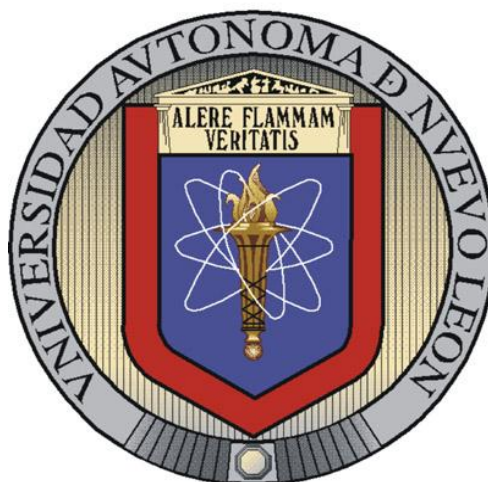


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS**

**“Producción de biocombustibles utilizando *Spirulina sp* como fuente de carbono”**

**Por:**

**Juana Esther Rocha Trejo**

Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestra en Ciencias  
con orientación en Procesos Sustentables

**Junio de 2011**

## APROBACIÓN DE LA TESIS

**“Producción de biocombustible utilizando *Spirulina sp* como fuente de carbono”**

---

Dra. Martha Alicia Suárez Herrera  
Presidente

---

M.C. Diana Bustos Rodríguez

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

---

Dra. María Elena Rodríguez Cantú

---

Dra. Rosa del Carmen Miranda Guardiola  
Coordinadora de Estudios de Posgrado con orientación a Procesos  
Sustentables

---

Dra. Ma. Teresa Garza González  
Subdirectora de Estudios de Posgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente a Dios por darme salud y permitirme llegar al final en esta etapa de mi vida.

A la Dra. María Elena Cantú Cárdenas por orientarme y motivarme en la confección de esta tesis, por su apoyo y comprensión y por sus sugerencias y críticas al presente trabajo a lo largo de este proyecto.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Martha Alicia Suárez Herrera mi directora de tesis, por su asesoría y valiosos consejos en el desarrollo de esta tesis.

A M.C. Diana Bustos por todo el apoyo, conocimiento y paciencia brindada durante este período.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L., por todas las facilidades y apoyos brindados.

Al Laboratorio de Análisis Instrumental, en especial a Berenice, por su asistencia, apoyo y por permitirme utilizar su equipo de Cromatografía de Gases al menos un día a la semana durante los últimos 9 meses.

A mis maestros por toda la enseñanza que me brindaron y por transmitirme sus conocimientos en el campo de la microbiología.

A mi familia por apoyarme y motivarme a no quedarme a medio camino.

A Erick Gabriel García Quintero por todo el apoyo moral y por su ayuda en el trabajo, ya que su compañía, facilitó la elaboración de este proyecto.

Y a mis amigos por acompañarme a lo largo de este proyecto.

A mis hermosas hijas Ericka Jacqueline y Gabriela Jocelyn por darme la fuerza para afrontar cualquier reto e inspirarme a ser mejor persona cada día...

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Crisis energética y combustibles fósiles: El petróleo. . . . .	2
1.2. Fuentes alternas de energía. . . . .	7
1.3. Clasificación de los biocombustibles. . . . .	9
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES	12
2.1. Estado del arte. . . . .	12
2.1.1. El biodiesel. . . . .	13
2.1.2. Bioetanol. . . . .	17
2.1.3. Producción de etanol. . . . .	19
2.1.3.1. Procesos de obtención de etanol. . . . .	19
2.1.3.2. Tipos de biomasa y microorganismos utilizados para la obtención de etanol. . . . .	21
2.1.4. Fuentes alternas de biomasa: microalgas, algas y cianobacterias. . . . .	25
2.1.4.1. Las cianobacterias. . . . .	27
2.1.4.2. <i>Spirulina sp.</i> . . . . .	28
2.1.5. Técnicas para determinar etanol y azúcares reductores. . . . .	35
2.1.5.1. Cromatografía de gases. . . . .	35
2.1.5.2. Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. . . . .	36
CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	38
3.1. Hipótesis. . . . .	38
3.2. Objetivo general. . . . .	38
3.3. Objetivos específicos. . . . .	38

CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA	39
4.1 Equipos y materiales. . . . .	39
4.2 Caracterización de la <i>Spirulina sp.</i> . . . . .	40
4.3 Hidrólisis de la <i>Spirulina sp.</i> . . . . .	41
4.4 Activación de la cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae.</i> . . . . .	42
4.5 Preparación del inóculo. . . . .	42
4.6 Curvas de crecimiento de la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae.</i> . . . . .	43
4.7 Tolerancia a la glucosa de la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae.</i> . . . . .	44
4.8 Producción de etanol por medio de <i>Saccharomyces cerevisiae.</i> . . . . .	44
4.8.1. Pruebas de producción de etanol. . . . .	47
4.8.2. Evaluación del consumo de sustrato. . . . .	48
4.8.2.1. Curva de calibración de azúcares reductores. . . . .	48
4.8.2.2. Preparación de la muestra. . . . .	50
4.9 Efecto del escalado en la producción de etanol. . . . .	51
 CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 53
5.1 Caracterización de la <i>Spirulina sp.</i> . . . . .	53
5.2 Activación de la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae.</i> . . . . .	54
5.3 Cinéticas de crecimiento. . . . .	55
5.4 Tolerancia a la glucosa de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
5.5 Producción de etanol. . . . .	60
5.6 Efecto del escalamiento en la producción de etanol. . . . .	71
 CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	 73
 RECOMENDACIONES	 75
 REFERENCIAS	 76
 APÉNDICES	

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Clasificación por generaciones de los biocombustibles.	10
II	Tipos y definición de los biocombustibles.	11
III	Comparación biodiesel-petrodiesel en motor de diesel.	14
IV	Materias primas de mayor estudio y propiedades del biodiesel producido.	15
V	Producción de bioetanol por fermentación con <i>S. cerevisiae</i> .	22
VI	Producción de bioetanol por medio de fermentación con diferentes microorganismos y fuentes de carbono.	24
VII	Algas y microalgas utilizadas para la producción de biocombustibles.	26
VIII	Clasificación taxonómica de <i>Spirulina maxima</i> .	29
IX	Composición química de <i>Spirulina geitierie</i>	32
X	Sustancias presentes en la <i>Spirulina sp.</i>	33
XI	Vitaminas presentes en <i>Spirulina sp.</i>	34
XII	Composición de los medios de cultivo.	40
XIII	Diseño de experimentos.	47
XIV	Estándares para la construcción de la curva de calibración de	49

azúcares reductores.

XV	Diluciones de la muestra.	50
XVI	$\mu_{\text{máx}}$ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en los diferentes medios de cultivo.	57
XVII	$\mu_{\text{máx}}$ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPS a diferentes concentraciones de fuente de carbono.	60
XVIII	Producción de etanol (mL/L) a diferentes concentraciones de azúcar a partir de biomasa hidrolizada de <i>Spirulina sp.</i>	63
XIX	Claves utilizadas para el diseño de experimentos.	66
XX	Datos de ANOVA.	70



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Reservas de petróleo probadas hasta el 1 de Enero del 2010.	3
2	Evolución de las reservas de petróleo.	5
3	Cambio de las reservas de petróleo 2009-2010.	5
4	Curva de Hubbert	6
5	Rutas térmicas, biológicas y químicas para la obtención de biocombustibles y productos químicos.	13
6	Rutas térmicas y biológicas para la obtención de etanol.	19
7	Ciclo de vida de <i>Spirulina sp.</i>	31
8	Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases.	36
9	Reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con glucosa.	37
10	IR de la biomasa de <i>Spirulina sp.</i>	54
11	Cinética de crecimiento para la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en diferentes medios de cultivo.	56
12	Cinética de crecimiento para la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPS a diferentes concentraciones de glucosa.	59
13	Producción de etanol y consumo de sustrato en medio YPS a) 100 g/L y b) 120 g/L de glucosa	62

14	Producción de etanol en medio YPS suplementado con biomasa de <i>Spirulina sp.</i> a diferentes concentraciones.	64
15	Producción y consumo de sustrato en medio YPS a diferentes concentraciones de azúcar	66
16	Comportamiento en la producción de etanol modificando las variables dependientes a) C1T1, b) C1T2, c) C1T3, d) C2T1, e) C2T2, f) C2T3, g) C3T2 y h) C3T3.	68
17	Producción de etanol y consumo de sustrato a las mejores condiciones de fermentación.	69
18	Interacción de los factores en el diseño de experimentos.	71
19	Efecto del escalado en la producción de etanol y consumo de sustrato en volúmenes de 5, 50 y 500mL.	72

## NOMENCLATURA

AA	Absorción Atómica
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
g	Gramos
h	Horas
CG	Cromatografía de Gases
L	Litros
log	Logaritmo
MMbpce	Miles de millones de barriles de petróleo crudo equivalente
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
D.O.	Densidad óptica
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
Temp.	Temperatura (°C)
t	Tiempo
v/v	Volumen/volumen
X	Concentración celular en tiempo t
X <sub>0</sub>	Concentración celular a tiempo t=0

YGB	Caldo de glucosa y levadura
YM	Caldo de extracto de malta
YPS	Caldo de sacarosa y levadura
$\mu$	Tasa específica de crecimiento celular
$\mu_{\text{máx}}$	Tasa específica de crecimiento celular máxima

## RESUMEN

Juana Esther Rocha Trejo  
Universidad Autónoma de Nuevo León

Fecha de graduación: Junio, 2011  
Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Producción de biocombustibles utilizando *Spirulina sp.* como fuente de carbono

Número de páginas: 116

Candidata para el grado de Maestría en  
Ciencias con orientación en Procesos Sustentables

Área de estudio: Procesos Sustentables

**Propósito y Método del Estudio:** Se estudió el comportamiento de biomasa de *Spirulina sp.* como fuente de carbono en la producción de etanol modificando la temperatura, concentración de células y concentración de fuente de carbono. El cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo a partir de levadura de panadería comercial, activándola mediante resiembra periódica en medio YM por 72 h e incubación a 30 °C y 150 rpm. Se estudió el comportamiento de la levadura en diferentes medios de cultivo y concentraciones de fuente de carbono, monitoreando el crecimiento celular a tiempos regulares por espectrofotometría a 600 nm, la cantidad de bioetanol producido por CG y el carbohidrato residual por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Todos los experimentos se corrieron por triplicado. Los resultados obtenidos para la caracterización fisicoquímica de *Spirulina sp.* fueron los siguientes: pH inicial de 6.38, humedad 2.67% y 18.13% de azúcares reductores promedio en su composición. El cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* presentó mayor crecimiento en medio YPS, una tolerancia máxima de glucosa de 120 g/L y producción de etanol de 15.48% v/v a las 30 h, en medio YPS. Se elevó la cantidad de glucosa tolerada por *Saccharomyces cerevisiae* reportada en 10 g/L.

**Contribuciones y Conclusiones:** En este trabajo se obtuvo una producción de etanol de 15.48% v/v mediante una fermentación a escala laboratorio utilizando como fuente de carbono biomasa de *Spirulina sp.* después de 30 h de incubación.

**FIRMA DEL ASESOR:** \_\_\_\_\_

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día la contaminación ambiental es una de las problemáticas de mayor relevancia en el mundo. (The Royal Society, 2008). En las últimas décadas, el aumento de la población, el desarrollo económico, el consumo individual, y la demanda de energía que va en aumento, son algunos factores más comunes que ayudan a su expansión a un nivel cada vez más crítico para la humanidad. (Wyman, 2001). El clima está en constante cambio como efecto de la contaminación, entre los causantes de estos cambios se encuentran los gases de invernadero, que a su vez, influyen en que los fenómenos climatológicos, tales como, huracanes, tsunamis, tormentas tropicales y sequías en algunas partes del mundo sean cada vez más desastrosos y duraderos. (BUN-CA, 2002).

Se ha extraído una gran cantidad de carbono en la forma de petróleo y carbón del suelo en los últimos 100 años. Éste se ha estado utilizando como

combustible principalmente para el medio de transporte, arrojando cerca de 70 millones de toneladas de CO<sub>2</sub> por día. (Evangelos & Costas, 2009) (BUN-CA, 2002).

Las emisiones de CO<sub>2</sub> emitidas por el uso de los combustibles fósiles, ha estado en constante aumento en los últimos 100 años, provocando un aumento de 0.8 °C durante ese período de tiempo. Este dato es relevante, pues se predice que para el año 2100 la temperatura de la tierra aumentará entre 1.4 y 5.8 °C si no se efectúan reformas energéticas que entren en vigor lo más pronto posible, de no hacerlo la temperatura promedio se incrementará a un nivel inimaginable, poniendo fin a un clima favorable para la existencia de los seres vivos. (The Royal Society, 2008).

### **1.1. Crisis energética y combustibles fósiles: El petróleo**

La crisis energética es un problemática que afecta no solamente a México, sino también al mundo entero debido a la globalización. El problema es de orden primordial, ya que normalmente hace referencia a una disminución de la disponibilidad de petróleo, electricidad u otros recursos naturales; y la demanda energética va en constante aumento, debido a la sobrepoblación de la humanidad. (Demirbas, 2005) (New Partnership for Africa's (NEPAD), 2007).

En los últimos años la sustitución del petróleo como la principal fuente de

combustible para los medios de transporte se ha convertido en materia primordial, como lo demuestra el aumento de la volatilidad de los precios y disminución de las reservas. Las reservas de petróleo han disminuido a nivel mundial casi al punto de agotamiento en la última década. En México, las reservas en el año 2007 estaban valuadas en cerca de 45,376 miles de millones de barriles de petróleo crudo equivalente (MMbpce). En el año 2010 las reservas de crudo ascendieron a 13,992 millones de barriles de petróleo crudo equivalente, de estas el 74% corresponde al crudo; 10% a condensados y 16% a gas seco. En la figura 1 se muestran las reservas probadas al 1 de enero del 2010. (PEMEX, 2010).

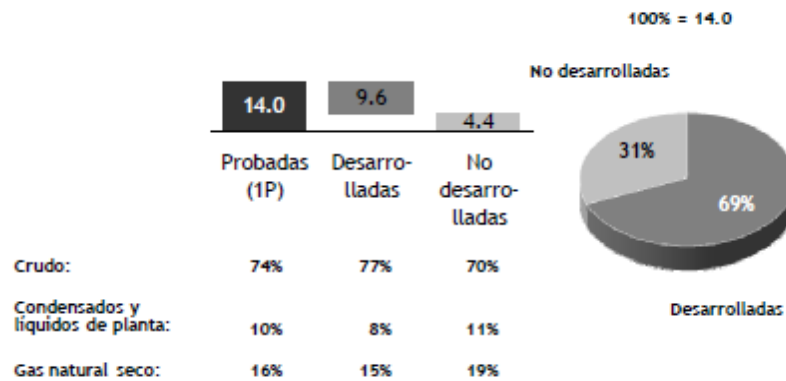


Figura 1. Reservas de petróleo probadas hasta el 1 de enero del 2010 (PEMEX, 2010)

Las reservas son acumulaciones de petróleo que se considera que pueden ser recuperadas comercialmente a partir de acumulaciones conocidas a una fecha futura. Las reservas probables, también llamadas reservas 2P, son aquellas donde el análisis de la información geológica y de ingeniería de los yacimientos en estudio sugiere que son más factibles de ser comercialmente



recuperables. Si se emplean métodos probabilísticos para su evaluación, habrá una probabilidad de al menos 50% de que las cantidades a recuperar sean iguales o mayores que la suma de las reservas probadas más probables. (Evangelos & Costas, 2009).

Las reservas posibles, también llamadas 3P, son aquellos volúmenes de hidrocarburos cuya información geológica y de ingeniería sugiere que es menos segura su recuperación comercial que las reservas probables.

Las reservas de petróleo han disminuído cerca del 17% en el período del año 2005 al 2009. En el período del primero de enero del 2009 al primero de enero del 2010, las reservas 3P de crudo disminuyeron en 433 millones de barriles, principalmente por el efecto de la producción de 950 millones de barriles de crudo, mientras que en este mismo período, las reservas probadas aumentaron solamente 15 millones de barriles al restituirse una parte sustancial de la producción. Además, las reservas probables disminuyeron 355 millones de barriles por la reclasificación a reserva probada. Cabe mencionar que las reservas posibles disminuyeron en 93 millones de barriles por efecto de las reclasificaciones hechas por los descubrimientos realizados durante 2009. (PEMEX, 2010) (Seungdo & Bruce, 2006).

Igualmente en el mismo período, las reservas probadas disminuyeron 316 MMbpce, mientras que la reserva 2P se redujo en 596 MMbpce y la reserva 3P en 488 MMbpce (figura 2). (PEMEX, 2010).

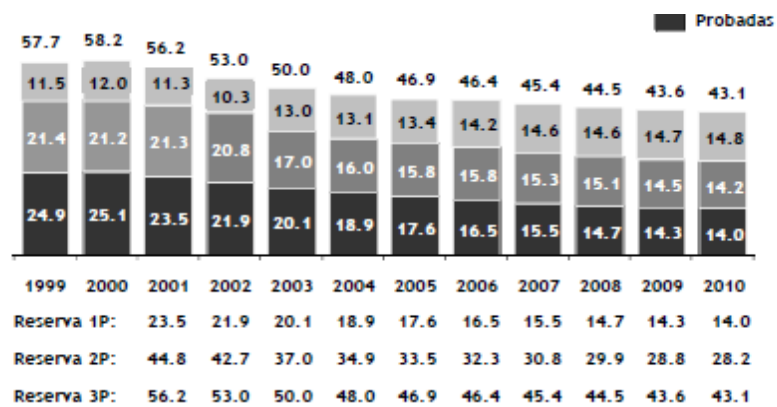


Figura 2. Evolución de las reservas de petróleo (PEMEX, 2010)

Una de las causas de este efecto fue que en el período anterior hubo una producción de 1,378 MMbpce, misma que debió ser compensada parcialmente por el restablecimiento de los descubrimientos, desarrollos, revisiones y delimitaciones de las nuevas reservas, este efecto se observa en la figura 3.

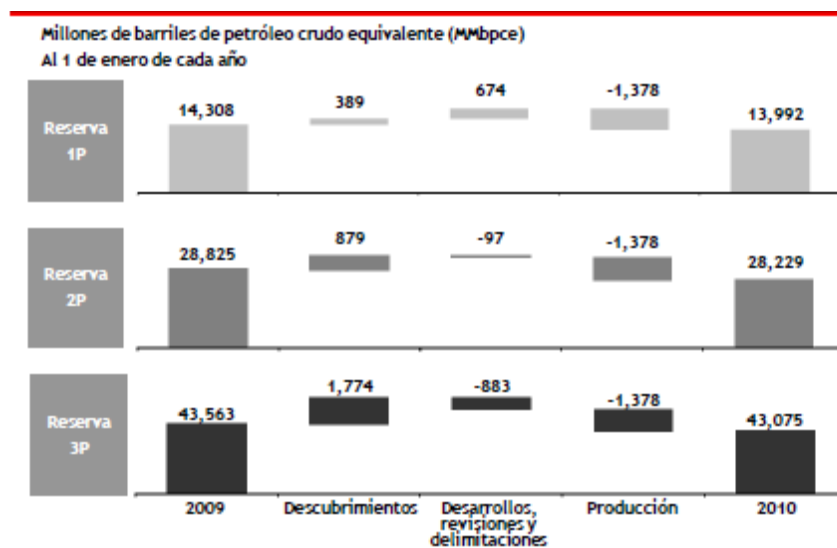


Figura 3. Cambio de las reservas de petróleo 2009-2010. (PEMEX, 2010)

Durante el año 2009 la producción de PEMEX alcanzó en promedio por día 2 millones 601 mil barriles de crudo y 7 mil 31 millones de pies cúbicos de gas natural, que corresponden a una producción anual de 1 mil 378 MMbpce. Sin embargo, la declinación de las reservas probadas se ha reducido de 6% en el período 2005-2007 a 3% en el período 2008-2010. (PEMEX, 2010).

Un hecho notable es que todas las economías mundiales dependen mayormente del consumo del petróleo y su agotamiento podría causar la mayor crisis energética hasta el momento. (Gil, 2008).

La teoría del pico de Hubbert se enfoca en la demanda, consumo y producción del petróleo. Esta teoría predice que la producción mundial de petróleo llegará a su cumbre y después descenderá tan rápido como creció, como se muestra en la figura 4. (Wyman, 2001).

