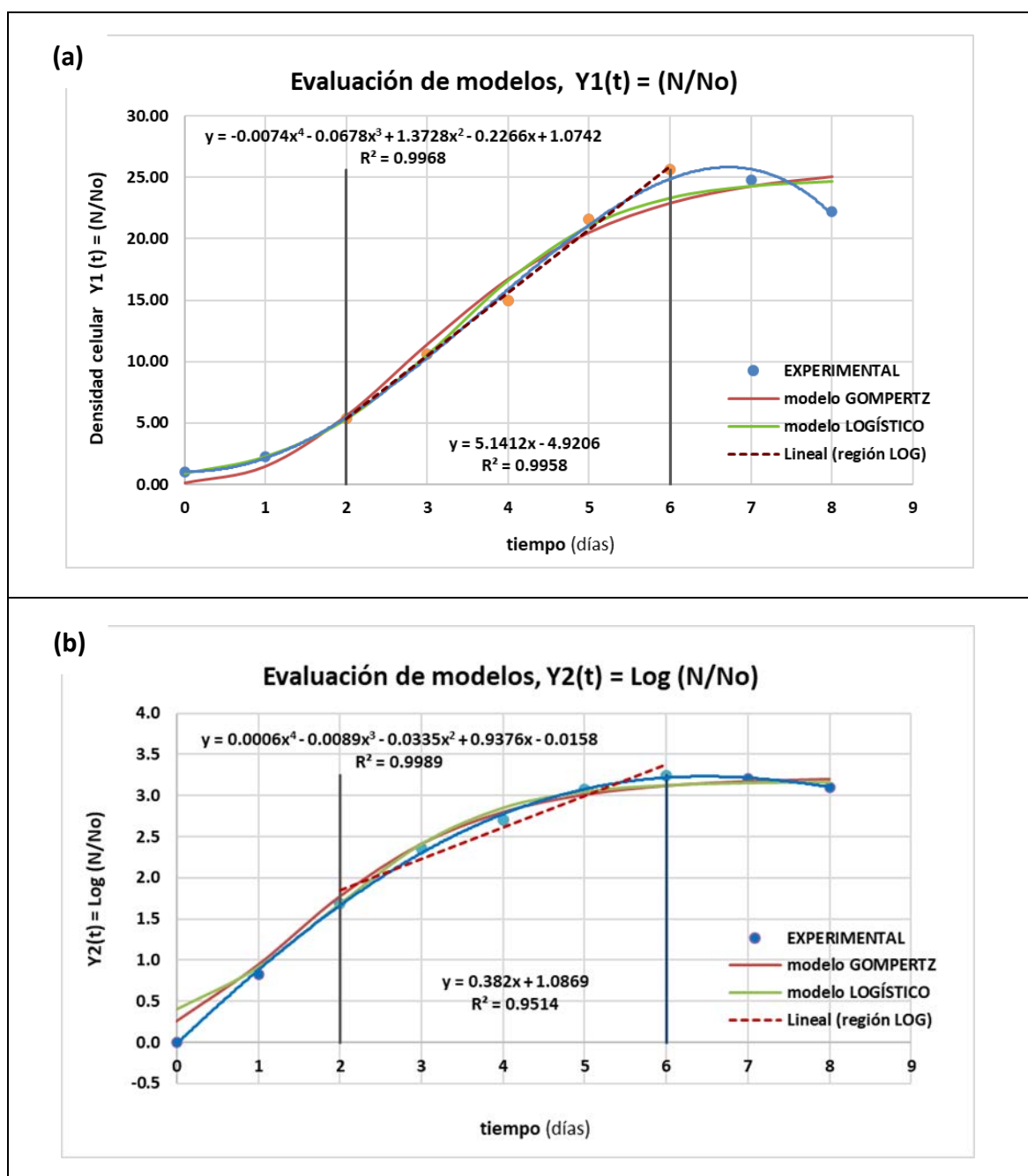


Figura 4.3. Modelos de crecimiento poblacional, de Gompertz-Makeham y Logístico, aplicados al cultivo de microalgas *P. cruentum*.

La data experimental del cultivo de microalgas *P. cruentum*, ver Tabla A.3, fue correlacionada con modelos de crecimiento poblacional de Gompertz-Makeham y Logístico, Fig. 4.3. Estos modelos matemáticos, con sus ventajas y desventajas, son utilizados como métodos predictivos cuando los microorganismos son sujetos al control de su crecimiento a diferentes condiciones, con limitaciones de recursos materiales y/o en medios ambientales variables, de manera efectiva.

Los coeficientes de los modelos matemáticos de crecimiento poblacional son deducidos mediante técnicas de Optimización de la función objetivo siguiente:

$$\min Z = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i^{\text{exp}} - Y_i^{\text{modelo}})^2}}{N_d - N_p}; \quad (\text{Nd: N}^\circ \text{ datos, Np: N}^\circ \text{ parámetros})$$

Los resultados obtenidos, utilizando aplicación SOLVER de Excel, son reportados en la Tabla 4.1; evaluados para la data experimental Tabla A.3, ver anexos.

En la Fig. 4.4, puede visualizarse el Análisis de Dispersión con el factor de linealidad, R^2 de Pearson. Los valores obtenidos, $R^2 \approx 1.0$, confirman los buenos cálculos de correlación alcanzados de los modelos de crecimiento poblacional, de Gompertz-Makeham y Logístico, con data experimental del cultivo de microalga *P. cruentum*. Asimismo; el polinomio de 4º orden también es una buena alternativa.

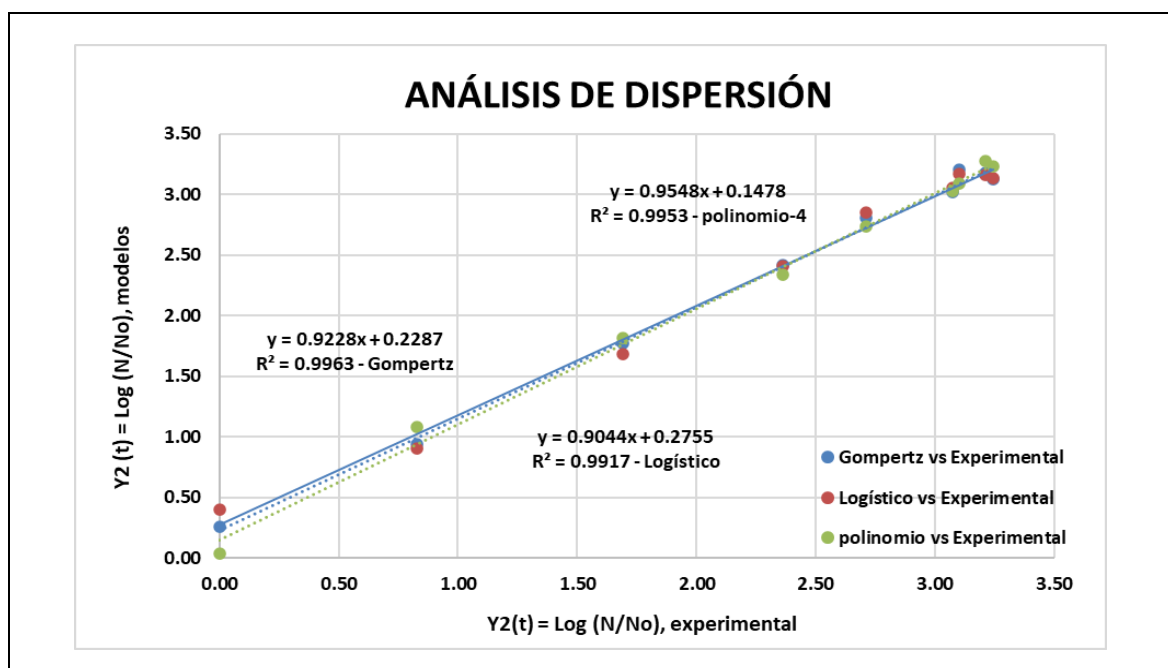


Figura 4.4. Análisis de dispersión, con factor de Pearson, de los modelos matemáticos de crecimiento poblacional en el cultivo microalgal.

En concordancia con los resultados obtenidos, considerando los fundamentos de la literatura especializada citada en el capítulo II y la metodología expuesta en capítulo III, es fundamental caracterizar las variables controlables y parámetros característicos para un cultivo de microalgas. Los modelos matemáticos de crecimiento poblacional de Gompertz y Logístico, son correlaciones muy útiles para

describir la cinética del crecimiento poblacional en cultivo de *P. cruentum*. También es factible, utilizando correctamente, aplicar un polinomio correlacional de 4° orden. En la Tabla 4.1, son reportados los resultados más relevantes obtenidos al estudiar un cultivo microalgal de *P. cruentum*. Todos los cálculos fueron realizados en hoja electrónica Excel.

Tabla 4.1. *Parámetros característicos, de la cinética del crecimiento poblacional, en un cultivo microalgal de P. cruentum.*

DATA EXPERIMENTAL						
REFERENCIAS	día	N (células / mL)		Y1 (t) = (N/No)	Y2 (t) = Log(N/No)	
Promedio:	4	9.714E+06		14.2851	2.2463	
Máximo:	6	1.743E+07		25.6324	3.2439	
Mínimo:	0	6.800E+05		1.0000	0.0000	
velocidad específica μ (días ⁻¹)	División por día D (DIV/día)		Tiempo duplicidad TD (días)	Producción diaria PD (células /mL)		
0.3885	0.5605		2.2382	3.44E+06		
Modelo de crecimiento poblacional, Gompertz-Makeham:						
$Y(t) = a \left(Exp(-Exp(b - c \ t)) \right)$						
Función / Parámetros		a	b	c	Zmín	
Y1 (t) = (N/No)		25.9509	1.6776	0.6245	1.5570	
Y2 (t) = Log (N/No)		3.2302	0.9292	0.7212	0.1188	
Modelo de crecimiento poblacional, Logístico:						
$Y(t) = \frac{a}{1 + b \ e^{-c \ t}}$						
Función / Parámetros		a	b	c	Zmín	
Y1 (t) = (N/No)		24.9137	27.4043	1.0014	1.2621	
Y2 (t) = Log (N/No)		3.1747	7.0138	1.0335	0.1518	
Modelo de correlación, polinomio 4º orden:						
$Y(t) = a_4 \ t^4 + a_3 \ t^3 + a_2 \ t^2 + a_1 \ t + a_0$						
Función / Parámetros		a4	a3	a2	a1	a0
Y1 (t) = (N/No)		-0.0074	-0.0678	1.3728	-0.2266	1.0742
Y2 (t) = Log (N/No)		0.0006	-0.0089	-0.0335	0.9376	-0.0158

4.1.3 Determinación del peso seco total y contenido de carbohidratos en la biomasa microalgal de *Porphyridium cruentum*

Arredondo et al. (2017), expresan que “la concentración celular puede ser estimada indirectamente usando la Densidad Óptica de un cultivo de microorganismos”. Asimismo; “el peso seco total de la biomasa microalgal presente en un cultivo, se determina usando muestras de volumen y concentración celular conocidos, las cuales se concentran en filtros de peso seco conocido y se secan en una estufa hasta peso constante”, (Arredondo et al., 2017).

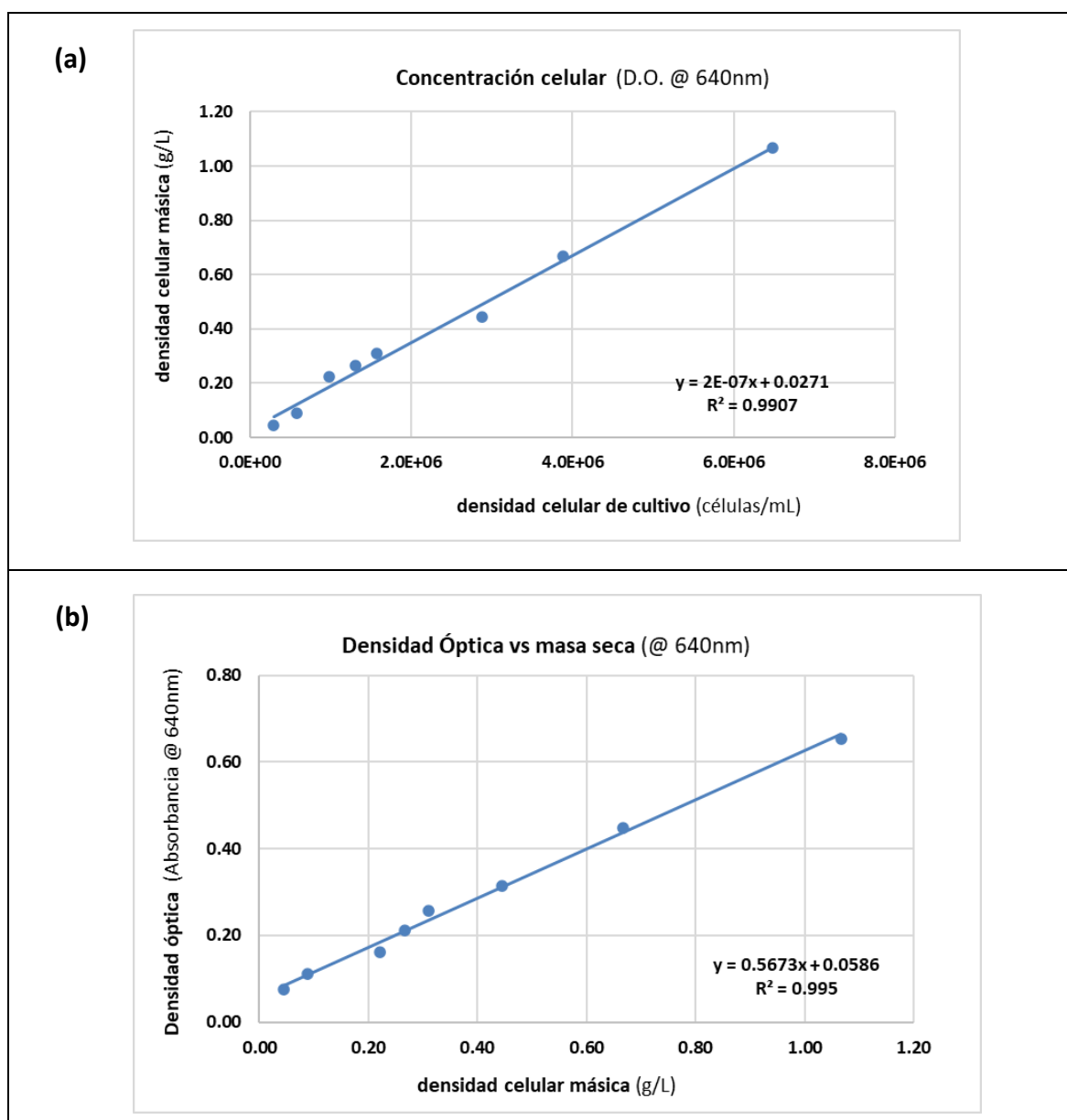


Figura 4.5. Determinación del peso seco total, en biomasa microalgal de *P. cruentum*

En la Fig. 4.5 es reportado las curvas de calibración para evaluar indirectamente el contenido de biomasa microalgal seca, producida en cultivo de *P. cruentum*, a partir del conteo celular en microscopio y/o de la determinación de su Densidad Óptica (absorbancia medida a 640 nm). Los datos experimentales requeridos para la evaluación se encuentran en sección anexos, Tablas A.4 y A.5. El peso seco de biomasa alcanzado es de 1.152-1.419 g/L, medición experimental; mientras que a través de la correlación se predice un valor de 1.317 g/L; en la literatura se reportan valores de 1.56 - 2.05 g/L (Shorkar *et al.*, 2018), dependiendo de las condiciones ambientales del cultivo. Tablas de datos experimentales, a diferentes condiciones ambientales, son reportados más adelante.

La determinación de carbohidratos contenidos en la biomasa microalgal seca de *P. cruentum*, fue desarrollado siguiendo el protocolo propuesto por Arredondo *et al.* (2017), ver Fig. A.12. Asimismo, aplicando el método de Miller (1959), reacción de dilución de cultivo microalgal con ácido Dinitrosalicílico DNS, se comprueba la presencia de carbohidratos, específicamente azúcar reductor **glucosa** con **15.3 %**. Los datos experimentales para la curva de calibración están reportados en anexos, ver Tabla A.6.

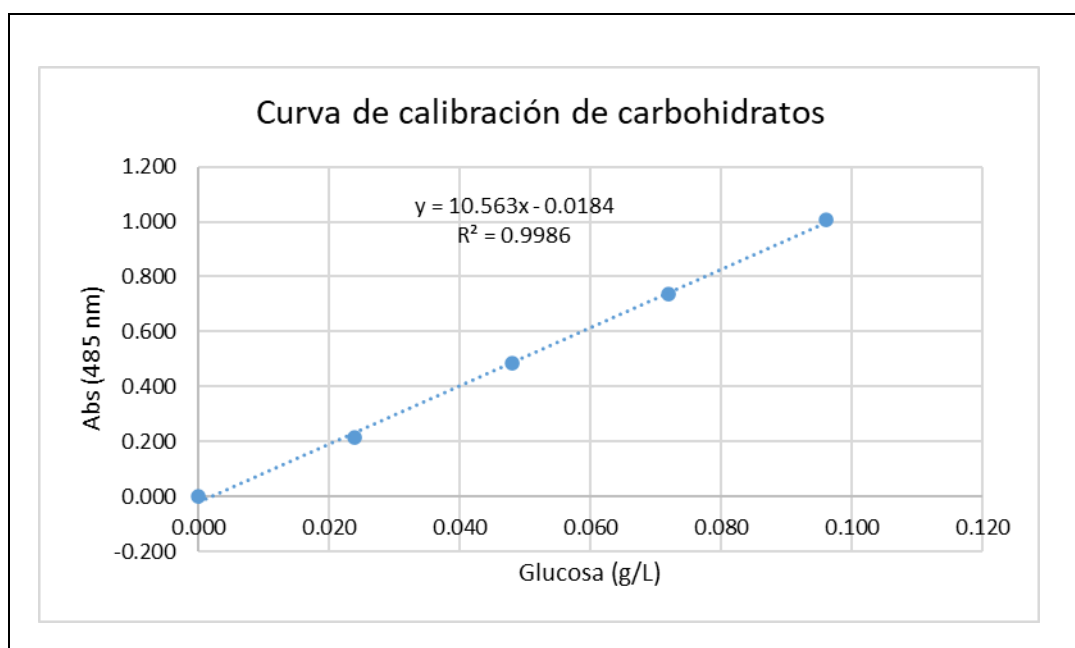


Figura 4.6. Curva de calibración para evaluar presencia de Carbohidratos, en biomasa microalgal de *P. cruentum*.

En la literatura, Shorkar *et al.*, (2017), reporta **29% de carbohidratos totales**; mientras que Kim *et al.*, (2017), reporta composición de azúcares reductores totales del 27.0 – 28.8 %, siendo el componente principal la **glucosa** con **16.6 – 16.9%**. Estos valores comparado con el **15.3% de glucosa** alcanzado en el presente trabajo, podemos manifestar que es un valor aceptable. Las diferencias se deben a las diversas condiciones ambientales, y también por las características del medio nutricional utilizado. La presencia de azúcares reductores en la biomasa seca de la microalga *P. cruentum*, con glucosa en mayor proporción, garantizan el objetivo de obtener bioetanol de tercera generación; previamente debe hidrolizarse estos azúcares fermentables.

4.1.4 Determinación de condiciones óptimas de las variables controlables en cultivos de microalga *Porphyridium cruentum*

En concordancia al Diseño Experimental Central Compuesto, ver Tablas 3.3 y 3.4, los diferentes experimentos fueron desarrollados a nivel de laboratorio y se obtuvieron los valores de las variables respuesta (Número de células por mL de cultivo, el peso seco de biomasa microalgal y la productividad), con sus respectivos parámetros operacionales (Temperatura, pH, salinidad) no manipulables pero si cuantificables, que mantenían casi constantes y dentro de los valores citados en la literatura para este tipo de microalgas. En la columna de tiempo, el *denominador* representa el tiempo de duración de cada cultivo, el **numerador es el día en que fue alcanzado el máximo número de células** según conteo celular realizado; debe precisarse que el **tiempo de inicio de cada cultivo es referenciado como día-0**. Las Tablas 4.2 a 4.4, reportan los resultados del crecimiento poblacional de la microalga *Porphyridium cruentum*, correspondientes a determinados volúmenes de cultivo (200 mL, 500 mL y 1000L); este criterio tiene por finalidad evaluar los efectos del escalamiento. Asimismo; las Fig. 4.7 y 4.8, muestran los perfiles característicos para algunas de las condiciones del diseño experimental establecido.

También son reportados los parámetros cinéticos de crecimiento y los coeficientes de correlación para el modelo poblacional de Gompertz-Makeham, evaluados para $Y(t) = \text{Log}(N/N_0)$, en Tablas 4.5 a 4.7, correspondientes para cada volumen de cultivo (200 mL, 500 mL y 1000 mL) controlado.

Tabla 4.2. Resultados experimentales, promedio, obtenidos en **200 mL** de cultivo de microalga *Porphyridium cruentum*

Tto	Variables controlables			Variables Respuesta				variables operacionales		
Nº	Iluminación (Watt)	Flujo de aire (LPM)	dosis C (g / L)	población N x 10 ⁶ (células / mL)	biomasa seca W (g / L)	Productividad 10 ⁶ (cél./ mL-día)	Productiv. (g / L-día)	tiempo (días)	T (°C)	pH
1	32.00	1.50	0.50	13.070 (± 0.16%)	1.1200	1.2950	0.4812	4/5	23.0 - 27.0	7.30 - 8.50
2	21.00	1.00	0.25	9.182 (± 0.21%)	0.8418	1.2581	0.4797	4/5	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
3	21.00	1.84	0.25	13.237 (± 0.23%)	1.0182	1.2905	0.4810	4/6	26.1 - 27.5	7.54 - 8.78
4	10.00	0.50	0.50	10.609 (± 0.30%)	0.9039	1.2777	0.4805	4/5	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
5	39.50	1.00	0.25	12.250 (± 0.15%)	0.9413	5.7900	0.6700	6/7	24.5 - 26.5	7.30 - 8.70
6	32.00	1.50	0.00	11.150 (± 0.19%)	1.1020	1.4275	0.4868	5/8	22.5 - 26.5	7.30 - 8.50
7	21.00	1.00	0.25	8.990 (± 0.15%)	0.8334	1.1611	0.4756	5/8	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
8	10.00	1.50	0.50	16.429 (± 0.10%)	1.1169	3.9588	0.5931	6/8	20.0 - 23.5	7.40 - 8.45
9	21.00	1.00	-0.17	9.050 (± 0.18%)	0.8360	1.8827	0.5059	3/4	24.5 - 26.5	7.85 - 8.45
10	2.50	1.00	0.25	0.858 (± 1.24%)	0.4629	0.1150	0.4317	4/5	24.5 - 26.5	7.85 - 8.45
11	10.00	1.50	0.00	12.110 (± 0.32%)	0.9354	3.5875	0.5775	6/8	22.0 - 26.5	7.50 - 8.70
12	21.00	1.00	0.25	8.203 (± 0.40%)	0.7992	4.4352	0.6131	6/8	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
13	21.00	1.00	0.67	17.430 (± 0.10%)	1.1520	3.4363	0.5711	6/8	20.0 - 23.5	7.40 - 8.45
14	21.00	1.00	0.25	8.950 (± 0.23%)	0.8317	7.9833	0.7621	5/8	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
15	32.00	0.50	0.00	7.040 (± 0.23%)	0.8060	0.8725	0.4635	5/8	23.0 - 27.0	7.30 - 8.50
16	32.00	0.50	0.50	7.890 (± 0.28%)	0.8440	0.8500	0.4625	4/5	23.0 - 27.0	7.30 - 8.50
17	10.00	0.50	0.00	9.1062 (± 0.29%)	0.8093	0.8772	0.4637	4/5	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
18	21.00	0.16	0.25	10.058 (± 0.38%)	0.8799	0.9005	0.4646	4/6	24.5 - 26.5	7.85 - 8.45
19	21.00	1.00	0.25	8.124 (± 0.29%)	0.7957	0.8893	0.4642	4/5	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
20	21.00	1.00	0.25	8.285 (± 0.31%)	0.8027	0.9356	0.4661	4/5	24.5 - 26.5	7.85 - 8.45
Promedio:	21.00	1.00	0.25	10.1011 (±0.29%)	0.8916	2.2112	0.5197			
Mínimo:	2.50	0.16	-0.17	0.8580 (± 1.24%)	0.4629	0.1150	0.4317			
Máximo:	39.50	1.84	0.67	17.4300 (± 0.15%)	1.1520	7.9833	0.7621			

Tabla 4.3. Resultados experimentales, promedio, obtenidos en 500 mL de cultivo de microalga *P. cruentum*

Tto	Variables controlables			Variables Respuesta				Variables operacionales		
Nº	Iluminación (Watt)	Flujo de aire (LPM)	dosis C (g / L)	población N x 10 ⁶ (células / mL)	biomasa seca W (g / L)	Productividad 10 ⁶ (cél. / mL- día)	Productiv. (g / L-día)	tiempo (días)	T (°C)	pH
1	32.00	1.50	0.50	24.879 (± 0.26%)	1.2315	9.9780	0.8540	4/5	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
2	21.00	1.00	0.25	9.643 (± 0.13%)	0.8953	8.3150	0.7834	4/6	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
3	21.00	1.84	0.25	11.216 (± 0.27%)	0.9664	4.1970	0.6088	4/5	25.0 - 27.5	7.80 - 8.90
4	10.00	0.50	0.50	15.3140 (± 0.06%)	1.0802	3.3010	0.5709	6/8	20.0 - 23.5	7.40 - 8.45
5	39.50	1.00	0.25	25.310 (± 0.09%)	1.4189	5.4300	0.6611	5/6	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
6	32.00	1.50	0.00	13.887 (± 0.46%)	1.2400	2.7717	0.5484	6/8	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
7	21.00	1.00	0.25	9.328 (± 0.39%)	0.8811	2.3212	0.5293	6/8	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
8	10.00	1.50	0.50	12.2975 (± 0.20%)	0.9523	2.3025	0.5285	5/6	23.5 - 27.5	7.30 - 8.80
9	21.00	1.00	-0.17	8.310 (± 0.27%)	0.8350	2.1836	0.5235	4/6	24.5 - 27.0	7.30 - 8.50
10	2.50	1.00	0.25	10.5840 (± 0.32%)	0.8797	2.6083	0.5415	4/6	25.5 - 27.5	7.40 - 8.45
11	10.00	1.50	0.00	8.475 (± 0.36%)	0.9600	1.0638	0.4760	6/8	22.5 - 26.5	7.40 - 8.50
12	21.00	1.00	0.25	10.841 (± 0.16%)	0.9495	4.8019	0.6345	4/6	25.5 - 27.5	7.40 - 8.54
13	21.00	1.00	0.67	18.490 (± 0.68%)	1.1270	3.2238	0.5676	6/8	22.0 - 26.5	7.50 - 8.70
14	21.00	1.00	0.25	10.104 (± 0.94%)	0.9161	4.4663	0.6203	4/6	25.0 - 27.5	7.80 - 8.90
15	32.00	0.50	0.00	15.298 (± 0.23%)	1.0795	1.8011	0.5073	5/8	22.5 - 26.5	7.30 - 8.50
16	32.00	0.50	0.50	20.020 (± 0.07%)	1.2073	5.1033	0.6473	5/6	24.0 - 26.5	7.50 - 8.80
17	10.00	0.50	0.00	7.4800 (± 0.82%)	0.7480	1.0613	0.4759	6/8	22.0 - 26.5	7.50 - 8.70
18	21.00	0.16	0.25	7.725 (± 0.73%)	0.8086	1.8200	0.5081	4/6	24.5 - 26.5	7.85 - 8.45
19	21.00	1.00	0.25	10.150 (± 0.91%)	0.9182	1.9441	0.5133	4/6	24.5 - 26.5	7.65 - 8.72
20	21.00	1.00	0.25	9.660 (± 0.86%)	0.8961	1.8029	0.5073	4/6	24.8 - 27.2	7.30 - 8.50
Promedio:	21.00	1.00	0.25	13.1367 (± 0.41%)	0.9995	3.5248	0.5803			
Mínimo:	2.50	0.16	-0.17	7.4800 (± 0.32%)	0.7480	1.0613	0.4759			
Máximo:	39.50	1.84	0.67	25.310 (± 0.09%)	1.4189	9.9780	0.8540			

Tabla 4.4. Resultados experimentales, promedio, obtenidos en **1000 mL** de cultivo de microalga *P. cruentum*

Tto	Variables controlables			Variables Respuesta				Variables operacionales		
Nº	Iluminación (Watt)	Flujo de aire (LPM)	dosis C (g / L)	población N x 10 ⁶ (células / mL)	biomasa seca W (g / L)	Productividad 10 ⁶ (cél./ mL-día)	Productiv. (g / L-día)	tiempo (días)	T (°C)	pH
1	32.00	1.50	0.50	15.188 (± 0.38%)	1.087	2.3580	0.5369	8/11	24.0 - 27.5	7.80 - 8.90
2	21.00	1.00	0.25	11.075 (± 0.31%)	0.990	1.8750	0.5162	4/5	24.5 - 26.5	7.85 - 8.45
3	21.00	1.84	0.25	14.855 (± 0.31%)	1.0007	2.2850	0.5337	4/5	24.5 - 26.5	7.85 - 8.45
4	10.00	0.50	0.50	8.935 (± 0.20%)	1.189	1.6633	0.5071	4/6	23.5 - 27.5	7.30 - 8.80
5	39.50	1.00	0.25	12.988 (± 0.48%)	0.9927	1.3299	0.4928	5/8	25.0 - 27.5	7.80 - 8.90
6	32.00	1.50	0.00	12.380 (± 0.46%)	1.060	1.4300	0.4971	8/11	24.0 - 27.5	7.80 - 8.90
7	21.00	1.00	0.25	11.409 (± 0.30%)	1.005	1.1931	0.4869	6/10	25.0 - 27.5	7.80 - 8.90
8	10.00	1.50	0.50	10.890 (± 0.23%)	0.981	0.9967	0.4785	6/8	22.5 - 26.5	7.40 - 8.50
9	21.00	1.00	-0.17	7.590 (± 0.42%)	0.827	0.9588	0.4769	6/8	22.5 - 26.5	7.40 - 8.50
10	2.50	1.00	0.25	6.445 (± 0.37%)	0.774	0.4763	0.4562	5/6	23.5 - 27.5	7.30 - 8.80
11	10.00	1.50	0.00	10.610 (± 0.38%)	0.968	1.7875	0.5124	6/8	22.5 - 26.5	7.40 - 8.50
12	21.00	1.00	0.25	11.325 (± 0.29%)	1.001	2.3212	0.5353	4/6	24.5 - 26.5	7.85 - 8.45
13	21.00	1.00	0.67	13.056 (± 0.24%)	0.996	1.6750	0.5076	9/11	24.0 - 27.5	7.80 - 8.90
14	21.00	1.00	0.25	12.560 (± 0.31%)	1.059	1.4983	0.5000	10/11	24.0 - 27.5	7.80 - 8.90
15	32.00	0.50	0.00	8.270 (± 0.19%)	0.859	0.7650	0.4686	5/6	23.5 - 27.5	7.30 - 8.80
16	32.00	0.50	0.50	13.090 (± 0.25%)	0.997	2.9250	0.5612	4/5	24.8 - 27.2	7.30 - 8.50
17	10.00	0.50	0.00	6.645 (± 0.30%)	0.783	0.8950	0.4741	5/6	23.5 - 27.5	7.30 - 8.80
18	21.00	0.16	0.25	8.784 (± 0.25%)	0.812	1.3633	0.4942	4/5	24.5 - 26.5	7.85 - 8.45
19	21.00	1.00	0.25	11.470 (± 0.31%)	1.008	1.7337	0.5101	3/5	24.5 - 26.5	7.85 - 8.45
20	21.00	1.00	0.25	12.445 (± 0.28%)	1.053	1.5517	0.5023	4/5	24.5 - 26.5	7.85 - 8.45
Promedio:	21.00	1.00	0.25	11.001 (± 0.31%)	0.972	1.5541	0.5024			
Mínimo:	2.50	0.16	-0.17	6.645 (± 0.30%)	0.774	0.4763	0.4562			
Máximo:	39.50	1.84	0.67	15.138 (± 0.38%)	1.189	2.9250	0.5612			

Tabla 4.5. *Parámetros cinéticos y de correlación poblacional, calculados, para 200 mL de cultivo de microalga P. cruentum*

Tto Nº	Variables controlables			Población N x 10 ⁶ (células / mL)	velocidad específica μ (días ⁻¹)	D (Divisiones/día)	Tiempo duplicidad TD (días)	Producción diaria PD (cél./mL)	Parámetros de GOMPERTZ - MAKEHAN			
	Iluminación (Watt)	Flujo de aire (LPM)	dosis C (g / L)						a	b	c	Zmín
1	32.00	1.50	0.50	13.070 (\pm 0.16%)	0.1104	0.1593	6.3279	1.2950E+06	0.8770	1.9025	1.8097	0.0421
2	21.00	1.00	0.25	9.182 (\pm 0.21%)	0.1073	0.1548	6.1476	1.2581E+06	0.8520	1.8483	1.7581	0.0409
3	21.00	1.84	0.25	13.237 (\pm 0.23%)	0.1100	0.1588	6.3060	1.2905E+06	0.8739	1.8959	1.8034	0.0420
4	10.00	0.50	0.50	10.609 (\pm 0.30%)	0.1089	0.1572	6.2432	1.2777E+06	0.8652	1.8770	1.7855	0.0416
5	39.50	1.00	0.25	12.250 (\pm 0.15%)	0.5724	0.8257	1.5483	5.7900E+06	4.5251	1.1573	0.6118	0.1741
6	32.00	1.50	0.00	11.150 (\pm 0.19%)	0.1959	0.2827	0.3431	1.4275E+06	1.6261	2.1144	1.3491	0.1167
7	21.00	1.00	0.25	8.990 (\pm 0.15%)	0.1594	0.2299	0.2791	1.1611E+06	1.3226	1.7198	1.0973	0.0949
8	10.00	1.50	0.50	16.429 (\pm 0.10%)	0.4781	0.6897	2.9326	3.9588E+06	4.4150	1.1754	0.8833	0.1274
9	21.00	1.00	-0.17	9.050 (\pm 0.18%)	0.0012	0.0017	0.0074	1.8827E+06	0.0111	0.0029	0.0022	0.0003
10	2.50	1.00	0.25	0.858 (\pm 1.24%)	0.1082	0.1561	7.1710	1.1500E+05	0.3235	1.8068	1.8776	0.0150
11	10.00	1.50	0.00	12.110 (\pm 0.32%)	0.5115	0.7379	1.7185	3.5875E+06	4.9253	1.1146	0.8480	0.1223
12	21.00	1.00	0.25	8.203 (\pm 0.40%)	0.6324	0.9123	2.1246	4.4352E+06	6.0891	1.3780	1.0484	0.1512
13	21.00	1.00	0.67	17.430 (\pm 0.10%)	0.3885	0.5605	2.2382	3.4363E+06	3.2302	0.9292	0.7212	0.1188
14	21.00	1.00	0.25	8.950 (\pm 0.23%)	0.9025	1.3021	5.1999	7.9833E+06	7.5045	2.1587	1.6754	0.2760
15	32.00	0.50	0.00	7.040 (\pm 0.23%)	0.1424	0.2055	5.0018	8.7250E+05	2.8972	1.3485	1.4145	0.0820
16	32.00	0.50	0.50	7.890 (\pm 0.28%)	0.1213	0.1750	5.7184	8.5000E+05	0.7576	2.5001	1.8950	0.0291
17	10.00	0.50	0.00	9.1062 (\pm 0.29%)	0.1252	0.1806	5.9011	8.7261E+05	0.7818	2.5800	1.9556	0.0300
18	21.00	0.16	0.25	10.058 (\pm 0.38%)	0.1285	0.1854	6.0580	8.9582E+05	0.8026	2.6486	2.0076	0.0308
19	21.00	1.00	0.25	8.124 (\pm 0.29%)	0.1269	0.1831	5.9831	8.8474E+05	0.7926	2.6158	1.9827	0.0304
20	21.00	1.00	0.25	8.285 (\pm 0.31%)	0.1336	0.1927	6.2946	9.3080E+05	0.8339	2.7520	2.0860	0.0320

Tabla 4.6. *Parámetros cinéticos y de correlación poblacional, calculados, para 500 mL de cultivo de microalga P. cruentum*

Tto Nº	Variables controlables			Población $N \times 10^6$ (células / mL)	velocidad específica μ (días-1)	D (Divisiones/día)	Tiempo duplicidad TD (días)	Producción diaria PD (cél./mL)	Parámetros de GOMPERTZ - MAKEHAN			
	Iluminación (Watt)	Flujo de aire (LPM)	dosis C (g / L)						a	b	c	Zmín
1	32.00	1.50	0.50	24.879 ($\pm 0.26\%$)	1.3939	2.0109	5.1673	9.978E+06	12.4181	3.0809	2.2357	0.2555
2	21.00	1.00	0.25	9.643 ($\pm 0.13\%$)	1.1616	1.6758	4.3061	8.315E+06	10.3484	2.5674	1.8631	0.2130
3	21.00	1.84	0.25	11.216 ($\pm 0.27\%$)	0.5864	0.8460	2.1739	4.198E+06	5.2243	1.2961	0.9406	0.1075
4	10.00	0.50	0.50	15.314 ($\pm 0.06\%$)	0.5228	0.7542	1.9381	3.743E+06	4.6577	1.1556	0.8386	0.0958
5	39.50	1.00	0.25	25.310 ($\pm 0.09\%$)	0.3439	0.4962	2.0903	5.430E+06	2.5968	1.3249	0.9499	0.0719
6	32.00	1.50	0.00	13.887 ($\pm 0.46\%$)	1.7555	2.5326	10.6695	2.772E+07	13.2551	6.7629	4.8485	0.3672
7	21.00	1.00	0.25	9.328 ($\pm 0.39\%$)	1.4702	2.1210	8.9354	2.321E+07	11.1007	5.6637	4.0604	0.3076
8	10.00	1.50	0.50	8.690 ($\pm 0.20\%$)	0.2740	0.3953	2.7737	1.623E+06	0.9397	3.2001	1.1983	0.0230
9	21.00	1.00	-0.17	8.310 ($\pm 0.27\%$)	0.3685	0.5317	3.7310	2.184E+06	1.2640	4.3045	1.6119	0.0310
10	2.50	1.00	0.25	6.661 ($\pm 0.32\%$)	0.4402	0.6351	4.4567	2.608E+06	1.5098	5.1417	1.9254	0.0370
11	10.00	1.50	0.00	8.475 ($\pm 0.36\%$)	0.1742	0.2513	4.5895	1.064E+06	1.3514	1.5000	0.8640	0.0476
12	21.00	1.00	0.25	10.841 ($\pm 0.16\%$)	0.0786	0.1134	2.0718	4.802E+05	0.6101	0.6771	0.3900	0.0215
13	21.00	1.00	0.67	18.490 ($\pm 0.68\%$)	0.2988	0.4311	3.3791	3.224E+06	4.4838	1.4894	1.3296	0.0952
14	21.00	1.00	0.25	10.104 ($\pm 0.94\%$)	0.4140	0.5973	4.6815	4.466E+06	6.2120	2.0634	1.8421	0.1319
15	32.00	0.50	0.00	15.298 ($\pm 0.23\%$)	0.1452	0.2095	7.0736	1.801E+06	1.2779	2.9148	2.0483	0.0737
16	32.00	0.50	0.50	20.020 ($\pm 0.07\%$)	0.4823	0.6959	1.5872	5.103E+06	2.5108	1.3641	0.7280	0.0746
17	10.00	0.50	0.00	7.480 ($\pm 0.82\%$)	0.2096	0.3023	3.8515	1.061E+06	2.2051	1.2565	0.9218	0.0882
18	21.00	0.16	0.25	7.725 ($\pm 0.73\%$)	0.3336	0.4813	4.9959	1.821E+06	3.1838	1.8667	1.3329	0.1104
19	21.00	1.00	0.25	10.150 ($\pm 0.91\%$)	0.3562	0.5139	5.3340	1.944E+06	3.3993	1.9931	1.4232	0.1179
20	21.00	1.00	0.25	9.660 ($\pm 0.86\%$)	0.3303	0.4766	4.9466	1.803E+06	3.1524	1.8483	1.3198	0.1093

Tabla 4.7. *Parámetros cinéticos y de correlación poblacional, calculados, para 1000 mL de cultivo de microalga P. cruentum*

Tto Nº	Variables controlables			Población N x 10 ⁶ (células / mL)	velocidad específica μ (días-1)	D (Divisiones/día)	Tiempo duplicidad TD (días)	Producción diaria PD (cél./mL)	Parámetros de GOMPERTZ - MAKEHAN			
	Iluminación (Watt)	Flujo de aire (LPM)	dosis C (g / L)						a	b	c	Zmín
1	32.00	1.50	0.50	15.188 (\pm 0.38%)	0.2994	0.4319	3.7962	2.358E+06	2.6572	1.5613	0.5883	0.0978
2	21.00	1.00	0.25	11.075 (\pm 0.31%)	0.2365	0.3412	3.3437	1.875E+06	0.7784	2.1027	1.3616	0.0233
3	21.00	1.84	0.25	14.855 (\pm 0.31%)	0.2063	0.2976	4.1138	2.285E+06	0.6127	2.6444	1.7507	0.0414
4	10.00	0.50	0.50	8.935 (\pm 0.20%)	0.2725	0.3931	3.4400	1.663E+06	0.9417	2.0703	1.5309	0.0551
5	39.50	1.00	0.25	12.988 (\pm 0.48%)	0.3894	0.5618	5.5058	1.330E+06	1.0088	4.3543	2.8826	0.0681
6	32.00	1.50	0.00	12.380 (\pm 0.46%)	0.1723	0.2486	4.9744	1.430E+06	2.2532	1.2947	0.7290	0.1070
7	21.00	1.00	0.25	11.409 (\pm 0.30%)	0.2041	0.2908	5.4399	1.193E+06	0.9660	3.9450	1.4626	0.0014
8	10.00	1.50	0.50	10.890 (\pm 0.23%)	0.1386	0.1999	7.5547	9.967E+05	1.5943	1.6391	0.7546	0.0783
9	21.00	1.00	-0.17	7.590 (\pm 0.42%)	0.1759	0.2538	5.2425	9.588E+05	1.2299	1.7978	0.9690	0.0441
10	2.50	1.00	0.25	6.445 (\pm 0.37%)	0.1640	0.1321	-0.4245	4.763E+05	0.6823	1.9037	0.9066	0.0340
11	10.00	1.50	0.00	10.610 (\pm 0.38%)	0.2804	0.4045	2.8410	1.788E+06	1.6239	1.6528	0.7440	0.0492
12	21.00	1.00	0.25	11.325 (\pm 0.29%)	0.2066	0.2891	3.4815	2.321E+06	1.1373	2.5527	1.2473	0.0523
13	21.00	1.00	0.67	13.056 (\pm 0.24%)	0.2485	0.3585	3.2125	1.675E+06	2.2532	1.2947	0.7290	0.1070
14	21.00	1.00	0.25	12.560 (\pm 0.31%)	0.2100	0.3030	4.6319	1.498E+06	2.4645	1.2054	0.3711	0.1161
15	32.00	0.50	0.00	8.270 (\pm 0.19%)	0.1084	0.1563	8.3851	7.650E+05	0.8868	1.8388	1.3459	0.0227
16	32.00	0.50	0.50	13.090 (\pm 0.25%)	0.2958	0.4268	2.5618	2.925E+06	0.6419	4.7763	1.9949	0.0237
17	10.00	0.50	0.00	6.645 (\pm 0.30%)	0.1725	0.2489	4.6444	8.950E+05	0.7125	2.2556	0.9528	0.0357
18	21.00	0.16	0.25	8.784 (\pm 0.25%)	0.2088	0.3013	3.7366	1.363E+06	0.7054	1.9875	1.2983	0.0251
19	21.00	1.00	0.25	11.470 (\pm 0.31%)	0.2066	0.2897	4.3519	1.734E+06	0.5958	4.3530	1.6003	0.0476
20	21.00	1.00	0.25	12.445 (\pm 0.28%)	0.1562	0.2254	5.0802	1.552E+06	0.4801	2.3202	1.4898	0.0448

En la Fig 4.7 son mostrados algunos perfiles del crecimiento poblacional, para los diferentes volúmenes de cultivo de la microalga *P. cruentum*, según reporte de los resultados experimentales consolidados en las Tablas 4.4 a 4.6, observándose que agregar carbono orgánico (glucosa) como suplemento nutricional al cultivo induce a que la población microalgal tenga un mayor crecimiento comparado al cultivo de control alimentado sólo con nutriente Guillard F/2, confirmándose los estudios realizados por Andreeva *et al.* (2021) con otros tipos de microalgas. Puede inferirse que la microalga *P. cruentum* es mixotrófica, aparte del CO₂ absorbido, puede utilizar carbono puro (glucosa) para su crecimiento y fijarlo principalmente en forma de carbohidratos.

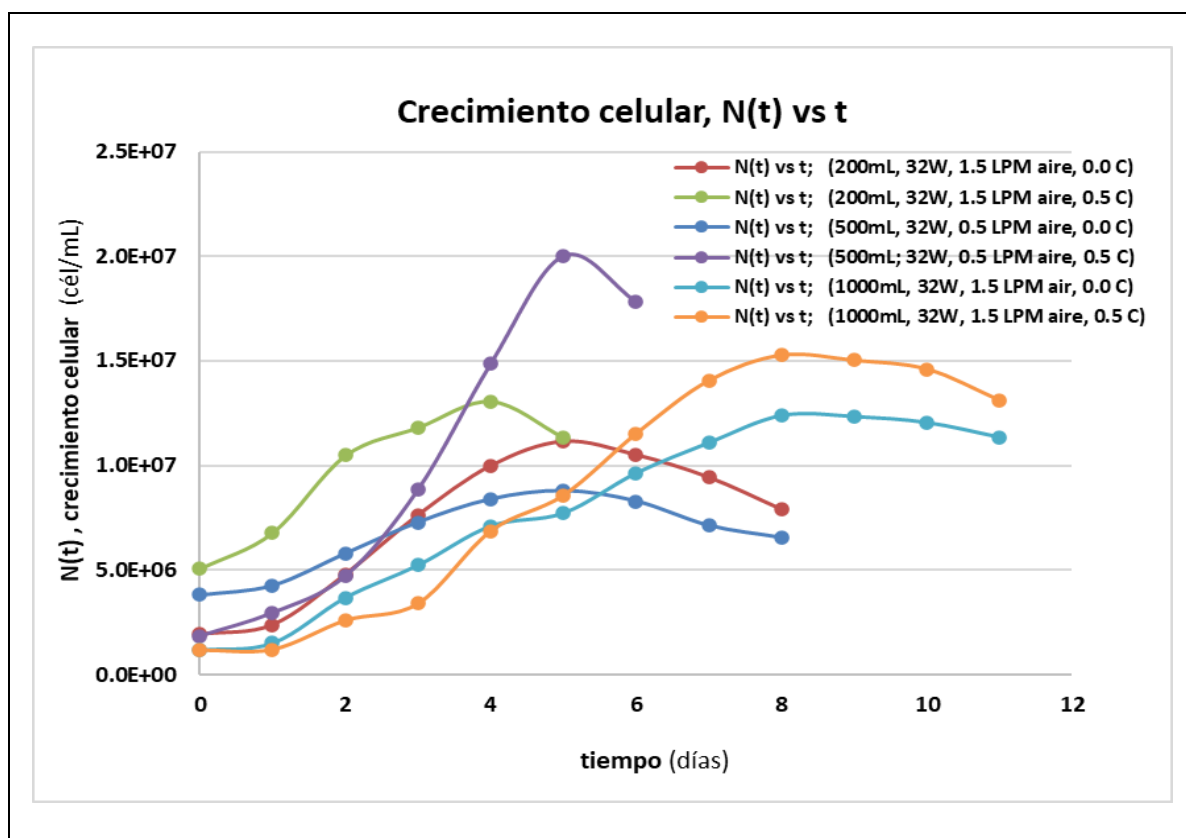


Figura 4.7. Perfiles del crecimiento poblacional, sin agregar y agregando Carbono orgánico (glucosa) como complemento nutricional a los cultivos de *Porphyridium cruentum*.

Asimismo; la Fig. 4.8 muestra los perfiles del crecimiento poblacional del cultivo microalgal de *P. cruentum*, bajo la influencia de diferentes condiciones de las variables controlables, y los efectos del escalamiento en los tres diferentes volúmenes de cultivo (200mL, 500mL y 1000mL) estudiados.

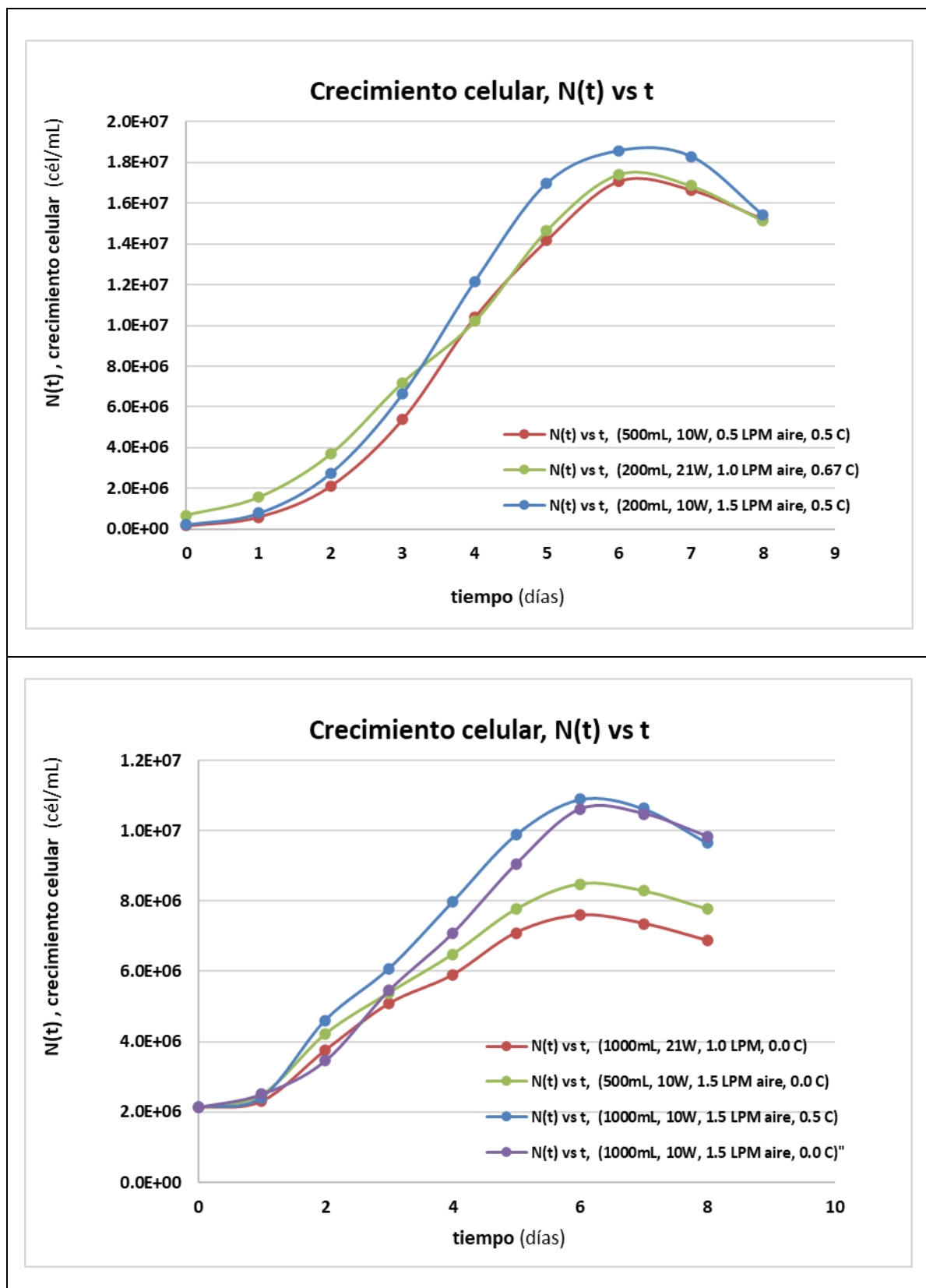


Figura 4.8. Perfiles del crecimiento poblacional, para diferentes condiciones de las variables controlables, en los cultivos de *P. cruentum*.

Todos los datos experimentales, y los promedios consolidados en las Tablas 4.4 a 4.6, fueron analizados estadísticamente aplicando ANOVA con $\alpha = 0.05$. Además; el Método Superficie de Respuesta (RSM) fue utilizado para determinar los valores óptimos operacionales del crecimiento poblacional microalgal en función de las variables controlables, en los volúmenes de cultivo (200mL, 500mL y 1000mL) estudiados. Los datos fueron procesados con software estadístico minitab, y Excel.

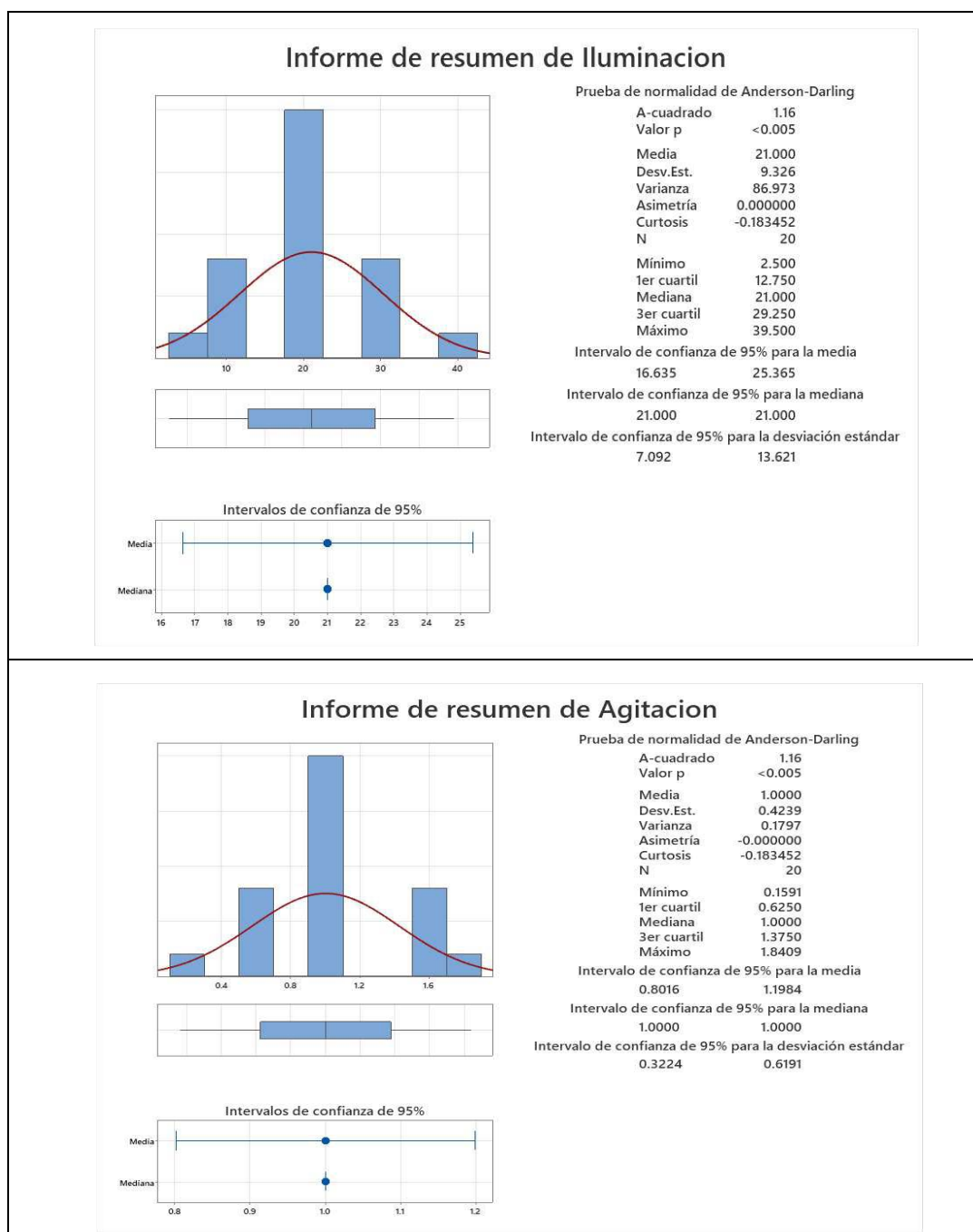


Figura 4.9. Descriptor estadístico de las variables controlables **Iluminación** (watts) y **Flujo de aire (agitación por burbujeo, en LPM)** en el cultivo microalgal. Ref.: reporte del software Minitab.