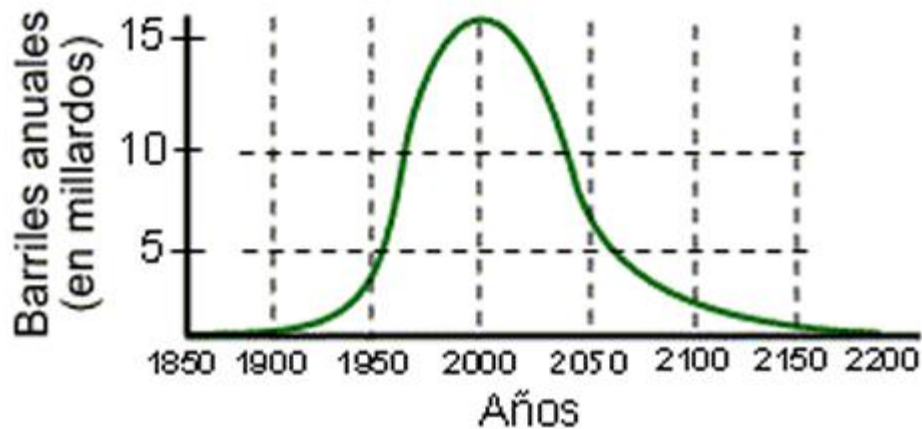


Figura 4. Curva de Hubbert (Al-Husseini, 2006)

Según la teoría de Hubbert la producción de los pozos petrolíferos tienen forma de campana. En la que se explica que la cantidad anual de petróleo

extraída de los pozos crece hasta llegar al tiempo de vida medio del pozo, que empieza a envejecer, y por consiguiente la extracción se hace más lenta, aun utilizando la mejor tecnología para cumplir con el objetivo. Esto trae como consecuencia que al aumentar la demanda de los países emergentes, los países productores no sean capaces de producir suficiente petróleo para satisfacerla. Para los próximos años se prevé que la producción de combustibles fósiles será cada vez más escasa y costosa. (Al-Husseini, 2006) (The Royal Society, 2008).

## **1.2. Fuentes alternas de energía**

Todos los países dependen del consumo y producción de petróleo. Es por eso que el agotamiento del petróleo es un problema cada vez más grave. Aunque la producción de petróleo crudo está llegando a su máxima capacidad, es razonable suponer que las fuentes de combustibles fósiles convencionales no pueden seguir cumpliendo la demanda de energía de la población en constante crecimiento. (Al-Husseini, 2006).

Ante esta situación de desabasto energético, el gobierno y el sector privado, en colaboración con científicos, buscan nuevas fuentes de energía que puedan sustituir al petróleo lo más pronto posible. (Savage, Way & Silver, 2009). De esta manera, el progreso en el campo científico y su aplicación a través de mejores y novedosos productos para ampliar la calidad de vida crea

nuevas esperanzas para el futuro de los pueblos a nivel mundial. (The Royal Society, 2008).

Entre las alternativas de energías limpias y renovables se encuentran la energía eólica, geotérmica, hidráulica, mareomotriz, solar, entre otras. Es conocido que las investigaciones de nuevas fuentes energéticas están centradas en generación de electricidad, mientras que la mayor parte de la energía consumida procede de los combustibles líquidos derivados del petróleo. (BUN-CA, 2002) (Savage, Way & Silver, 2009).

Uno de los sectores más afectados por la crisis del petróleo es el del transporte. El sistema de transporte se ha convertido en el principal demandante de combustible fósil dependiendo casi totalmente de este producto. Es por eso que se plantea el uso de los biocombustibles. A pesar de que la biomasa en condiciones específicas es usada para generar calor y electricidad en su combustión directa, también tiene propiedades como combustible líquido. Los biocombustibles son de los pocos materiales disponibles actualmente que tienen el potencial para desplazar completamente al petróleo y proporcionar un beneficio al medio de transporte. (Avagyan, 2008).

### 1.3. Clasificación de los biocombustibles

Los biocombustibles son combustibles derivados de biomasa de origen biológico, tal como, trigo, maíz o semillas oleaginosas. (Bailey & Ollis, 1997). Los biocombustibles abarcan una gran variedad de productos con diversas características. Entre sus principales ventajas se encuentran:

- ✓ Proporcionar una fuente de energía reciclable.
- ✓ Revitalizar las economías rurales, y generar empleo al favorecer la puesta en marcha de un nuevo sector en el ámbito agrícola.
- ✓ Mejorar la competitividad al no tener que importar fuentes de energía tradicionales.
- ✓ Reducir las emisiones de efecto invernadero al 12% por el etanol y al 41% por el biodiesel.

El último punto es el más importante, la biomasa utilizada no solo disminuye las emisiones de CO<sub>2</sub> durante su combustión, sino que además, absorbe CO<sub>2</sub> del medio ambiente durante su crecimiento. (Campbell, 2008). Los biocombustibles se dividen en varias generaciones según su origen, mostradas en la tabla I.

Tabla I. Clasificación por generaciones de los biocombustibles.

Generación	Definición	Ejemplo de biomasa
1	Son aquellos provenientes de la biomasa, especialmente de cultivos agrícolas destinados a la alimentación humana.	Maíz, caña, soja, entre otras.
2	Pueden producirse a partir de fuentes no alimentarias como residuos agrícolas (paja) y desechos de maderas.	Paja, muebles de madera desechados
3	Utilizan métodos de producción en cultivos bioenergéticos específicamente diseñados o adaptados (a menudo por medio de técnicas de biología molecular) para mejorar la conversión de biomasa a biocombustible.	Maíz modificado genéticamente
4	La clave es la «captación y almacenamiento de carbono (CAC)», tanto a nivel de la materia prima como de la tecnología de proceso. La materia prima no sólo se adapta para mejorar la eficiencia de proceso, sino que se diseña para captar más dióxido de carbono, a medida que el cultivo crece.	Árboles modificados.

Se estima que los biocombustibles de segunda generación son los combustibles que dejarán una huella de carbono mucho menor que la de los biocombustibles de primera generación. A menudo los biocombustibles son mezclados con otros combustibles en pequeñas cantidades, proporcionando una reducción limitada de los gases de efecto invernadero, por lo que países desarrollados como Estados Unidos y parte de Europa, están

implementando legislaciones que exijan a los proveedores de combustibles la mezcla de biocombustibles a sus productos, con el fin de mejorar y reducir las emisiones de los gases productores del efecto invernadero. (New Partnership for Africa's (NEPAD), 2007). En la tabla II se muestran los diferentes tipos de biocombustibles.

Tabla II. Tipos y definición de los biocombustibles.

<b>Tipo de biocombustible</b>	<b>Definición</b>
<b>Biodiesel</b>	Está compuesto por ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables.
<b>Bioetanol</b>	Se obtiene por fermentación utilizando como fuente de carbono azúcar, maíz, caña de azúcar y sustancias con alto contenido de celulosa, como la madera y residuos agrícolas.
<b>Biogas</b>	Es un gas combustible que se genera en medios naturales o en dispositivos específicos, por las reacciones de biodegradación de la materia orgánica, mediante la acción de microorganismos.
<b>Madera</b>	Es la que se utiliza para alimentar el fuego, es una de las formas más simples de biomasa.

Los biocombustibles ya están entrando al mercado, debido entre otras cosas, a su potencial para mejorar la seguridad energética y contribuir a la mitigación del cambio climático. (BUN-CA, 2002).



# CAPÍTULO 2

## ANTECEDENTES

### 2.1. Estado del arte

La problemática relacionada con el petróleo en la actualidad va en aumento. Los biocombustibles se postulan como la solución a la crisis energética ofreciendo mayor seguridad en el ámbito energético. Uno de los retos más importantes, aparte de abastecer de energía a los países del mundo, es la sustentabilidad: estabilizar y revertir el cambio climático que ha afectado a la humanidad en los últimos 100 años. (Barraza *et. al.*, 2009). Es por eso que la producción mundial de los biocombustibles está aumentando sostenidamente, al ofrecer dentro de sus ventajas el desarrollo rural, mejorar el desempeño de los vehículos, así como menores emisiones de gases de invernadero y material particulado y reducir la demanda del consumo de petróleo. (Campbell, 2008).

Existen diferentes procesos para la producción de biocombustibles, según el producto final que se desea obtener. En la figura 5 se muestran las rutas térmicas, biológicas y químicas para la producción de biocombustibles y productos químicos de diferentes tipos de biomasa según su composición química principal dando como resultado una amplia gama de productos químicos, biodiesel, bioetanol, biobutanol, entre otros. (Demirbas, 2005).

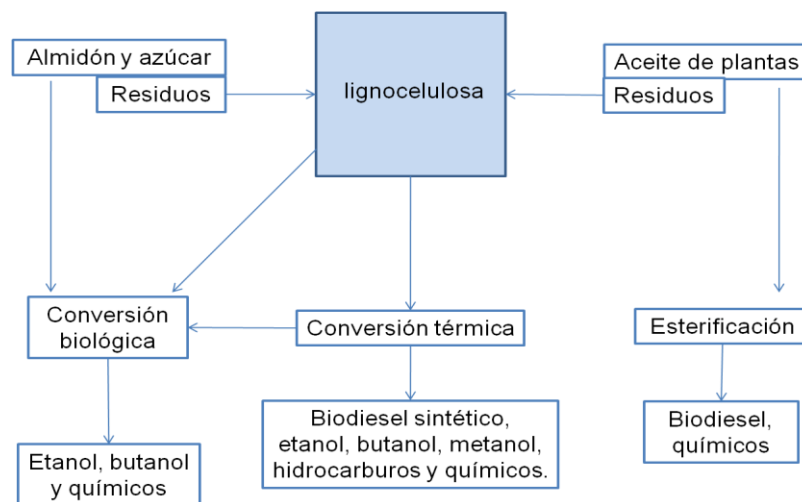


Figura 5. Rutas térmicas, biológicas y químicas para la obtención de biocombustibles y productos químicos. (The Royal Society, 2008)

### 2.1.1. El biodiesel

El biodiesel es una alternativa competitiva y amigable con el medio ambiente. Entre las características positivas del biodiesel se encuentran que es biodegradable, renovable, no tóxico, posee lubricidad inherente, un punto de inflamación relativamente alto, un balance energético positivo, y en

comparación al petrodiesel (tabla III), tiende a reducir las emisiones de escape a niveles dentro de los permitidos. El biodiesel está compuesto por ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables. Además, dentro de esta definición se incluyen, ésteres metílicos o etílicos, y otros ésteres de monoalcoholes como los ésteres isopropílicos, butílicos etc. (Barraza *et. al.*, 2009).

Tabla III. Comparación biodiesel-petrodiesel en motor diesel. (Barraza, et al., 2009).

Parámetro	Unidades	Diesel	Biodiesel
Poder Calórico	Kcal./L	8.74	7.795
Densidad	(15°C) g/cm <sup>3</sup>	0.820-0.845	0.860-0.900
Punto de Inflamación	°C	55 (mínimo)	101 (mínimo)
Azufre ppm	ppm	350 (máximo)	10 (máximo)
Contaminación Total	ppm	24 (máx)	---
Agua	ppm	200 (máx)	500 (máx)
Viscosidad Cinemática	cSt	2.0 – 4.5	3.5 – 5.0

Disponible en : [www.fiaagro.org.sv/archivos/0/997.pdf](http://www.fiaagro.org.sv/archivos/0/997.pdf)

En los últimos años se han investigado diferentes tipos de biomasa para la producción no solo de biodiesel, sino de todos los tipos de biocombustibles. En la tabla IV se muestran diferentes tipos de materia prima y algunas propiedades del biodiesel producido. (BUN-CA, 2002).

Una de las ventajas destacables de la producción de biocombustibles, es que se pueden aprovechar tanto los excesos de cultivos agrícolas, como los

residuos industriales, como por ejemplo, los desechos de las frutas obtenidos en la producción de jugos y bebidas, (cáscara de naranja, entre otras). (Demirbas, 2005).

Tabla IV. Materias primas de mayor estudio y propiedades del biodiesel producido. (Querini, 2006)

Ésteres biológicos para propósitos técnicos					
	Punto de fusión °C			Número de yodo	Número de cetano
	Aceite o grasa	Metiléster	Etiléster		
<b>Aceites:</b>					
Colza	-5	-10	-12	110 a 115	58
Girasol	-18	-12	-14	125 a 135	52
Soja	-12	-10	-12	125 a 140	53
Algodón	0	-5	-8	100 a 115	55
Maíz	-5	-10	-12	115 a 124	53
Oliva	-12	-6	-8	77 a 94	60
Coco	20 a 24	-9	-6	8 a 10	70
Semilla de palma	20 a 26	-8	-8	12 a 18	70
Aceite de palma	30 a 38	14	10	44 a 58	65
Oleína de palma	20 a 25	5	3	85 a 95	65
Estearina de palma	35 a 40	21	18	20 a 45	85
<b>Grasas:</b>					
Grasa de vaca	35 a 40	16	12	50 a 60	75
Grasa de cerdo	32 a 36	14	10	60 a 70	65

Una gran cantidad de biomasa está siendo estudiada para utilizarla como materia prima en la producción de biocombustibles, con las características nativas de su país de origen, así como los cambios climáticos y tipos de suelo para su máxima obtención. (BUN-CA, 2002).

La biomasa se puede transformar a biodiesel por esterificación o por conversión térmica. Diversos estudios se han enfocado principalmente en la conversión térmica de la biomasa, por ejemplo, Du Z. *et al.* en el año 2011, realizaron la pirólisis del alga *Chlorella sp.* por medio de un horno de microondas, obteniendo un 28.6% de biodiesel.

La composición química del biodiesel depende del tipo de biomasa utilizada para su producción, y de acuerdo a su composición química, varían las propiedades del producto final. (DeOliveira *et al.*, 2006). En el año 2006, DeOliveira E. *et al.* obtuvieron el calor de combustión de biodiesel preparado por pirólisis y transesterificación de diferentes biomásas, observando que esta propiedad del biocombustible variaba de manera significativa dependiendo del tipo de biomasa utilizada.

Sin embargo, existen algunos problemas asociados con el uso del biodiesel como, mejorar las propiedades de flujo en frío y la estabilidad de almacenamiento, así como reducir la concentración de óxidos de nitrógeno (NOx) en las emisiones de escape, especialmente de los motores que no están equipados con las nuevas tecnologías de reducción de emisiones de escape. A

esto, se le suma que la biomasa utilizada para la producción de biodiesel puede variar considerablemente, tanto sus propiedades, como su producción de acuerdo al clima y la biodisponibilidad. Por ejemplo, los aceites de colza y girasol predominan en Europa, el aceite de palma que predomina en los países tropicales, y aceite de soya y grasas animales en los Estados Unidos. (Lin & Tanaka, 2006).

### **2.1.2. Bioetanol**

La producción de etanol es una forma de combatir la contaminación ambiental y la demanda de petróleo. El bioetanol es un alcohol de dos carbonos obtenido de la fermentación de azúcares presentes en biomasa de origen vegetal, como caña de azúcar, cereales, remolachas (biomasa celulósica), entre otros. (Chen, Wu & Fukuda, 2008) (Peña & Arango, 2009).

El bioetanol es el biocombustible líquido renovable para vehículos de motor más conocido y de mayor éxito en el mundo. La mayoría de la población piensa en el bioetanol como el único biocombustible líquido y que los avances en tecnología de biocombustibles girará en torno a la conversión enzimática de la biomasa celulósica en azúcares simples para su fermentación. Esto no se aleja mucho de la realidad, pues en pocos años la producción a gran escala de bioetanol será posible. El etanol, a diferencia de la gasolina, es un combustible oxigenado que contiene 35% de oxígeno, que reduce las emisiones de NO<sub>x</sub> y

partículas procedentes de la combustión. Cuando se quema el etanol procedente de la fermentación, no se produce ningún aumento neto de dióxido de carbono en la atmósfera. El etanol puro tiene un octanaje más alto que la gasolina común (Lang, Macdonald & Hill, 200a1).

Una de las consideraciones primordiales para la producción de alcohol etílico es utilizar recursos renovables (de preferencia desechos de procesos industriales), y la determinación de la viabilidad económica y técnica del uso de alcohol como combustible de automoción mezclado con la gasolina. El uso de gasohol oalconafta (mezcla de etanol y gasolina) como combustible para motores alternativos ha ido en constante aumento en todo el mundo. Las proporciones de la mezcla más utilizada son **E10** y **E85**, con contenidos de etanol del 10% y 85%, respectivamente. (Seungdo & Bruce, 2006).

El principal productor de bioetanol mundial es Brasil, que en conjunto con Estados Unidos de América producen el 70% de etanol mundial. En Brasil se desarrollaron los primeros vehículos a base de biocombustible en el año 2003. En la actualidad cerca del 40% de las necesidades del medio de transporte en Brasil es sostenido por el bioetanol. (The Royal Society, 2008). En México, las pruebas piloto fueron llevadas a cabo en los años 2008-2009, mientras que su uso definitivo en vehículos está en proceso.

## 2.1.3. Producción de etanol

### 2.1.3.1. Procesos de obtención de etanol

El bioetanol se puede producir por diferentes vías, que pueden ser: biológicas, químicas y térmicas. Los principales procesos de obtención son fermentación biológica ó síntesis química. (mostrados en la figura 6). (The Royal Society, 2008).

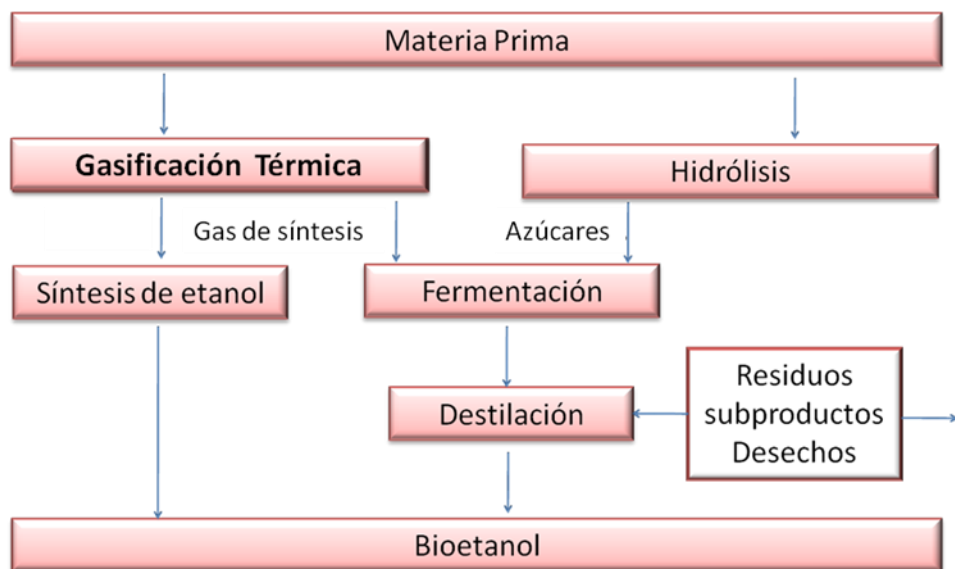


Figura 6. Rutas térmicas y biológicas para la obtención de etanol. (The Royal Society, 2008)

Las rutas térmicas y químicas dependen de la gasificación de la biomasa para utilizarla en la síntesis del etanol.

**Conversión por gasificación térmica:** reduce la materia orgánica (biomasa) en gas de síntesis, que está compuesto por una mezcla de hidrógeno



y monóxido de carbono. El etanol puede ser sintetizado directamente del gas de síntesis mediante un proceso químico ó, el gas podría alimentar a un proceso de fermentación biológica. (Subramani & Gangwal, 2008).

**Síntesis química:** El etileno es modificado químicamente por hidratación catalítica con ácido sulfúrico como catalizador, obteniendo una mezcla de etanol y agua que posteriormente se destila para su purificación. Dentro de sus ventajas se encuentra que es más económico que la fermentación tradicional, sin embargo, no es muy utilizado (5% de producción mundial). (Demirbas, 2005).

**Fermentación biológica:** Consiste en utilizar microorganismos que procesan los azúcares fermentables para su alimentación, obteniendo como productos alcohol etílico y otros subproductos. Todo el proceso de fermentación utiliza tres pasos: (a) preparar una solución de azúcares fermentables, (b) la fermentación de los azúcares para bioetanol, y (c) la separación y purificación del etanol, por lo general por destilación. La fermentación biológica es el proceso más utilizado para obtener etanol. (The Royal Society, 2008).

Todo tipo de biomasa puede ser utilizada en cualquiera de los métodos, aunque para el caso de alimentos con azúcares y almidón tiende a utilizarse el proceso biológico. La fermentación puede ser realizada en forma directa por azúcares fermentables, o de manera indirecta convirtiendo hidratos de carbono como el almidón y la celulosa, por hidrólisis, en azúcar. La hidrólisis es un

proceso de tratamiento de la materia prima que consiste en romper los enlaces O-glucosídicos de las fracciones de la hemicelulosa y la celulosa en componentes monoméricos como: pentosas y hexosas, que después del tratamiento pueden ser fermentadas para producir el bioetanol. (Galbe & Zacchi, 2002). La hidrólisis se clasifica en dos tipos: hidrólisis química y enzimática. La hidrólisis química se lleva a cabo en medio ácido (diluido ó concentrado), un ejemplo es el tratamiento del almidón ó celulosa, mientras que la hidrólisis enzimática utiliza extractos de enzimas para descomponer los polisacáridos, ejemplo el tratamiento de la malta. (Regalbuto, 2009).

### **2.1.3.2. Tipos de biomasa y microorganismos utilizados para la obtención de etanol**

Los microorganismos productores de etanol son denominados etanológenos, y son microorganismos que utilizan azúcares de cinco o seis carbonos para su crecimiento. De todos los microorganismos utilizados en la fermentación, hay tres cepas recombinantes de fermentación que se consideran candidatos para la mejora del proceso a corto plazo y son: *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli* y *Zymomonas*. Otros microorganismos mencionados en investigaciones de fermentación son: *Klebsiella*, *B. stearrowthermophilus* y *Kluyveromyces*. También se conocen otros microorganismos naturales que convierten pentosas a etanol, estas cepas incluyen *P. stipitis*, *Pachysolen tannophilus* y *Candida shehatae*. (Demirbas, 2005). Entre los microorganismos

más utilizados en las investigaciones de bioetanol por fermentación se encuentran *Klebsiella aerogenes*, con un rendimiento de etanol de 24 g/L, *Spirochaeta aurantia*, produce 1.5 g/L y 30017-*K fragilis* con un rendimiento de 18-94 g/L, sin embargo, hay una clara preferencia por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, por los productores de bioetanol a partir de granos. Esta cepa es ampliamente utilizada y conocida porque se ajusta a los equipos existentes de fermentación con un rendimiento promedio de 5.1-91.8 g/L. (Lin & Tanaka, 2006). En la tabla V se muestran trabajos de investigación en los que se utiliza *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo para llevar a cabo la fermentación.

Tabla V. Producción de bioetanol por fermentación con *S. cerevisiae*.

Referencia	Fuente de carbono	Condiciones de fermentación	Resultados
Kuyper <i>et al</i> , 2005	Xilosa-glucosa	pH= 2, 30 °C y 800 rpm, fermentador continuo	0.49 g de etanol/g de biomasa
Ennouali <i>et al</i> , 2006	<i>Gelidium sesquipedale</i>	pH= 4, 31°C, reactor fed-batch	1.2 g de etanol /g de biomasa
Cot <i>et al</i> , 2007	Glucosa	pH= 4, 31°C, reactor fed-batch	0.029 g de etanol /g de biomasa
Adams, Gallagher, & Donnison, 2009	Alga <i>Laminaria sp.</i>	pH= 6 , 26°C, reactor continuo	0.45 g de etanol / g de biomasa
Yang <i>et. al.</i> , 2009	xilosa, glucosa y /ó lignina	pH= 2, 30° C, 600 rpm, reactor tipo fed-batch	0.082 g de etanol / g de biomasa

La técnica de fermentación de carbohidratos es la más utilizada para la producción de bioetanol. La biomasa utilizada para la producción de bioetanol se divide en cuatro grandes familias principales: azúcares (caña o remolacha), cereales (azúcares del almidón), residuos forestales (azúcares contenidos en la celulosa y hemicelulosa) y materiales lignocelulósicos. (Avagyan, 2008).

Dentro de los azúcares fermentables más utilizados se encuentran: la glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa. (Pimentel & Patzek, 2005). Algunos azúcares pueden ser convertidos directamente a bioetanol, mientras que el almidón y la celulosa primero deben ser hidrolizados a azúcares antes de su conversión a bioetanol. (Rodgers, Hu & Zhan, 2009).

En la tabla VI se muestran una serie de investigadores que han trabajado utilizando diferentes fuentes de carbono y diversos microorganismos para la producción de bioetanol, resumiendo las condiciones a las cuales se llevó a cabo la fermentación, así como la concentración de etanol obtenida en cada una de ellas. Destacando *Saccharomyces cerevisiae* por obtener mayor producción de etanol. (Dake, Jadhv & Patil, 2010) (Sommer, Georgieva & Ahring, 2004)

Tabla VI. Producción de bioetanol por medio de fermentación con diferentes microorganismos y fuentes de carbono.

Micro-organismo	Fuente de carbono y concentración (g/l)	T (°C) y pH	Tiempo de incubación (h)	Concentración de etanol (g/l)	Referencia
<i>K. fragilis</i>	Glucosa (20–120)	30, 5.5	18–94	48.96 (max)	Vallet <i>et al</i> , 1996
<i>P. tannophilus</i>	Glucosa (0–25) y xilosa (0–25)	30, 4.5	100	7.8 (max)	Sánchez <i>et. al</i> , 1999
<i>S. cerevisiae</i>	Melaza, (1.6-5)	30, 4.5	24	18.4 máx	Ergun & Mutlu, 2000
<i>S. cerevisiae</i>	Sacarosa (30)	30, 6	72	42	Kiran, Sikander & Lkram, 2003
<i>E. coli</i>	Xilosa (60)	40, 6	42	0.7–0.1	Dien, Cotta & Jeffries, 2003
<i>S. cerevisiae</i>	Glucosa (31.6)	30, 5.5	30	13.7	Yu & Zhang, 2004
<i>E. coli</i>	Xilosa (30-70)	37,6	50	0.7-0.1	Matthew, 2005

Según el balance de materia de la reacción de fermentación, a partir de 100 gramos de glucosa se producen 51.4 g de etanol y 48.8 g de dióxido de carbono teóricamente. Sin embargo, en el proceso real, los microorganismos utilizan parte de la glucosa para sus funciones fisiológicas por lo que el

rendimiento es inferior al 100%. Existen otros factores que afectan la producción de etanol, como son la temperatura, pH, concentración de la fuente de carbono y cantidad de inóculo. (Dien, Cotta & Jeffries, 2003) (Donev & Uzunova, 2002).

La biomasa proveniente de cereales, tiene la desventaja de competir con los cultivos destinados a la alimentación elevando los precios de producción. Es por eso que los investigadores están probando nuevas fuentes de biomasa, que produzcan altos rendimientos de etanol y que sean renovables sin competir con los cultivos destinados a la alimentación. (Chisti, 2007).

#### **2.1.4. Fuentes alternas de biomasa: microalgas, algas y cianobacterias**

Es un hecho que los biocombustibles son la tecnología del momento. Entre los biocombustibles el más destacado es el bioetanol, es por eso que las investigaciones en biotecnología se han dirigido a la identificación de especies adecuadas de biomasa que pueda proporcionar productos de alta energía, sin competir con los cultivos destinados a la alimentación humana. Una nueva alternativa para obtener azúcares fermentables son las microalgas, algas y cianobacterias. (Chisti, 2007) (Campbell, 2008).

Las algas y microalgas cuentan con una gran variedad morfológica y

fisiológica, se encuentran en el suelo y en ambientes acuáticos, realizan la fotosíntesis, pueden vivir a expensas de pocos minerales, CO<sub>2</sub> y luz. (Martín, Almazán & Palomino, 2008). De estos organismos se extraen diferentes aceites y compuestos que se pueden utilizar en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y en el sector energético, así como en la producción de biodiesel. (Evangelos & Costas, 2009). La tabla VII muestra diferentes especies de algas y microalgas, utilizadas en la producción de biodiesel.

Tabla VII. Algas y microalgas utilizadas en la producción de biocombustible.

Alga/microalga	Aceite (% p/p)	Referencia
<i>Spirogyra sp.</i>	11-21	Chisti, 2007
<i>Chlorella vulgaris</i>	14–40/56	Gouveia & Oliveira, 2008
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23	Chisti, 2007
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	Chisti, 2007
<i>Monallanthus salina</i>	>20	Chisti, 2007
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20	Barraza <i>et. al.</i> , 2009
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30	Chisti, 2007
<i>Nannochloris sp</i>	20-35	Gouveia & Oliveira, 2008
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21	Lin & Tanaka, 2006
<i>Chlorella sorokiana</i>	22	Gouveia & Oliveira, 2008
<i>Prymnesium parium</i>	22-38	Lin & Tanaka, 2006
<i>Dunaliella primolecta</i>	23	Chisti, 2007

Las algas y microalgas se aprovechan en la actualidad en la extracción de aceite para la producción de biodiesel (Mandal & Mallick, 2009) (Lardon, 2009) (Vijayaraghavan & Hemanathan, 2009) (Xiong, Li & Wu, 2008), así como también en la producción de bioetanol mediante conversión térmica de la biomasa (Prassone *et. al*, 2000) (Hu *et. al*, 2008), y en los últimos años se han empleado como fuente de carbono para la fermentación. Por ejemplo, en el año 2006 Ennouall *et al.* utilizaron la especie *Gelidium sesquipedale*, obteniendo una producción de 1.2 g de etanol/g de biomasa, y en el año 2008 Adams, *et al.* utilizaron la especie *Laminaria sp.* obteniendo 0.45 g de etanol/g de biomasa. En este proyecto se propone emplear cianobacterias como fuente de carbono para la producción de bioetanol por fermentación utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **2.1.4.1. Las cianobacterias**

Las cianobacterias comprenden un grupo grande y heterogéneo de microorganismos fototróficos que pertenecen al dominio de Bacteria, son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Durante muchos años recibieron el nombre de algas verdeazuladas, pero debido su naturaleza procariota se propuso que se llamaran cianobacterias o bacterias verde-azuladas. Difieren de otros procariotas por la composición de sus ácidos grasos, presentan clorofila *a* y un fotosistema II. Las cianobacterias se dividen en cinco grupos: unicelulares que se dividen por fisión binaria, unicelulares que se dividen por fisión múltiple,



filamentosas con heteroquistes, filamentosas sin heteroquistes y por último, filamentosas ramificadas. Los análisis genéticos recientes han venido a situar a las cianobacterias entre las bacterias gramnegativas. Las cianobacterias tienen en común en sus esquemas metabólicos la ausencia del ciclo de Krebs completo. Las cianobacterias filamentosas sobre todo, poseen la cualidad de fijar nitrógeno atmosférico (Madigan, Martinko & Parker, 2003).

En la naturaleza, las cianobacterias tienen una distribución muy amplia, pueden habitar en lugares terrestres, en lugares de aguas frescas y también pueden estar en aguas saladas. Son más tolerantes a los ambientes extremos que las algas eucariotas, y son los organismos dominantes en manantiales de agua caliente. Un ejemplo de cianobacterias es la *Spirulina sp.*; esta especie es utilizada como alimento desde épocas muy remotas. (Borowitzka, 2009).

#### **2.1.4.2. *Spirulina sp.***

El género *Spirulina* se ha estudiado en los últimos años debido a las propiedades nutricionales descubiertas. Desde épocas muy remotas se ha encontrado una gran variedad de especies de *Spirulina* en diferentes ambientes y condiciones climatológicas, por lo que se deduce que es un microorganismo con alta capacidad de adaptación. Es una especie muy abundante en los lagos de África y en México es encontrada en lagos alcalinos como el lago de Texcoco. (Ciferri, 1983) (Gordillo, Jiménez, Figueroa & Niell, 1999).

La *Spirulina sp.* es una bacteria fotoautótrofa, aparece bajo el microscopio como filamentos espiralados color verde-azulados. Se pueden obtener cultivos en medios de sales alcalinas como carbonatos y nitratos, buena iluminación y buena distribución de nutrientes por medio de agitación.

La familia Oscilatoriaceae contiene un grupo homogéneo de cianobacterias filamentosas con células en forma de espiral y una membrana externa mucilaginosa llamada vaina, las especies más estudiadas son la *Spirulina maxima* y *Spirulina platensis*. (Oliveira, Monteiro, Robbs & Leite, 1999). En la tabla VIII se muestra la clasificación taxonómica de *Spirulina maxima*. (Rodriguez & Triana, 2003).

Tabla VIII. Clasificación taxonómica de *Spirulina maxima* (Rodriguez & Triana, 2003)

<b>Dominio: Bacteria</b>
<b>Phylum: Cyanobacteria</b>
<b>Clase: Cyanobacteria</b>
<b>Orden: Oscillatoriales</b>
<b>Familia: Oscilatoriaceae</b>
<b>Género: <i>Spirulina</i></b>
<b>Especie: <i>S. maxima</i> (=Arthrospira)</b>

(Rodriguez & Triana, 2003)

Dentro de su estructura la *Spirulina sp.* está conformada por una parte

periférica citoplasmática, conocida como cromatoplasma; y otra parte central llamada núcleoplasma. Una de las características del género son los tricomas, que son excrecencias epidérmicas de forma helicoidal, manteniendo esa forma solo en medios líquidos. Una posible explicación a esta teoría es que los cambios en la rigidez de la célula se deban a la hidratación o deshidratación de los oligopéptidos de la capa de peptidoglicano. (Ciferri, 1983) (Rodríguez & Triana, 2003)

La pared celular está formada por cuatro unidades llamadas LI, LII, LIII y LIV, donde la unidad LI, está compuesta por  $\beta$ -1,2-glucano, proporcionando el mayor soporte a la célula, mientras que la unidad LII está formada por peptidoglucano, la capa LIII, posiblemente está compuesta por proteínas fibrosas que enrollan los tricomas de la capa LIV, y la capa externa LIV se compone de tricomas en forma paralela, esta capa es considerada como la capa de las bacterias gramnegativas. (Ciferri, 1983).

En el sistema tilacoide de la *Spirulina sp.* se localizan varios pigmentos funcionales característicos de esta especie como: clorofila a, carotenos y ficobilinas. Los tilacoides son sacos membranosos que contienen cianoficina y cuerpos poliédricos. Los cuerpos poliédricos son gránulos de poliglucano, lípidos, polifosfatos y metacromatina. Los gránulos de poliglucano o gránulos de glucógeno son polímeros de glucosa que contribuyen a la formación de glucoproteínas. (Ciferri, 1983) (Madigan, Martinko & Parker, 2003).

La reproducción de la *Spirulina sp.* se da por bipartición, donde las tres etapas fundamentales son: fragmentación de tricomas, ampliación de células del hormogonio (fragmentos pluricelulares, generalmente móviles, que se forman en el tricoma de las Cianobacterias) y procesos de maduración y alargamiento del tricoma, mostradas en la figura 7. (Madigan, Martinko & Parker, 2003) (Ciferri, 1983)

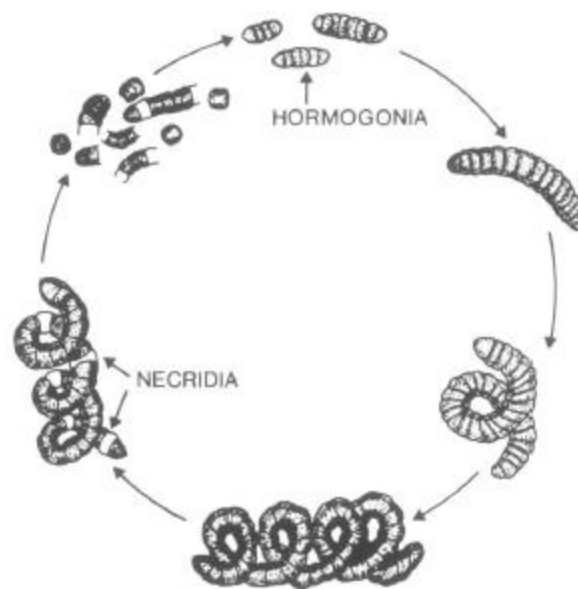


Figura 7. Ciclo de vida de *Spirulina sp.* (Ciferri, 1983)

En los primeros estudios se observó que su composición química era rica en proteínas. Cerca del 50 al 70% del peso seco de la *Spirulina* está constituido por proteínas (Ciferri, 1983). El género *Spirulina sp.* contiene todos los aminoácidos indispensables para consumo humano (Rodríguez & Triana, 2003) (Borowitzka, 2009).

En la tabla IX se muestra la composición química según Borowitzka, 2009 para la especie *Spirulina geitleri* variando entre 10 y 15% el contenido de cada uno de los componentes nutricionales entre especie y tiempo de vida en el cual se recolectó la cianobacteria.

Tabla IX. Composición química de *Spirulina geitleri* (Borowitzka, 2009)

Compuesto	VALORES EXTREMOS	
	MÍNIMO (%)	MÁXIMO (%)
Nitrógeno orgánico total	10.85	13.35
Nitrógeno proteico total	9.60	11.36
Proteínas crudas (%N ´ 6.25)	60.00	71.00
Humedad residual	4.0	7.0
Cenizas	6.4	9.0
Proteínas	60.0	71.0
Fibra cruda	0.1	0.9
Carbohidratos totales	13.0	16.5
Lípidos totales	6.0	7.0

Dentro de los minerales presentes en la *Spirulina sp.* se encuentran Ca, P, Fe, Na, Mg, Mn, Zn, K, siendo los más abundantes el calcio (1315 mg/Kg) y el fósforo (8942 mg/Kg). (El-Bestawya, Bellinger & Sigea, 1996). El género *Spirulina* contiene ácidos grasos dentro de su composición química tales como: láurico, palmítico, y el ácido linoléico que es uno de los más difíciles de encontrar en los alimentos (solo se encuentra en la leche humana y aceites

vegetales pocos comunes), entre otros. Debido a las propiedades nutritivas de la *Spirulina*, diversos investigadores se han dedicado a la búsqueda de sustancias presentes en la composición química que expliquen sus propiedades anticancerígenas. En la tabla X se muestran otras sustancias presentes en la *Spirulina sp.*

Tabla X. Sustancias presentes en la *Spirulina sp.* (Borowitzka, 2009)

Compuesto	MÍNIMO (mg/Kg)	MÁXIMO (mg/Kg)
Esteroles	100	325
Alcoholes Triterpenos	500	800
Carotenoides	2900	4000
Clorofila a	6100	7600
3-4 Benzopireno	2.6	3.6
Colesterol	60	196
<i>b</i> - Sitosterol	30	97
Criptoxantina (promedio)	1600	-----
Equinenona	556	-----
Zeaxantina	439	-----
Luten y Euglenanona	289	-----
$\alpha$ -Caroteno (promedio)	trazas	-----
$\beta$ -Caroteno (promedio)	1700	-----

Actualmente la *Spirulina sp.* tiene varias aplicaciones terapéuticas y de efecto farmacológico dependiente a sus componentes, entre ellas, antialérgica,

anticoagulante, antiinflamatoria, antitóxico, protección cardiovascular, inmunoestimulante, antianémico por la variada cantidad de vitaminas presentes de acuerdo a la composición química mostradas en la tabla XI. (Rodríguez & Triana, 2003).

Tabla XI. Vitaminas presentes en *Spirulina sp.* (Rodríguez & Triana, 2003)

VITAMINAS	PROMEDIO ( mg/Kg)
Biotina (H)	0.4
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	2.0
δ-Ca-Pantotenato	11.0
Ácido Fólico	0.5
Inositol	350.0
Ácido Nicotínico (PP)	118.0
Piridoxina (B <sub>6</sub> )	3.0
Riboflavina (B <sub>2</sub> )	40.0
Tiamina (B <sub>1</sub> )	55.0
Tocoferol (E)	190.0

En los últimos años la producción de *Spirulina sp.* como suplemento alimenticio ha ido en aumento. Cada vez es más la industrialización de esta especie por su fácil obtención, rápido crecimiento y se puede producir en cualquier parte del mundo por su abundancia en el ambiente, así como la adaptación a condiciones climatológicas extremas. Es por eso que puede ser utilizada para producir bioetanol, sin competir con los cultivos destinados para consumo humano, presentando una gran ventaja contra las biomasas

tradicionales para la obtención de biocombustibles. La *Spirulina sp.* presenta en su composición química una concentración cercana al 20% de azúcares, entre los que se encuentran azúcares fermentables que hacen de esta un candidato potencial para la producción de biocombustibles. (Zhen-yuan, Jin-lan & Levert, 2002) (El-Bestawya, Bellinger & Sigee, 1996).

## **2.1.5. Técnicas para determinar etanol y azúcares reductores**

### **2.1.5.1. Cromatografía de gases**

La cromatografía es una de las técnicas más utilizadas en el análisis de muestras. Esta técnica permite la separación, determinación y cuantificación de los componentes de la muestra problema. Usa una fase móvil y una fase estacionaria, las cuales se deben elegir conforme el tipo de muestra que se va a analizar. La fase móvil se hace pasar a través de la fase estacionaria con la cual es inmisible, los componentes de la muestra son retenidos en la fase estacionaria, separándose en bandas o picos analizados en los cromatogramas según su tiempo de retención.

Las ventajas que presenta esta técnica son: velocidad (análisis de 30 min), proporciona información cuantitativa y cualitativa, resolución, alta sensibilidad, baja cantidad de muestra requerida y no genera residuos. Los límites de detección están en el rango de partes por millón (ppm). (Skoog,



Holler & Nieman, 2001).

En la figura 8 se muestra en diagrama general de un cromatógrafo de gases.