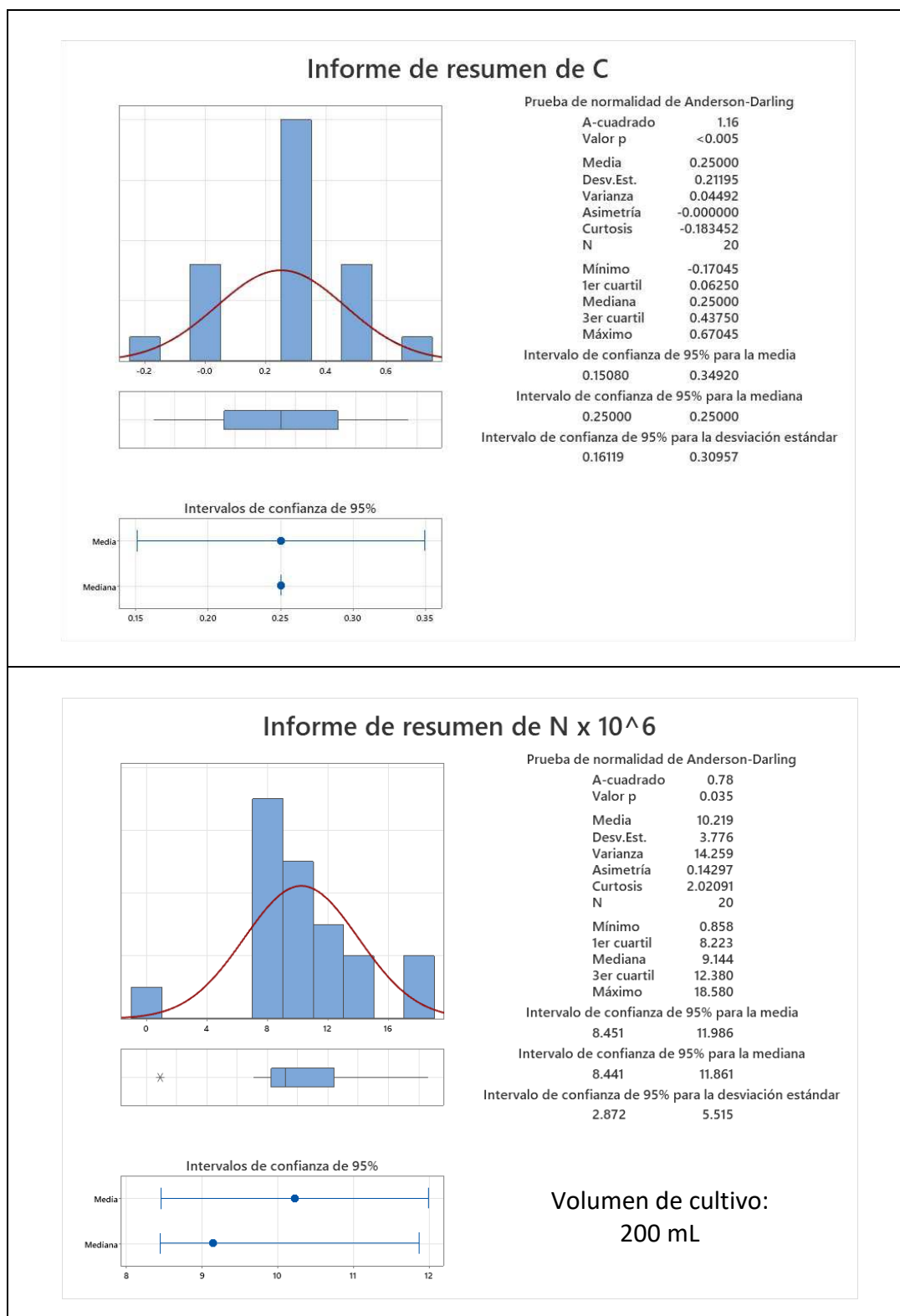


Figura 4.10. Descriptor estadístico de la variable controlable dosificación carbono orgánico C (g/L) y variable respuesta población N (células/mL) en 200 mL de cultivo microalgal. Ref.: reporte del software Minitab.

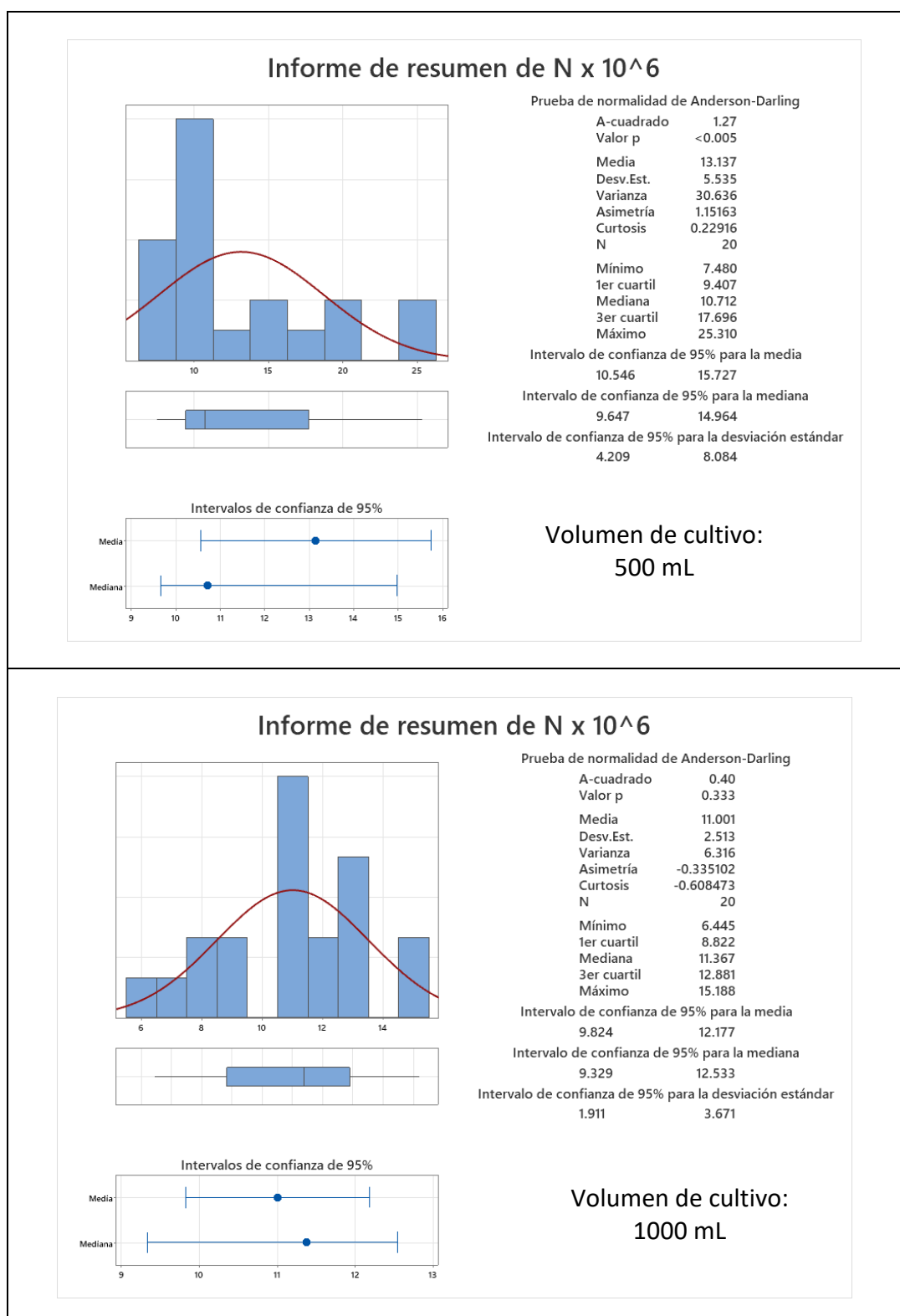


Figura 4.11. Descriptor estadístico de la variable respuesta población N (células/mL), en 500 mL y 1000 mL de cultivo microalgal. Ref.: reporte del software Minitab.

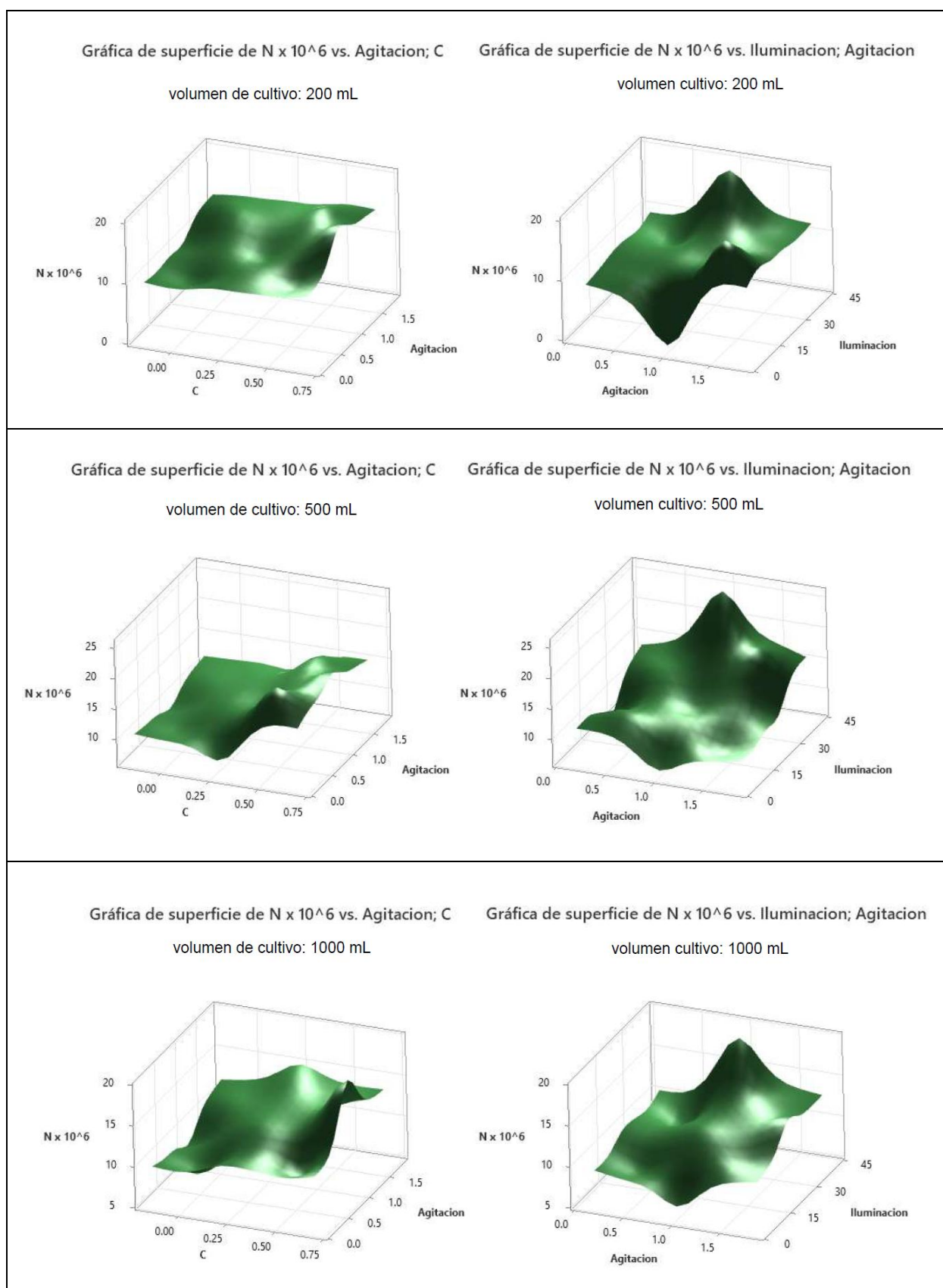


Figura 4.12. Superficie de respuesta del crecimiento poblacional de cultivo microalga *P. cruentum*, en tres volúmenes diferentes de cultivo. Ref.: reporte del software Minitab.

Aplicando el Método Superficie de Respuesta (RSM) es posible evaluar el efecto de las variables controlables del proceso y sus interacciones sobre el crecimiento poblacional $N(t)$ (respuesta medida), correlacionados en el modelo predictivo propuesto en la Tabla 4.8, como se indica:

Tabla 4.8. *Parámetros óptimos, variables controlables y de respuesta, y el modelo de Optimización $N(t)$ para predecir crecimiento poblacional en cultivo microalgal*

Volumen de cultivo	Iluminación X1 (watts)	Flujo aire X2 (LPM)	Dosificación C, X3 (g/L)	N x10 ⁶ (células/mL)	
				Máximo	Objetivo
200 (mL)	22.6818	1.8409	0.670448	17.43	23.72
	$N(t) 10^6 = 6.43 + 0.321 (X1) - 6.88 (X2) - 8.0 (X3) - 0.00546 (X1)^2 + 4.56 (X2)^2 + 27.2 (X3)^2 + 0.011 (X1) * (X2) - 0.139 (X1) * (X3) + 3.89 (X2) * (X3)$				
500 (mL)	27.9738	1.8409	0.6705	27.841	25.31
	$N(t) 10^6 = 14.69 - 0.966 (X1) - 3.55 (X2) + 4.02 (X3) + 0.02570 (X1)^2 + 0.450 (X2)^2 + 24.03 (X3)^2 + 0.2759 (X1) * (X2) + 0.015 (X1) * (X3) - 4.41 (X2) * (X3)$				
1000 (mL)	39.4997	1.8409	0.6705	17.20	19.083
	$N(t) 10^6 = 1.61 + 0.3187 (X1) + 3.51 (X2) + 8.47 (X3) - 0.00549 (X1)^2 + 0.316 (X2)^2 - 7.20 (X3)^2 + 0.0065 (X1) * (X2) + 0.2299 (X1) * (X3) - 4.02 (X2) * (X3)$				

Ref.: datos reportados por software Minitab.

El diagrama de Pareto, Fig. 4.13, proporcionado por software estadístico minitab, permite la evaluación de las interacciones de las variables. La línea vertical representa el límite entre los efectos significativos con respecto al crecimiento poblacional de la biomasa microalgal. La longitud de las barras del gráfico de Pareto de cada parámetro (A: iluminación; B: agitación con flujo de aire, C: dosificación de C orgánico) revela la magnitud del efecto estimado. Los gráficos de Pareto revelan que todas las variables controlables y sus interacciones tienen más efecto en los cultivos de 500 mL y 1000 mL, mientras que en el cultivo de 200 mL la dosificación de C orgánico (glucosa) es la que tiene mayor influencia.

Por tanto; el método de optimización RSM es útil para identificar y mostrar el impacto de las variables controlables en el crecimiento poblacional de biomasa microalgal de *P. cruentum*. También, el modelo correlacional propuesto para alcanzar condiciones óptimas operacionales es aceptable. En anexo A.3.2 se reporta la información estadística complementaria.

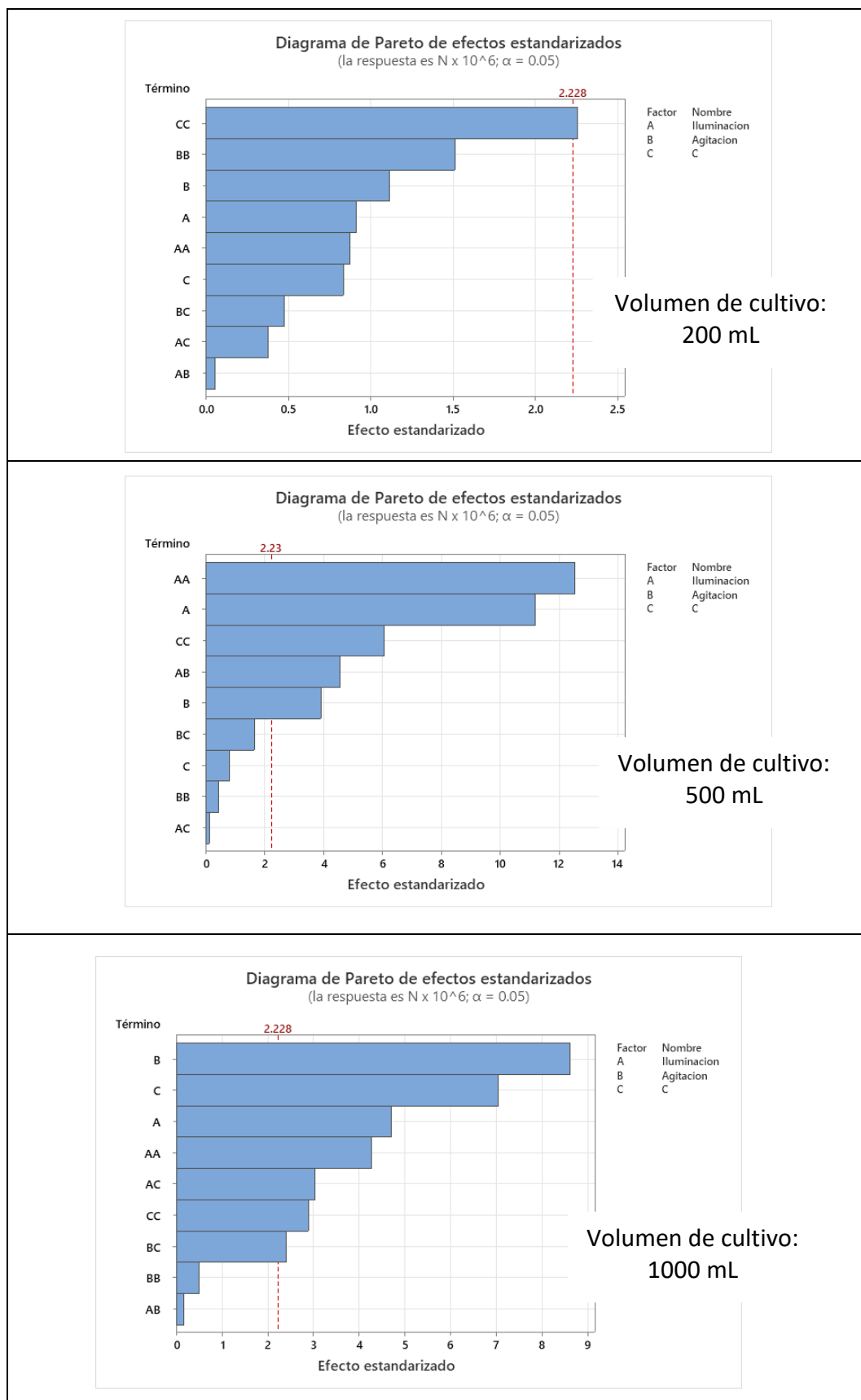


Figura 4.13. Gráfica de Pareto para el crecimiento poblacional, en cultivo microalgal de *P. cruentum*. Ref.: reporte del software Minitab

4.2 EVALUACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN LA BIOMASA MICROALGAL DE *Porphyridium cruentum*

4.2.1 Determinación de la actividad enzimática de la Celulasa

El método propuesto en la literatura (Adney B. & Baker J.,1998), procedimiento en anexos Fig. A.11a y A.11b, es utilizado en la evaluación experimental de **Actividad enzimática del cóctel Celulasa**, para encontrar las condiciones operacionales óptimas necesarias en la hidrólisis enzimática, sacarificación de carbohidratos, de la biomasa microalgal de *P. cruentum*.

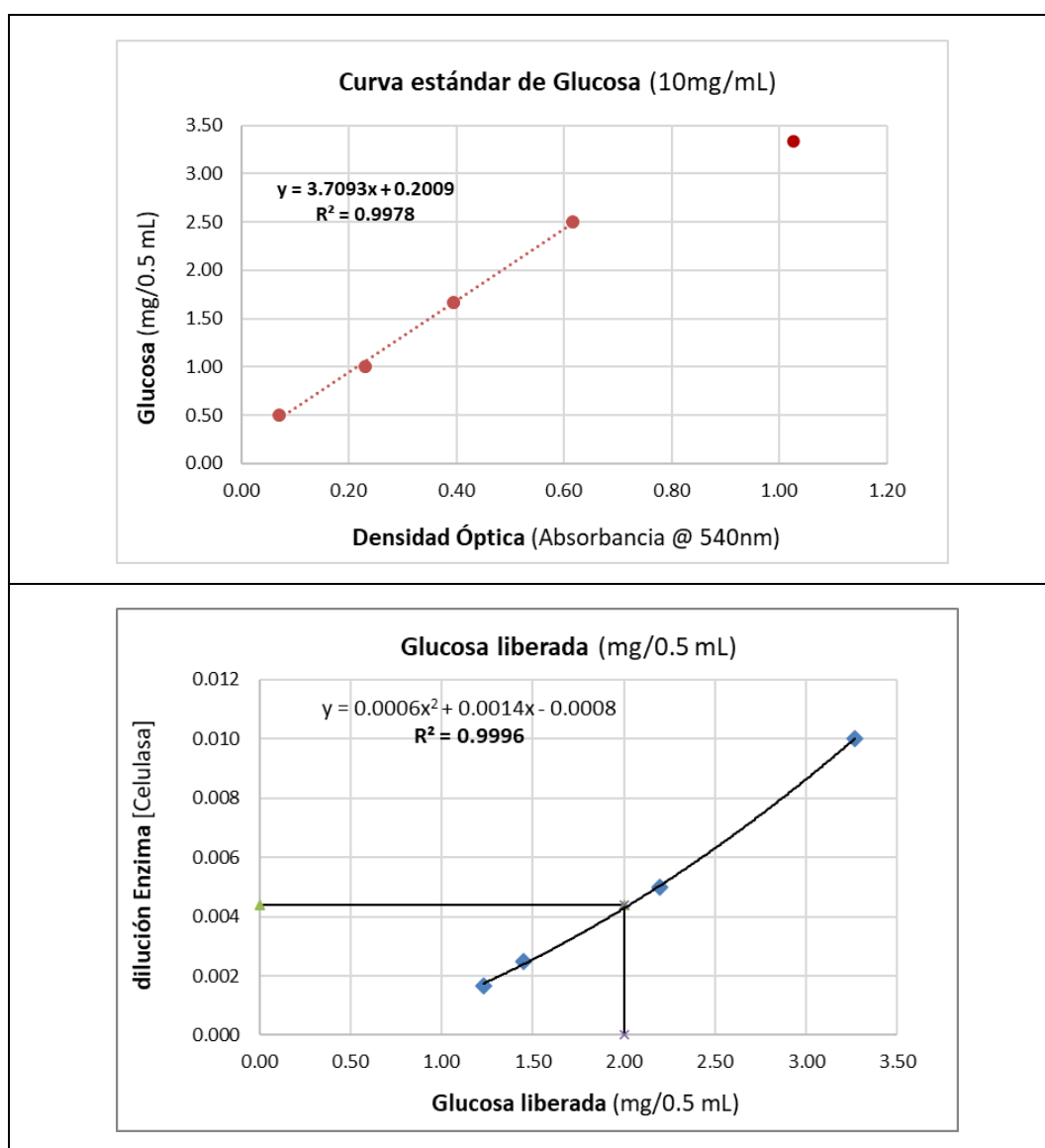


Figura 4.14. Evaluación de la Actividad Enzimática, (a) curva estándar de Glucosa, calibración con D.O; (b) Glucosa liberada con enzima Celulasa.

Según datos experimentales obtenidos en la evaluación de **Actividad enzimática del cóctel Celulasa**, aplicando el método citado (Adney B. & Baker J.,1998), la **condición óptima se produce a 50 °C, pH 4.6** en medio buffer de Citrato sódico. Según IUPAC, “la Actividad enzimática se mide en términos de **Unidades de papel de filtro (FPU)**”, que es definido como “la cantidad de enzima requerida para producir un azúcar reductor equivalente a 2.0 mg de glucosa”, observándose en la Fig. 4.14b que este valor es alcanzado experimentalmente con una dilución de **Celulasa = 0.0044**; el valor calculado y obtenido de la **Actividad = 84.1 (FPU/mL)**, es cercano al valor de **70.0 FPU/mL** obtenido por Adney y Baker (1996), que afirman “si el procedimiento es seguido cuidadosamente, debería dar las mismas lecturas numéricas aproximadas obtenidas por otros laboratorios. La precisión en los ensayos con papel de filtro puede verse afectada por las propiedades físicas inherentes de las preparaciones de celulasa”.

Los datos experimentales ver en anexos, Tabla A.7 y Fig. A.15. Los resultados operacionales óptimos: concentración de enzima, tiempo de reacción, máxima concentración de glucosa (como azúcar reductor, determinado por método DNS), Temperatura, pH, están reportados en Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Parámetros óptimos evaluados, para la Actividad enzimática de la Celulasa

Temperatura = 50 °C; pH = 4.6 (buffer Citrato sódico); tiempo reacción = 60 minutos Actividad enzimática = 84.1 (FPU/mL); [Glucosa] = 2.0 (mg/mL) dilución de enzima Celulasa = 0.0044		
Modelo de Monod $r_x = \frac{\alpha_1 C_s}{\alpha_2 + C_s};$ Evaluado mediante técnicas de Optimización, con Solver.	dilución enzima Celulasa (1:200) $r_{x1} = \frac{0.0353 C_{s1}}{-0.0462 + C_{s1}};$ Zmín = 0.043754	Dilución de enzima Celulasa (1:400) $r_{x2} = \frac{0.03491 C_{s2}}{-0.0458 + C_{s2}};$ Zmín = 0.113162

Ref.: obtenidos aplicando procedimiento experimental IUPAC, Adney B. & Baker J. (1998).

Asimismo; aplicando método de Optimización con aplicación Solver de Excel, es posible calcular los parámetros de la ecuación de Monod para esta reacción enzimática. En la misma Tabla 4.9, están reportados los valores óptimos de los parámetros calculados para el modelo cinético de Monod, con su correspondiente valor mínimo de error de Optimización.