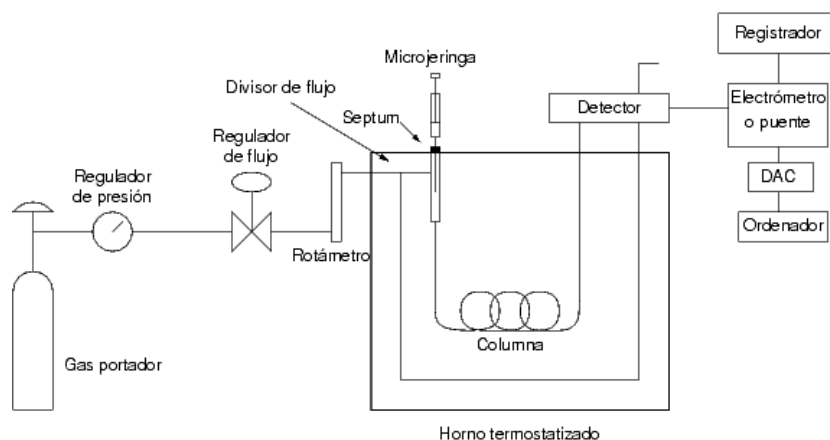


Figura 8. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases. (Skoog, Holler & Nieman, 2001)

Como método cuantitativo se usa propanol como estándar interno. La relación de área de ambos picos se compara con la de una solución patrón de etanol y propanol. Este procedimiento se denomina método del estándar interno.

### 2.1.5.2. Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico

El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) es un ensayo indirecto en el que los productos de la reacción son detectados espectrofotométricamente al ser teñidos de color rojo ladrillo. Por medio de este método se determina la

concentración de azúcares reductores como glucosa, fructosa, maltosa, galactosa, entre otros. El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico por el azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (figura 9), pasando por un cambio de coloración que va de amarillo a rojo ladrillo según la etapa de reacción, determinándose por medio de la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540-570 nm. (Peña & Arango, 2009)

La reacción del fundamento del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico se muestra en la figura 9.

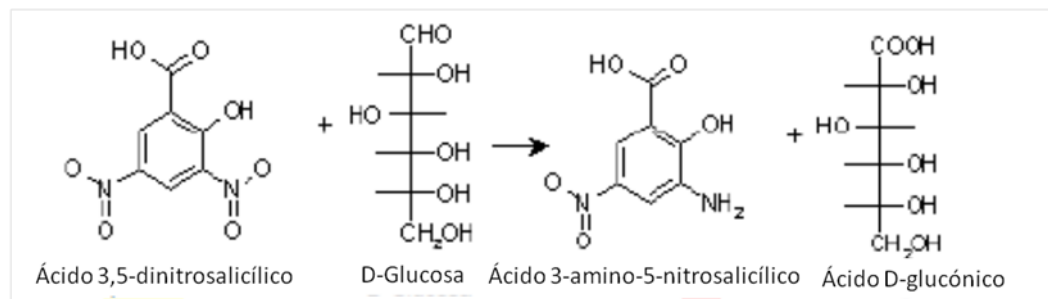


Figura 9. Reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con glucosa.

# CAPÍTULO 3

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 3.1 Hipótesis

La biomasa hidrolizada de *Spirulina sp.* puede ser utilizada como fuente de carbono para la producción de biocombustibles.

### 3.2 Objetivo general

Emplear *Spirulina sp.* como fuente de carbono para la producción de bioetanol por fermentación utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.3 Objetivos específicos:

- Caracterizar la biomasa de *Spirulina sp.*
- Preparar el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Encontrar las condiciones adecuadas de fermentación.
- Producir de bioetanol por fermentación.
- Determinar la concentración de bioetanol por la técnica de CG-MS.

# CAPÍTULO 4

## METODOLOGÍA

### 4.1 Equipos y materiales

- ❖ Autoclave
- ❖ Balanza analítica
- ❖ Centrífuga refrigerada
- ❖ Medidor de pH
- ❖ Plancha de agitación con control de temperatura
- ❖ Espectrofotómetro UV-Vis Spectronic Instruments 20 Genesis
- ❖ Incubadoras con agitación Shel Lab y Shaker Lab line 3532
- ❖ Cromatógrafo de gases (CG) Perkin Elmer Instruments modelo Clarus 500, columna tipo capilar n9316403 marca Elite\_Was.
- ❖ Espectrofotómetro de Infrarrojo acoplado a transformadas de Fourier (FT-IR)
- ❖ Analizador elemental Perkin Elmer Instruments modelo Series II CHNS/O Analyzer 2400.

Se utilizaron: tartato de potasio, ácido 3,5-dinitrosalicílico marca Sigma-

Aldrich y los siguientes medios de cultivo con su respectiva composición.

Tabla XII. Composición de los medios de cultivo

Compuesto (g/L)	YM	YGB	YPS	Marca
Extracto de levadura	3.0	10.0	5.0	BD Bioxon
Bactopeptona	5.0	20.0	10.0	
Glucosa	10.0	20.0	-----	Sigma-Aldrich
Extracto de malta	3.0	-----	-----	BD Difco™,
Sacarosa	-----	-----	17.0	CTR SCIENTIFIC
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-----	-----	1.0	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-----	-----	0.5	

#### 4.2 Caracterización de la *Spirulina sp.*

A la biomasa de *Spirulina sp.* se le realizaron las siguientes pruebas para llevar a cabo su caracterización fisicoquímica.

- a) pH: se suspendieron 5 g de biomasa en 100 mL de agua y se midió el pH de la suspensión.
- b) Determinación de Análisis Elemental: se colocaron 1.5 mg de muestra en el porta muestras del analizador elemental y posteriormente se realizó el barrido para obtener los elementos presentes y la cantidad.
- c) Determinación de azúcares reductores por medio del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico.
- d) Determinación de grupos funcionales: se colocaron 0.5 g de la

muestra en el porta muestras del FT-IR realizando posteriormente el barrido para obtener los elementos presentes y la cantidad.

#### **4.3 Hidrólisis de la *Spirulina sp.***

Se realizó una hidrólisis ácida a la biomasa de *Spirulina sp.* para liberar los azúcares reductores presentes suspendiendo 5 g de biomasa en 5 mL de agua, se mezcló esta suspensión y posteriormente se realizó una dilución 1:2 mezclando en una plancha con control de temperatura y agitación durante 5 min. Se prosiguió a ajustar el pH a 6 con una solución de HCl 2M.

En el paso siguiente se varió el pH (2, 4 y 6) observando como respuesta la hidrólisis de la biomasa, monitorizando la cantidad de azúcares reductores presentes en la solución. El pH se ajustó con la solución de HCl 2M según el pH de interés. Se mantuvo la mezcla a 23 °C por 30 min y posteriormente se llevó a 70 °C elevando la temperatura a una velocidad de 1°C/min y manteniendo por 30 min más. Pasando los 30 min de hidrólisis, se detuvo la reacción colocando la mezcla en hielo y se ajustó, en el caso de ser necesario, a pH 6 con NaOH 5M. A partir de esta mezcla se tomaron alícuotas para la determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico y el sobrante de la mezcla fue utilizado para preparar el medio de cultivo de la fermentación.

#### **4.4 Activación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae***

Se suspendieron 0.5 g de levadura de panadería liofilizada en 50 mL de medio de YM estéril a pH 6 contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se incubaron a 30 °C y 150 rpm por 24 horas (condiciones estándares). De esta suspensión se transfirieron 2.5 mL a cada uno de tres matraces Erlenmeyer de 250 mL preparados con 50 mL de medio YM a pH 6 y se incubaron en las condiciones estándares.

A partir del cultivo de levaduras se tomó 1 µL se depositó en portaobjetos y se comprobó su pureza por medio de observaciones microscópicas en objetivos de 10x y 40x.

#### **4.5 Preparación del inóculo**

Para la preparación del inóculo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se prepararon 10 matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio YM, estos matraces se esterilizaron en autoclave a temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Trascurrido el tiempo de esterilización los matraces se sacaron del autoclave para dejar que alcanzaran la temperatura ambiente.

A continuación se tomaron 2.5 mL del cultivo de levadura activada para

trasferirlos a dos de los matraces y se incubaron a las condiciones estándares. Después de las 24 horas se tomaron 2.5 mL de estos matraces para transferirlos a dos matraces con medio estéril incubando a las condiciones estándares por 12 horas, repitiendo este último paso hasta obtener una D.O.<sub>600</sub> de 1.8 la cual corresponde a  $1 \times 10^6$  células por mililitro en 12 horas.

#### **4.6 Curvas de crecimiento de la cepa *Saccharomyces cerevisiae***

Para la evaluación del crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utilizaron tres medios de cultivo: caldo de extracto de malta (YM), caldo de glucosa y levadura (YGB) y caldo de sacarosa y levadura (YPS).

Se colocaron en matraces Erlenmeyer 50 mL de cada uno de los medios anteriores y se esterilizaron en autoclave a temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente enfriados a temperatura ambiente, se adicionó el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* activada a cada uno de ellos y se incubaron en las condiciones estándares. Se realizaron muestreos periódicos de 5 mL cada 5 horas por un lapso de 35 horas. Para el muestreo de toda la serie de experimentos fue necesario utilizar dos matraces inoculados a diferente hora de manera que las muestras de la hora 15 y 20 puedan ser tomadas durante el día. El crecimiento de la población microbiana se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.



#### **4.7 Tolerancia a la glucosa de la cepa *Saccharomyces cerevisiae***

A partir de los resultados obtenidos en el punto **cinéticas de crecimiento** se seleccionó el medio de cultivo en el que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* mostró el mejor crecimiento. Se preparó ese medio de cultivo con cinco concentraciones de glucosa más elevadas que la concentración base (40 g/L, 60 g/L, 80 g/L, 100 g/L y 120 g/L), esterilizando en autoclave.

Posteriormente, una vez que se enfriaron a temperatura ambiente, se transfieren a cada matraz 2.5 mL del inóculo preparado en el punto **preparación del inóculo** incubando en las condiciones estándares realizando muestreos periódicos cada 5 horas por un lapso de 30 horas. El crecimiento de la población microbiana se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **4.8 Producción de etanol por medio de *Saccharomyces cerevisiae***

Esta fase del estudio se dividió en tres etapas: i) pruebas de fermentación en medio de cultivo modificado con la concentración de glucosa en el que *Saccharomyces cerevisiae* mostró un mejor crecimiento, ii) pruebas de fermentación a diferentes concentraciones de *Spirulina sp.* hidrolizada (40, 60, 80, 100 y 120 g/L azúcares reductores)

y iii) diseño de experimentos para encontrar las condiciones adecuadas de la fermentación.

- i) Se realizaron pruebas de fermentación en el medio de cultivo seleccionado en el punto **cinéticas de crecimiento** utilizando como fuente de carbono glucosa donde la levadura mostró mejor crecimiento. Para ésto, se colocaron 50 mL de medio de cultivo en 12 matraces. Se adicionó la glucosa necesaria para alcanzar la concentración a la cual la levadura mostró su máxima tolerancia y se esterilizaron. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se les adicionó 5 % de inóculo v/v en condiciones de asepsia, incubando en las condiciones estándares y colocando una cubierta de látex en la boca de cada matraz para suprimir la entrada de oxígeno. En estos ensayos también se trabajó con dos matraces inoculados a diferente hora para realizar los muestreos en horas hábiles. Se tomaron 10 mL de muestra al momento de agregar el inóculo siguiendo con muestreos periódicos cada 5 horas por un lapso de 30 horas. A cada muestra se le determinó D.O. a una longitud de onda de 600 nm y posteriormente se dividió en dos porciones de 5 mL en tubos de 13 x 100 milímetros (mm) para centrifugarlas a 10,000 rpm por 10 min. Se realizaron las pruebas de producción de etanol y consumo de sustrato

en el sobrenadante. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

ii) Para las pruebas de fermentación con diferentes concentraciones de *Spirulina sp.* se agregó en condiciones de asepsia al medio seleccionado en el punto **cinéticas de crecimiento** previamente esterilizado, solución preparada de *Spirulina sp.* hidrolizada para obtener diferentes concentraciones de azúcares reductores (40, 60, 80, 100 y 120 g/L) en un volumen final de 50 mL. A estos matraces se les adicionó en condiciones de asepsia 5% de inóculo v/v, y se incubaron como se describió anteriormente (**4.8 i**). También se realizó el muestreo, el procesamiento de las muestras y las determinaciones como se indica en la sección anterior.

iii) En la última etapa de esta fase, se realizaron pruebas de fermentación en el medio de cultivo donde la levadura mostró el mejor crecimiento adicionado con hidrolizado de *Spirulina sp.* para alcanzar la concentración a la cual se obtuvo mayor concentración de etanol en el punto (**4.8. ii**). El medio fue previamente esterilizado y llevado a

temperatura ambiente antes de adicionar el hidrolizado de la cianobacteria. A continuación se utilizó un diseño de experimentos  $3^2$ , tomando como factores temperatura y cantidad de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual se muestra en la tabla XIII.

Tabla XIII. Diseño de experimentos

	Factor	Temperatura (°C)	Cantidad de inóculo (UFC/mL)
Nivel	Alto	35	$1 \times 10^{10}$
	Medio	30	$1 \times 10^8$
	Bajo	25	$1 \times 10^6$

Se adicionó a 54 matraces medio de cultivo YPS y se esterilizó, después se les adicionó en condiciones de asepsia la cantidad necesaria de inóculo v/v, incubando en las condiciones según el diseño de experimentos mostrado anteriormente. Las alícuotas se trataron según los puntos anteriores.

#### 4.8.1. Pruebas de producción de etanol

La cuantificación del etanol se realizó por comparación con una serie de estándares preparados a partir de una solución de etanol absoluto (99.99% v/v). Las concentraciones de los estándares preparados son: 5, 10, 15, 20 y 25 %

v/v. Adicionalmente se preparó un estándar de propanol al 5% v/v para utilizarlo como estándar interno en el método de cuantificación. Para elaborar la curva de calibración, en un vial se depositaron 5 mL con una pipeta volumétrica de cada uno de los estándares de etanol y se agregó 1 mL del estándar interno, posteriormente se calentó durante 5 min el vial en un baño agua preparado con anticipación a 70 °C para evaporar el etanol, se inyectó 1 µL del gas en el cromatógrafo de gases y se obtuvo el cromatograma.

Para el análisis de la muestra, se depositaron 5 mL del sobrenadante de la muestra centrifugada y 1 mL del estándar interno en un vial y se calentó en un baño de agua a 70 °C con control de temperatura durante 5 min, inyectando 1 µL del gas dentro del cromatógrafo de gases para obtener los cromatogramas, después se obtiene la relación de los picos y con la ecuación de la curva de calibración se determinó la concentración de la muestra.

## **4.8.2. Evaluación del consumo de sustrato**

### **4.8.2.1. Curva de calibración de azúcares reductores**

Se preparó una solución patrón de glucosa 0.01M, disolviendo 0.180 g de glucosa en 100 mL de agua destilada. Posteriormente se procedió a preparar estándares con los siguientes volúmenes de solución como se indica en la tabla XIV.

Tabla XIV. Estándares para la construcción de la curva de calibración de azúcares reductores.

Solución patrón (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	Concentración (mM)
1	9	1
2	8	2
3	7	3
4	6	4
5	5	5
6	4	6
7	3	7
8	2	8
9	1	9
0	1	blanco

Se realizó la reacción de color de los estándares para lo cual se tomó 1 mL de cada uno de los estándares preparados anteriormente y se transfirieron a un tubo de 18 x 150 mm. A cada uno de los tubos se le agregó 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico y se llevaron a baño de agua a 70°C durante 5 min. Posteriormente se transfirieron a baño de hielo para detener la reacción y se completó el volumen a 10 mL con agua destilada fría con agitación para obtener una solución de coloración uniforme.

Por último, colocando la solución en las celdas, se prosiguió a leer

su absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. A partir de estos datos se construyó la curva de calibración graficando absorbancia (A) contra concentración del estándar.

#### 4.8.2.2. Preparación de la muestra

La muestra fue centrifugada para obtener el sobrenadante a 10 000 rpm durante 15 min. A partir del sobrenadante se realizaron las diluciones de acuerdo a la tabla XV.

Tabla XV. Diluciones de la muestra

Muestra (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	Dilución
0.1	0.9	1:10
0.1	1.9	1:20
0.1	4.9	1:50
0.1	9.9	1:100

Se realizó la reacción de color a las muestras para lo cual se tomó 1 mL de las diluciones anteriores y se transfirieron a un tubo de 18 x 150 mm. A cada uno de los tubos se les agregó 1 mL de ácido 3,5, dinitrosalicílico. Los tubos se trataron según el punto anterior para la determinación de azúcares reductores. Se prosiguió a leer su absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de

onda de 540 nm y a partir de la ecuación de la curva de calibración se obtuvo la concentración de azúcares en la muestra.

#### 4.9 Efecto del escalado en la producción de etanol

Esta prueba se realizó empleando tres volúmenes diferentes del medio de cultivo seleccionado en el punto **cinéticas de crecimiento**, acondicionado con la solución de *Spirulina sp.* hidrolizada hasta obtener la concentración de azúcares reductores en el medio a la cual se obtuvo la mayor concentración de etanol. Se emplearon  $1 \times 10^{10}$  células/mL de *Saccharomyces cerevisiae* como inóculo. Se colocó una cubierta de látex para suprimir la entrada de oxígeno y se incubaron a 30°C.

- a) 5 mL: se inocularon  $1 \times 10^{10}$  células/mL de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de asepsia en 21 tubos de 18 x 150 mm con 5 mL de medio de cultivo esterilizado y acondicionado con la solución de *Spirulina sp.* hidrolizada hasta obtener la concentración necesaria de azúcares reductores y se incubaron en las condiciones estándares. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.
  
- b) 50 mL: se procedió igual que el inciso **a)** cambiando a 50 mL el volumen de medio de cultivo. Todos los experimentos se



realizaron por triplicado.

- c) 500 mL: se procedió igual que el inciso **a)** cambiando a 500 mL el volumen de medio de cultivo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Se realizaron las pruebas de cinéticas de crecimiento, producción de etanol y consumo de sustrato para cada uno de los puntos anteriores.

# CAPÍTULO 5

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización de la *Spirulina sp.*

El pH obtenido en las muestras de *Spirulina sp.* fue de 6.38. La composición química de la *Spirulina sp.* obtenida mediante análisis elemental fue la siguiente: C= 42.84%, H= 7.08%, N= 10.47%, S= 1.17% y 2.67% de humedad.

A partir de las muestras obtenidas de la hidrólisis de la cianobacteria en la determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico se obtuvo 18.13% promedio de azúcares presentes, este valor se encuentra dentro del rango reportado en referencia (Rodriguez & Triana, 2003), cerca al 20% de carbohidratos totales. Dentro de los azúcares reductores reportados presentes en *Spirulina sp.* se encuentran glucosa, maltosa, manosa, fructosa y galactosa. (Zhen-yuan, Jin-lan & Levert, 2002). En

la figura 10 se muestra el IR de la biomasa de *Spirulina sp.* con los picos característicos de los grupos funcionales presentes en las aldosas, aminoácidos y ácidos grasos.

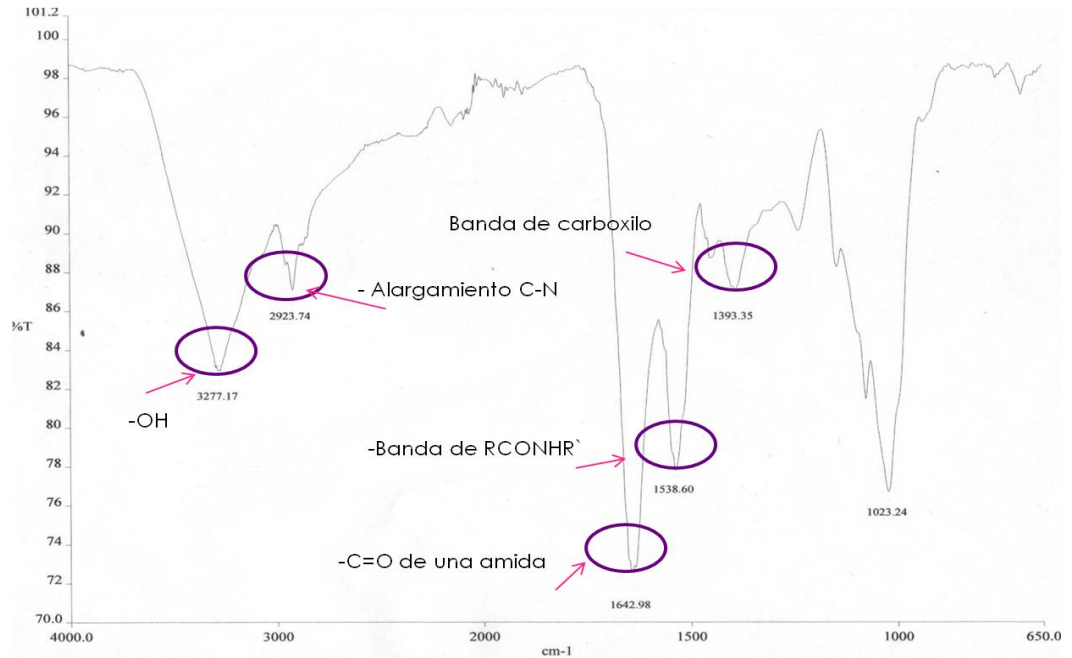


Figura 10. IR de la biomasa de *Spirulina sp.*

## 5.2 Activación de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

En este trabajo se utilizó levadura de panadería comercial. La cepa de trabajo fue identificada y a su vez activada para obtener cepas resistentes al azúcar y productoras de etanol, sin ser modificadas genéticamente. Durante las observaciones al microscopio se comprobó la pureza del cultivo de acuerdo a su morfología característica en forma ovalada y al tamaño de las células. (Gonzalez, A. & Valenzuela, L. 2003). Estas demostraron tener resistencia y

adaptación a los medios de cultivo adicionados con altas concentraciones de azúcar.