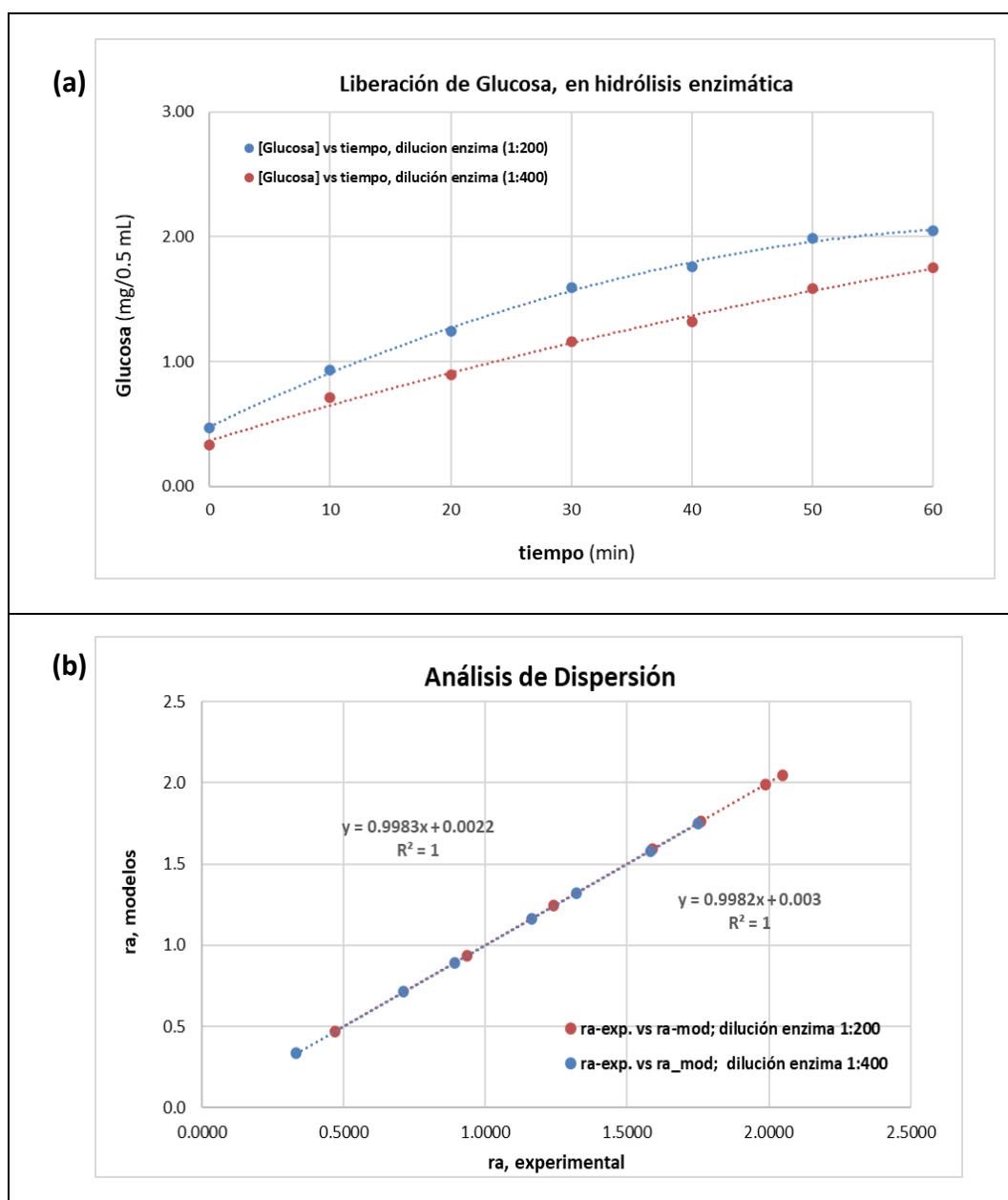


Figura 4.15. Perfiles: (a) Evolutivo de la reacción enzimática; (b) Linealidad de Pearson, al evaluar modelo de Monod.

4.2.2 El hidrolizado enzimático de la biomasa microalgal

La hidrólisis enzimática por acción de la celulasa fue realizada para las condiciones de “biomasa seca *in natura*” y “biomasa seca molida” del cultivo de *P. cruentum*, adaptando al presente proceso la metodología desarrollada por Shokrkar *et al.*, (2017, 2018) y Kim *et al.*, (2017); con las condiciones operacionales obtenidas durante la evaluación de la Actividad Enzimática del complejo Celulasa, descrita en sección anterior. Los resultados son mostrados a continuación:

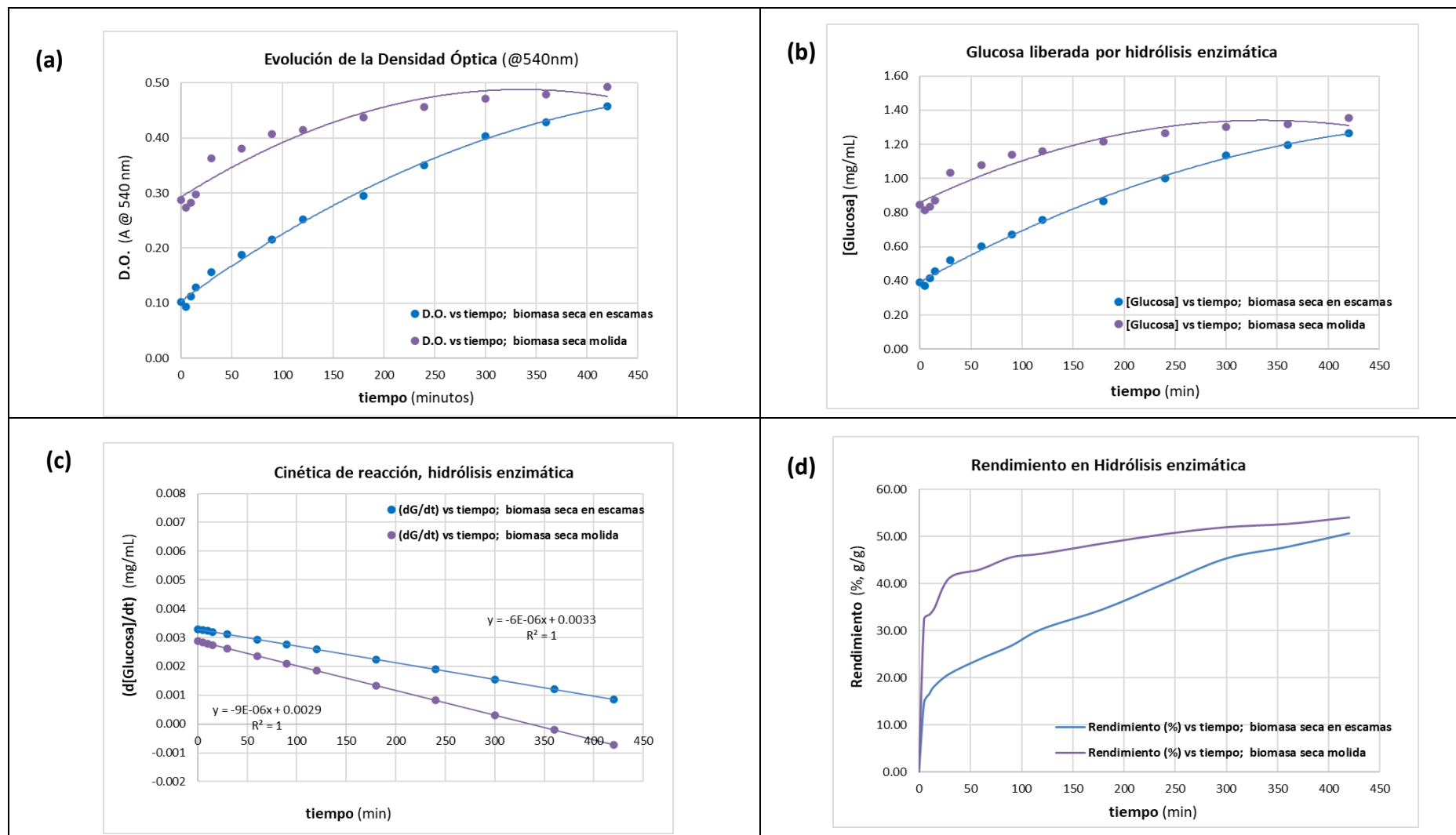


Figura 4.16. Perfiles de hidrólisis enzimática de la biomasa seca de *P. cruentum*, “in natura” y “molida”, con dilución enzima 1:200.

En la Fig. 4.16 puede observarse que la máxima efectividad en la sacarificación es lograda con la biomasa seca molida; es decir, la hidrólisis enzimática, aparte de las condiciones de la reacción (Temperatura, pH, agitación, concentración de enzima, tiempo de reacción) depende fuertemente de la naturaleza química y física del sustrato, la biomasa molida ofrece una mayor área específica y que es aprovechado por las enzimas para catalizar mejor la reacción. Los resultados experimentales y valores calculados de parámetros son reportados en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. *Hidrólisis enzimática biomasa microalgal, sin y con pretratamiento mecánico*

Parámetros	biomasa microalgal “seca in natura”	biomasa microalgal “seca molida”
[Glucosa] =	1.267 (mg/mL); D.O. = 0.458 (540 nm)	1.353 (mg/mL); D.O. = 0.493 (540 nm)
Rendimiento (%) =	50.66 % (g-glucosa/ g- sustrato)	54.11 % (g-glucosa/ g- sustrato)
Temperatura = 50 - 51 (°C); pH = 4.6 – 4.8 (buffer Citrato sódico); agitación = 200 rpm		
dilución de enzima Celulasa = 0.0050 (1:200); tiempo reacción = 8 horas, [Sustrato] = 50 (g/L)		
Modelo de Monod $r_x = \frac{\alpha_1 C_s}{\alpha_2 + C_s};$ Método de Optimización, con Solver de Excel.	$r_{x1} = \frac{0.1691 C_{s1}}{-1.3290 + C_{s1}};$ Zmín = 0.014341	$r_{x2} = \frac{0.4165 C_{s2}}{-0.8560 + C_{s2}};$ Zmín = 0.007302

Asimismo; la efectividad del proceso de hidrólisis enzimática de biomasa microalgal de *P. cruentum* seca molida fue evaluada para tres tipos de diluciones del cóctel enzimático Celulasa (1:100, 1:300 y 1:400). Los resultados, para estas condiciones de dilución, son reportados en la Tabla 4.10 y Fig. 4.17 que se describe:

Tabla 4.10. *Hidrólisis enzimática biomasa microalgal, con dilución de enzima variable*

Factor	dilución de enzima (1:100)	dilución de enzima (1:300)	dilución enzima (1:400)
[Glucosa] =	1.052 (mg/mL)	0.887 (mg/mL)	0.734 (mg/mL)
D.O. =	0.371 (@ 540 nm)	0.304 (@ 540 nm)	0.242 (@ 540 nm)
Enzima =	0.0050	0.0033	0.0025
Rendimiento	48.94 % (g-azúcar/ g-sustrato)	35.76 % (g-azúcar/ g-sustrato)	30.84 % (g-azúcar/ g-sustrat)
Temperatura = 50 - 51 (°C); pH = 4.6 – 4.8 (buffer Citrato); agitación = 200 rpm; tiempo reacción = 7 h.			
Modelo de Monod método de Optimización, con Solver	$r_{x1} = \frac{0.4533 C_{s1}}{-0.6263 + C_{s1}};$ Zmín = 0.001379	$r_{x2} = \frac{0.295224 C_{s2}}{-0.8458 + C_{s2}};$ Zmín = 0.002964	$r_{x3} = \frac{0.2176 C_{s3}}{-0.9976 + C_{s3}};$ Zmín = 0.000741

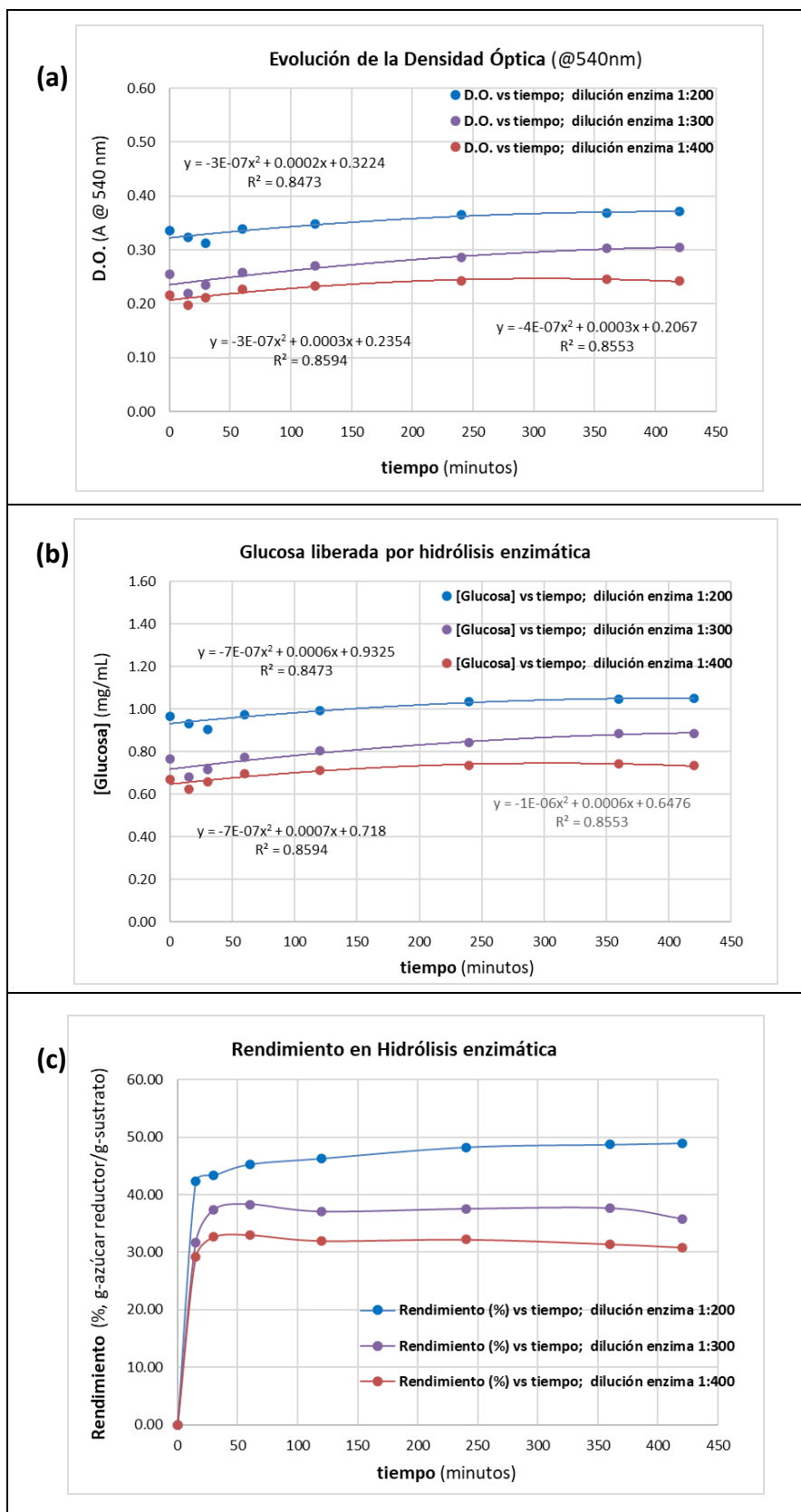


Figura 4.17. Perfiles de hidrólisis enzimática de biomasa seca de *P. cruentum*, molida, dilución enzima 1:200 - 1:400

Análogamente al caso anterior, en la Fig. 4.17 puede observarse que la máxima efectividad en la sacarificación es lograda con dilución de enzima celulasa 1:200 (menos diluida, mayor concentración y alto rendimiento) y la menor efectividad con dilución de enzima 1:400 (más diluida, menor concentración y bajo rendimiento); es decir, la hidrólisis enzimática, aparte de las condiciones operacionales (agitación, pH, Temperatura, tiempo reacción) también depende fuertemente de concentración de la enzima. Los resultados experimentales directos, y valores calculados de parámetros de Monod, son reportados en la Tabla 4.10. Además; según reportes de la literatura, Shokrkark *et al.* (2017, 2018) para una concentración de sustrato 50 g/L (biomasa de una mezcla de cepas microalgas) alcanzaron rendimiento del 57%, después de 72 horas de hidrólisis enzimática con cóctel compuesto por cuatro tipos de enzimas (glucosidasa, celulasa, amilasa, y amiloglucosidasa), manifiestan que un incremento en la concentración del sustrato mayor a 50 (g/L) disminuye el rendimiento; mientras que Kim *et al.* (2014) usando sustrato biomasa de microalga *C. vulgaris*, alcanzó rendimientos de 52.2 % después de 9 horas, y 69.9 % en 72 horas de reacción de hidrólisis enzimática por efecto de la mezcla de enzimas celulasa y amilasa. Por tanto; los resultados obtenidos en la presente investigación comparativamente están dentro de los valores estimados aceptables.

4.3 EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE LA BIOMASA MICROALGAL DE *Porphyridium cruentum*

El proceso de fermentación, de la biomasa microalgal de *P. cruentum* sacarificada, se realizó en matraces Erlenmeyers de 250 mL de capacidad. En esta etapa para obtener bioetanol, producto de la fermentación de azúcares reductores, la levadura *S. stipitis* fue utilizada, los inóculos fueron preparados en un medio nutricional líquido, ver anexos Tabla A.11, luego activados a 30°C y 150 rpm de agitación en el shaker, dejándolo crecer hasta obtener las condiciones requeridas. Los volúmenes de trabajo fueron 30 – 50 mL. Deben tomarse todas las medidas de seguridad y sanitización, para evitar efectos contaminantes por microorganismos extraños. En el proceso de fermentación, muestras de 1 mL fueron tomadas, desde el inicio del proceso y cada cierto tiempo, para medir las concentraciones de azúcares en el sustrato con método DNS, y la cantidad de bioetanol producido mediante cromatografía de gases en un equipo 6890-GC Agilent Technologies.

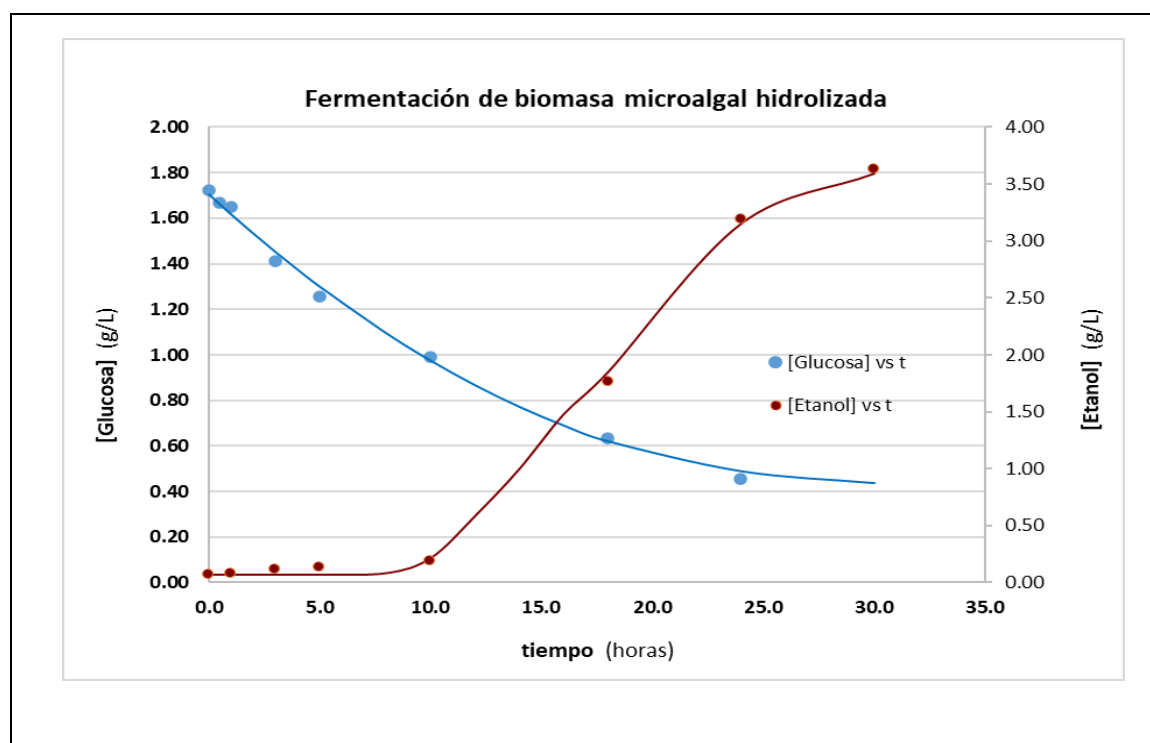


Figura 4.18. Evolución del proceso de fermentación del hidrolizado de la biomasa de *P. cruentum*, utilizando *S. stipitis*.

La Fig. 4.18 muestra la evolución de la fermentación del hidrolizado de la biomasa microalgal de *P. cruentum* utilizando levadura *S. stipitis*, al incrementarse el tiempo la concentración de azúcares disminuye y del etanol producido aumenta, después de 30 horas de fermentación se alcanzó [etanol] = 3.6356 (g/L). El análisis de cromatografía GC-MS del etanol obtenido, en tiempos diferentes de fermentación, es mostrado en la Fig. 4.19, observándose el incremento de su concentración.

Kim *et al.* (2014), empleando hidrolizado de *C. vulgaris*, alcanzó rendimientos de 89 % en 48 horas de fermentación con *S. cerevisiae*. Agustini & Febran, (2019), utilizando hidrólisis ácida (H_2SO_4 y HNO_3) para la biomasa de *P. cruentum*, obtuvieron rendimientos de 34.5% y 14.8% de etanol, respectivamente, en 120 horas de fermentación con *S. cerevisiae*; asimismo, afirman que casi toda la mitad de la glucosa contenida en el sustrato se consume después de 24 horas. Shokrkar *et al.* (2017, 2018), informa rendimientos de 4.96 - 6.01 g/L de etanol, obtenido de un hidrolizado enzimático de biomasa microalgal mezclada de varias especies, en 48 horas de fermentación con *S. cerevisiae*.

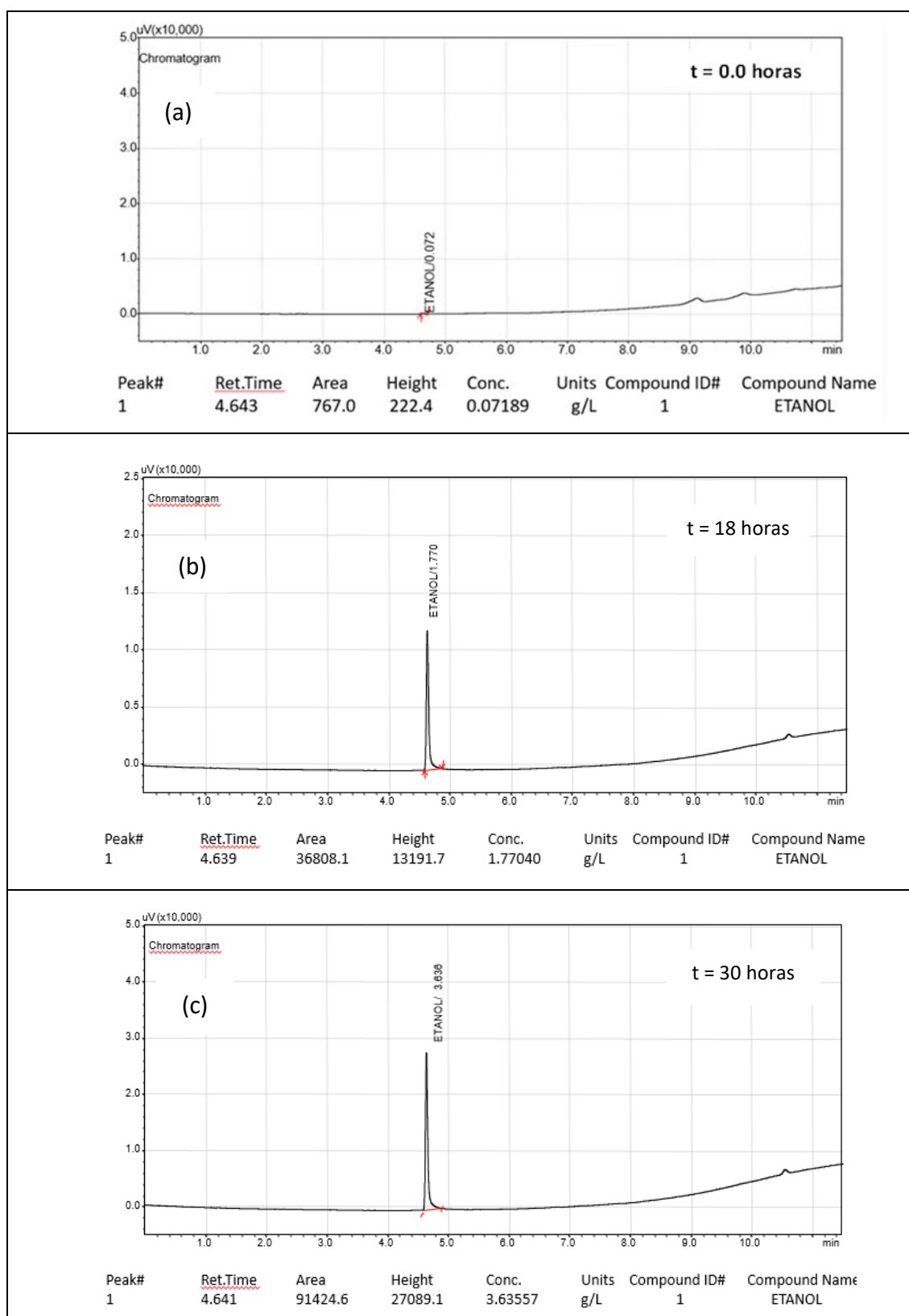


Figura 4.19. Espectros de masa del Etanol, a diferentes tiempos de fermentación del hidrolizado de la biomasa de *P. cruentum*.

Ref.: proporcionado por Instituto de Investigación y Tecnología Agroindustrial IITA-UNS, a solicitud de autor.

Tabla 4.11. Compendio comparativo de resultados, para el proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal

ETAPA	INDICADORES / Fuentes	Kim <i>et al.</i> (2014)	Shokrkar <i>et al.</i> (2017-2018)	Agustini & Febran (2019)	Luca <i>et al.</i> (2023)	Jimenez E. (2024)
CULTIVO	Cepa =	<i>Chlorella vulgaris</i>	Mezcla de microalgas	<i>P. cruentum</i>	<i>P. cruentum</i>	<i>Porphyridium cruentum</i>
	medio + nutriente =	agua mar + BBM	agua mar + Jaworski	agua mar + Johnson	agua mar + Guillard F/2	agua mar + Guillard F/2
	Población celular =	n.d.	---	3.38 - 4.41 x 10 ⁶	12.10 x 10 ⁶ (cél. /mL)	27.84 x 10 ⁶ (cél. /mL)
	Productividad =	---	---	---	--	9.978 x 10 ⁶ (cél. /mL-día)
	Rendimiento =	---	≈ 1.5 g/L	---	1.5 g/L	1.152 - 1.419 g/L
	Velocidad específica =	---	---	---	--	0.3439 (días ⁻¹)
	Contenido carbohidratos =	16.0 - 22.4 %	---	20.82 % carbohidratos	12.34 – 24.75, % lípidos	16.4% glucosa, 23.2% total
	días de cultivo =	14 días	12 días	10 días	8 – 10, días	6/8 días
HIDRÓLISIS	Método de hidrólisis =	Hidrólisis Enzimática	Hidrólisis enzimática	Hidrólisis ácida	---	Hidrólisis Enzimática
	Agente =	Celulasa + pectinasa	Glucosidasa+Celulasa+amilasa	H ₂ SO ₄ , HNO ₃ , (1-3%)	---	Celulasa
	Actividad enzimática =	0.122 (celulasa) FPU/mg proteína	1000 U/g, 145000, 600 AGU/mL	---	---	84.1 FPU/mL
	Dilución de enzima =	0.24-0.94 mg prot/mg (pectinasa)	---	---	---	1:200
	[sustrato] =	1% (w/v)	50 g/L	5.0 g/L	---	50.0 g/L
	[glucosa] =	1.48 mg/mL	66.3 – 95.1 %	---	---	1.353 mg/mL
	Rendimiento =	35.7 % (9h), 69.9 % (72h)	0.951 g-gluc/ g-sust	---	23.74 % phycoeritrina	50.66 %, 54.11 %
	tiempo reacción =	72 h	9 h	60 minutos	---	8.0 h
	Temperatura =	50 °C	65 - 95 °C	100 °C	---	50 - 51 °C
	pH, (buffer citrato sódico) =	4.8	4.0 – 6.5	---	---	4.5 - 4.6
	agitación =	200 rpm	400 rpm	---	---	200 rpm
FERMENTACIÓN	Levadura =	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	---	<i>Scheffersomyces stipitis</i>
	sustrato =	200 mL	3mL hidrolisato+3mL levadura	100 mL	---	30 – 50 mL
	[etanol] =	78 – 89 %	4.96 - 6.01 g/L (76%)	34.5% (H ₂ SO ₄), 14.8% (HNO ₃)	---	3.6356; (≈5.8170 g/L,48h).
	tiempo fermentación =	48 h.	24 – 48 h.	120 h. (5 días)	---	30 h.
	Temperatura =	30 °C	30 °C	20 °C	---	30 °C
	pH, (buffer citrato sódico) =	4.8	4.6 – 6.5	4.2	---	4.5 – 4.6
	agitación =	200 rpm	150 rpm	---	---	150 rpm
	PRODUCTO FINAL	bioetanol	bioetanol	bioetanol	lípidos, pigmentos	bioetanol

Ref.: Información recopilada y adaptada por el autor (Jimenez E. M., 2024), de las fuentes citadas. **n.d.:** no disponible.