Se observó crecimiento escaso en los cultivos resultantes de la transferencia del cultivo original a los primeros matraces inoculados y crecimiento abundante en los cultivos que se colocaron en los matraces siguientes; en éstos últimos la levadura alcanzó una lectura superior a 2 unidades de A a 600 nm equivalente a  $1 \times 10^{12}$  células/mL.

### **5.3 Cinéticas de crecimiento**

En la Figura 11 se aprecia el comportamiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* partiendo de una suspensión bacteriana con un valor de D.O.<sub>600</sub> de 1.8 equivalente a  $1 \times 10^{10}$  células/mL en los diferentes medios de cultivo. La fase lag se observó durante las primeras 5 horas en los tres medios de cultivo, sin embargo en el medio YM la pendiente es más pronunciada, lo que indica que la levadura se adaptó más rápidamente. Para el medio YGB se observó según la figura 11 que fue en el que hubo menor crecimiento de los tres medios probados, esto se debe a la falta de nutrientes necesarios para el desarrollo del microorganismo. A continuación entra a una corta fase exponencial de las 5 a las 10 horas, sin embargo, se observó que la levadura aun continúa en crecimiento hasta las 20 horas, que es cuando se inicia la fase estacionaria, en la cual permanece hasta las 35 horas de

incubación. Es importante señalar que en el medio YPS la levadura se desarrolló mejor ya que es el medio en el cual se alcanzó la mayor densidad óptica.

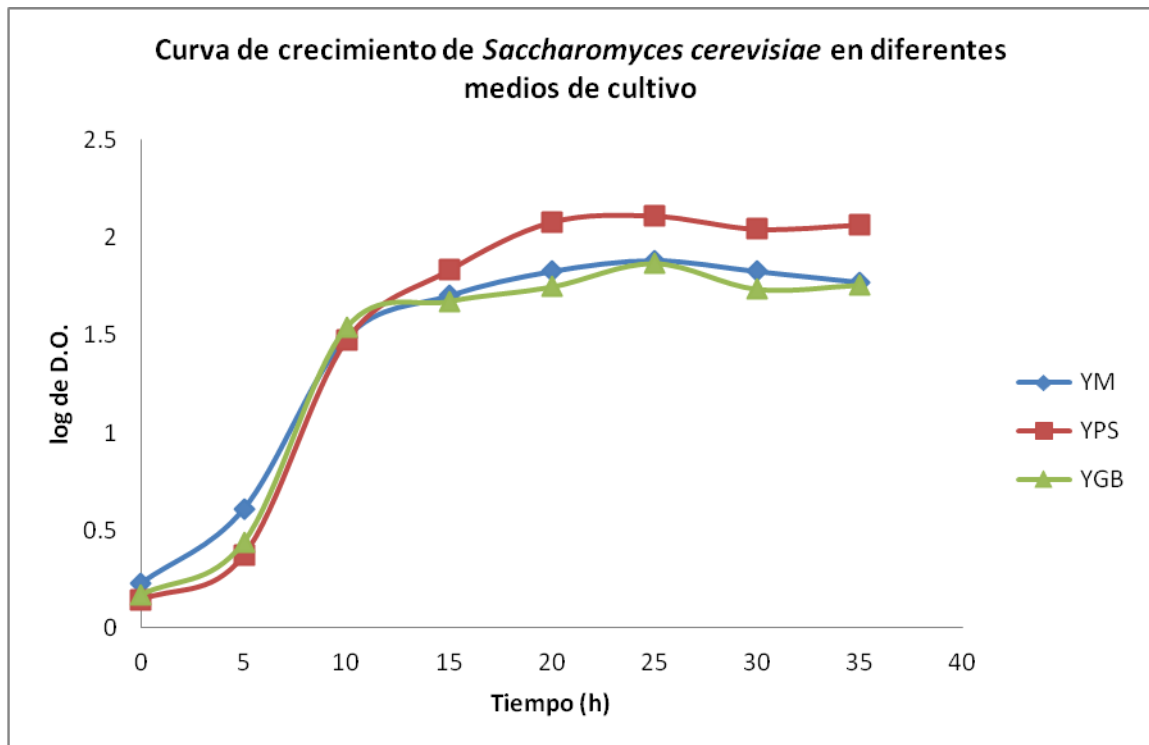


Figura 11. Cinética de crecimiento para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes medios de cultivo

Para comprobar que el medio YPS era el mejor medio para promover el desarrollo de la levadura se determinó la tasa específica de crecimiento, la cual será aproximadamente igual a  $\mu_{\text{máx}}$ , mediante las ecuaciones siguientes:

$$X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

Donde  $\mu$  es constante durante la fase exponencial del crecimiento y de acuerdo a esto la ecuación se puede integrar a:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (2)$$

Donde X= concentración celular en tiempo t

$X_0$ = concentración celular a t=0

$\mu$ = tasa específica de crecimiento celular, considerada  $\mu_{\text{máx}}$  en la fase exponencial de crecimiento celular

La  $\mu_{\text{máx}}$  de la levadura obtenida en los diferentes medios de cultivo utilizados se presenta en la tabla XVI.

Tabla XVI.  $\mu_{\text{máx}}$  de *Saccharomyces cerevisiae* en los diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	$\mu_{\text{máx}}$
YM	0.1861
YGB	0.2201
YPS	0.2332

Con estos valores se comprobó que la levadura tiene mayor tasa específica de crecimiento celular en el medio YPS. Según Peña & Arango, esto se debe a que el medio YPS contiene en su composición química algún nutriente que favorece al crecimiento del microorganismo obteniendo mayor producción de biomasa, por lo que se decidió utilizar este medio de cultivo en la serie de experimentos siguientes. Los valores de tasa específica de crecimiento celular en los medios YGB y YPS superaron las  $\mu_{\text{máx}}$  reportadas por Peña & Arango 2009, con valores de 0.2074 y 0.1984 como valores máximos.

#### 5.4 Tolerancia a la glucosa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

En las pruebas de tolerancia a la glucosa, en las curvas de crecimiento a diferentes concentraciones del carbohidrato, se observó que en todos los experimentos la levadura mostró un comportamiento similar.

En la figura 12 puede apreciarse que no hay fase de adaptación para ninguna de las concentraciones, entrando directamente a la fase exponencial, posiblemente debido a la constante activación de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en medios con glucosa. Además, se puede apreciar que a la concentración de 60 g/L se obtuvo mayor velocidad de crecimiento, le siguen las concentraciones 80, 40, 120 y 100 g/L. En la mayoría de las concentraciones (a excepción de 100 g/L), la levadura entra a la fase estacionaria a las 10 horas de incubación, continuando así el resto del experimento. A la concentración de 100 g/L la velocidad de crecimiento es menor que a la concentración de 120 g/L, permaneciendo 5 horas más en la fase exponencial.

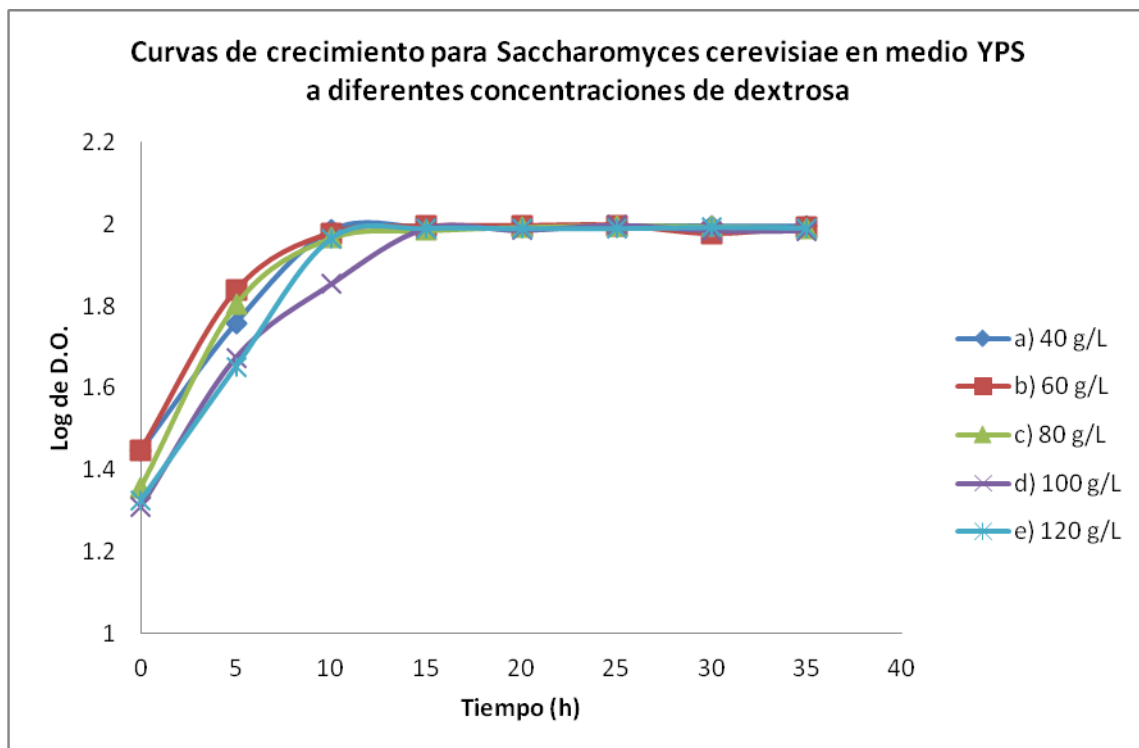


Figura 12. Cinética de crecimiento para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPS a diferentes concentraciones de glucosa

En esta etapa del estudio se llevó a la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* a su máxima tolerancia de glucosa a una concentración de 120 g/L, valor por encima de los resultados reportados en bibliografía para cepas silvestres de *Saccharomyces cerevisiae*, 40 g/L según Yu & Zhang, 2004.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento en medio YPS a diferentes concentraciones de la fuente de carbono se procedió a calcular la  $\mu_{max}$  según las ecuaciones 1 y 2 obteniendo los siguientes valores.



Tabla XVII.  $\mu_{\text{máx}}$  de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPS a diferentes concentraciones de fuente de carbono

Concentración de fuente de carbono (g/L)	$\mu_{\text{máx}}$
40	0.2332
60	0.2218
80	0.2307
100	0.1135
120	0.2374

Se observó que para las concentraciones 40 g/L y 80 g/L la tasa específica de crecimiento fue similar 0.2332 y 0.2307 respectivamente, destacando la concentración de 120g/L con mayor tasa de crecimiento 0.2374, mientras que la  $\mu_{\text{máx}}$  para 100 g/L fue menor comparada con las concentraciones restantes. El comportamiento de los valores obtenidos de  $\mu_{\text{máx}}$  es similar al reportado por Peña & Arango, 2009.

## 5.5 Producción de etanol

Los resultados de las primeras pruebas de producción de etanol en medio YPS adicionado con glucosa a la máxima concentración de tolerancia al carbohidrato (100 y 120 g/L glucosa) se muestran en la Figura 13. Para la concentración de 100 g/L de glucosa, se observó una producción exponencial las primeras 15 horas, según T. Nagodawithana, C. Castellano & K. Steinkraus

esto concuerda con la “fermentación rápida” definida como la fermentación en donde el etanol producido se incrementa de 0 a 12% v/v en 6 horas o menos, pero en el intervalo de 15 a 20 horas de incubación se observó una corta fase estacionaria en la producción de etanol, siguiendo de otra fase de producción exponencial de las 20 a las 30 horas y finalmente de las 30 a las 35 horas la producción se mantuvo constante. En esta concentración de glucosa se alcanzó una producción máxima de etanol del 10.02% v/v.

Para la concentración de 120 g/L hubo una menor producción de etanol comparada con la concentración de 100 g/L. Durante las primeras 20 horas la producción de etanol fue en aumento de forma exponencial, hasta que finalmente alcanzó su producción máxima a las 30 horas. La concentración de etanol producido a 120 g/L fue de 9.20% v/v.

En las concentraciones de azúcar probadas se observó que a medida que aumenta la concentración, la cantidad de azúcar residual también es mayor (figura 13)

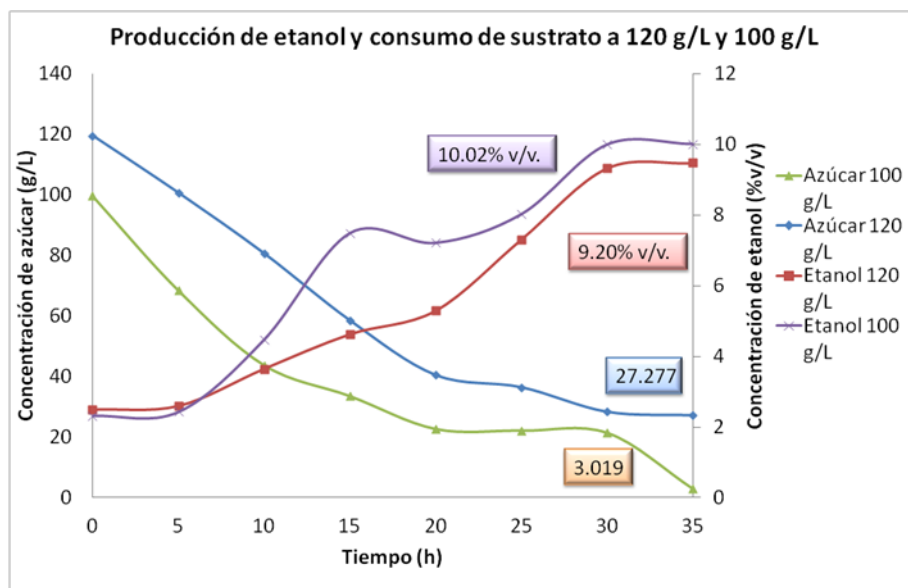


Figura 13. Producción de etanol y consumo de sustrato en medio YPS a) 100 g/L y b) 120 g/L de glucosa.

Comparando la producción de etanol a las concentraciones de glucosa anteriores se observó que al incrementar la concentración del azúcar la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* disminuye la producción de etanol. Esto se puede atribuir a que la concentración de azúcar es muy elevada para el crecimiento de la levadura, por lo tanto el sistema biológico se encuentra sobresaturado según Peña & Arango 2009.

En la tabla XVIII se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la producción de etanol en el medio YPS adicionado con hidrolizado de *Spirulina sp.* para ajustar la concentración de azúcares a diferentes valores.

Tabla XVIII. Producción de etanol (mL/L) a diferentes concentraciones de azúcar a partir de biomasa hidrolizada de *Spirulina sp.*

Tiempo (h)	Concentración de azúcares reductores				
	40 g/L	60 g/L	80 g/L	100 g/L	120 g/L
0	0	0	0	0	0
5	2.0773	2.2783	2.3437	1.9824	2.4245
10	2.2715	4.6408	2.5467	2.4373	3.9282
15	2.5870	4.1656	2.8636	4.7439	4.2375
20	2.8952	4.8897	4.6141	4.3489	4.6061
25	4.5403	4.8545	4.7420	4.6908	4.5714
30	4.7091	6.7686	8.4487	6.6413	10.3062
<b>Porcentaje de rendimiento</b>	<b>23.0339</b>	<b>22.0715</b>	16.2422	20.1644	16.8037

En las pruebas de fermentación utilizando *Spirulina sp.* hidrolizada como fuente de carbono a diferentes concentraciones se observó que al finalizar la fermentación (30 horas), la producción de etanol se incrementó a medida que aumentaba la concentración de sustrato, a excepción de la concentración de 100 g/L.

En la figura 14 se aprecia el comportamiento en la producción de etanol a las diferentes concentraciones de *Spirulina sp.* durante las 30 horas de fermentación. Se observó que de las 0 a las 5 horas la levadura mostró una producción de etanol casi a la misma velocidad en las cinco concentraciones de sustrato, mientras que en el intervalo de 5 a 25 horas mostró ligeras diferencias en cuanto a la velocidad de producción aunque la cantidad producida fue diferente. Se observó que a la concentración de 60 g/L de azúcares sobresale

la producción de etanol a las 10, 20 y 25 horas. En el intervalo de las 25 a las 30 horas es donde se observó la mayor diferencia entre las velocidades de producción de etanol para las diferentes concentraciones de azúcares. Se apreció con mayor claridad que, para la concentración de 120 g/L se produjo mayor cantidad de etanol con respecto a las demás concentraciones.

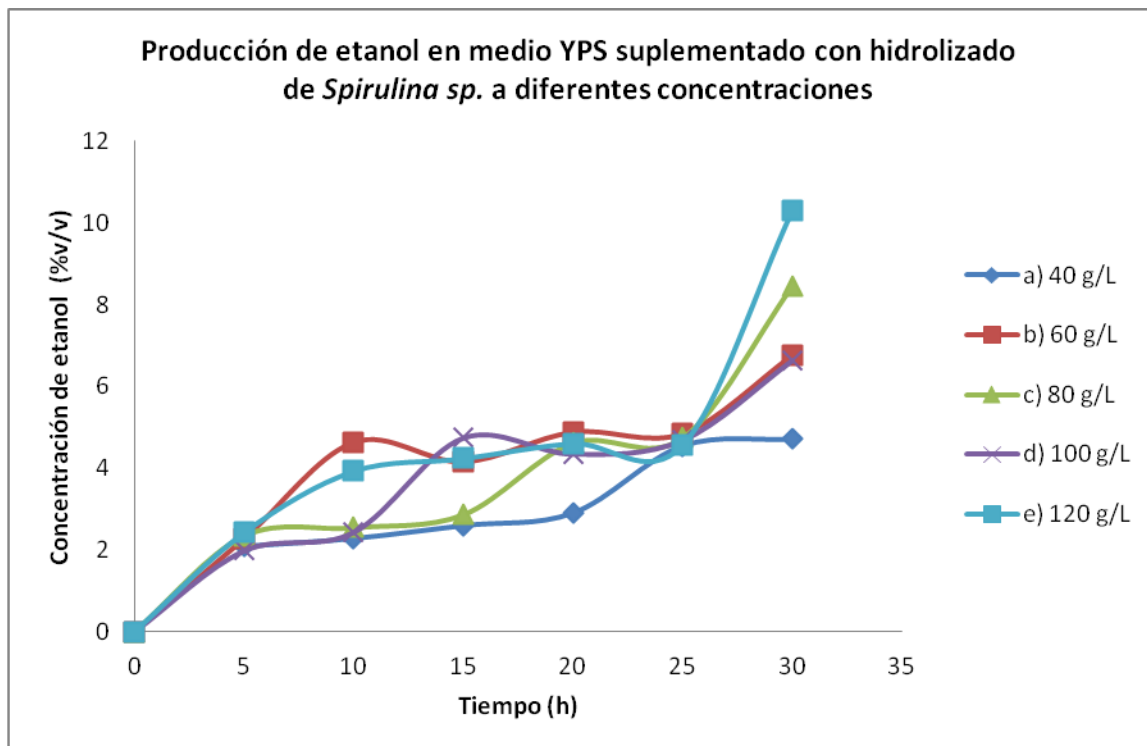


Figura 14. Producción de etanol en medio YPS suplementado con biomasa de *Spirulina sp.* a diferentes concentraciones.

Se logró una concentración de etanol máxima de 10.30% v/v, superando el valor reportado por Adams, Gallagher & Donnison de 0.45% v/v, utilizando *Saccharina latissima* como fuente de carbono. A pesar de la producción de etanol alcanzada, el rendimiento de la fermentación fue de 16.80%, mientras

que para la concentración de 60 g/L se logró obtener una concentración de etanol de 6.77% v/v con un rendimiento de producción de 22.07%. Este rendimiento se puede optimizar por medio de un diseño de experimentos involucrando mas variables según Donev & Uzunova, 2002, tal como pH, agitación y oxígeno disuelto entre otros.

Se puede observar de acuerdo a la tabla XVII y a la figura 14 que no hay diferencia marcada entre los porcentajes de rendimiento de las concentraciones 40 y 60g/L, por lo que se decidió tomar la concentración de 60 g/L para realizar el diseño de experimentos.

En la figura 15 se observó que el microorganismo consumió casi la misma cantidad de sustrato produciendo un porcentaje de etanol similar entre las concentraciones de 40 g/L y 60 g/L de azúcar. En la concentración de 60 g/L se produjo 31% más de etanol que a 40 g/L y a la vez consumió 25% más de azúcar.