La Tabla 4.11 reporta datos comparativos, estructurados por etapas del proceso, con datos recopilados de diversas publicaciones en la literatura, relacionados con el presente estudio. A partir de los resultados observados, entre las ventajas más notables a favor del proceso de producción de etanol de tercera generación, utilizando microalgas como materia prima, podemos afirmar:

- ✓ El cultivo microalgal tiene una duración promedio de 8 a 12 días. Dependiendo de la especie, y condiciones de cultivo, es posible inducir la generación de gran cantidad de biomasa microalgal, con ciertas características de concentraciones requeridas de sus componentes bioquímicos (carbohidratos, lípidos, proteínas, pigmentos, etc.)
- ✓ En la sacarificación, es más favorable utilizar la hidrólisis enzimática, en caso de hidrólisis química trabajar con bajas concentraciones para evitar situaciones contaminantes no deseadas. El factor económico también debe ser evaluado.
- ✓ El utilizar la levadura *S. stipitis*, favorece la fermentación de mayor cantidad de azúcares reductores, comparado con la *S. cerevisiae*; y por ende aumenta la capacidad de producir etanol en menor tiempo.

Los procesos tecnológicos para producir etanol son similares, la diferencia radica en el tipo de materia prima a utilizar, la cual debe contener carbohidratos (celulosa y almidón) acumulados en sus paredes y estructura interna. Para producir bioetanol de tercera generación, a partir de microalgas, el proceso consta de las etapas siguientes: I) cultivo de microalgas, II) sacarificación mediante hidrólisis de biomasa microalgal, y III) fermentación del hidrolizado.

Al término del análisis y discusión realizado, consideramos haber alcanzado los objetivos propuestos y resuelto las interrogantes del problema de investigación. El procedimiento experimental se desarrolló según diseño planificado. Los resultados obtenidos, muy halagadores, ratifican que los modelos matemáticos conceptuales y los correlacionales, utilizados para validar los datos experimentales adquiridos, describen con buena aproximación la fenomenología operacional. Por tanto, el estudio realizado representa una herramienta útil generadora de conocimientos, para analizar y escalar el proceso de producción de etanol de tercera generación, también como referencia para la evaluación de procesos similares.

Capítulo V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- 5.1.1.** El estudio demostró que, disponiendo de una sólida base teórica y con evidencia experimental, es posible la extracción de azúcares y producir bioetanol de tercera generación desde biomasa microalgal de *P. cruentum*.
- 5.1.2.** En el cultivo controlado de *P. cruentum*, los valores óptimos de las variables operacionales determinados mediante el Método de Superficie de Respuesta, fueron: Intensidad de luz LED 27.97 W, 1.84 LPM de aire, dosificación de glucosa 0.67 g/L. Obteniéndose, para cultivo 500mL: población 27.84×10^6 (células/mL), rendimiento 1.419 g-biomasaSeca/L, velocidad específica 0.3439 días^{-1} , productividad 9.978×10^6 (células/mL-día), parámetros del modelo de crecimiento celular de Gompertz-Makeham ($a = 2.5968$, $b = 1.3249$, $c = 0.9499$). Las variables intervinientes: Temperatura (22-27.5 °C), pH (7.0 - 9.0) y salinidad (37-38 %), se mantuvieron dentro del rango de valores previstos en la literatura.
- 5.1.3.** El contenido de glucosa en la biomasa microalgal seca total fue 16% aprox. La adición de carbono orgánico (glucosa), como suplemento nutricional, coadyuvó a aumentar la velocidad de crecimiento poblacional de la biomasa microalgal en el cultivo, acumulando más carbohidratos, generalmente como exopolisacáridos.
- 5.1.4.** El complejo de *Celulasa*, utilizado en la hidrólisis, tuvo una Actividad enzimática de 84.1 FPU/mL, para una dilución de enzima 1:250 y [Glucosa] = 2.0 mg/mL; valores obtenidos en las condiciones operacionales óptimas de 50 °C, pH = 4.6 (buffer de Citrato sódico), y en una hora de termorreacción.

- 5.1.5.** La hidrólisis enzimática proporcionó 1.267 mg/mL y 1.353 mg/mL de azúcares reductores, desde la biomasa microalgal seca natural y molida respectivamente. Los rendimientos fueron 50.66% y 54.11% (g-azúcares reductores/g-sustrato), respectivamente, en ocho horas de termorreacción; demostrando que éste único paso de hidrólisis es suficiente para la sacarificación de la biomasa. Además, que es menos tóxica que la hidrólisis química (ácida o alcalina).
- 5.1.6.** La fermentación del hidrolizado sacarificado, produjo 3.6356 (g/L) de bioetanol, en 30 horas de fermentación con *S. stipitis*. Además, la *S. stipitis* puede fermentar mayor cantidad de azúcares reductores, como las pentosas, que la *S. cerevisiae*; con la capacidad de producir etanol.
- 5.1.7.** En la evaluación fenomenológica del proceso, modelos matemáticos apropiados diversos fueron utilizados y con buena precisión de cálculos para los resultados. El crecimiento poblacional celular puede predecirse utilizando modelo Logístico, de Gompertz-Makeham, y también correlación polinómica de 4º orden. El Método de Superficie de Respuesta es útil para encontrar las condiciones óptimas del crecimiento celular en cultivo microalgal. El método de linealidad es utilizado para evaluar el rango de la enzima *Celulasa* y su actividad correspondiente. La ecuación de Monod, en paralelo con técnicas matemáticas de Optimización, permitió evaluar la data experimental adquirida y obtener los valores de los parámetros cinéticos *K_m* y *V_{max}* de la enzima *Celulasa*.

5.2. RECOMENDACIONES

- 5.2.1. Aprovechar los resultados obtenidos para consolidar esta plataforma tecnológica y proseguir estudios afines; reconociendo la importancia de la cepa *P. cruentum* como materia prima para obtener valiosos productos bioactivos, como: bioetanol, pigmentos (ficoeritrina), polisacáridos (xilosa, glucosa, galactosa, manosa, etc.), entre otros. Así como también, aprovechar los subproductos (ácidos orgánicos y alcoholes superiores) generados en la hidrólisis enzimática y durante la fermentación del hidrolizado de la biomasa microalgal.
- 5.2.2. Evaluar otros nutrientes alternativos en cultivo de *P. cruentum*, para reemplazar el medio Guillard F/2 utilizado en este estudio, que permita alcanzar un desarrollo eficiente del cultivo microalgal y también de menor costo para que el proceso sea económicamente competitivo.
- 5.2.3. Evaluar otras cepas de microalgas, que contengan cantidades apreciables de carbohidratos y permitan obtener productos similares, tales como *Spirogira sp.* que tiene la ventaja de no contener lignina, *Scenedesmus*, *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis* y *Dunaliella salina*.
- 5.2.4. Ensayar con otras enzimas termoestables, como: *b-glucosidasa*, *a-amilasa*, *pectinasa* y *la amiloglucosidasa*, que podrían hidrolizar eficazmente la biomasa de microalgas para la producción de etanol.
- 5.2.5. Es muy importante mantener las condiciones de salubridad y sanitización, en todas las etapas del trabajo experimental, para evitar contaminación por agentes microbiológicos externos que pueden afectar la cepa y el proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acien F.G., Reis A., Wijffels R.H., Barbosa M., Verdelho V., & Llamas B. (2021). *The role of microalgae in the bioeconomy*. New BIOTECHNOLOGY, 61: 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.011>
- Acleto O. César y Endo A. Jorge. (1977). *Las especies peruanas de PORPHYRA (Rhodophyta, Bangiales), I. Taxonomía y distribución geográfica*. PUBLICACIONES del MUSEO DE HISTORIA NATURAL "JAVIER PRADO", UNMSM-Lima-Perú. BOTANICA, Serie B, No. 29: 1-20. https://museohn.unmsm.edu.pe/docs/pub_botanica/Publicaciones%20Bot%C3%A1nica%20Serie%20B%20N%C2%B0%2029.pdf
- Adney B. & Baker J. (1998) *Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. Technical Report NREL/TP-510-42628 (January 2008) <https://doi.org/10.7773/cm.v36i4.1732>
- Aguilar-Samanamud C. (2009). *Avances en la Determinación de la biomasa microalgal potencialmente acumuladora de lípidos para la obtención de combustible*. Instituto del Mar del Perú-Ciencia y Tecnología: Proyecto FINCyT (Contrato N° 025-FINCyT-PIBAP-2007).
- Agustini N.W., & Febrian N., (2019). *Hidrolisis biomassa mikroalga Porphyridium cruentum menggunakan asam (H₂SO₄ dan HNO₃) dalam produksi bioetanol*. Jurnal Kimia dan Kemasan, 41(1):1-10. <http://dx.doi.org/10.24817/jkk.v41i1.3962>
- Alam, F., Mobin, S., & Chowdhury, H. (2015). *Third Generation Biofuel from Algae*. Procedia Engineering, 105: 763-768. <http://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.05.068>
- Altimari P., Di Caprio F., Brasiello A., & Pagnanelli F. (2023). *Production of microalgae biomass in a two-stage continuous bioreactor: Control of microalgae-bacteria competition by spatial uncoupling of nitrogen and organic carbon feeding*. Chemical Engineering Science (272), 118604, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2023.118604>
- Andreeva A., Budenkova E., Babich O., Sukhikh S., Dolganyuk V. Philippe Michaud P., & Ivanova S. (2021). *Influence of Carbohydrate Additives on the Growth Rate of Microalgae Biomass with an Increased Carbohydrate Content*. Mar. Drugs (19), 381:1-18. <https://doi.org/10.3390/md19070381>
- Aro E.M. (2016). *From first generation biofuels to advanced solar biofuels*. Ambio, 45 (Suppl.1): 24-31. <http://doi.org/10.1007/s13280-015-0730-0>
- Arredondo-V. B., Voltolina D., Zenteno T., Arce M., y Gómez G. (2017). *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de Biomasa Microalgal*. 2da edición, Centro de Investigaciones Biológica - CIBNOR. https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/539/1/arredondo_b.pdf.
- Ávila-Peltroche J. & Padilla-Vallejos J. (2020). **Review. The seaweed resources of Peru**. Botanica Marina; 63(4): 381-394. <https://doi.org/10.1515/bot-2020-0026>
- Bader A.N., Sanchez-Rizza L., Consolo V.F., Curatti L. (2020). *Efficient saccharification of microalgal biomass by Trichoderma harzianum enzymes for the production of etanol*. Algal Research, 48: 101926. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101926>
- Barsanti L., & Gualtieri P. (2014). *ALGAE: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Second edition; Taylor & Francis Group, CRC Press.
- Barten R.J., Wijffels R.H., & Barbosa M.J. (2020). *Bioprospecting and characterization of temperature tolerant microalgae from Bonaire*. Algal Research (50), 102008. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102008>

- Bernaerts, T.M., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh, K., Vandionant, S., Foubert, I., Hendrickx, M., & van Loey, M.A. (2018a). *Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides*. *Algal Research*, 32, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.017>
- Bernaerts, T.M., Kyomugasho, C., van Looveren, N., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M., & van Loey, M. (2018b). *Molecular and rheological characterization of different cell wall fractions of *Porphyridium cruentum**. *Carbohydrate Polymers*, 195, 542-550. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.001>
- Bharathiraja B., Jayamuthunagai J., Chakravarthy M., Ranjith K.R., Yogendran D., & Praveen K.R. (2015). *Algae - Promising Future Feedstock for Biofuels*. In: Singh B., Baudh K. & Bux F., (Eds), *Algae and Environmental Sustainability* (Developments in Applied Phycology 7). (Chap 1, pp.: 1-8). Springer India. DOI: 10.1007/978-81-322-2641-3_1
- Bibi R., Ahmad Z., Imran M., Hussain S., Ditta A., Mahmood S., & Khalid A. (2017). *Algal bioethanol production technology: A trend towards sustainable development*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71: 976-985. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.126>
- Boffill-Rodríguez, Y., García-Rodríguez, A., & Castellanos-Estupián, J. (2012). *Estimación cuantitativa preliminar de índices de producción de biomasa microalgal a partir de la reacción de fotosíntesis*. *Tecnología Química*, XXXII (1), 26-33. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445543775004>
- Borovkov A.B., Gudvilovich I.N., Lelekov A.S., Anna L., & Avsiyan A.L. (2023). *Effect of specific irradiance on productivity and pigment and protein production of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) semi-continuous culture*. *Bioresource Technology*, (374), 128771, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128771>
- Borowitzka M.A., Beardall J., & Raven J.A. (2016). *The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing. DOI 10.1007/978-3-319-24945-2
- Castillo C., Augusto. (1994). *Estudio de la fermentación alcohólica de hidrolizado de car con pichia stipitis*. (Tesis de grado, Maestría en Ingeniería Bioquímica). Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
- Chaudhary L., Pradhan P., Soni N., Singh P., & Tiwari A. (2014). *Algae as a Feedstock for Bioethanol Production: New entrance in Biofuel World*. *International Journal Chemical Technology Research*, 6(2): 1381-1389. [http://sphinxσαι.com/2014/CTVOL6/CT=62\(1381-1389\) AJ14.pdf](http://sphinxσαι.com/2014/CTVOL6/CT=62(1381-1389) AJ14.pdf)
- Chen C-Y., Zhao X-Q., Yen H-W., Ho S-H., Cheng C-L., Lee D-J., Bai F-W., & Chang J.S. (2013). *Microalgae-based carbohydrates for biofuel production*. *Biochemical Engineering Journal*, 78: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>
- Chisti Y. (2007). *Biodiesel from microalgae*. Elsevier Inc. *Biotechnology Advances*, 25:294-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chowdhury H., Loganathan B., Mustary I., Alam F., & Mobin S. (2019). *Algae for biofuels: The third generation of feedstock*. In: Basile A. y Dalena F., (Eds). *Second and Third Generation of Feedstocks - The Evolution of Biofuels*. (Chap 12, pp.: 323-344). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815162-4.00012-4>
- Cook T.D., y Reichardt C.S. (2005). *Métodos cualitativos y cuantitativos en investigación evaluativa*. 5ª. edición. España: Editorial Morata.
- Costa P. (2017). *Aumento das Atividades das Glicohidrolases produzidas por *Trichoderma Harzianum* por Otimização de Meio de Cultura e Melhoramento Genético Clássico visando a viabilidade do Etanol 2G*. (Tese Doutorado, Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas-Brasil. <https://www.unicamp.br/unicamp/teses/2017/07/03/aumento-das-atividades-das-glicohidrolases-produzidas-por-trichoderma-harzianum>
- Cuellar-Bermúdez S.P., García-Pérez J.S., Rittmann B.E., y Parra-Saldivar R. (2014). Conference report - *Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: an approach on fuel gases utilization for third generation Biofuels*. *Journal of Cleaner Production*, 98: 53-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.03.034>
- Dalena F., Senatore A., Basile M., Marino D., & Basile A. (2019). *From sugar to ethanol-from agricultural wastes to algal sources: An overview*. In: Basile A. y Dalena F., (Eds), *Second and Third Generation of Feedstocks, of Biofuels*. (Chap 1, 3-34). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815162-4.00001-X>
- Das D. & Varanasi J. (2019). *Fundamentals of Biofuel Production Processes*. Taylor & F. Group, CRC Press.
- Devarapalli M., & Atiyeh H.K. (2015). *A review of conversion processes for bioethanol production with a*

focus on syngas fermentation. Biofuel Research Journal, 7: 268-280.
https://www.biofueljournal.com/article_10157_0.html

- Enamala M.K., Enamala S., Chavali M., Donepudi J., Yadavalli R., Kolapalli B., Aradhyula T.V., Velpuri J., & Kuppam C. (2018). **Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae.** Renewable Sustainable Energy Review, 94:49-68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.012>
- Fan L., Zhang H., Lia J., Wang Y., Leng L., Lia J., Yao Y., Lua Q., Yuan W., and Zhou W. (2020). **Algal biorefinery to value-added products by using combined processes based on thermochemical conversion: A review.** Algal Research, 47: 101819. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101819>
- Franco-León J., Acleto-Osorio C., Vicente Chambilla-Quispe V., y Quispe L. (1995). **Estudio de las algas Rhodophyta del litoral de Tacna (boca del río, Vila-Vila y Cánepa).** Revista Ciencia y Desarrollo, UNJBG Tacna-Perú, 5-11. <https://revistas.unjbg.edu.pe/index.php/cyd/article/download/1/1/4>
- Fernandes de Souza M., Almenara-Rodrigues M.A., Pereira-Freitas S., Pinto da Silva Bon E. (2020). **Effect of milling and enzymatic hydrolysis in the production of glucose from starch-rich *Chlorella sorokiniana* biomass.** Algal Research, 50: 101961. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101961>
- Gallego R., Martínez M., Cifuentes A., Ibañez E., & Herrero M. (2019). **Development of a Green Downstream Process for the Valorization of *Porphyridium cruentum* Biomass.** Molecules, 24 (1564):1-13. <http://doi.org/10.3390/molecules24081564>
- Guillard, R.R.L. (1973). Division rates. En: Stein, J.R. (Ed.). **Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements.** Cambridge University Press, 289-313.
- Guillard, R. R. L. (1975). **Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates.** Culture of Marine Invertebrate Animals, 29-60. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. (1962a). **Studies on Marine Planktonic Diatoms I. use of *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran.** Canadian Journal of Microbiology, (8): 229-239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. (1962b). **Studies on Marine Planktonic Diatoms II. *Cyclotella nana* Hustedt for assays of vitamin B12 in seawater.** Canadian Journal of Microbiology, (8): 437-445. <https://doi.org/10.1139/m62-058>
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. (1962c). **Studies on Marine Planktonic Diatoms III. Some effects of temperature on respiration of five species.** Canadian Journal of Microbiology, (8): 447-453. <https://doi.org/10.1139/m62-057>
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2020). **AlgaeBase. Global algal database of taxonomic, nomenclatural and distributional information.** University of Galway, Ireland. <http://www.algaebase.org>.
- Guo M., Song W., & Buhain J. (2015). **Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, 42: 712-725. doi:10.1016/j.rser.2014.10.013
- Henríquez-Ramírez J.A. (2018). **Actividad antioxidante de las microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Pediastrum* sp. como respuesta a la radiación UV y altitud de origen.** (Tesis de grado, Ingeniero Pesquero). UNALM La Molina, Lima-Perú. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3615>
- Hernández D., Riaño B., Coca M., García-González M.C. (2015). **Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production.** Chem. Eng. Journal, 262: 939-945. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.049>
- Hernández-Pérez A., & Labbé J.I. (2014). **Microalgas, cultivo y beneficios.** Revista de Biología Marina y Oceanografía, 49(2):157-173. DOI: 10.4067/S0718-19572014000200001
- Hernández-Sampieri R., y Mendoza-Torres C.P. (2018). **Metodología de la Investigación - Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta.** McGraw-Hill Education.
- Ho O.S., Gun H.J., Kim Y., Hye H.J., Seop K.S., Hoon J.M., Suk J.H., Young K.N., Sub C.J., Byong Y.W., Young L.S., Hyung K.D., & Yong L.H. (2009). **Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions.** Journal of Bioscience and Bioengineering, 108(5):429-434. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.05.020>
- Ho S-H., Huang S-W., Chen C-Y., Hasunuma T., Kondo A., & Chang J-S. (2013). **Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock.** Bioresource Technology, 135: 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>

- Huayna D.L., Romero B.J., Guzmán S.W., y Basilio A. (2017). *Empleo del agua de mar con sanguaza en la producción de biomasa microalgas de nannochloropsis oceanica en condiciones de laboratorio*. Big Bang Faustiniiano, 6(4):5-10. <http://revistas.unjfsc.edu.pe/index.php/BIGBANG/article/view/173>
- IICA. (2014). *Uso y acceso a las energías renovables en territorios rurales. Informe Técnico de la Región Andina*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). http://biblioteca.olade.org/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=14498&shelfbrowse_itemnumber=15833#shelfbrowser
- IMARPE (2011). *COMPENDIO METODOLOGICO PARA LA OBTENCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL*. Convenio Imarpe-Fincyt. www.Imarpe.pe
- Jimenez-Escobedo, M.J. (2019). *FRACCIONAMIENTO AL VACÍO DE ACEITES ESENCIALES: Separación de limoneno*. (Tesis, Magister en Ingeniería Química). Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Perú. https://unmsm.ent.sirsi.net/client/es_ES/search/asset/37898/0
- Jimenez-Escobedo M. & Castillo, A. (2021). *Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles*. Scientia Agropecuaria, 12(2): 265-282. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.030>
- Khoo C.G., Dasan Y.K., Lam M.K., & Lee K.T. (2019). *Algae biorefinery: Review on a broad spectrum of downstream processes and products*. Bioresource Technology, 292 (121964):1-13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121964>
- Kim K.H., Choi I-S., Kim H-M., Wic S-G., & Bae H-J. (2014). *Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga Chlorella vulgaris by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation*. Bioresource Technology, 153:47-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.059>
- Kim H.M., Oh H-C., & Bae H-J. (2017). *Comparison of red microalgae (Porphyridium cruentum) culture conditions for bioethanol production*. Bioresource Technology, 33:44-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.040>
- Kim S-K. (Ed). (2015). *HANDBOOK OF MARINE MICROALGAE - Biotechnology Advances*. Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/book/9780128007761/handbook-of-marine-microalgae>
- Lackner M. (2015). *3rd Generation Biofuels: Bacteria and Algae as Sustainable Producers and Converters*. In: Chen W.Y., Suzuki T., Lackner M. (Eds). *Handbook of Climate Change Mitigation and Adaptation*. Springer. DOI:10.1007/978-1-4614-6431-0_90-1
- Li T., Xu J., Wu H., Jiang P., Chen Z., & Xiang W. (2019). *Growth and Biochemical Composition of Porphyridium purpureum SCS-02 under Different Nitrogen Concentrations*. Marine Drugs, 17(124):1-16. doi:10.3390/md17020124
- Luca R., Luca-Langellotti A., Verardo V., Martin-Garcia B., Oliviero M. & Masi P. (2024). *Sustainable Cultivation of Porphyridium cruentum via Agro-Industrial By-Products: A Study on Biomass and Lipid Enhancement*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, (60), 103341: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103341>
- Lutzu G.A., Zhang L., Zhang Z., & Liu T. (2017). *Feasibility of attached cultivation for polysaccharides production by Porphyridium cruentum*. Bioprocess Biosystem Eng., 40:73-83. DOI:10.1007/s00449-016-1676-8
- Martins A.O., Azimov U., & Burluka A. (2018). *Algae biofuel: Current status and future applications*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 90:316-337. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.067>
- Márquez-Corigliano D., Arakaki N., Gil-Kodaka P. & Tellier F. (2019). *Diversidad de especies de Porphyra y Pyropia (Bangiaceae, Rhodophyta) de Marcona (Ica, Perú) bajo la evidencia molecular Species diversity in Porphyra and Pyropia (Bangiaceae, Rhodophyta) from Marcona (Ica, Peru) according to molecular evidence*. Arnela, 26 (2): 623-642. https://www.researchgate.net/publication/335811867_Diversidad_de_especies_de_Porphyra_y_Pyropia_Bangiaceae_Rhodophyta_de_Marcona_Ica_Peru_bajo_la_evidencia_molecular_Species_diversity_in_Porphyra_and_Pyropia_Bangiaceae_Rhodophyta_from_Marcona_Ica_Peru
- Mat Aron, N.S., Khoo, K.S., Chew, K.W., Show, P.L., Chen, W., & Nguyen, T.H.P. (2020). *Sustainability of the four generations of biofuels – A review*. International Journal of Energy Research, 1-17. <http://doi.org/10.1002/er.5557>
- Medina-Cabrera E.V., Rühmann B., Schmid J., and Sieber V. (2020). *Characterization and comparison of*

- Porphyridium sordidum* and *Porphyridium purpureum* concerning growth characteristics and polysaccharide production. *Algal Research*, 49: 101931. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101931>
- Miller, G. (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mussatto S., Dragone G., Guimaraes P., Silva J., Carneiro L., Roberto I., Vicente A., Domingues L., & Teixeira J.A. (2010). *Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production*. Elsevier Inc., *Biotechnology Advances*, 28: 817-830. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>
- Nägeli Carl. (1849). *Gattungen einzelliger Algen, physiologisch und systematisch bearbeitet. Neue Denkschriften der Allg. Schweizerischen Gesellschaft für die Gesamten Naturwissenschaften* (Nuevos memorandos Soc. Gral Suiza de Ciencias Completas), 10 (7): i-viii, 1-139, pls I-VIII. https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=14589
- 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>
- Orrego-Moya, R. (2011). *Estado del arte y novedades de la bioenergía en el Perú*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Papini, M., Nookaew, I., Uhlén, M., & Nielsen, J. (2012). *Scheffersomyces stipitis: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 136. DOI:10.1186/1475-2859-11-136
- Patil V., Tran K-Q., & Giselsrød H.R. (2008). *Towards Sustainable Production of Biofuels from Microalgae*. *Int. Journal of Molecular Sciences*, 9(7): 1188-1195. DOI:10.3390/ijms9071188
- Préat N., Taelman S.E., De Meester S., Allais F., Dewulfa J. (2020). *Identification of microalgae biorefinery scenarios and development of mass and energy balance flowsheets*. *Algal Research* 45: 101737. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101737>
- Rempel A., de Souza S.F., Margarites A.C., Astolfi A.L., Radis S.R., Kunz A., Treichel H., & Colla L.M. (2019). *Bioethanol from Spirulina platensis biomass and the use of residuals to produce biomethane: An energy efficient approach*. *Bioresource Technology*, 288(121588): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121588>
- Rodríguez-Aliaga P. (2016). *Evaluación de tres medios de cultivo para el crecimiento poblacional de microalgas (Chlorella Sp.) y determinar el Potencial Energético como Bioetanol en la Región Ucayali*. (Tesis de pregrado, Ingeniero Ambiental), Universidad Nacional de Ucayali - Perú. <https://es.scribd.com/document/338029638/Proyecto-de-Tesis-UNU>
- Sánchez-Rizza L., Sanz S.M., Do Nascimento M., Salerno G.L., & Curatti L. (2017). *Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol*. *Algal Research*, 22:140-147. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.021>
- Sanz-Smachetti M.E., Coronel C.D., Salerno G.L., Curatti L. (2020). *Sucrose-to-ethanol microalgae-based platform using seawater*. *Algal Research*, 45: 101733. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101733>
- Shokrkar H., Ebrahimi S., & Zamani M. (2017). *Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture*. *Fuel*, (200): 380-386. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.03.090>
- Shokrkar H., Ebrahimi S., & Zamani M. (2018). *Enzymatic hydrolysis of microalgal cellulose for bioethanol production, modeling and sensitivity analysis*. *Fuel*, (228): 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.04.143>
- Singh N.K., & Dhar D.W. (2011). *Microalgae as second-generation biofuel. A review*. *Agronomy Sust. Developm*, 31:605-629. <http://doi.org/10.1007/s13593-011-0018-0>
- Singh R.S., Pandey A., & Gnansounou E., (Eds). (2017). *Biofuels - Production and Future Perspectives*. Taylor & Francis Group, CRC Press.
- Spiden E.M., Yap B.H., Hill D.R., Kentish S.E., Scales P.J., & Martin G.J. (2013). *Quantitative evaluation of the ease of rupture of industrially promising microalgae by high pressure homogenization*. *Bioresource Technology*, 140:165-171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.074>
- Suarez-Ruiz C.A., Zarate Baca S., van den Broek L.A.M., van den Berg C., Wijffels R.H., Eppink M.H.M. (2020). *Selective fractionation of free glucose and starch from microalgae using aqueous two-phase*

- systems*. Algal Research, 46: 101801. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101801>
- Taipabu M.I., Viswanathan K., Wu W., & Nagy Z.K. (2021). *Production of renewable fuels and chemicals from fats, oils, and grease (FOG) using homogeneous and heterogeneous catalysts: Design, validation, and optimization*. Chemical Engineering Journal, 424, 130199: 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130199>
- Távora H. Caleen. (1992). *Morfología y reproducción de Porphyra pseudolanceola Krishnamurthy (BANGIALES, RHODOPHYTA) en la costa peruana*. Rev. Per. Biol. 4(1-2): 5-15. https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v04_n1-2/pdf/a01.pdf
- Tejido-Núñez Y., Aymerich E., Sancho L., Refardt D. (2020). *Co-cultivation of microalgae in aquaculture water: Interactions, growth and nutrient removal efficiency at laboratory and pilot-scale*. Algal Research, 49: 101940. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101940>
- Tiwari A., Kiran T., & Pandey A. (2019). *Algae cultivation for biofuel production*. In: Basile A. & Dalena F. (Eds), *Second and Third Generation of Feedstocks-The Evolution of Biofuels*. (Chap. 14, pp: 383-403). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815162-4.00014-8>
- Vásquez, A.; Tamayo, J., y Salvador J. (Eds.) (2017). *La Industria de la Energía Renovable en el Perú-10 años de contribuciones a la mitigación del cambio climático*. Osinergmin. https://www.osinergmin.gob.pe/seccion/centro_documental/Institucional/Estudios_Economicos/Libros/Osinergmin-Energia-Renovable-Peru-10anios.pdf
- Velázquez-Lucio J., Rodríguez-Jasso R., Colla L., Sáenz-Galindo A., Cervantes-Cisneros D., Aguilar C.N., Fernandes B.D., y Ruiz H.A. (2018). *Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review*. Biofuel Research Journal, 17:780-791. DOI:10.18331/BRJ2018.5.1.5
- Vieira de Mendonça H., Assemany P., Abreu M., Couto E., Maciel A.M., Duarte R.L., Barbosa dos Santos M.G., Reis A. (2021). *Microalgae in a global world: new solutions for old problems?* Renewable Energy, Part 1, (165), 842-862. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.11.014>
- Vieira de Mendonça H., Assemany P., Abreu M., Couto E., Maciel A.M., Duarte R.L., Barbosa dos Santos M.G., Reis A. (2021). *Corrigendum to Microalgae in a global world: new solutions for old problems?* Renewable Energy, (167), 962-965. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.12.018>
- Wang J., Chen B., Rao X., Huang J. & Li M. (2007). *Optimization of culturing condition of Porphyridium cruentum using uniform design*. World J. Microbial Biotechnol., 23:1345-1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9369-8>
- Webb A., & Coates D. (2012). *Biofuels and Biodiversity*. Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Montreal, CBD Technical Series No. 65, 69 pages.
- Wichmann J., Lauersen K.J., & Kruse O. (2020). *Green algal hydrocarbon metabolism is an exceptional source of sustainable chemicals*. Current Opinion in Biotechnology, 61:28-37 <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.019>
- World Bioenergy Association. (2019). *WBA-Global Bioenergy Statistics*. <http://www.worldbioenergy.org>
- Yap J., Dumsday G., Scales J., & Martin G. (2015). *Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation*. Bioresource Technology, 184, 280-285. doi:10.1016/j.biortech.2014.11.049
- Zhu J., Rong J., & Zong B. (2013). *Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. A review*. Chinese Journal of Catalysis, 34: 80-100. DOI: 10.1016/S1872-2067(11)60497-X

ANEXOS

A.1. MATERIALES Y EQUIPOS	96
A.1.1. Materiales e instrumentos de laboratorio	96
A.1.2. Materia prima y reactivos químicos	97
A.1.3. Equipos de laboratorio y complementos varios	98
A.2. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	99
A.2.1. La cepa y el cultivo de microalga <i>Porphyridium cruentum</i>	99
A.2.2. Dinámica del crecimiento celular, conteo celular y densidad óptica	99
A.2.3. Cosecha de biomasa microalgal, método peso seco	100
A.2.4. Determinación de la Actividad de la enzima <i>Celulasa</i>	100
A.2.5. Determinación de Carbohidratos, en la biomasa microalgal	103
A.2.6. Hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal	104
A.2.7. Fermentación del hidrolizado enzimático, obtención de bioetanol 3G	104
A.3. INFORMACIÓN TÉCNICA.	105
A.3.1. Tablas y Figuras, de datos experimentales	105
A.3.2. Tablas y diagramas estadísticos	111
A.3.3. Tablas técnicas y Figuras varias, complementarias	117

A.1. MATERIALES Y EQUIPOS

A.1.1. Materiales e instrumentos de laboratorio

- a) Material de vidrio y afines.-** placas Petri, tubos de ensayo, pipetas graduadas y descartables, micropipetas, viales de vidrio y plástico, tubos falcon de 50 mL, Erlenmeyer, probetas, vasos de precipitados, envases y cristalería conexas, botellas de plástico de 1 y 3 L, mangueras 3/16", etc.

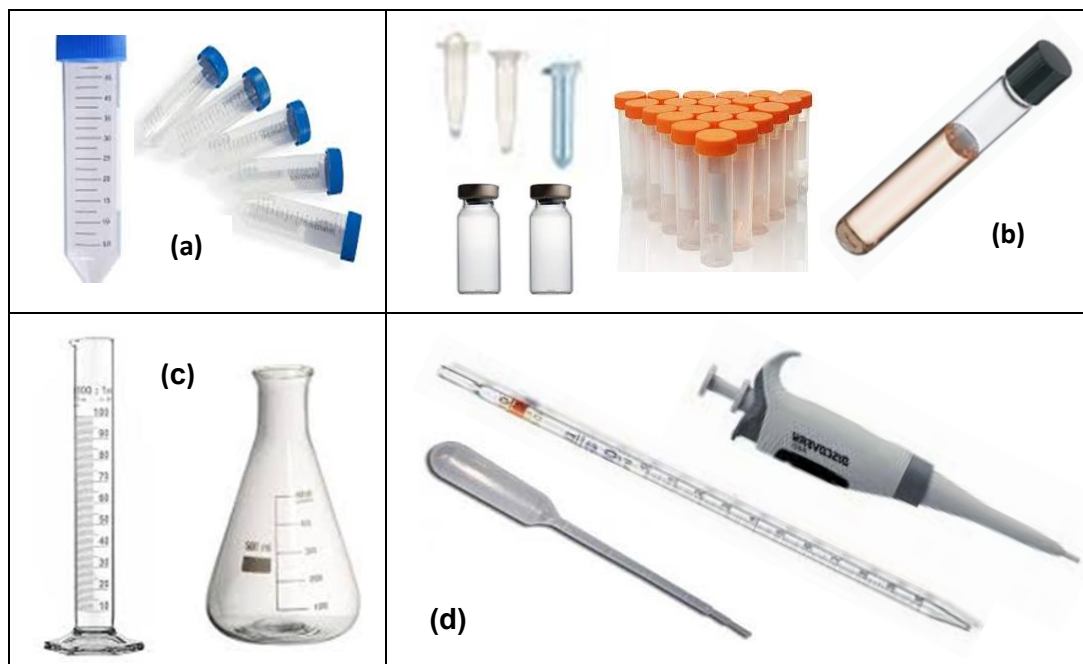


Figura A.1. Material de laboratorio, varios: (a) tubos Falcon; (b) tubos viales; (c) probeta y Erlenmeyer; (d) pipeta descartable, pipeta graduada y micropipeta.

- b) Instrumentación y otros.-** cámara Neubauer Marienfeld, termómetros, pH-metro, refractómetro de salinidad, flujómetro, válvulas de plástico, soportes y accesorios, etc.



Figura A.2. Instrumentos de laboratorio, varios: (a) cámara Neubauer; (b) pH-metro de mesa y portátil; (c) refractómetro de salinidad y termómetro digital; (d) flujómetro y válvulas.

A.1.2. Materia prima y reactivos químicos

- Cepa de microalgas *Porphyridium cruentum*, adquirida del Institute Algae Research and Supply Inc., 1405 Buena Vista - Carlsbad, CA 92008 USA, [www.http://AlgageResearchSupply.com](http://AlgageResearchSupply.com)
- Solución nutritiva F/2 (fórmula de Guillard y Rither), adquirida del Institute Algae Research and Supply Inc.
- Enzima: complejo *Celulasa* (NS22086), de laboratorio NOVOZYMES.
- Soluciones de glucosa, solución buffer de citrato de sodio, preparados según Norma NREL/TP-42628, (Adney y Baker, 1996).
- Reactivo DinitroSalicílico DNS, laboratorio Sigma.
- Agar-Agar, 1.5 % y 3%, preparada en laboratorio según protocolos.
- Levadura *Scheffersomyces stipitis* (*pichia stipitis*)
- Ácido acético, hidróxido de sodio.
- Agua de mar, de playa El Dorado - Nuevo Chimbote, salinidad 37-38% aprox; esterilizada según protocolos.
- Agua destilada.
- hipoclorito de sodio (lejía), material de limpieza varios.

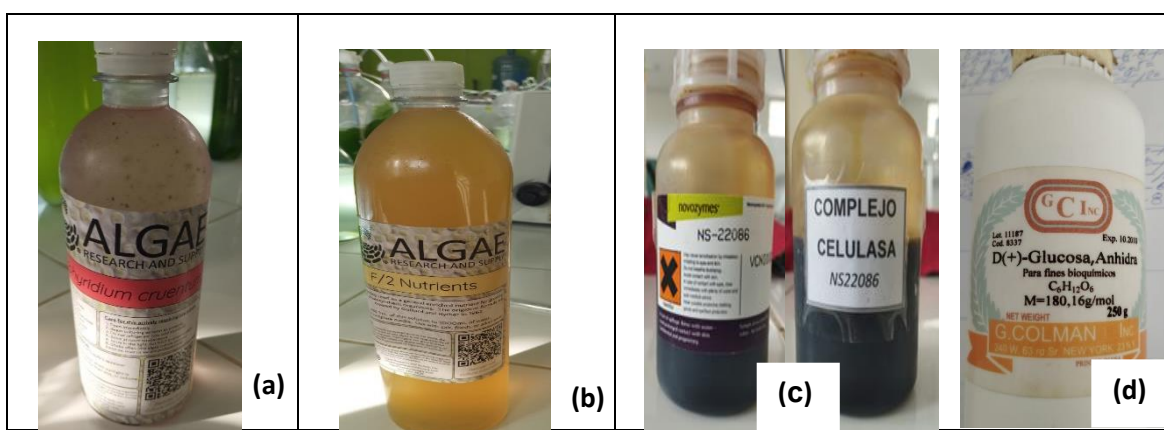


Figura A.3. (a) cepa de microalga *Porphyridium cruentum*; (b) medio nutriente F/2; (c) complejo enzimático Celulasa; (d) Glucosa anhidra.

A.1.3. Equipos de laboratorio y complementos varios

- a) **Equipos de laboratorio.-** microscopio electrónico MOTIC mod. Phantera, Espectrofotómetro Scientific mod. Génesis 20; centrifuga digital DATHAN Scientific Ce.D50.6; balanza analítica PRECISA XB-320M; pH-metro; agitador de plataforma Shakers Lab-Line Instruments; agitador vortex Thermolyne Maxi Mix II; Termoreactor HACH modelon DRB-200; sistema de enfriamiento, sistema de iluminación fluorescente y LED; baño de ultrasonido; ventilador de aire; estufa eléctrica.
- b) **Complementos varios.-** laptop Acer mod. Aspire 5, Intel Core i7 y 12 GB RAM; software con licencia académica (Excel, Polymath, Minitab).

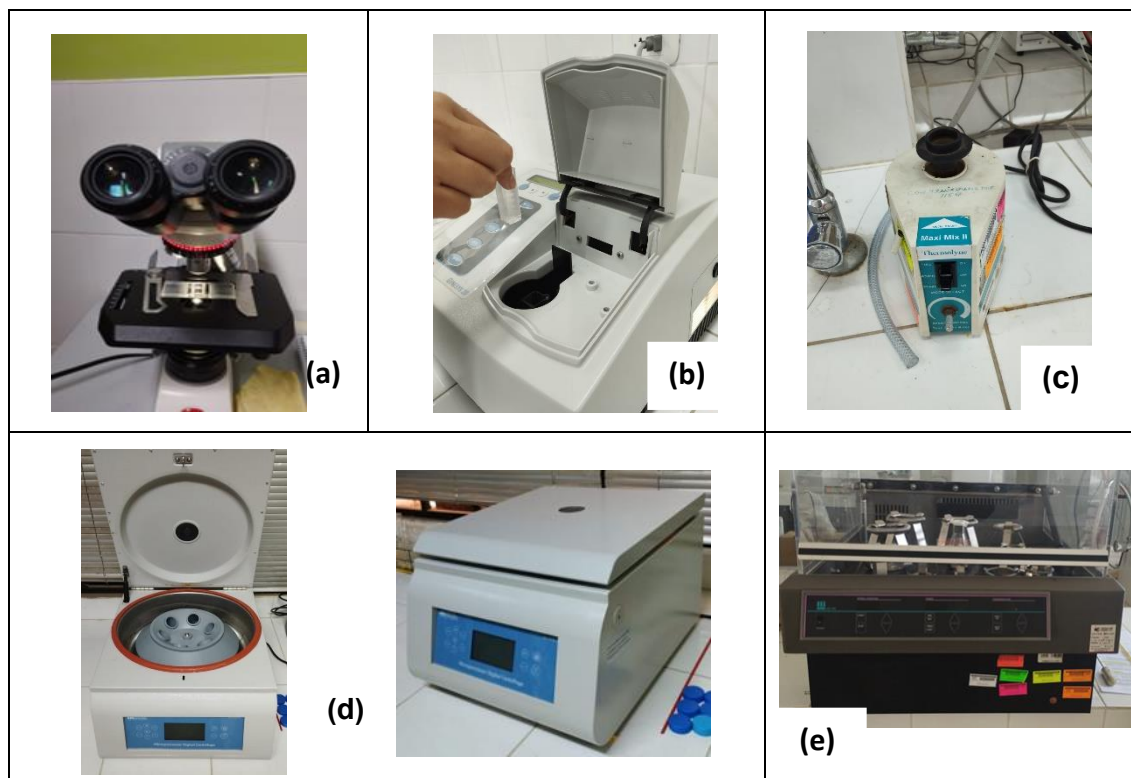


Figura A.4. equipos de laboratorio: (a) microscopio electrónico MOTIC; (b) Espectrofotómetro SCIENTIFIC; (c) agitador vortex; (d) centrifuga digital; (e) agitador de plataforma Shaker. (Ref.: equipos propiedad de la UNS).

A.2. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

A.2.1. La cepa y el cultivo de microalga *Porphyridium cruentum*

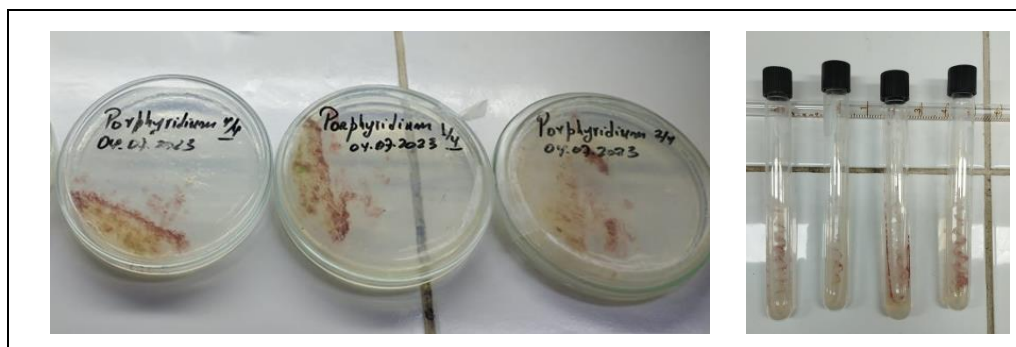


Figura A.5. cepa de microalga *Porphyridium cruentum* en medio Agar-Agar 3%, cultivada para su conservación en placas Petri y tubos viales.

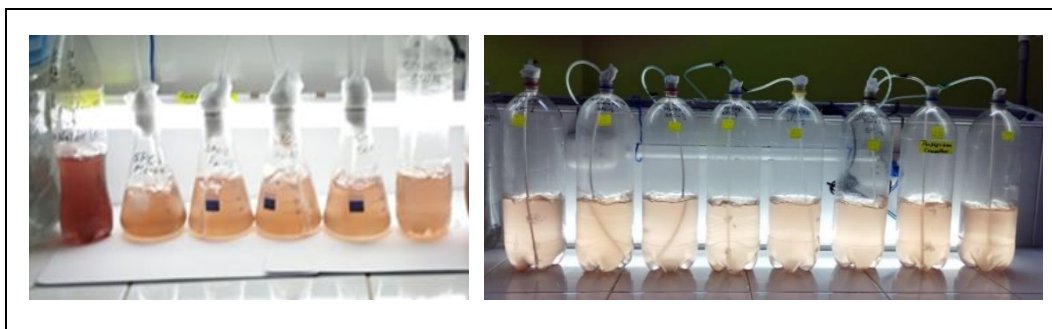


Figura A.6. cultivos microalgal en medio apropiado, a diferentes condiciones, con escalamientos de 200 mL y 1000 mL.

A.2.2. Dinámica del crecimiento celular, conteo celular y densidad óptica

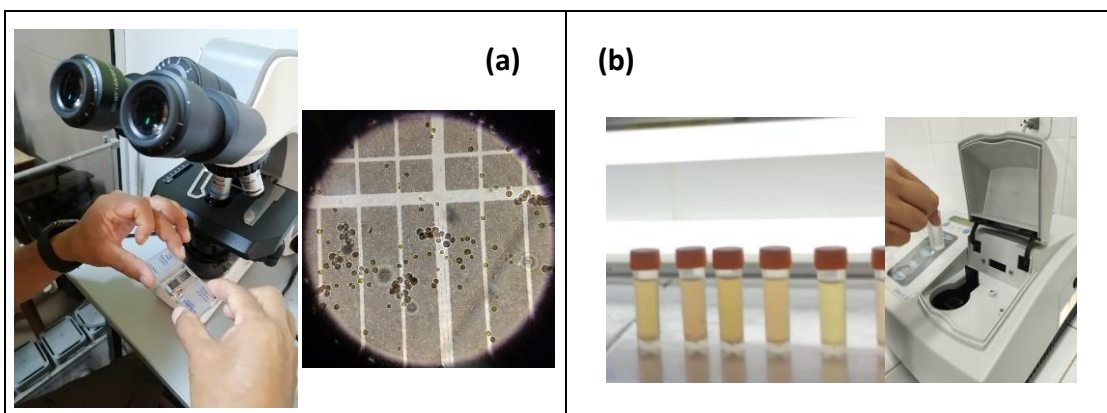


Figura A.7. (a) conteo celular, del cultivo microalgal; (b) lectura de Densidad óptica.

A.2.3. Cosecha de biomasa microalgal, método peso seco

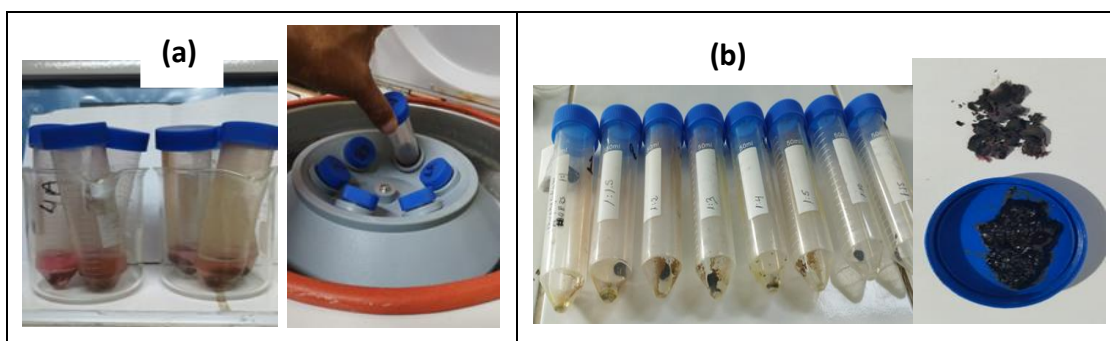


Figura A.8. (a) cosecha y centrifugado de biomasa microalgal cultivada; (b) Determinación del peso seco total de biomasa microalgal.

A.2.4. Determinación de la Actividad de la enzima Celulasa

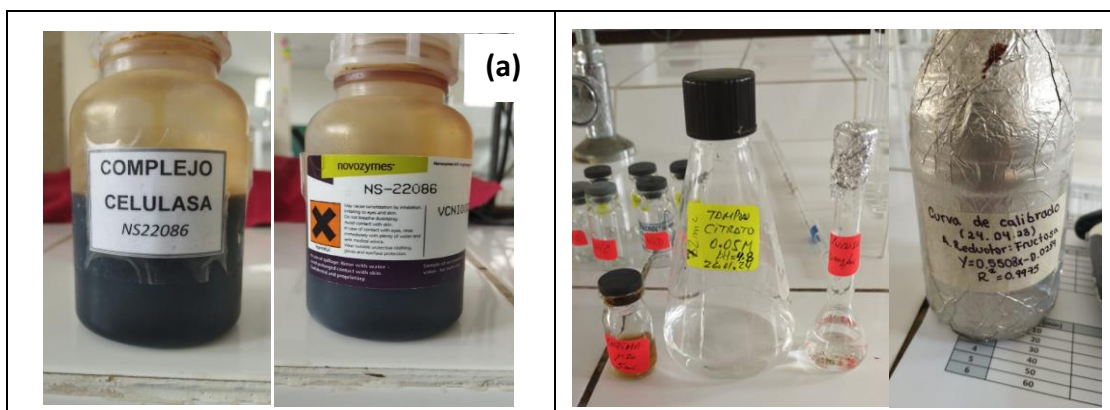


Figura A.9. (a) complejo enzimático Celulasa; (b) buffer citrato de sodio, solución patrón de glucosa y reactivo DNS.

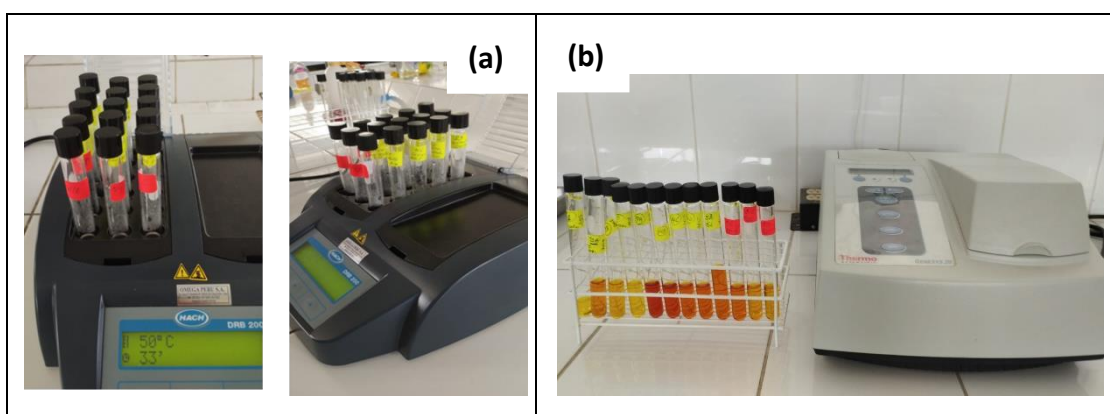


Figura A.10. Evaluación de Actividad enzimática: (a) termorreacción de sustrato con Celulasa, a 50°C; (b) método de Miller, con DNS, análisis de Densidad óptica.

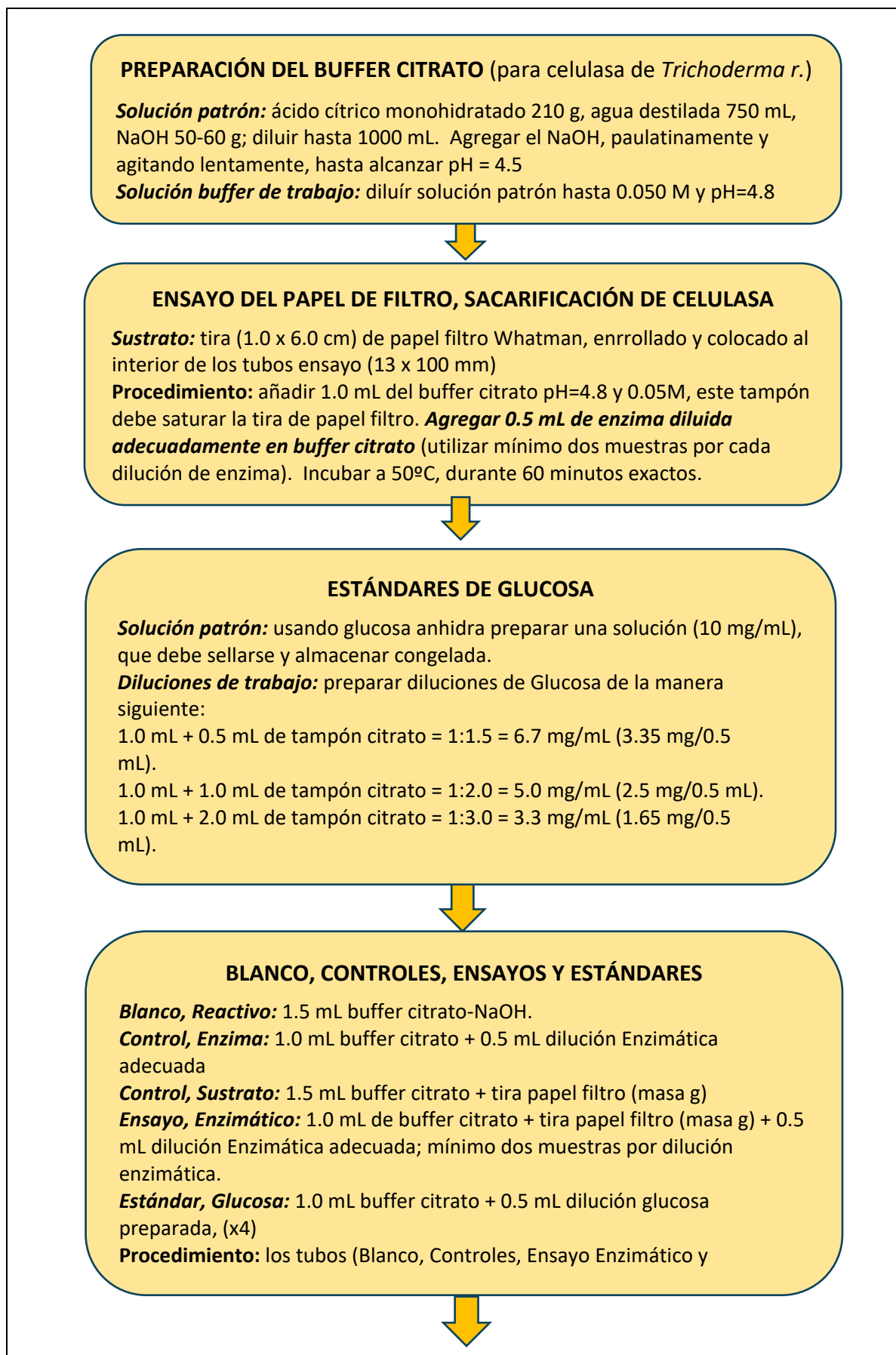


Figura A.11a. Método de Adney y Baker, (1998), para evaluar actividad de cóctel enzimático Celulasa