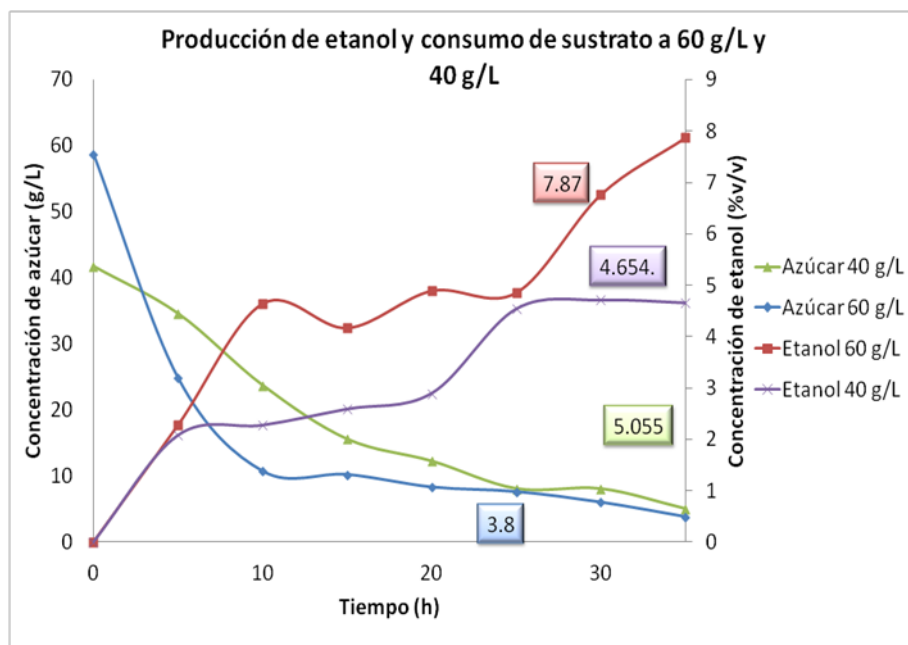


Figura 15. Producción de etanol y consumo de sustrato en medio YPS a diferentes concentraciones de azúcar

En la tabla XIX se muestran las condiciones de los diferentes ensayos realizados para evaluar la producción de etanol en esta etapa, que corresponde al diseño de experimentos, y las claves que se utilizaron.

Tabla XIX. Claves utilizadas para el diseño de experimentos.

Clave	Cantidad de inóculo (UFC/mL)	Clave	Temperatura (°C)
C1	$1 \times 10^6$	T1	35
C2	$1 \times 10^8$	T2	25
C3	$1 \times 10^{10}$	T3	30

En la figura 16 se muestra el comportamiento para las variables durante los experimentos. Las pruebas C2T1 y C1T2 se comportaron de la misma manera durante todo el proceso de fermentación, a excepción de las 20 a las 25 horas donde la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiende a bajar su producción de etanol y de las 25 horas en adelante la producción de etanol por la levadura se mantuvo constante, sin embargo, en ambas pruebas, produjo la misma concentración de etanol a las 30 horas.

Para las pruebas con clave C1T1, C1T3 y C3T2 se observó que tienden a comportarse de manera similar en ciertos tiempos de la fermentación, la tendencia de estas corridas fue mantener su velocidad y producción de etanol constante durante el período de 10 a 20 horas, y posteriormente subió la producción de etanol las últimas 10 horas del proceso.

Finalmente las corridas C2T3, C3T3 y C2T2, mostraron un comportamiento similar entre si, las corridas C3T3 y C2T2 fueron las que presentan mayor similitud en su comportamiento, ya que en el rango de 25 a 30 horas se disparó la velocidad y producción de etanol.



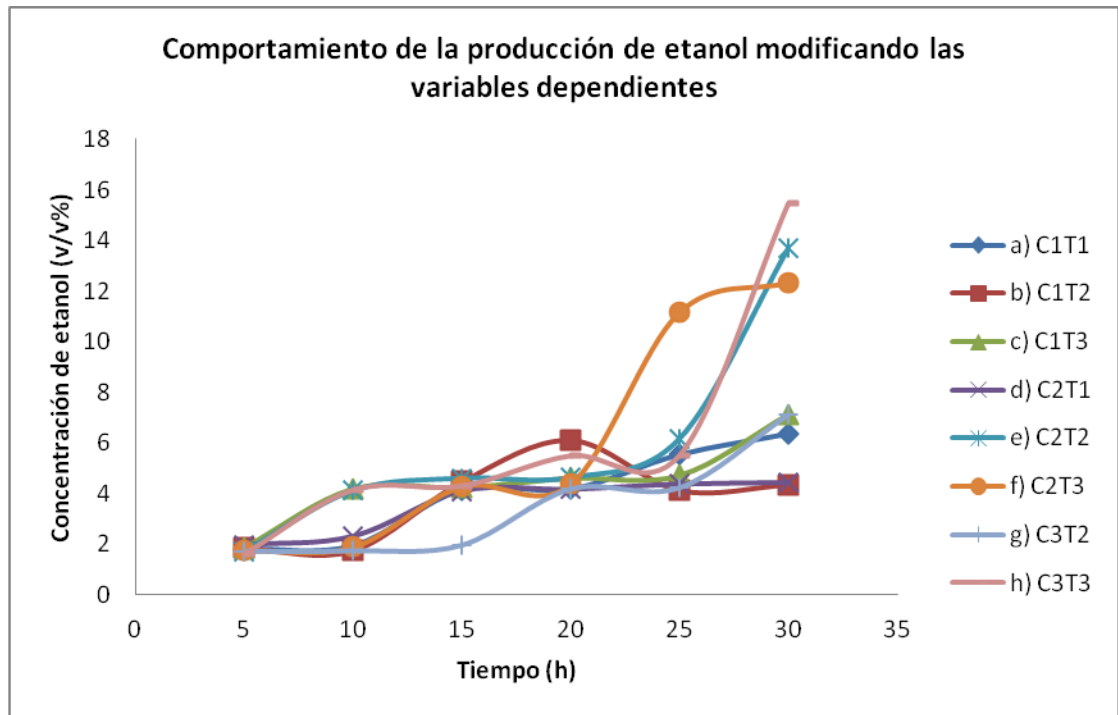


Figura 16. Comportamiento en la producción de etanol modificando las variables dependientes a) C1T1, b) C1T2, c) C1T3, d) C2T1, e) C2T2, f) C2T3, g) C3T2 y h) C3T3.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el diseño de experimentos a medida que aumenta la concentración celular se incrementó la producción de etanol, al haber mayor número de células que procesan el sustrato. La producción de etanol más elevada se logró a la temperatura de fermentación de 30 °C, la cual fue la mejor de las tres temperaturas probadas. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que de 25 a 30 °C aumenta la producción de etanol, sin embargo de 30 a 35 °C disminuye la cantidad de etanol producida, esto concuerda con los resultados obtenidos por T. Nagodawithana, C. Castellano & K. Steinkraus, aunque ellos comparan velocidad de producción de etanol.

La producción máxima de 15.47% v/v, superó valores reportados en literaturas para diferentes fuentes de carbono (0.45 % v/v y 8% v/v). (Adams, Gallagher, & Donnison, 2009) (Xiong, Li, & Wu, 2008)

En la figura 17 se observó que los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado, ya que al incrementar la cantidad de inóculo aumenta la producción de etanol y a la vez disminuye la cantidad de azúcar residual.

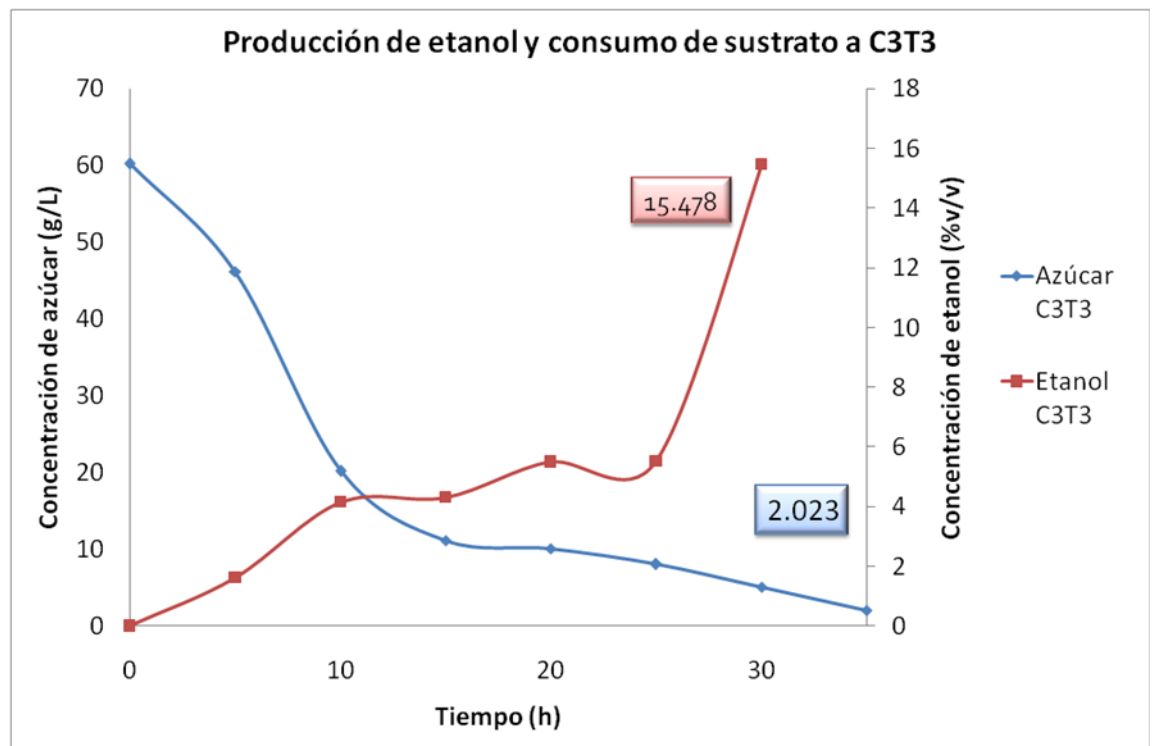


Figura 17. Producción de etanol y consumo de sustrato a las mejores condiciones de fermentación.

En la tabla XX se muestran los resultados obtenidos mediante el ANOVA tomando en cuenta las variables del diseño de experimentos.

Tabla XX. Datos del ANOVA

Valor de Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor F	P value	
Modelo	388.98	8	48.62	101.36	< 0.0001	significativo
A- Temperatura	153.55	2	76.77	160.05	< 0.0001	
B- Concentración celular	89.05	2	44.53	92.82	< 0.0001	
AB	146.37	4	36.59	76.29	< 0.0001	
Error puro	8.63	18	0.48			
Cor total	397.61	26				

A=Temperatura B=Cantidad de inóculo

Conforme a ANOVA y a la gráfica de las interacciones de las variables (fig. 18), todas las variables tienen efecto significativo en el proceso, principalmente la temperatura de fermentación. Se logró elevar el porcentaje de rendimiento en la producción de etanol obtenido de 22.07 % a 50.47%. Se encontraron las condiciones más favorables para el fermentador a partir del diseño de experimentos: temperatura de 30°C, concentración celular de  $1 \times 10^{10}$  cel/mL y 60 g/L de azúcares proveniente de biomasa hidrolizada de *Spirulina sp.*

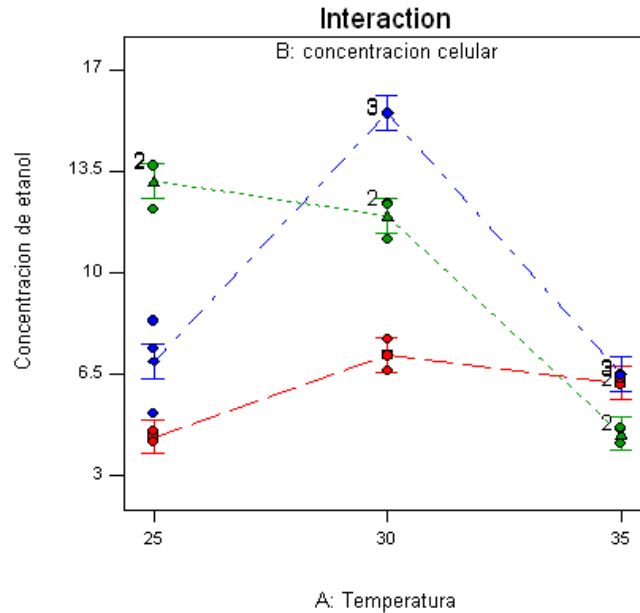


Figura 18. Interacción de los factores en el diseño de experimentos

## 5.6 Efecto del escalamiento en la producción de etanol

En la figura 19 se observó el efecto del volumen del medio en la producción de etanol. Para un volumen de 5 mL se apreció que en las primeras 5 horas se produce la mayor parte de etanol de la fermentación, y después de las 5 a las 25 horas la producción de etanol se mantiene constante, aumentando lentamente a partir de las 25 horas hasta alcanzar la producción máxima de etanol a las 30 horas.

Para los volúmenes de 50 y 500 mL de medio de cultivo YPS suplementado con 60 g/L de azúcares obtenidos de hidrolizado de *Spirulina sp.* a las 5 horas se observó que empleando 500 mL de medio se produjo la doble cantidad de etanol de la producida en 50 mL de medio. Se observó un

comportamiento similar en cuanto a la producción de etanol a partir de las 10 horas para ambos volúmenes de medio.

En la figura 19 se muestra que la concentración de etanol obtenida en 50 mL (15.48% v/v) y en 500 mL (14.79% v/v) a las 30 horas difieren solamente en un 5%, por lo tanto se deduce que el escalado de la fermentación no afecta en la producción de etanol.

Respecto al consumo de sustrato los resultados obtenidos tienen el comportamiento esperado.

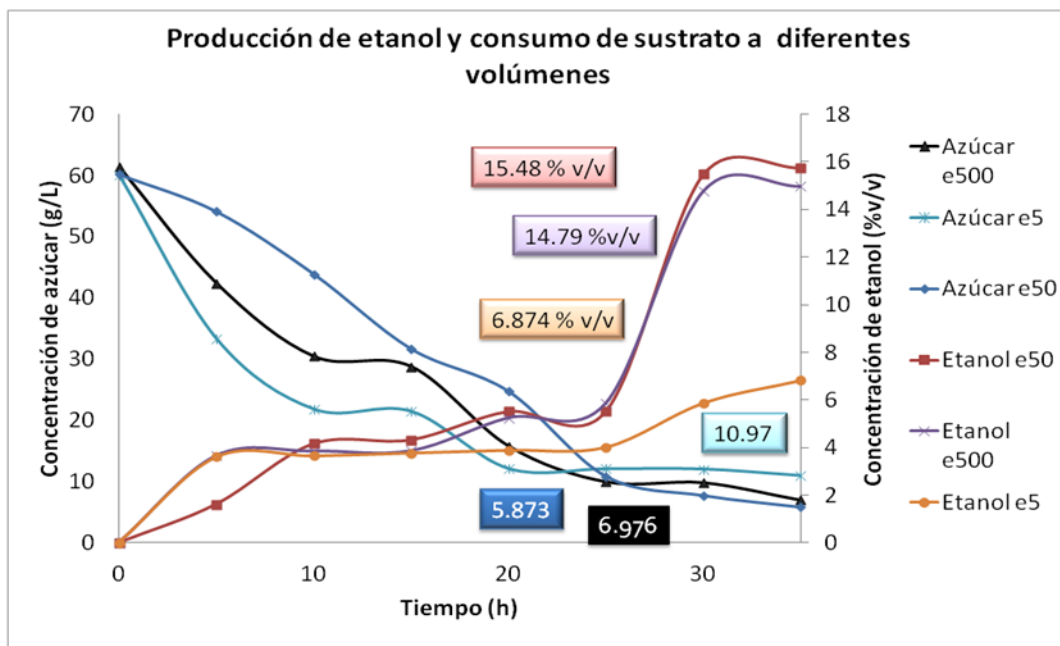


Figura 19. Efecto del escalado en la producción de etanol y consumo de sustrato en volúmenes de 5, 50 y 500 mL.

# CAPÍTULO 6

## CONCLUSIONES

- En la caracterización química de *Spirulina sp.* la cantidad de azúcares promedio fue de 18.13%.
- En la preparación del inóculo se obtuvo el mejor crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPS.
- La concentración máxima tolerada de glucosa es 120 g/L logrando elevar la tolerancia a la glucosa por la *Saccharomyces cerevisiae*.
- En las pruebas de fermentación en medio con hidrolizado de la biomasa de *Spirulina sp.* se obtuvo mayor porcentaje de rendimiento a concentraciones de 40 y 60 g/L alcanzando 23.03% y 22.07 % respectivamente. Se eligió la concentración 60 g/L.
- En el diseño de experimentos se logró encontrar las condiciones óptimas para el fermentador, temperatura 30°C, concentración de inóculo de

$1 \times 10^{10}$ .

- Se obtuvo un rendimiento máximo de 50.47 % correspondiente a 15.48 % v/v de etanol, superando valores reportados en bibliografías.

## Recomendaciones

En este trabajo de investigación se evaluó la capacidad de fermentación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* en medio acondicionado con biomasa de *Spirulina sp.* presentando las bases para un estudio más a fondo en cuanto a la composición cualitativa de azúcares y otros componentes presentes en la cianobacteria que pueden inhibir el crecimiento de la levadura.

En este proyecto se abre la posibilidad de utilizar diversas biomásas ricas en nutrientes, de alta producción industrial y que a su vez no compite con los cultivos destinados a consumo humano, por lo que se propone utilizar otras cepas de cianobacterias, algas y microalgas, con propiedades similares a la *Spirulina sp.* para la obtención de biocombustibles.

Otra recomendación es realizar una mejora del proceso al tomar en cuenta diversas variables como el control de la entrada de oxígeno, control de pH durante todo el proceso de fermentación y optimizar el proceso.



## REFERENCIAS

1. Adams, J., Gallagher, J., & Donnison, I. (2009). "Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments", ***Journal of Applied Phycology***, Vol. 21, DOI 10.1007/s10811-008-9384-7. 569–574.
2. Al-Husseini, M. (2006). "The debate over Hubbert's Peak: a review". ***GeoArabia***, Vol. 11, No. 2 , 181-210.
3. Avagyan, A. (2008). "A contribution to global sustainable development: inclusion of microalgae and their biomass in production and bio cycles". ***Clean Technologies and Environmental Policy***, Vol 10 , 313-317.
4. Babadzhanov, A.; *et al.* (2004). "Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan". ***Chemistry of Natural Compounds***, Vol. 40, No. 3, 276-279.
5. Bailey, & Ollis. (1997). "*Biochemical engineering fundamentals*". University Princenton: McGraw-Hill. Inc.
6. Barraza, C.; *et al.* (2009). "*Introducción a Ingeniería Bioquímica: PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS*". Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.: facultad de ingeniería escuela de ingeniería bioquímica.
7. Becker, J., & Boles, E. (2003). "A Modified *Saccharomyces cerevisiae* Strain That Consumes L-Arabinose and Produces Ethanol". ***Applied and Environmental Microbiology***, Vol.69, No. 7 , 4144-4150.

8. Borowitzka, M. (2009). "M. E. Gershwin, A. Belay (eds). *Spirulina* in human nutrition and health". ***Journal of Applied Phycology***, Vol 21, 747-748.
9. BUN-CA, U. N. (2002). "*Manuales sobre energía renovable: Biomasa*". San José, Costa Rica: Copyright 2002, BUN-CA.
10. Campbell, M. (2008). "Biodiesel: Algae as a Renewable Source for Liquid Fuel". ***Guelph Engineering Journal***, Vol.7 No.1, Col. 2, 1916-1107.
11. Chen, J., Wu, K., & Fukuda, H. (2008). "Bioethanol Production from Uncooked Raw Starch by Immobilized Surface-engineered Yeast Cells". ***Applied Biochemistry Biotechnology***, Vol 145, 59–67.
12. Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae". ***Biotechnology Advances***, Vol. 25, 294-306.
13. Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the Edible Microorganism. ***American Society for Microbiology, MICROBIOLOGICAL REVIEWS***, Vol. 47, No. 4 , 551-578.
14. Cot et al, M. (2007). "Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol" ***FEMS Yeast Research***, Vol. 7. 22–32.
15. Dake, M., Jadhav, J., & Patil, N. (2010). "Variations of two pools of glycogen and carbohydrate in *Saccharomyces cerevisiae* grown with various ethanol concentrations". ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology***, Vol. 37, 701–706.
16. Demirbas, A. (2005). "Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass". ***Energy Sources***, Vol. 27 , 327-337.