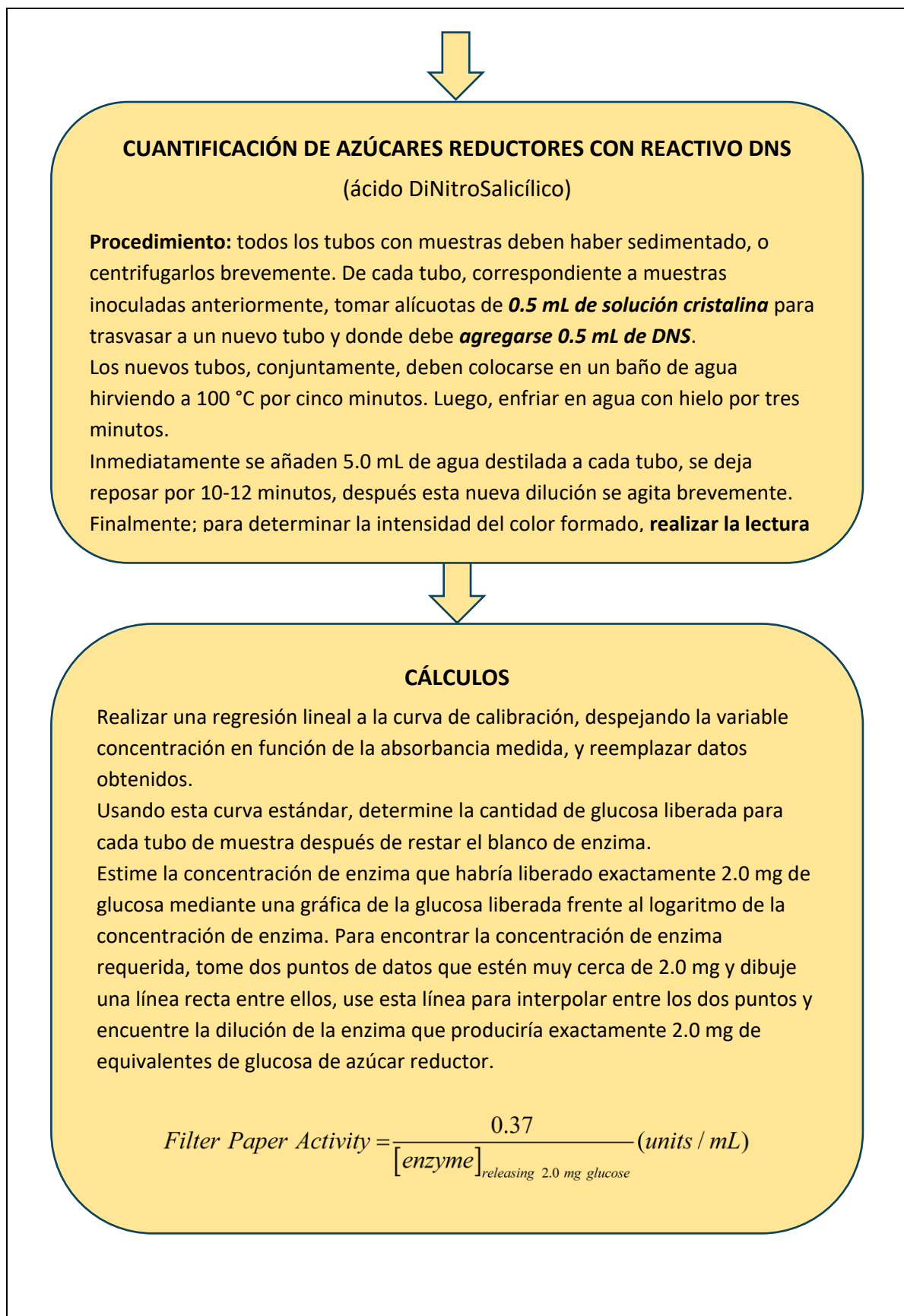


Figura A.11b. continuación del método de Adney y Baker (1998,) para evaluar actividad de Celulasa

A.2.5. Determinación de Carbohidratos, en la biomasa microalgal

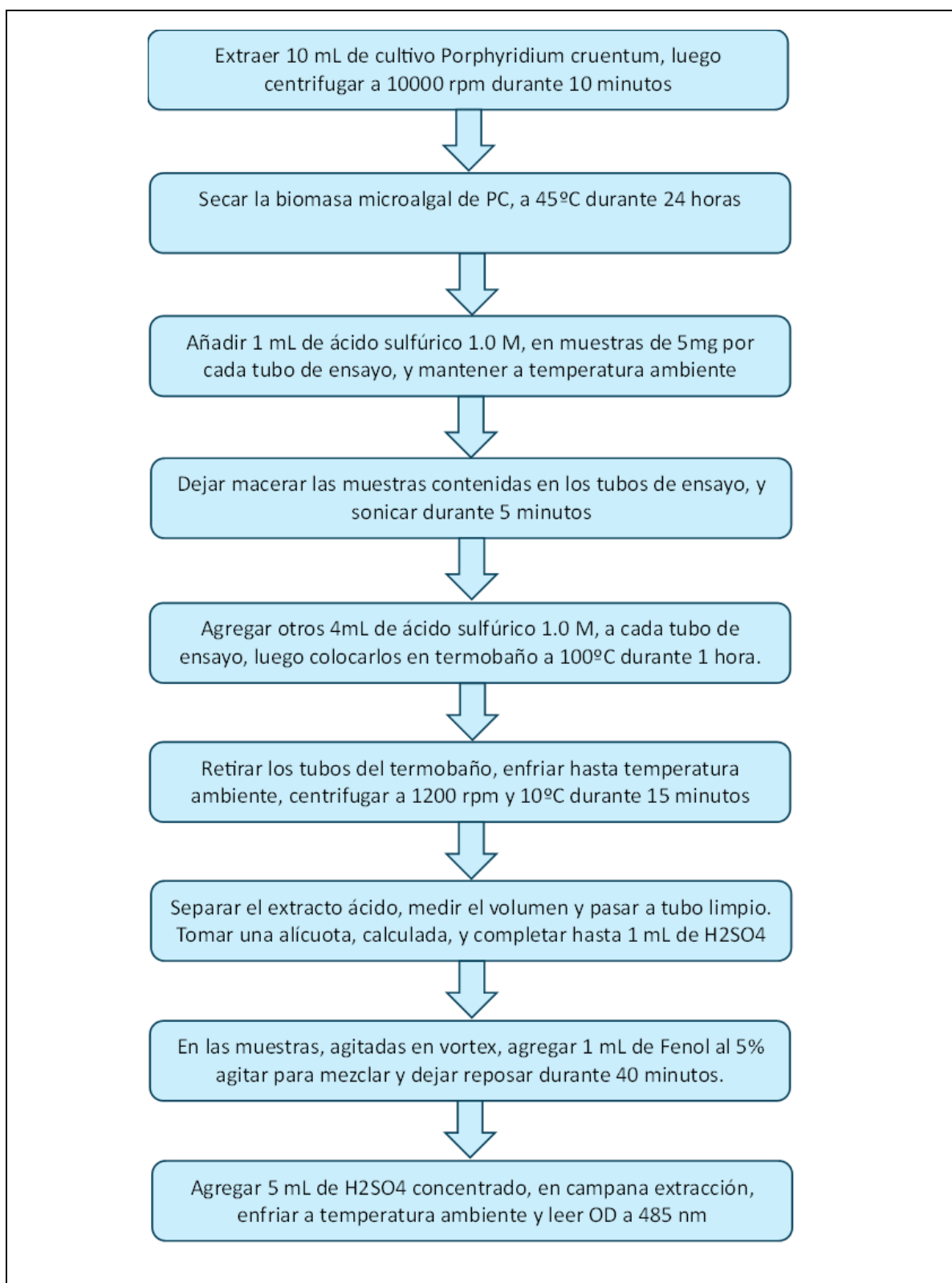


Figura A.12. Procedimiento para determinar carbohidratos en biomasa microalgal.

Ref.: Arredondo *et al.*, 2019; Miller G., (1959)

A.2.6. Hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal

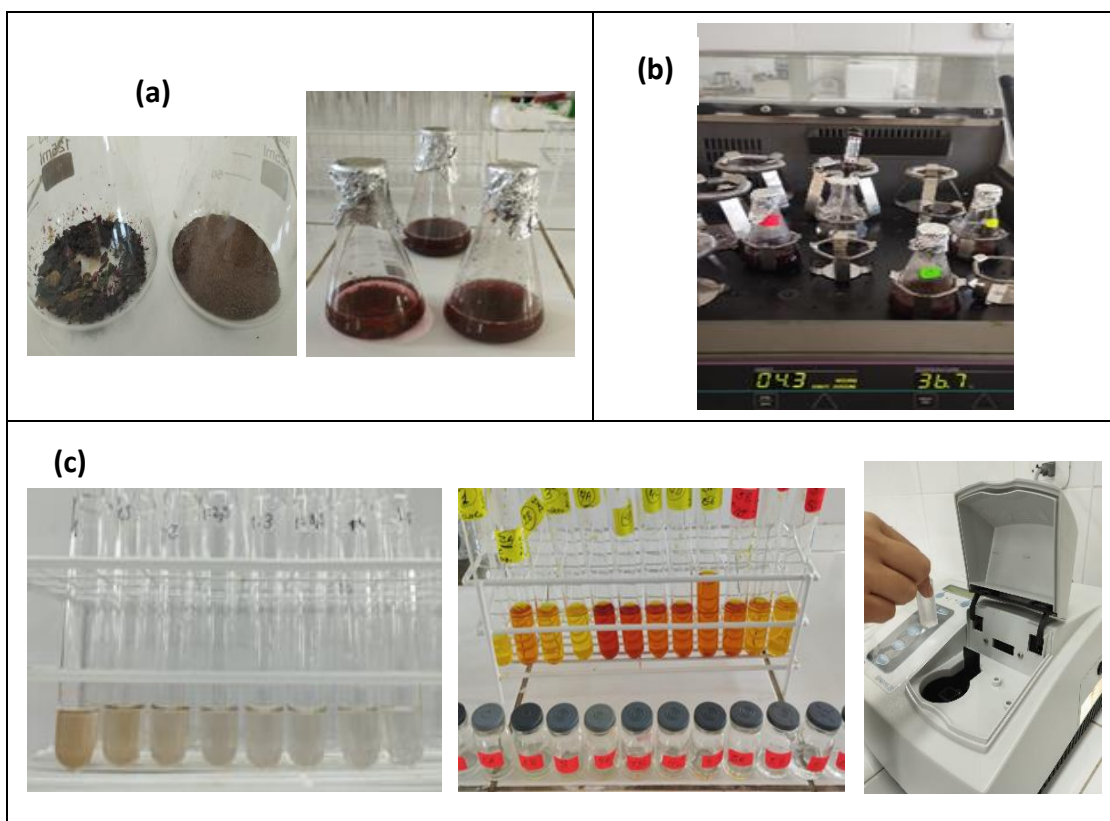


Figura A.13. (a) Biomasa pretratada; (b) incubación en Shaker, hidrólisis enzimática con Celulasa; (c) método de Miller, y Densidad óptica, evaluando azúcar liberada.

A.2.7. Fermentación del hidrolizado, obtención de bioetanol 3G

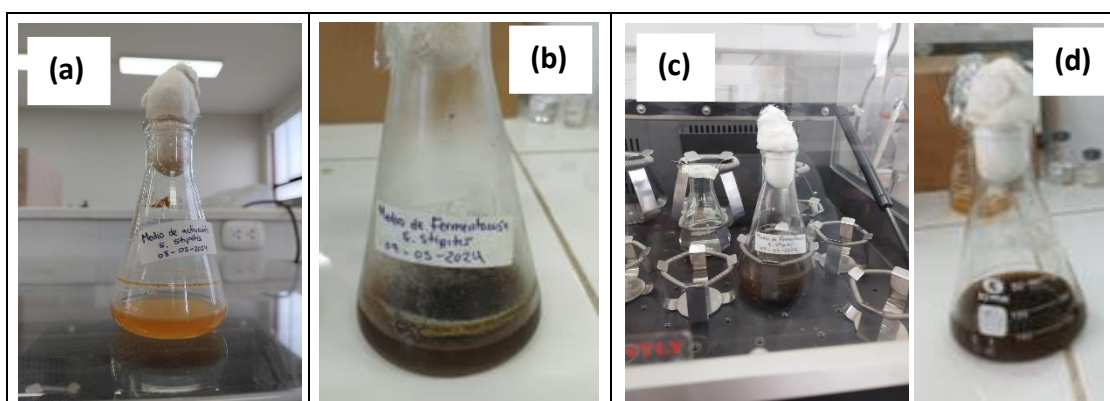


Figura A.14. (a) activación *S. stipitis*; (b) hidrolizado; (c) proceso de fermentación, hidrolizado + *S. stipitis*, a 30°C en shaker; (d) bioetanol.

A.3. INFORMACIÓN TÉCNICA.

A.3.1. Tablas y Figuras, de datos experimentales

Tabla A.1. Conteo celular cultivo de *Porphyridium cruentum* , Seawater (G201_SPC-02)

Data N°	03012024			04012024			05012024			06012024			07012024			08012024			09012024			10012024			11012024		
	dia0-A	dia0-B	[dia0*]	dia1-A	dia1-B	[dia1*]	dia2-A	dia2-B	[dia2*]	dia3-A	dia3-B	[dia3*]	dia4-A	dia4-B	[dia4*]	dia5-A	dia5-B	[dia5*]	dia6-A	dia6-B	[dia6*]	dia7-A	dia7-B	[dia7*]	dia8-A	dia8-B	[dia8*]
1	0	6	3	2	9	6	15	12	14	28	32	30	43	38	41	57	63	60	68	75	72	71	66	69	64	59	62
2	1	4	3	4	7	6	14	14	14	25	35	30	38	45	42	50	60	55	70	65	68	63	71	67	57	63	60
3	2	3	3	7	9	8	12	17	15	30	29	30	43	36	40	55	62	59	64	74	69	67	64	66	63	56	60
4	5	2	4	5	6	6	15	18	17	28	28	28	37	33	35	59	60	60	68	70	69	70	66	68	62	48	55
5	3	4	4	8	8	8	11	17	14	25	33	29	39	41	40	56	58	57	53	84	69	66	72	69	61	65	63
6	4	1	3	4	6	5	14	14	14	36	23	30	41	37	39	49	58	54	68	73	71	61	69	65	70	54	62
7	0	4	2	6	8	7	13	19	16	26	28	27	45	38	42	52	57	55	75	69	72	68	72	70	65	61	63
8	3	3	3	7	6	7	14	14	14	28	31	30	36	46	41	55	65	60	66	76	71	66	69	68	64	59	62
9	1	3	2	3	5	4	12	19	16	30	27	29	43	48	46	64	56	60	68	75	72	70	71	71	59	56	58
10	2	5	4	5	9	7	14	17	16	24	32	28	39	46	43	60	61	61	63	72	68	66	72	69	61	61	61
11	4	1	3	6	8	7	12	17	15	26	31	29	40	43	42	61	63	62	66	70	68	67	64	66	63	59	61
12	5	0	3	8	9	9	12	17	15	29	26	28	37	48	43	59	61	60	64	74	69	61	76	69	65	58	62
13	2	1	2	5	7	6	13	16	15	27	32	30	43	39	41	55	66	61	68	72	70	63	71	67	61	67	64
14	1	4	3	3	8	6	12	18	15	28	26	27	34	43	39	61	60	61	70	75	73	70	69	70	61	56	59
15	0	3	2	4	6	5	14	17	16	26	36	31	32	51	42	57	57	57	74	70	72	63	71	67	64	54	59
16	4	2	3	7	8	8	14	17	16	27	33	30	43	36	40	59	62	61	69	75	72	63	72	68	65	63	64
17	1	3	2	4	5	5	12	18	15	25	31	28	37	43	40	52	63	58	75	63	69	68	66	67	55	57	56
18	0	5	3	3	8	6	11	17	14	23	32	28	38	39	39	57	62	60	70	72	71	61	70	66	61	63	62
19	2	4	3	5	7	6	14	17	16	29	31	30	37	43	40	64	56	60	68	65	67	70	66	68	59	62	61
20	6	2	4	8	9	9	15	14	15	23	36	30	43	43	43	55	63	59	66	70	68	67	71	69	61	66	64
21	1	4	3	4	9	7	12	18	15	31	28	30	44	38	41	54	61	58	68	70	69	70	66	68	55	63	59
22	4	2	3	7	6	7	11	21	16	26	26	26	37	42	40	55	60	58	66	73	70	61	70	66	62	59	61
23	1	5	3	3	5	4	9	17	13	28	31	30	42	41	42	50	66	58	53	80	67	67	62	65	55	68	62
24	5	3	4	6	8	7	12	18	15	30	29	30	44	42	43	56	60	58	71	73	72	65	69	67	49	61	55
25	1	4	3	5	7	6	14	13	14	31	25	28	40	47	44	69	53	61	73	67	70	63	71	67	59	67	63
Población	58	78	68	129	183	156	321	416	369	689	751	720	995	1046	1021	1421	1513	1467	1684	1802	1743	1647	1726	1687	1521	1505	1513
Promedio	2.3	3.1	2.7	5.2	7.3	6.2	12.8	16.6	14.7	27.6	30.0	28.8	39.8	41.8	40.8	56.8	60.5	58.7	67.4	72.1	69.7	65.9	69.0	67.5	60.8	60.2	60.5
N (cél/mL)	5.8E+05	7.80E+05	6.80E+05	1.29E+06	1.83E+06	1.56E+06	3.21E+06	4.16E+06	3.69E+06	6.89E+06	7.51E+06	7.20E+06	9.95E+06	1.05E+07	1.02E+07	1.42E+07	1.51E+07	1.47E+07	1.68E+07	1.80E+07	1.74E+07	1.65E+07	1.73E+07	1.69E+07	1.52E+07	1.51E+07	1.51E+07
Error			0.95%			0.81%			0.23%			0.16%			0.20%			0.14%			0.10%			0.09%			0.17%

cámara Neubauer (mm³)		Volumen medio (mL) Seawater Inóculo		Iluminación LED (Watt)	Flujo de aire (LPM)	Dosifica C (g/L)	T (°C)	pH	Salinidad % NaCl
0.1	0.0001	100	100	21	1.0	0.67	20.0 - 22.5	7.40 - 8.45	38.0

Tabla A.2. Cálculos de parámetros cinéticos, característicos, de un cultivo de microalgas *Porphyridium cruentum*

día	Concentración celular microalgal			velocidad específica	División por día	Tiempo duplicidad	Producción diaria
	N (cél. / mL)	(N/No)	Log (N/No)	μ (días ⁻¹)	D (DIV/día)	TD (días)	PD (cél/mL)
0	6.800E+05	1.0000	0.0000	-	-	-	-
1	1.560E+06	2.2941	0.8303	0.8303	1.1979	0.8348	8.80E+05
2	3.685E+06	5.4191	1.6899	0.8596	1.2401	0.8064	2.13E+06
3	7.200E+06	10.5882	2.3597	0.6698	0.9663	1.0348	3.52E+06
4	1.021E+07	15.0074	2.7085	0.3488	0.5032	1.9873	3.01E+06
5	1.467E+07	21.5735	3.0715	0.3629	0.5236	1.9099	4.47E+06
6	1.743E+07	25.6324	3.2439	0.1724	0.2487	4.0208	2.76E+06
7	1.687E+07	24.8015	3.2109	-0.0330	-0.0475	-21.0348	-5.65E+05
8	1.513E+07	22.2500	3.1023	-0.1086	-0.1566	-6.3849	-1.74E+06
Ref.: ecuaciones, sección 2.2.4.1, son aplicados a la data experimental de Tabla A.1.			Promedio:	0.3885	0.5605	2.2382	3.44E+06
			Máximo:	0.6698	0.9663	4.0208	4.47E+06
			Mínimo:	0.1724	0.2487	1.0348	2.76E+06

Tabla A.3. Modelos matemáticos de crecimiento poblacional, aplicados para evaluar un cultivo microalgal de *Porphyridium cruentum*, 200 mL.

DATA EXPERIMENTAL					EVALUACIÓN DE MODELOS Y = f(t)					
Fecha	día	Concentración celular microalgal			Modelo GOMPERTZ-02		modelo LOGISTICO		modelo POLINOMIO-04	
		N (cél/mL)	Y1 = (N/No)	Y2 = Log(N/No)	G1 = Y1(t)	G2 = Y2(t)	L1 = Y1(t)	L2 = Y2(t)	P41 = Y1(t)	P42 = Y2(t)
03012024	0	6.80E+05	1.0000	0.0000	0.1229	0.2567	0.8771	0.3962	1.2390	0.0365
04012024	1	1.56E+06	2.2941	0.8303	1.4767	0.9430	2.2512	0.9083	2.6737	1.0847
05012024	2	3.69E+06	5.4191	1.6899	5.5915	1.7752	5.3029	1.6818	5.8550	1.8129
06012024	3	7.20E+06	10.5882	2.3597	11.4070	2.4145	10.5634	2.4128	10.4601	2.3369
07012024	4	1.02E+07	15.0074	2.7085	16.7104	2.8040	16.6197	2.8541	15.8542	2.7317
08012024	5	1.47E+07	21.5735	3.0715	20.5014	3.0154	21.0540	3.0527	21.0905	3.0315
09012024	6	1.743E+07	25.6324	3.2439	22.8735	3.1239	23.3418	3.1302	24.9102	3.2297
10012024	7	1.69E+07	24.8015	3.2109	24.2547	3.1781	24.3123	3.1588	25.7425	3.2789
11012024	8	1.51E+07	22.2500	3.1023	25.0283	3.2048	24.6893	3.1690	21.7046	3.0909
Promedio	4	9.714E+06	14.2851	2.2463	14.2185	2.3017	14.3346	2.3071	14.3922	2.2926
Máximo	6	1.743E+07	25.6324	3.2439	25.0283	3.2048	24.6893	3.1690	25.7425	3.2789
Mínimo	0	6.800E+05	1.0000	0.0000	0.1229	0.2567	0.8771	0.3962	1.2390	0.0365

Ref.: aplicación de modelos matemáticos expuestos en la sección 2.2.4.1, a datos de Tabla A.1.

Tabla A.4. *Determinación de la Densidad Óptica de cultivo microalgal, y del peso seco total de biomasa, de microalgas Porphyridium cruentum*

Data N°	Relación dilución	Volumen para dilución (mL)			Absorb. D.O. (@ 640 nm)	Trasmittancia (%)	biomasa microalgal (g)		Concentración celular	
		Vsoluto	Vsolvente	Vtotal			húmeda	seca	(g/mL)	(g/L)
0	1:1.0	45.00	0.00	45.00	0.653	22.233	0.314	0.048	1.07E-03	1.067
1	1:1.5	30.00	15.00	45.00	0.449	35.563	0.250	0.030	6.67E-04	0.667
2	1:2.0	22.50	22.50	45.00	0.314	48.529	0.209	0.020	4.44E-04	0.444
3	1:3.0	15.00	30.00	45.00	0.256	55.463	0.185	0.014	3.11E-04	0.311
4	1:4.0	11.25	33.75	45.00	0.212	61.376	0.188	0.012	2.67E-04	0.267
5	1:5.0	9.00	36.00	45.00	0.162	68.865	0.151	0.010	2.22E-04	0.222
6	1:10.0	4.50	40.50	45.00	0.112	77.268	0.116	0.004	8.89E-05	0.089
7	1:15.0	3.00	42.00	45.00	0.076	83.946	0.091	0.002	4.44E-05	0.044

Ref.: procedimiento experimental en Arredondo *et al.*, (2017).

Tabla A.5. *La Densidad Óptica y su correlación con la concentración celular microalgal de Porphyridium cruentum*

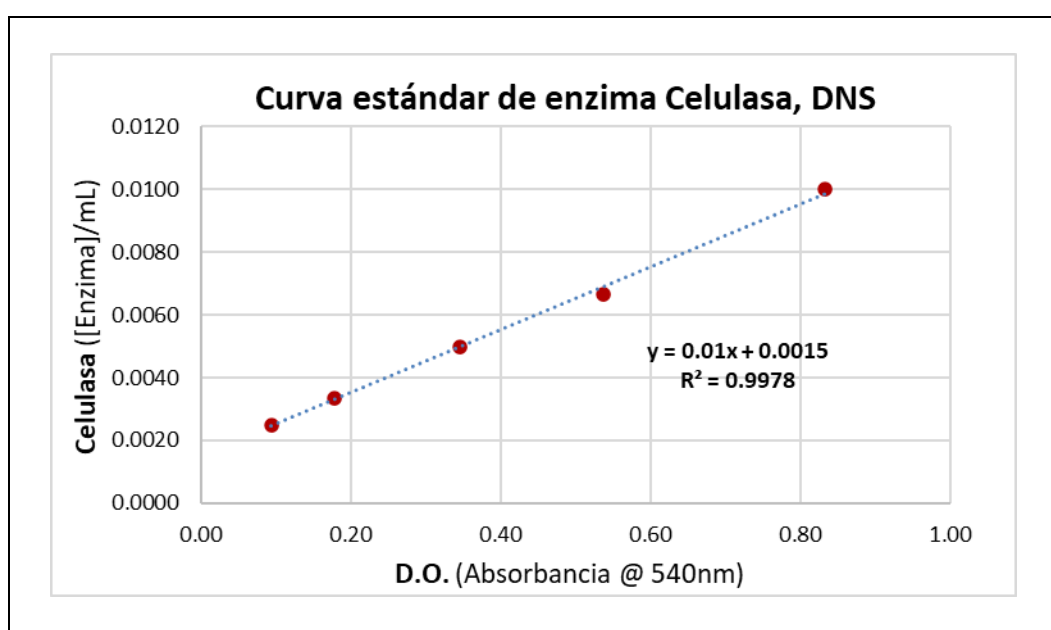
Data N°	Relación dilución	Absorbancia D.O. (@ 640 nm)	Transmitancia (%)	Concentración celular microalgal			
				(células/mL)	(células/L)	(g/mL)	(g/L)
0	1:1.0	0.653	22.233	6.485E+06	6.485E+09	1.07E-03	1.0667
1	1:1.5	0.449	35.563	3.885E+06	3.885E+09	6.67E-04	0.6667
2	1:2.0	0.314	48.529	2.880E+06	2.880E+09	4.44E-04	0.4444
3	1:3.0	0.256	55.463	1.575E+06	1.575E+09	3.11E-04	0.3111
4	1:4.0	0.212	61.376	1.310E+06	1.310E+09	2.67E-04	0.2667
5	1:5.0	0.162	68.865	9.850E+05	9.850E+08	2.22E-04	0.2222
6	1:10.0	0.112	77.268	5.800E+05	5.800E+08	8.89E-05	0.0889
7	1:15.0	0.076	83.946	3.000E+05	3.000E+08	4.44E-05	0.0444

Tabla A.6. *Datos de calibración, para evaluar presencia de carbohidratos, en dilución de cultivo microalgas*

N°	Solución estandar	H2SO4	Concentración (g/L)	Densidad Óptica
				Abs. (@485 nm)
1	0	1000	0.000	0.000
2	200	800	0.024	0.214
3	400	600	0.048	0.486
4	600	400	0.072	0.737
5	800	200	0.096	1.006
6	1000	0	0.120	1.155

Tabla A.7. *Diluciones de enzima Celulasa (solución patrón 1:20)*

Data N°	Relación dilución	Volumen para dilución (mL)			Concentración final Enzima		Densidad Óptica (Absorbancia @540 nm)
		Citrato buffer	Enzima (1:20)	Vtotal	[Enzima]	Relación dilución	
1	1:5.0	0.600	2.400	3.00	0.0100	1:100	0.833
2	1:7.5	0.400	2.600	3.00	0.0067	1:150	0.538
3	1:10	0.300	2.700	3.00	0.0050	1:200	0.346
4	1:15	0.200	2.800	3.00	0.0033	1:300	0.179
5	1:20	0.150	2.850	3.00	0.0025	1:400	0.095

**Figura A.15.** *curva estándar de calibración, para evaluar Actividad Enzimática de celulasa.***Tabla A.8.** *Glucosa liberada por cóctel enzimático Celulasa*

Data N°	Densidad Óptica (Abs. @540nm)	Concentración [Glucosa] (g/0.5L)	Concentración final Enzima	
			[Enzima]	Relación dilución
1	0.826	3.265	0.0100	1:100
2	0.538	2.197	0.0050	1:200
3	0.337	1.451	0.0025	1:400
4	0.277	1.228	0.0017	1:600

Tabla A.10. *Hidrólisis enzimática de biomasa microalgal, con tres tipos de dilución enzima Celulasa*

Data Nº	tiempo (min.)	Muestra-<01> (dilución 1:200)				Muestra-<02> (dilución 1:300)				Muestra-<03> (dilución 1:400)			
		D.O. (540 nm)	[glucosa] (mg/mL)	[Cs] (mg/mL)	Yield (%, g/g)	D.O. (540 nm)	[glucosa] (mg/mL)	[Cs] (mg/mL)	Yield (%, g/g)	D.O. (540 nm)	[glucosa] (mg/mL)	[Cs] (mg/mL)	Yield (%, g/g)
0	0	0.336	0.966	1.184	0.00	0.255	0.766	1.384	0.00	0.216	0.670	1.480	0.00
1	15	0.323	0.934	1.216	43.44	0.220	0.680	1.470	31.64	0.198	0.626	1.524	29.12
2	30	0.312	0.907	1.243	42.18	0.235	0.717	1.433	37.37	0.211	0.658	1.492	32.67
3	60	0.339	0.973	1.177	45.27	0.258	0.774	1.376	38.28	0.227	0.697	1.453	33.01
4	120	0.348	0.996	1.154	46.31	0.270	0.803	1.347	37.02	0.234	0.715	1.435	31.98
5	240	0.365	1.037	1.113	48.25	0.286	0.843	1.307	37.48	0.243	0.737	1.413	32.21
6	360	0.369	1.047	1.103	48.71	0.303	0.885	1.265	37.60	0.245	0.742	1.408	31.41
7	420	0.371	1.052	1.098	48.94	0.304	0.887	1.263	35.76	0.242	0.734	1.416	30.84
Temperatura = 50 - 51 (°C); pH = 4.6 - 4.8 (buffer Citrato sódico);													
Agitación shaker = 200 rpm; [Sustrato] = 2.15 (mg/mL) biomasa microalgal <i>P. cruentum</i>													

Tabla A.11. Composición de nutrientes y de la solución de sales, utilizada en los medios de cultivo de fermentación para *S. stipitis*

Nutriente	Concentración	Sales	Concentración (g/L)
Fuente de carbono: Hidrolizado microalgas	75 mL/100 mL	CaCl ₂ .H ₂ O	1.25
extracto de levadura <i>Scheffersomyces Stipitis</i>	3 g/L	ZnO	0.30
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g/L	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.90
KH ₂ PO ₄	2 g/L	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.1 g/L	CoCl ₂	0.025
Solución de sales	1 mL/L	H ₃ BO ₃	0.05
Tampón citrato pH: 4.5	10 mL/L	MnSO ₄ .H ₂ O	0.19
		NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.035
		HCl cc	< 13 mL/L

Ref. Castillo A., (1994)

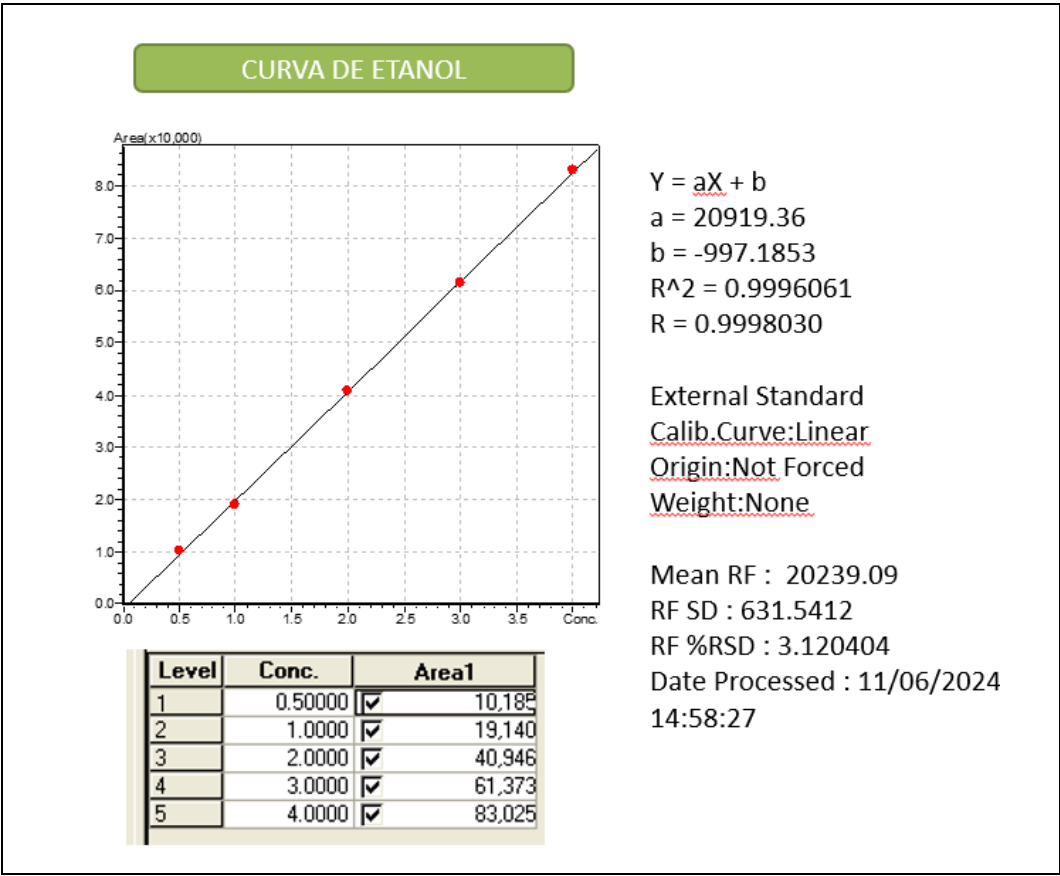


Figura A.16. curva estándar de calibración, para evaluar Etanol. Ref.: IITA-UNS, (2024)

A.3.2. Tablas de cálculos estadísticos

Información reportada por el software minitab, al procesar la data experimental, Tablas 4.2 – 4.4, del crecimiento microalgal de *P. cruentum*.

Tabla A.12. Regresión de superficie de respuesta, en volumen de cultivo 200 mL

N x 10⁶ vs. (Iluminación; Agitación; Carbono orgánico)

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	8.44	1.20	7.06	0.000	
Iluminación	1.06	1.16	0.91	0.383	2.26
Agitación	1.30	1.16	1.12	0.290	2.26
Carbono (C)	-0.0731	0.0876	-0.84	0.423	3.79
Iluminación*Iluminación	-0.661	0.755	-0.88	0.402	1.02
Agitación*Agitación	1.140	0.755	1.51	0.162	1.02
C*C	0.00573	0.00254	2.26	0.048	3.81
Iluminación*Agitación	0.06	1.01	0.06	0.955	1.00
Iluminación*C	-0.0221	0.0588	-0.38	0.714	2.26
Agitación*C	0.0282	0.0588	0.48	0.642	2.26

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
2.86530	65.57%	34.58%	0.00%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	156.325	17.3695	2.12	0.129
Lineal	3	22.816	7.6053	0.93	0.463
Iluminacion	1	6.845	6.8454	0.83	0.383
Agitacion	1	10.243	10.2435	1.25	0.290
C	1	5.727	5.7269	0.70	0.423
Cuadrado	3	67.858	22.6192	2.76	0.098
Iluminacion*Iluminacion	1	6.299	6.2991	0.77	0.402
Agitacion*Agitacion	1	18.719	18.7188	2.28	0.162
C*C	1	41.782	41.7824	5.09	0.048
Interacción de 2 factores	3	3.080	1.0266	0.13	0.943
Iluminacion*Agitacion	1	0.027	0.0271	0.00	0.955
Iluminacion*C	1	1.164	1.1645	0.14	0.714
Agitacion*C	1	1.888	1.8882	0.23	0.642
Error	10	82.100	8.2100		
Falta de ajuste	5	81.006	16.2012	74.06	0.000
Error puro	5	1.094	0.2187		
Total	19	238.425			

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$N \times 10^6 = 6.43 + 0.321 \text{ Iluminación} - 6.88 \text{ Agitación} - 8.0 C \\ - 0.00546 \text{ Iluminación} * \text{Iluminación} + 4.56 \text{ Agitación} * \text{Agitación} + 27.2 C * C \\ + 0.011 \text{ Iluminación} * \text{Agitación} - 0.139 \text{ Iluminación} * C + 3.89 \text{ Agitación} * C$$

Optimización de respuesta:

$N \times 10^6$ – volumen de cultivo 200 mL

Parámetros

Respuesta	Meta	Inferior	Objetivo	Superior	Ponderación	Importancia
$N \times 10^6$	Máximo	0.858	17.43		1	1

Solución

Solución	iluminación	Agitación	Carbono	$N \times 10^6$ Ajuste	Deseabilidad compuesta
1	22.6818	1.84090	0.670448	23.7220	1

Predicción de respuesta múltiple

Variable	Valor de configuración
iluminación	22.6818
Agitación	1.8409
Carbono	0.670448

Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
$N \times 10^6$	23.72	4.23	(14.30; 33.14)	(12.34; 35.10)

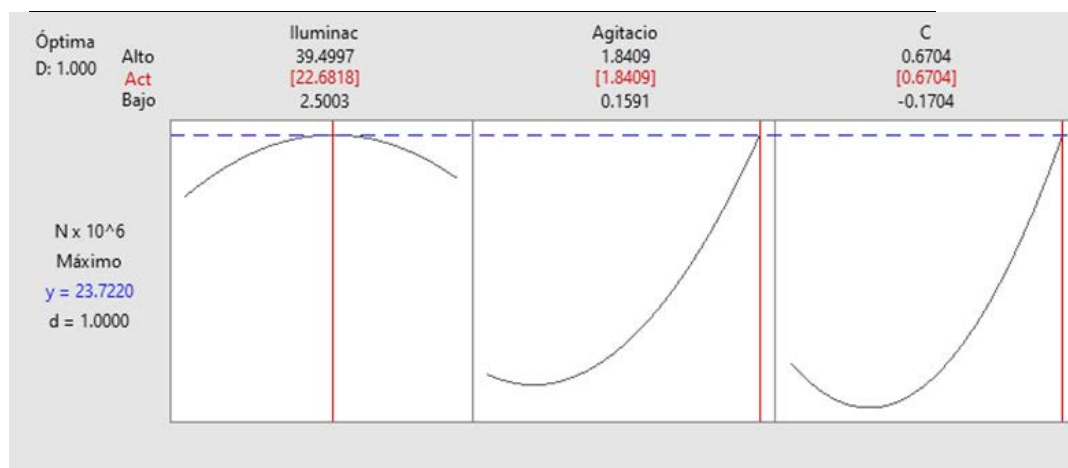


Tabla A.13. Regresión de superficie de respuesta, en volumen de cultivo 500 mL**N x 10⁶ vs. (Iluminación; Agitación; Carbono orgánico)****Coeficientes codificados**

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	8.455	0.393	21.50	0.000	
iluminación	4.285	0.383	11.19	0.000	2.26
Agitación	1.496	0.383	3.91	0.003	2.26
Carbono	0.0237	0.0288	0.82	0.430	3.79
iluminación*iluminación	3.109	0.248	12.53	0.000	1.02
Agitación*Agitación	0.113	0.248	0.45	0.660	1.02
C*C	0.005052	0.000835	6.05	0.000	3.81
iluminación*Agitación	1.517	0.333	4.56	0.001	1.00
iluminación*C	0.0024	0.0193	0.13	0.902	2.26
Agitación*C	-0.0320	0.0193	-1.66	0.129	2.26

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
0.942050	98.48%	97.10%	89.53%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	573.216	63.691	71.77	0.000
Lineal	3	125.237	41.746	47.04	0.000
Iluminacion	1	111.095	111.095	125.18	0.000
Agitacion	1	13.542	13.542	15.26	0.003
C	1	0.600	0.600	0.68	0.430
Cuadrado	3	161.418	53.806	60.63	0.000
Iluminacion*Iluminacion	1	139.343	139.343	157.01	0.000
Agitacion*Agitacion	1	0.183	0.183	0.21	0.660
C*C	1	32.507	32.507	36.63	0.000
Interacción de 2 factores	3	20.868	6.956	7.84	0.006
Iluminacion*Agitacion	1	18.421	18.421	20.76	0.001
Iluminacion*C	1	0.014	0.014	0.02	0.902
Agitacion*C	1	2.433	2.433	2.74	0.129
Error	10	8.875	0.887		
Falta de ajuste	5	7.452	1.490	5.24	0.047
Error puro	5	1.423	0.285		
Total	19	582.090			

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\begin{aligned}
 N \times 10^6 &= 14.69 - 0.966 \text{ iluminación} - 3.55 \text{ Agitación} + 4.02 C \\
 &+ 0.02570 \text{ iluminación} * \text{iluminación} + 0.450 \text{ Agitación} * \text{Agitación} + 24.03 C * C \\
 &+ 0.2759 \text{ iluminación} * \text{Agitación} + 0.015 \text{ iluminación} * C - 4.41 \text{ Agitación} * C
 \end{aligned}$$

Optimización de respuesta:

$N \times 10^6$ – volumen de cultivo 500 mL

Parámetros

Respuesta	Meta	Inferior	Objetivo	Superior	Ponderación	Importancia
$N \times 10^6$	Objetivo	7.48	25.31	27.841	1	1

Solución

Solución	iluminación	Agitación	Carbono	$N \times 10^6$ ajuste	Deseabilidad compuesta
1	27.9738	1.84090	0.670448	25.31	1.00000

Predicción de respuesta múltiple

Variable	Valor de configuración
iluminación	27.9738
Agitación	1.8409
Carbono	0.670448

Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
$N \times 10^6$	25.31	1.48	(22.01; 28.61)	(21.40; 29.22)

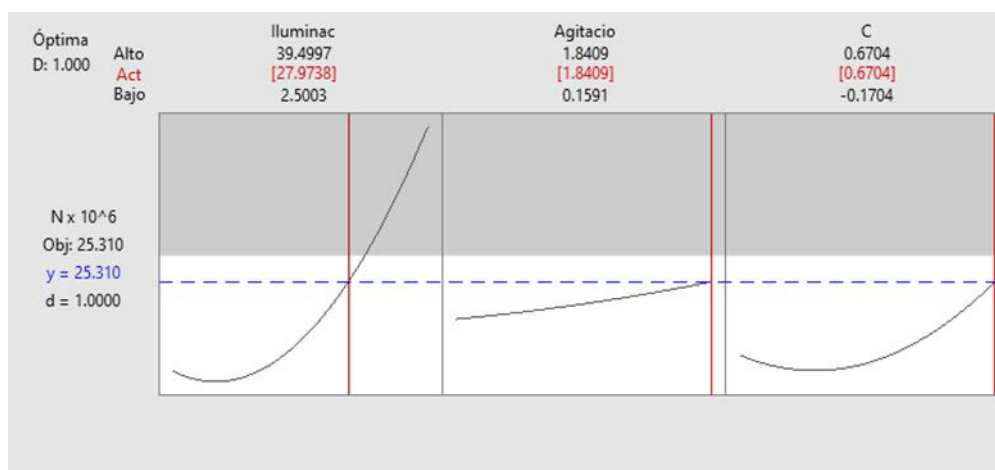


Tabla A.14. Regresión de superficie de respuesta, en volumen de cultivo 1000 mL**N x 10⁶ vs. (Iluminación; Agitación; Carbono orgánico)****Coeficientes codificados**

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	10.158	0.246	41.23	0.000	
Iluminación	1.131	0.240	4.71	0.001	2.26
Agitación	2.067	0.240	8.61	0.000	2.26
Carbono (C)	0.1271	0.0180	7.05	0.000	3.79
iluminación*iluminación	-0.665	0.155	-4.27	0.002	1.02
Agitación*Agitación	0.079	0.155	0.51	0.622	1.02
C*C	-0.001514	0.000523	-2.89	0.016	3.81
iluminación*Agitación	0.036	0.209	0.17	0.866	1.00
iluminación*C	0.0367	0.0121	3.03	0.013	2.26
Agitación*C	-0.0292	0.0121	-2.41	0.037	2.26

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
0.590301	97.10%	94.48%	88.02%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	116.523	12.9470	37.16	0.000
Lineal	3	50.909	16.9698	48.70	0.000
Iluminacion	1	7.739	7.7387	22.21	0.001
Agitacion	1	25.857	25.8565	74.20	0.000
C	1	17.314	17.3142	49.69	0.000
Cuadrado	3	8.984	2.9948	8.59	0.004
Iluminacion*Iluminacion	1	6.363	6.3635	18.26	0.002
Agitacion*Agitacion	1	0.090	0.0900	0.26	0.622
C*C	1	2.919	2.9192	8.38	0.016
Interacción de 2 factores	3	5.230	1.7434	5.00	0.023
Iluminacion*Agitacion	1	0.010	0.0104	0.03	0.866
Iluminacion*C	1	3.198	3.1979	9.18	0.013
Agitacion*C	1	2.022	2.0221	5.80	0.037
Error	10	3.485	0.3485		
Falta de ajuste	5	1.522	0.3045	0.78	0.606
Error puro	5	1.962	0.3925		
Total	19	120.007			

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\begin{aligned}
 N \times 10^6 &= 1.61 + 0.3187 \text{ iluminación} + 3.51 \text{ Agitación} + 8.47 C \\
 &- 0.00549 \text{ iluminación} * \text{iluminación} + 0.316 \text{ Agitación} * \text{Agitación} - 7.20 C * C \\
 &+ 0.0065 \text{ iluminación} * \text{Agitación} + 0.2299 \text{ iluminación} * C - 4.02 \text{ Agitación} * C
 \end{aligned}$$

Optimización de respuesta:

$N \times 10^6$ – volumen de cultivo 1000 mL

Parámetros

Respuesta Meta		Inferior	Objetivo	Superior	Ponderación	Importancia
N x 10^6	Objetivo	6.445	19.083	20.9913	1	1

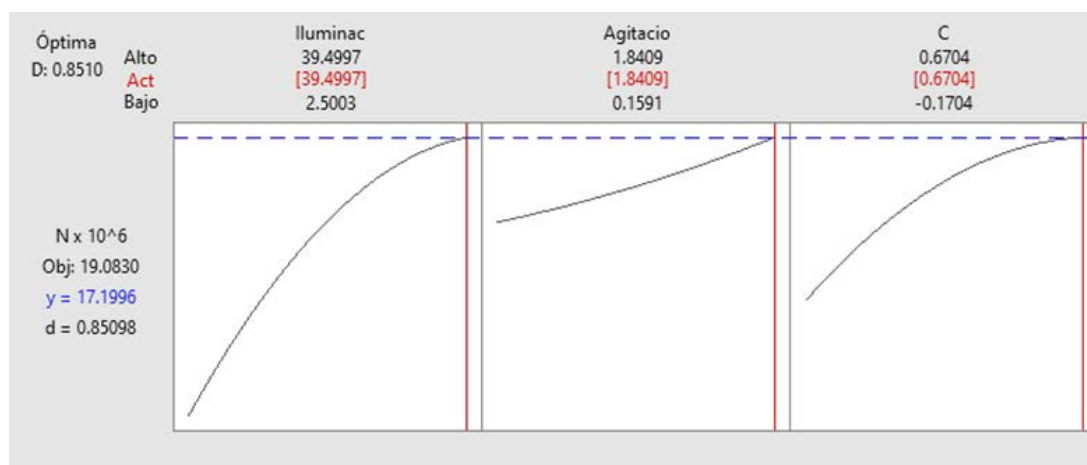
Solución

Solución	iluminación	Agitación	Carbono	$N \times 10^6$ Ajuste	Deseabilidad compuesta
1	39.4997	1.84090	0.670448	17.1996	0.850977

Predicción de respuesta múltiple

Variable	Valor de configuración
Iluminación	39.4997
Agitación	1.8409
Carbono	0.670448

Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
$N \times 10^6$	17.20	1.30	(14.31; 20.09)	(14.03; 20.37)



A.3.3. Tablas técnicas y Figuras varias, complementarias

Tabla A.15. Composición de medios nutricionales, de Guillard y Ryther, para cultivo microalgal

Nombre del compuesto	Fórmula química	F (masa / L)	F/1 (masa / L)	F/2 (masa / L) *
MACRONUTRIENTES:				
Nitrato de sodio	NaNO ₃	150 mg		75 mg
Fosfato monobásico de sodio	NaH ₂ PO ₄	10 mg		5 mg
Fe sequestrene	FeCl ₃ -EDTA	10 mg		-
Silicato de sodio hidratado	Na ₂ SiO ₃ .9 H ₂ O	30-60 mg		15-30 mg
TRAZA DE METALES (oligoelementos):				
Sulfato de cobre	Cu (SO ₄).5 H ₂ O	0.0196 mg	El medio F/1 es el medio F tamponado con 2 ml/L de una solución al 25% de "tris" (hidroximetil) amino-metano, que es añadido antes de la autoclave. (rinde 500 mg "tris" por litro)	0.01 mg
Sulfato de zinc	Zn (SO ₄).7 H ₂ O	0.044 mg		0.022 mg
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6 H ₂ O	0.020 mg		0.01 mg
Cloruro de manganeso	MnCl ₂ .4 H ₂ O	0.360 mg		0.18 mg
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.0126 mg		0.006 mg
Na ₂ .EDTA+	Na ₂ C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈	-		4.36 mg
Cloruro férrico	FeCl ₃ .6 H ₂ O	-		3.15 mg
VITAMINAS:				
Tiamina-HCl	Ci ₂ H ₁₇ N ₄ OS	0.20 mg		0.1 mg
Biotina	Ci ₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	1.0 ug		0.5 ug
B ₁₂		1.0 ug		0.5 ug
Agua de mar (filtrada y esterilizada)		Enrasar, la mezcla de compuestos, todo a un litro		
pH (de solución final)		6.5 – 7.0	7.1 – 7.3	7.2 – 8.0
puede ajustarse con NaOH o HCl 1M				

Ref: (*) se utilizó Nutrientes F/2, adquirido del Instituto Algae Research Supply, CA. USA. **Guillard and Ryther, (1962).**

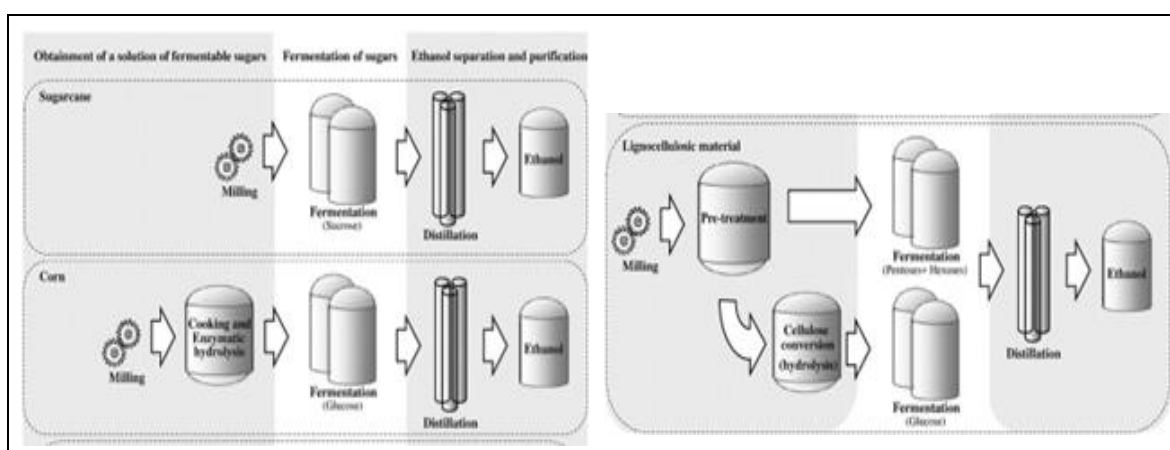


Figura A.17. Diagrama de flujo con las principales materias primas y procesos utilizados para la producción de etanol 2G. (Ref.: Mussato et al., 2010)

Tabla A.16. Análisis composicional de biomasa algal seleccionada

Macroalgas	Carbohidratos (g/g)	Proteínas (g/g)	Lípidos (g/g)	Referencias
<i>Laminaria japonica</i>	0.56	0.08	0.01	Shi <i>et al.</i> (2011)
<i>Ecklonia stolonifera</i>	0.48	0.13	0.02	Jung <i>et al.</i> (2011)
<i>Undaria pinnatifida</i>	0.40	0.15	0.02	
<i>Hijikia fusiforme</i>	0.28	0.05	0.01	
<i>Gelidium amansii</i>	0.61	0.16	0.03	
<i>Porphyra tenera</i>	0.35	0.38	0.04	
<i>Gracilaria verrucosa</i>	0.33	0.15	0.03	
<i>Codium fragile</i>	0.32	0.10	0.01	
Microalgas	Carbohidratos (g/g)	Proteínas (g/g)	Lípidos (g/g)	Referencias
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.38	0.49	0.007	Yun <i>et al.</i> (2012)
<i>Chlorella</i> sp.	0.25	0.41	0.11	Sun <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0.14	0.14		Roy <i>et al.</i> (2014)
<i>Nanochloropsis oceanica</i>	0.33	0.10	0.34	Xia <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0.17	0.48	0.21	Becker (2007)
<i>Porphyridium cruentum</i>	0.40–0.57	0.28–0.39	0.09–0.14	Becker (2007)
<i>Dunaliella bioculata</i>	0.04	0.49	0.08	Demirbas (2010)
<i>Tetraselmis maculata</i>	0.15	0.52	0.03	
<i>Prymnesium parvum</i>	0.25–0.33	0.28–0.45	0.22–0.38	
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0.23	0.47	0.019	
<i>Scenedesmus dimorphous</i>	0.21–0.52	0.08–0.18	0.16–0.40	
<i>Spirogyra</i>	0.33–0.64	0.06–0.20	0.11–0.21	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.10–0.17	0.50–0.56	0.12–0.14	Becker (2007)
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.12–0.17	0.51–0.58	0.14–0.22	
<i>Spirulina maxima</i>	0.13–0.16	0.60–0.71	0.06–0.07	
<i>Spirulina platenensis</i>	0.08–0.14	0.46–0.63	0.04–0.09	
<i>Anabaena cylindrica</i>	0.25–0.30	0.43–0.56	0.04–0.07	
<i>Synechococcus</i> sp.	0.15	0.63	0.11	
<i>Dunaliella saliana</i>	0.32	0.57	0.06	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0.26	0.57	0.02	
<i>Euglena gracilis</i>	0.14–0.18	0.39–0.61	0.14–0.20	
<i>Arthrospira platensis</i>	0.44	0.45		Cheng <i>et al.</i> (2012)

Ref.: Dass & Varanasi (2019).

Tabla A.17. Ventajas y limitaciones de estanques abiertos y fotobiorreactores.

Sistema producción	Ventajas	Limitaciones
Estanque	Relativamente barato	Pobre productividad de biomasa
	Fácil de limpiar	Se requiere gran área de tierra
	Utiliza tierras no agrícolas	Limitado a unas pocas cepas de algas
	Entradas de baja energía	Mezclado pobre, utilización de luz y CO ₂
	Mantenimiento fácil	Los cultivos se contaminan fácilmente
Fotobiorreactor tubular	Gran superficie de iluminación.	Algún grado de crecimiento de la pared
	Adecuado para cultivos al aire libre	Ensuciamiento
	Relativamente barato	Requiere gran espacio de tierra
	Buenas productividades de biomasa	Gradientes de pH, oxígeno disuelto y CO ₂ , a lo largo de los tubos
Fotobiorreactor placa plana	Alta productividad de biomasa	Escalamiento difícil
	Fácil de esterilizar	Difícil control de temperatura
	Baja acumulación de oxígeno	Pequeño grado de estrés hidrodinámico
	Templado fácilmente	Algún grado de crecimiento de la pared
	Buen camino de luz, con gran superficie de iluminación	
	Adecuado para cultivos al aire libre.	
Fotobiorreactor de columna	Compacto	Área de iluminación pequeña
	Alta transferencia de masa	Caro, comparado con estanques abiertos
	Bajo consumo de energía	Esfuerzo cortante
	Buena mezcla con bajo esfuerzo cortante	Construcción sofisticada
	Fácil de esterilizar, Fotoinhibición y fotooxidación reducidas.	

Ref.: Das & Varanasi, (2019); Aro, (2016); Alam *et al.*, (2015); Enamala *et al.*, (2018)

Tabla A.18. Enzimas utilizadas en la degradación de la pared celular de microalgas

Especies de microalgas	Enzimas	Condiciones	Tasa de sacarificación	Referencias
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cellulase, Pectinase β -glucosidase Amylase, Xylanase Chitinase; Lysozyme Sulfatase	Cellulase (0.122 FPU/mg); Pectinase (240 IU/mg protein); Amylase (16 FAU/mL); β -glucosidase (10 U/mL); Xylanase (100 U/mL); Chitinase (0.2 U/mL); Lysozyme (4000 U/mL); Sulfatase (50 U/mL) 50 °C and pH 4.8 for 72 h	79 %	Kim et al. (2014)
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Glucanase Protease	Glucanase (0.3 mL/g biomass); Protease (0.2 mL/g biomass); 50 °C and pH 4.5 for 5 h	86 - 96 %	Mahdy et al. (2014)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Cellulases Amylases	Cellulast 1.5 L (60 μ L/3 g biomass); Novozyme 188 (30 μ L / 3 g biomass); 55 °C and pH 4.5 for 72 h	100 %	Hernández et al. (2015)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Amyloglucosidase	0.4 mL enzyme/g biomass; 55 °C pH 5.5	80.9 %	Lee et al. (2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	α -amylase Amyloglucosidase	120 KNU/g (300 AGU/mL); 50 - 65 °C; pH 4.5 – 5.5; para 10 – 60 min	56 %	Choi et al. (2010)