17. DeOliveira, E.; *et al* (2006). "Heats of combustion of biofuels obtained by pyrolysis and by transesterification and of biofuel/diesel blends". ***Thermochimica Acta***, Vol. 450, No. 1-2 , 87-90.
18. Dien, B., Cotta, M., & Jeffries, T. (2003). "Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status" MINI-REVIEW. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, Vol. 63 , 258–266.
19. Donev, T., & Uzunova, T. (2002). "Influence of the growth conditions on the resistance of *Saccharomyces cerevisiae*, strain NBIMCC 181, by freeze-drying". ***Journal of culture collections***, Vol.3, 72-77.
20. Du, Z., & al, e. (2011). "Microwave-assisted pyrolysis of microalgae for biofuel production". ***Bioresource Technology***, Vol. 102, No. 7 , 4890-4896 .
21. El-Bestawya, E., Bellinger, E., & Sigee, D. (1996). "Elemental composition of phytoplankton in a subtropical lake: X-ray microanalytical studies on the dominant algae *Spirulina platensis* (Cyanophyta) and *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyceae)". ***European Journal of Phycology***, Vol. 31 , 157-166.
22. Emdadi, L., & al, e. (2009). "Optimization of Withering Time and Fermentation Conditions During the Manufacture of Black Tea Using a Response Surface Methodology". ***Transactions of Chemistry and Chemical Engineering***, Vol. 16, No. 1 , 61-68.
23. Ennouali *et al*, M. (2006). "Biotransformation of algal waste by biological fermentation" ***African Journal of Biotechnology***, Vol. 5, No. 13. 1233-1237.

24. Ergun, M., & Mutlu, S. (2000). "Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*". **Bioresource Technology**, Vol. 73 , 251–255.
25. Escorihuela, A., & al., e. (2007). "Presence of microalgae in a lagoon for polishing of effluents from a treatment plant for urban wastewaters". **Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)**, Vol. 24, Supl.1, 225-230.
26. Evangelos, P., & Costas, P. (2009). "Biofuels: A Survey on Pros and Cons". **Energy & Fuels**, Vol. 23 , 1055–1066.
27. Galbe, M., & Zacchi, G. (2002). "A review of the production of ethanol from softwood". **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 59, 618-628.
28. Gil, G. e. (2008). "La crisis del petróleo en México". *Foro consultivo Científico y Tecnológico. A.C.* , primera edición, D.F. México: Impreso en México.
29. Gonzalez, A., & Valenzuela, L. (2003). "*Saccharomyces cerevisiae*". Cd. de México: Departamento De Genética Molecular, Instituto De Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma De México.
30. Gordillo, F., Jimenez, C., Figueroa, F., & Niell, F. (1999). "Effects of increased atmospheric CO<sub>2</sub> and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (Arthrospira)". **Journal of Applied Phycology**, Vol. 10, 461–469.
31. Gouveia, L., & Oliveira, A. (2008). "Microalgae as a raw material for biofuels production". **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Vol. 36, DOI 10.1007/s10295-008-0495-6. 269–274.

32. Hu, G., & al, e. (2008). "Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances". *The Plant Journal*, Vol. 54, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x, 621–639.
33. Jae, W., Hartono, M., Heng Chan, W., & Siong Yeo, S. (2011). "Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*". *Applied Microbiology and Biotechnology, BIOENERGY AND BIOFUELS*, Vol. 89 , 1255–1264.
34. Kiran, S., Sikander, A., & Lkram, H. (2003). "Time course study for yeast invertase production by submerged fermentation.". *Journal Biology Science*, Vol. 3, No. 11, 984–988.
35. Kuyper et al, M. I. (2005). "Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain", *FEMS Yeast Research*, Vol 5. 925–934.
36. Lang, X., Hill, G., & Macdonald, D. (2001b). "Recycle bioreactor for bioethanol production from wheat starch I, Cold enzyme hydrolysis". *Energy Sources*, Vol. 23, 417-425.
37. Lang, X., Macdonald, D., & Hill, G. (2001a). "Recycle bioreactor for bioethanol production from wheat starch II, Fermentation and economics". *Energy Sources*, Vol. 23, 427-436.
38. Lardon, L. e. (2009). "Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae". *Environmental Science & Technology*, Vol. 43, No. 17, doi: 10.1021/es900705j, 6475-6482.
39. Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). "Ethanol fermentation from biomass resources: current state". *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.69, DOI 10.1007/s00253-005-0229-x, 627–642.

40. Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock, Biología de los microorganismos*. 10 Edición. Southern Illinois University Carbondate: Pearson, Prentice Hall.
41. Mandal, S., & Mallick, N. (2009). "Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production". ***Applied Microbiology and Biotechnology***, *BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING*, Vo. 84 , 281–291.
42. Martín, F., Almazán, J., & Palomino, C. (2008). "Biodiésel de algas". ***Biomasa***, 100-106.
43. Matthew, H. (2005). Obtenido de <http://www.arches.uga.edu/matthaas/strains.htm>
44. New Partnership for Africa's (NEPAD). (2007). *Development Biofuels (Bioethanol and Biodiesel) Crop Production: Technology Options for Increased Production, Commercialisation & Marketing*. Africa: GOVERNMENT OF THE REPUBLIC OF SOUTH AFRICA.
45. Oliveira, M., Monteiro, M., Robbs, P., & Leite, S. (1999). "Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures". ***Aquaculture International***, Vol. 7, 261–275.
46. PEMEX. (2010). "2010, las reservas de hidrocarburos en México". México: Secretaria de energía (SENER).
47. Peña, C. & Arango, R. (2009). "Evaluation of ethanol production using recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* from sugar cane molasses". ***Dyna***, Vol. 76, No. 159 , 153-161.

48. Pimentel, D. & Patzek, T. (2005). "Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower". **Natural Resources Research**, Vol. 14, No. 1 , 65-76.
49. Prassone, A. & al, e. (2000). "*Microalgae biomass production process by air-lift photobioreactors*". Genova: Universidad de Genova.
50. Querini, C. (2006). "Biodiesel: Impacto del tipo de materia prima en el proceso de produccion y calidad del producto". *1er foro tecnico de cultivos alternativos: generacion de materias primas con fines energeticos* (pág. 32). Buenos Aires, Argentina: INCAPE.
51. Regalbutto, J. (2009). Cellulosic Biofuels—Got Gasoline? **Science**, Vol. 325, 822-824.
52. Rodgers, M., Hu, Z. & Zhan, X. (2009). "Enhancing Enzymatic Hydrolysis of Maize Stover by Bayer Process Sand Pretreatment". **Energy & Fuels**, Vol. 23, 2284–2289.
53. Rodriguez, A. & Triana, F. (2003). "*Evaluacion del pH en el cultivo de Spirulina spp. (Arthrospira) bajo condiciones de laboratorio*". Bogota, D. C.: Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias.
54. Salgueiro, S., Correia, I. & Novais, J. (1988). "Ethanol-Induced Leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics and Relationship to Yeast Ethanol Tolerance and Alcohol Fermentation Productivity". **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 54, No. 4, 903-909.
55. Sanchez et al, S. (1999). "Comparative study of the fermentation of D-glucose/D-xylose mixtures with *Pachysolen tannophilus* and *Candida shehatae*". **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Vol. 21 , 525–

532.

56. Savage, D., Way, J., & Silver, P. (2009). "Defossilizing Fuel: How Synthetic Biology Can". **ACS Chemical Biology**, Vol 3, No. 1, 13-16.
57. Seungdo, K., & Bruce, D. (2006). "Ethanol Fuels: E10 or E85 – Life Cycle Perspectives". **LCA Case Studies**, Vol. 11, No. 2, 117 – 121.
58. Skoog, Holler, & Nieman. (2001). *Principios de análisis instrumental*. Aravaca, Madrid: McGraw-Hill.
59. Sommer, P., Georgieva, T., & Ahring, B. (2004). "Potential for using thermophilic anaerobic bacteria for bioethanol production from hemicellulose". **Biochemical Society**, Vol. 32, part 2, 283-289.
60. Stang, G., Macdonald, G., & Hill, G. (2001). "Mass Transfer and Bioethanol Production in an External-Loop". **Industrial & Engineering Chemistry Research**, American Chemical Society, Vol. 40, 5074-5080.
61. Steichen, J., Koelliker, J., & Grosh, D. (1998). "Contamination of Farmstead Wells by Pesticides, Volatile Organics, and Inorganic Chemicals in Kansas". **FOCUS**, 153-160.
62. Subramani, V., & Gangwal, S. (2008). "A Review of Recent Literature to Search for an Efficient Catalytic Process for the Conversion of Syngas to Ethanol". **Energy & Fuels**, Vol. 22, 814-839.
63. The Royal Society. (2008). *Sustainable biofuels: prospects and challenges*. London SW1Y 5AG: Science Policy Section The Royal Society.
64. Vallet et al, C. (1996). "Natural abundance isotopic fractionation in the



fermentation reaction: influence of the nature of the yeast". **Bioorganic Chemistry**, Vol. 24, 319-330.

65. Vijayaraghavan, K., & Hemanathan, K. (2009). "Biodiesel Production from Freshwater Algae". **Energy & Fuels**, DOI:10.1021/ef9006033.

66. Wyman, C. (2001). "Twenty Years of Trials, Tribulations, and Research Progress in Bioethanol Technology". **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Vol. 91–93, 5-22.

67. Xiong, W., Li, X., & Wu, Q. (2008). "High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production". **Applied Microbiology & Biotechnology**, Vol.78, 29–36 DOI 10.1007/s00253-007-12851

68. Yang, Y., & al, e. (2009). "Dilute Acid Pretreatment of Oven-dried Switchgrass Germplasms for Bioethanol Production". **Energy & Fuels**, Vol. 23, 3759–3766.

69. Yu, Z., & Zhang, H. (2004). "Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*". **Bioresource Technology**, Vol. 93, 199–204.

70. Zhen-yuan, N., Jin-lan, X., & Levert, J. (2002). "Fractionation and characterization of polysaccharides from cyanobacterium *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* in nitrogen-limited batch culture". **Journal CSUT**, Vol. 9, No. 2, 81-86.

# APÉNDICES

## TABLA DE CONTENIDO

APÉNDICE	PÁGINA
APÉNDICE A. PRUEBA DE VERIFICACIÓN DE LINEALIDAD. ....	1
APÉNDICE B. TABLAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL. ....	12
APÉNDICE C. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR CROMATOGRFÍA DE GASES DE ETANOL. ....	15

# Apéndice A

## **Prueba de verificación de linealidad**

## Prueba de verificación de linealidad

Esta prueba es recomendada para la verificación de la linealidad. Para esta prueba se utilizan la función de primer orden ( $y = a + bx$ ) y de segundo orden ( $y = a + bx + cx^2$ ) de calibración, incluyendo sus respectivas desviaciones estándar residuales ( $S_y$ ) que son usadas.

El valor de la prueba es calculado por  $DS^2 = (N-2)S^2_{y_1} - (N-3)S^2_{y_2}$  con el grado de libertad  $f=1$ , y el valor de TV es calculado por:

$$TV = DS^2 / S^2_{y_1}$$

Y comparado con el valor obtenido de la tabla  $F(f_1=1, f_2=2, P=99\%)$  si  $TV \leq F$  entonces la función de segundo orden de calibrado no provee una mejor significancia y la función es lineal. De acuerdo a la prueba de Mandel se obtuvieron los valores correspondientes para cada curva de calibración

Las figuras muestran las curvas de calibración obtenidas para la determinación de azúcares reductores con el método del ácido 3-5, dinitrosalicílico.

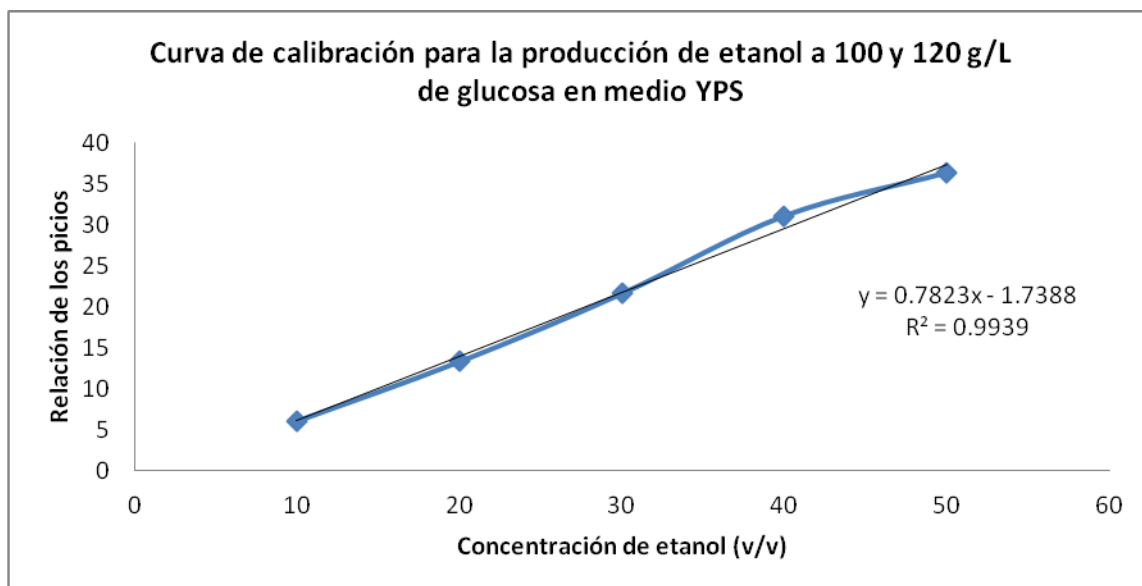


Figura A1. Curva de calibración para la producción de etanol en medio YPS a 100 y 120 g/L de glucosa

Ecuación:  $y = 0.7823x - 1.7388$

Tabla A I: Prueba de Mandel para la curva de calibración A1.

Estándar	x	Y	x <sup>2</sup>	x <sup>3</sup>	x <sup>4</sup>	y <sup>2</sup>	x*y	(x <sup>2</sup> )*y
1	10	6.134	100	1000	10000	37.631	61.344	613.441
2	20	13.367	400	8000	160000	178.699	267.356	5347.1354
3	30	21.656	900	27000	810000	469.014	649.702	19491.065
4	40	31.117	1600	64000	2560000	968.292	1244.696	49787.845
5	50	36.374	2500	125000	6250000	1323.111	1818.730	90936.507
SUMATORIA	150	108.651	5500	225000	9790000	2976.749	4041.829	166175.996
PROMEDIO	30	21.730	1100				808.365	

Tabla A II: Valores de Q y constantes a, b y c de la prueba de Mandel para la curva de calibración de A1

Qxx 1000	Qxy 782.2994	
Qx3 60000	Qx4 3740000	
Qx2y 46659.8963	Qyy 615.7411	
c	b	a
-0.002	0.9015	-3.1291

Tabla A III: Valores de DS<sup>2</sup> y TV de la prueba de Mandel para la curva de calibración de A1

x	y	$(y_i - (a + bx + cx^2))^2$	Sy2	$(y_i - (a + bx))^2$	Sy1
10	6.1344	0.2002	1.2642	0.0619	3.7335
20	13.3678	0.5446		2.3485	
30	21.6567	0.2216		5.0998	
40	31.1174	1.8648		3.2846	
50	36.3746	0.3652		31.0232	
Sumatoria		3.1964		41.8181	
DS2	TV				
38.6216	24.1653				

Si N-3 son los grados de libertad y  $F(f_1=1, f_2=2, P=99\%) = 98.50$  y  $TV = 24.16$  y la condición de Mandel para comprobar la linealidad de la curva de calibración

es:  $TV \leq F$ , entonces se comprueba que la curva de calibración la producción de etanol en medio YPS a concentraciones de 100 g/L y 120 g/L **es lineal**.

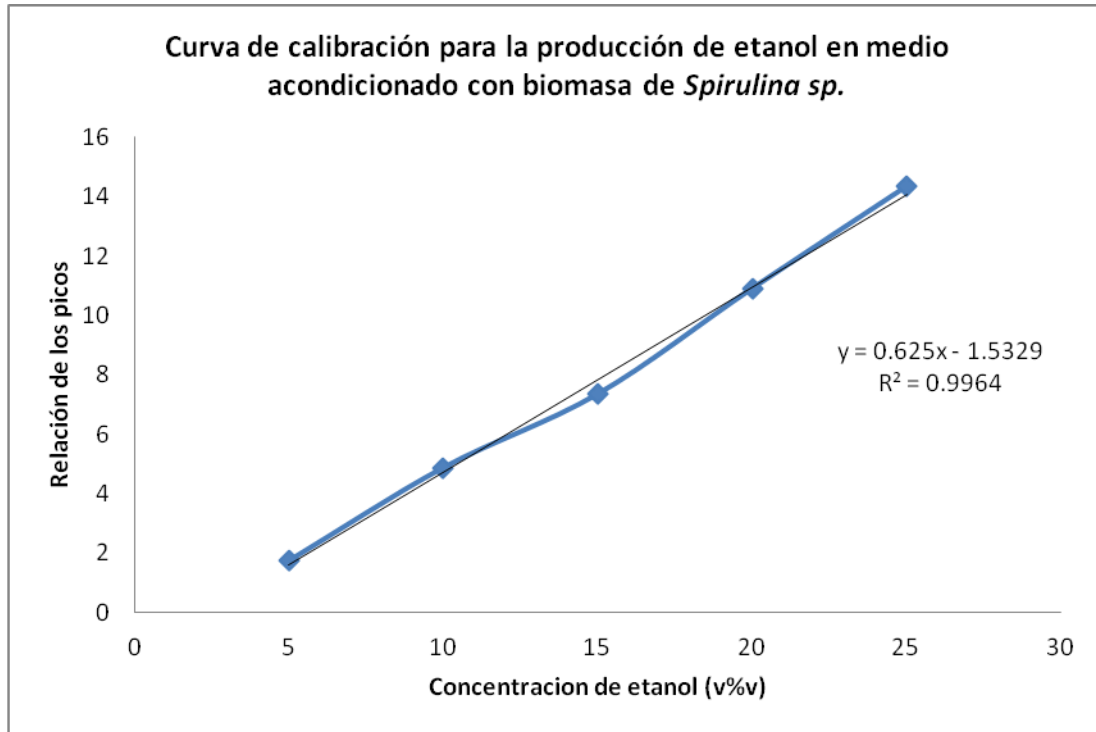


Figura A2. Curva de calibración para la producción de etanol en medio acondicionado con biomasa de *Spirulina sp.*

Ecuación:  $y = 0.625x - 1.5329$

Tabla A IV: Prueba de Mandel para la curva de calibración A2.

Estándar	x	y	x <sup>2</sup>	x <sup>3</sup>	x <sup>4</sup>	y <sup>2</sup>	x*y	(x <sup>2</sup> )*y
1	5	1.7377	25	125	625	3.0198	8.6887	43.4439
2	10	4.8707	100	1000	10000	23.7240	48.7073	487.0738
3	15	7.3506	225	3375	50625	54.0321	110.2598	1653.8978
4	20	10.9070	400	8000	160000	118.9638	218.1410	4362.8211
5	25	14.3446	625	15625	390625	205.7700	358.6171	8965.4296
SUMATORIA	75	39.2108	1375	28125	611875	405.5099	744.4142	15512.6666
PROMEDIO	15	7.8421	275				148.8828	



Tabla A V: Valores de Q y constantes a, b y c de la prueba de Mandel para la curva de calibración de A2.

Qxx	Qxy	
250	156.2509	
Qx3	Qx4	
7500	233750	
Qx2y	Qyy	
4729.6708	98.0112	
c	b	a
0.0048	0.4805	-0.6899

Tabla A VI: Valores de  $DS^2$  y TV de la prueba de Mandel para la curva de calibración de A2

x	y	$(y_i - (a+bx+cx^2))^2$	Sy2	$(y_i - (a+bx))^2$	Sy1
5	1.7378	0.0091	0.2745	0.0006	2.1867
10	4.8707	0.0751		0.5710	
15	7.3506	0.0628		0.6939	
20	10.9070	0.0036		3.9477	
25	14.3446	0.0001		9.1323	
Sumatoria		0.1508		14.3456	
DS2	TV				
14.1948	188.3197				

Si N-3 son los grados de libertad y  $F(f_1=1, f_2=2, P=99\%) = 98.50$  y  $TV = 188.3198$  y la condición de Mandel para comprobar la linealidad de la curva de

calibración es:  $TV \leq F$ , entonces se comprueba que la curva de calibración para la producción de etanol en medio acondicionado con biomasa de *Spirulina sp.* **no es lineal.**

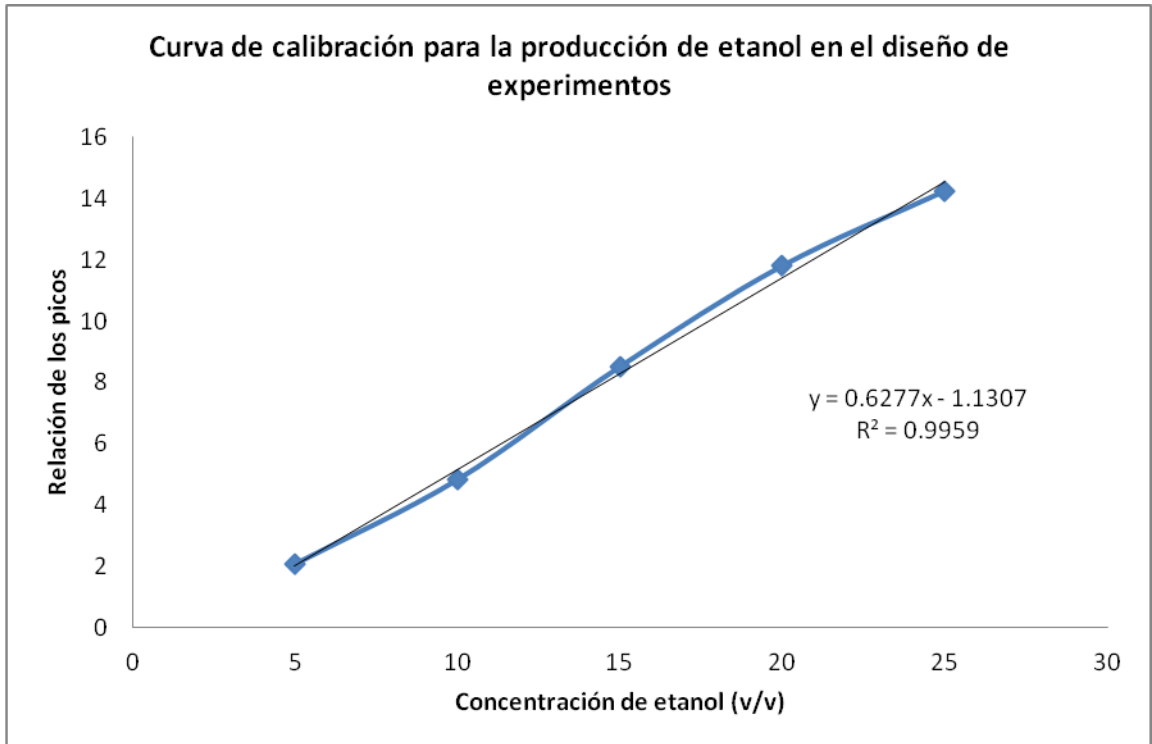


Figura A3. Curva de calibración para la producción de etanol en el diseño de experimentos

Ecuación:  $y = 0.6277x - 1.1307$

Tabla A VII: Prueba de Mandel para la curva de calibración de A3

Estándar	x	y	x <sup>2</sup>	x <sup>3</sup>	x <sup>4</sup>	y <sup>2</sup>	x*y	(x <sup>2</sup> )*y
1	5	2.0523	25	125	625	4.2122	10.2618	51.3093
2	10	4.81200	100	1000	10000	23.1553	48.1200	481.2004
3	15	8.50385	225	3375	50625	72.3154	127.5577	1913.3663
4	20	11.8052	400	8000	160000	139.3648	236.1057	4722.1149
5	25	14.2471	625	15625	390625	202.9801	356.1777	8904.4447
SUMATORIA	75	41.4206	1375	28125	611875	442.0280	778.2232	16072.4358
PROMEDIO	15	8.2841	275				155.6446	

Tabla A VIII. Valores de Q y constantes a, b y c de la prueba de Mandel para la curva de calibración de A3.

Qxx	Qxy	
250	156.9138	
Qx3	Qx4	
7500	233750	
Qx2y	Qyy	
4681.76342	98.8944	
c	B	a
-0.0029	0.7156	-1.6437

Tabla A IX. Valores de  $DS^2$  y TV de la prueba de Mandel para la curva de calibración de A3.

x	y	$(y_i - (a + bx + cx^2))^2$	Sy2	$(y_i - (a + bx))^2$	Sy1
5	2.0524	0.0367	0.4071	0.0139	1.3650
10	4.8120	0.1658		0.4904	
15	8.5038	0.0053		0.3439	
20	11.8053	0.0958		0.7448	
25	14.2471	0.0279		3.9967	
sumatoria		0.3315		5.5897	
DS2	TV				
5.2582	31.7269				

Si  $N-3$  son los grados de libertad y  $F(f_1=1, f_2=2, P=99\%) = 98.50$  y  $TV = 31.7269$  y la condición de Mandel para comprobar la linealidad de la curva de calibración es:  $TV \leq F$ , entonces se comprueba que la curva de calibración para la producción de etanol en el diseño de experimentos **es lineal**.

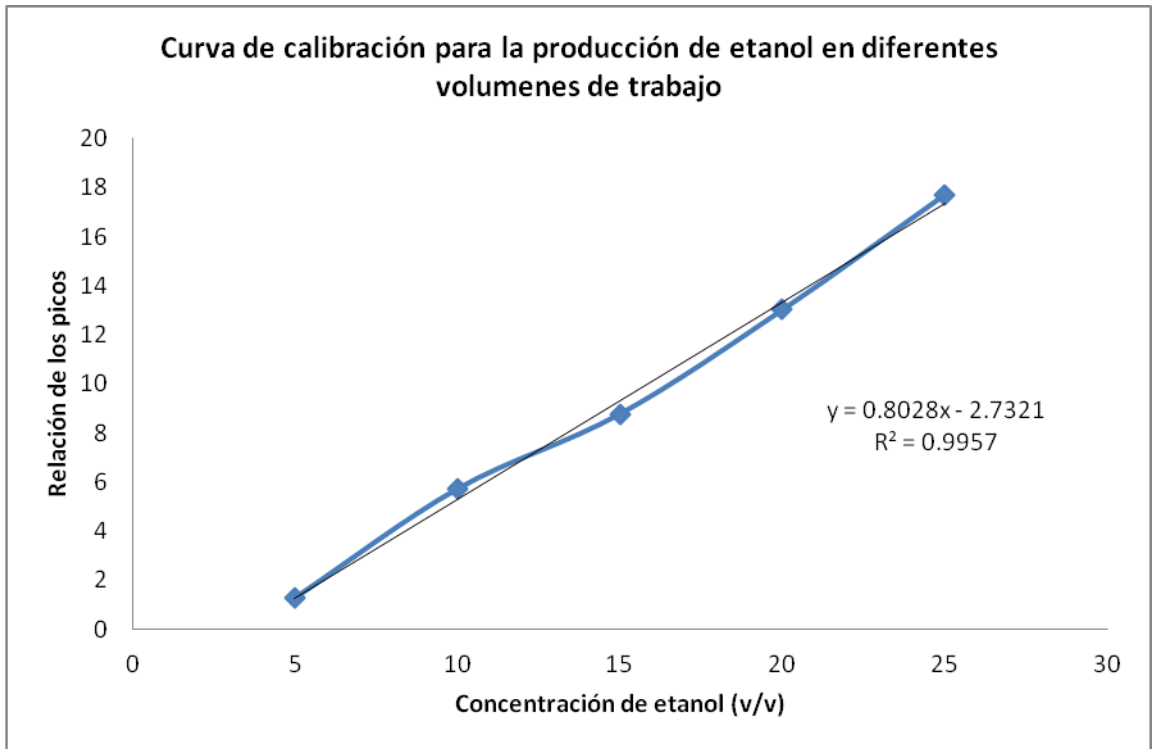


Figura A4. Curva de calibración para la producción de etanol en diferentes volúmenes de trabajo

Ecuación:  $y = 0.8028x - 2.7321$

Tabla A VII: Prueba de Mandel para la curva de calibración de A4

Estándar	x	y	x <sup>2</sup>	x <sup>3</sup>	x <sup>4</sup>	y <sup>2</sup>	x*y	(x <sup>2</sup> )*y
1	5	1.2907	25	125	625	1.6662	6.4539	32.2696
2	10	5.7342	100	1000	10000	32.8811	57.3420	573.4205
3	15	8.7834	225	3375	50625	77.1489	131.7516	1976.2752
4	20	13.0286	400	8000	160000	169.7446	260.5722	5211.4441
5	25	17.7140	625	15625	390625	313.7873	442.8511	11071.2779
SUMATORIA	75	46.5510	1375	28125	611875	595.2282	898.9709	18864.6874
PROMEDIO	15	9.31021	275				179.7941	

Tabla A VIII. Valores de Q y constantes a, b y c de la prueba de Mandel para la curva de calibración de A4.

Qxx	Qxy	
250	200.7046	
Qx3	Qx4	
7500	233750	
Qx2y	Qyy	
6063.1371	161.8274	
C	B	a
0.0048	0.6588	-1.8921

Tabla A IX. Valores de  $DS^2$  y TV de la prueba de Mandel para la curva de calibración de A4.

x	y	$(y_i - (a+bx+cx^2))^2$	Sy2	$(y_i - (a+bx))^2$	Sy1
5	1.2908	0.0534	0.4982	0.0123	2.2055
10	5.7342	0.3114		1.0776	
15	8.7834	0.0822		0.6291	
20	13.0286	0.0308		3.0424	
25	17.7140	0.0184		9.8317	
sumatoria		0.4964		14.5932	
DS2	TV				
14.0968	56.7924				

Si N-3 son los grados de libertad y  $F(f_1=1, f_2=2, P=99\%)= 98.50$  y  $TV = 56.7923$  y la condición de Mandel para comprobar la linealidad de la curva de calibración es:  $TV \leq F$ , entonces se comprueba que la curva de calibración para la producción de etanol a diferentes volúmenes de trabajo es lineal.

## Apéndice B

### **Tablas de producción de etanol**

**Tablas de producción de etanol en medio YPS, medio acondicionado con biomasa de *Spirulina sp.*, diseño de experimentos y efecto del escalado**

Tabla B I. Concentración de etanol en % v/v en medio YPS a 100 g/L y 120 g/L de glucosa obtenido del proceso de fermentación por la cepa *Saccharomyces cerevisiae*

tiempo (h)	100 g/L	120 g/L
0	2.3199	2.4916
5	2.4314	2.5951
10	4.4794	3.6490
15	7.4949	4.6296
20	7.2183	5.2966
25	8.0337	7.3182
30	10.0057	9.3371
35	10.0175	9.4821

Tabla B II. Concentración de etanol en % v/v en medio acondicionado con biomasa de *Spirulina sp.* obtenido del proceso de fermentación por la cepa *Saccharomyces cerevisiae*

Tiempo (h)	40 g/L	60 g/L	80 g/L	100 g/L	120 g/L
0	0	0	0	0	0
5	2.0773	2.2783	2.3436	1.9823	2.4244
10	2.2715	4.6408	2.5467	2.4372	3.9282
15	2.5869	4.1656	2.8636	4.7439	4.2375
20	2.8952	4.8897	4.6141	4.3488	4.6060
25	4.5402	4.8545	4.7420	4.6908	4.5713
30	4.7091	6.7686	8.4486	6.6412	10.3062



Tabla B III. Concentración de etanol en % v/v en el diseño de experimentos obtenido del proceso de fermentación por la cepa *Saccharomyces cerevisiae*

Corrida	Concentración de etanol (v/v)	Corrida	Concentración de etanol (v/v)	Corrida	Concentración de etanol (v/v)
1C1T1	1.8170	1C1T2	1.8555	1C1T3	1.8614
2C1T1	1.9444	2C1T2	1.7654	2C1T3	4.1937
3T1C1	4.1411	3C1T2	4.4766	3C1T3	4.2522
4C1T1	4.1784	4C1T2	6.1232	4C1T3	4.6225
5T1C1	5.5368	5T2C1	4.1439	5C1T3	4.7292
6T1C1	6.3580	6C1T2	4.3677	6C1T3	7.1485
1C2T1	1.9665	1C2T2	1.7192	1C2T3	1.7513
2C2T1	2.3028	2C2T2	4.1295	2C2T3	1.8980
3C2T1	4.1045	3C2T2	4.6196	3C2T3	4.2821
4C2T1	4.1669	4C2T2	4.6459	4C2T3	4.3746
5C2T1	4.3745	5C2T2	6.1795	5C2T3	11.1595
6C2T1	4.4337	6C2T2	13.6904	6C2T3	12.3387
1C3T2	1.7325	1C3T3	1.6219		
2C3T2	1.7495	2C3T3	4.1573		
3C3T2	1.9713	3C3T3	4.3171		
4C3T2	4.1860	4C3T3	5.5103		
5C3T2	4.2374	5C3T3	5.5255		
6C3T2	7.1173	6C3T3	15.4788		

Tabla B IV. Concentración de etanol en % v/v en efecto del escalado en el proceso de fermentación por la cepa *Saccharomyces cerevisiae*

Tiempo (h)	5 mL	50 mL	500 mL
0	0	0	0
5	3.6133	1.6219	3.6614
10	3.6515	4.1573	3.8458
15	3.7750	4.3171	3.8635
20	3.8927	5.5103	5.2529
25	4.0212	5.5255	5.8811
30	5.8855	15.4788	14.7915

## Apéndice C

### **Cromatogramas obtenidos por Cromatografía de Gases de etanol**

## Cromatogramas obtenidos por Cromatografía de Gases de etanol

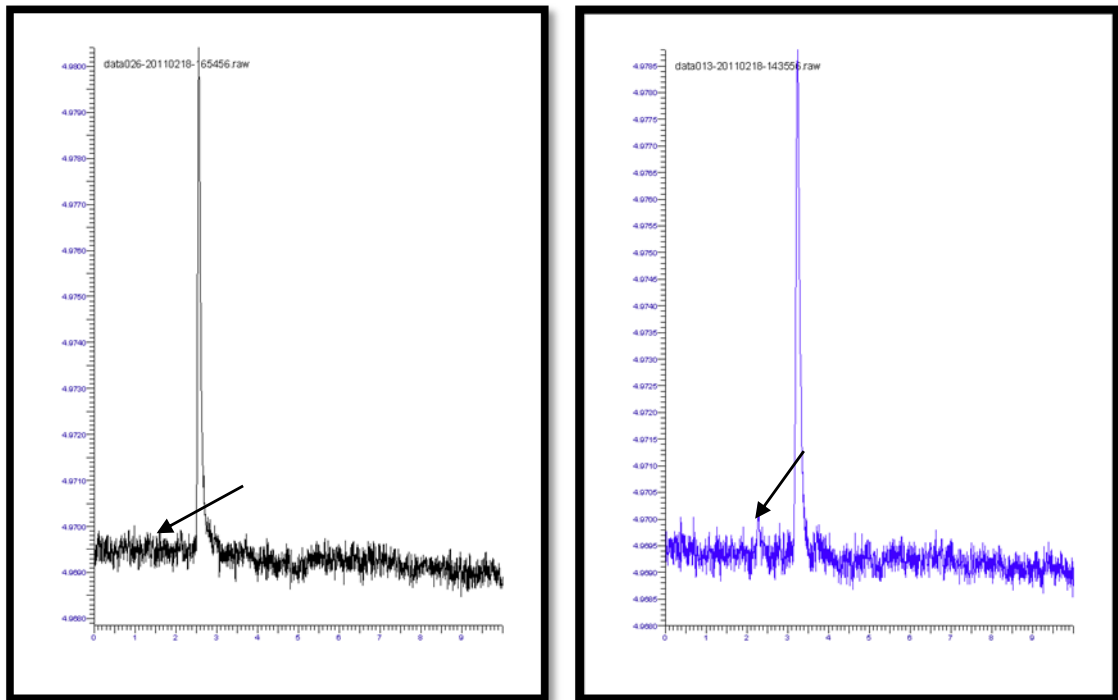


Figura C1. Producción de etanol a las 0 y a las 5 h respectivamente a una  $T=30^{\circ}\text{C}$

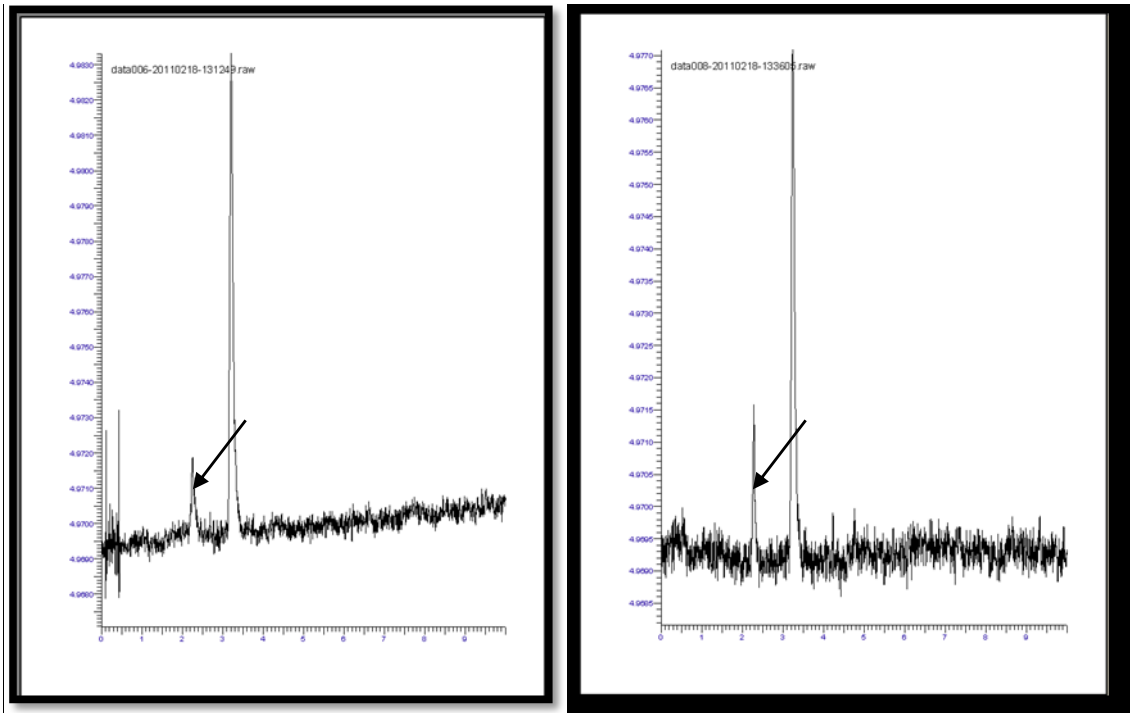


Figura C2. Producción de etanol a las 10 y a las 20 h de fermentación respectivamente a una  $T=30^{\circ}\text{C}$

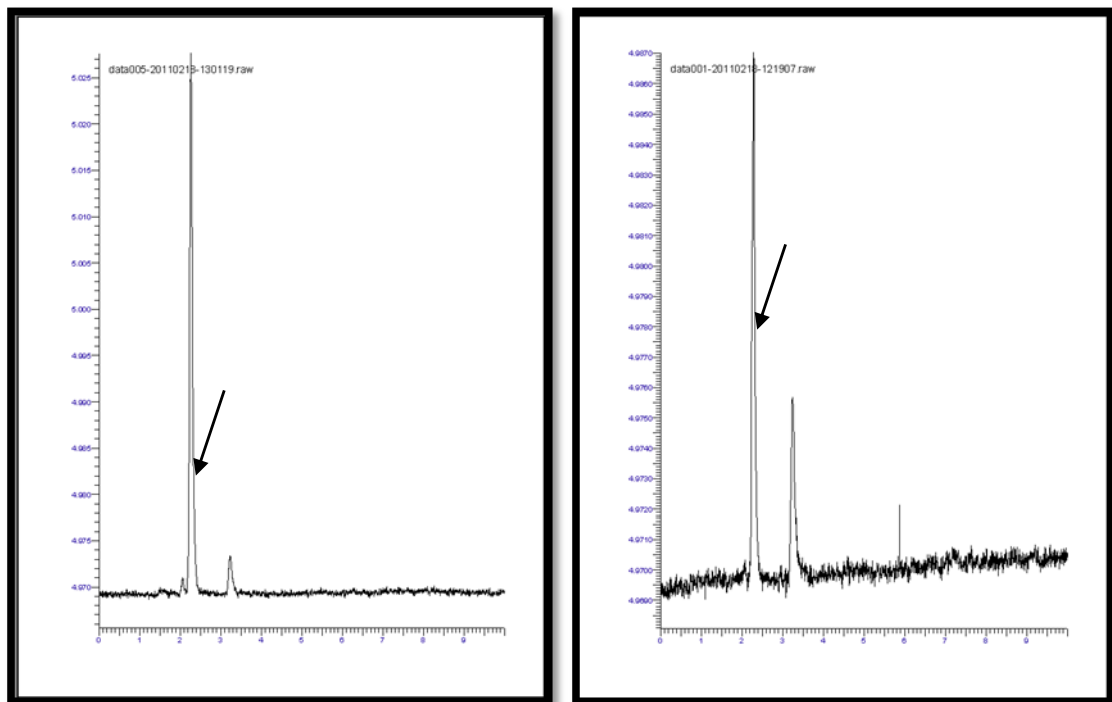


Figura C3. Comparación del estándar de etanol de 15% v/v con la producción de etanol a las 30 h de fermentación a una  $T=30^{\circ}\text{C}$