



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

Producción de bioetanol utilizando biomasa de un cultivo mixto de microalgas  
como materia prima

---

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

**Autor:** Miguel Ángel Carrera Ocampo

**Tutor:** Ing. Mario Daniel García Solís, PhD.

**Ambato – Ecuador**

**Septiembre – 2022**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Ing. Mario Daniel García Solís, PhD.

### **CERTIFICA**

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 11 de agosto de 2022

---

Ing. Mario Daniel García Solís, PhD.

C.I. 1103605471

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Miguel Ángel Carrera Ocampo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las referencias bibliográficas.



---

Miguel Ángel Carrera Ocampo

C.I. 1804196630

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos docentes calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

---

Presidente del Tribunal

---

Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria  
C.I. 1802142461

---

Mg. Danae Fernández Rivero  
C.I. 1757181209

Ambato, 29 de agosto de 2022

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final de Integración Curricular o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

Miguel Ángel Carrera Ocampo

C.I. 1804196630

**AUTOR**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por ser el apoyo en cada etapa de mi vida, mi guía y fortaleza, por brindarme su amor y bendecirme, y por permitirme cumplir uno de mis objetivos.

A mis padres, María y Jorge, por ser el pilar fundamental de mi vida, por estar conmigo, apoyarme y brindarme su amor incondicional, por enseñarme a enfrentar cada desafío y nunca rendirme, por su sacrificio, enseñanzas, consejos y su paciencia.

A mis hermanas, Nancy y Fernanda por todo su amor y compañía durante este proceso; por impulsarme a ser mejor cada día y alegrar mi vida.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por sus bendiciones, por brindarme la sabiduría y fortaleza para superar cada una de las pruebas que se han presentado en mi camino.

A mi familia por ser mi apoyo incondicional, por brindarme su amor, consejos y palabras de aliento para seguir adelante.

A mis compañeros y amigos por todo su apoyo, cariño y amistad a lo largo de mi carrera universitaria, los llevo en mi corazón.

A mi tutor, Ph.D. Mario García, y a la docente Ph.D. Liliana Cerda, por guiarme adecuadamente durante el desarrollo del presente proyecto de investigación.

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por recibirme en sus instalaciones, a mis docentes por su paciencia, apoyo y por brindarme sus conocimientos en mi formación profesional.

A cada una de las personas que directa o indirectamente me apoyaron en el desarrollo de mi vida estudiantil ayudándome a lograr mi sueño, mi más sincero agradecimiento.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO .....	1
1.1    Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1    Introducción .....	1
1.1.2    Escenario energético global .....	2
1.1.2.1    Combustibles fósiles: producción, demanda y efectos ambientales.....	2
1.1.2.2    Alternativas de energía renovable.....	3
1.1.3    Biocombustibles.....	4
1.1.3.1    Generalidades.....	4
1.1.3.2    Biocombustibles de primera generación.....	4
1.1.3.3    Biocombustibles de segunda generación .....	5
1.1.3.4    Biocombustibles de tercera generación .....	5
1.1.4    Bioetanol .....	6
1.1.4.1    Generalidades.....	6
1.1.4.2    Producción .....	6
1.1.4.3    Aplicaciones como biocombustible.....	8
1.1.5    Producción de bioetanol a partir de biomasa de microalgas.....	9
1.1.5.1    Biología de las microalgas.....	9
1.1.5.2    Potencial biotecnológico de las microalgas.....	10



1.1.5.3	Requerimientos nutricionales y sistemas de cultivo para la generación de biomasa microalgal.....	13
1.1.5.4	Estrategias para la acumulación de carbohidratos.....	14
1.1.5.5	Procesamiento de la biomasa y recuperación de azúcares fermentables.....	14
1.1.5.6	Fermentación y extracción de bioetanol.....	15
1.2	Objetivos.....	16
1.2.1	Objetivo General.....	16
1.2.2	Objetivos Específicos.....	16
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.....		17
2.1	Materiales.....	17
2.1.1	Equipos de laboratorio.....	17
2.1.2	Reactivos.....	18
2.1.3	Material fungible.....	18
2.2	Métodos.....	19
2.2.1	Establecimiento del cultivo inicial de microalgas.....	19
2.2.2	Evaluación de la generación de biomasa microalgal empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo.....	20
2.2.3	Determinación de las condiciones óptimas para la hidrólisis ácida de los carbohidratos contenidos en la biomasa microalgal.....	22
2.2.4	Evaluación de los carbohidratos contenidos en la biomasa microalgal generada empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo.....	23
2.2.5	Obtención de bioetanol a partir de la fermentación de los carbohidratos hidrolizados derivados de la biomasa microalgal.....	24
2.2.6	Análisis de datos.....	26
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		27
3.1	Análisis y discusión de los resultados.....	27
3.1.1	Observación de la morfología de las células del consorcio de microalgas.....	27
3.1.2	Evaluación de la generación de biomasa microalgal empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo.....	28
3.1.3	Determinación de las condiciones óptimas para la hidrólisis ácida de los carbohidratos contenidos en la biomasa microalgal.....	33
3.1.4	Evaluación de los carbohidratos contenidos en la biomasa microalgal generada empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo.....	35

3.1.5	Obtención de bioetanol a partir de la fermentación de los carbohidratos derivados de la hidrólisis de la biomasa microalgal.....	39
3.2	Verificación de hipótesis.....	41
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		42
4.1	Conclusiones .....	42
4.2	Recomendaciones.....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		44
ANEXOS.....		60
Anexo A. Análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey.....		60
Anexo B. Evaluación de la generación de biomasa microalgal.....		62
Anexo C. Determinación de la concentración de azúcares reductores .....		63
Anexo D. Determinación de la concentración etanol.....		64
Anexo E. Obtención de bioetanol .....		65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de lípidos y carbohidratos de varias especies de microalgas	12
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos propuestos para la generación de biomasa microalgal utilizando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo .....	21
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos propuestos para la hidrólisis de carbohidratos utilizando diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	22
<b>Tabla 4.</b> Generación de biomasa en el día 15 de cultivo con las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo .....	30
<b>Tabla 5.</b> Consumo de azúcares reductores durante la fermentación .....	39
<b>Tabla 6.</b> Producción y rendimiento del etanol obtenido.....	40
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre el peso seco.....	60
<b>Tabla 8.</b> Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre el peso seco .....	60
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre el número de células .....	60
<b>Tabla 10.</b> Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre el número de células .....	60
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza del efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la liberación de azúcares reductores.....	61
<b>Tabla 12.</b> Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la liberación de azúcares reductores.....	61
<b>Tabla 13.</b> Análisis de varianza del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la liberación de azúcares reductores .....	61
<b>Tabla 14.</b> Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la liberación de azúcares reductores .....	61
<b>Tabla 15.</b> Cultivo de consorcio de microalgas durante el periodo de evaluación de la generación de biomasa microalgal empleando diferentes fuentes de carbono .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Emisión global de gases de efecto invernadero (GEI) en 2019.....	2
<b>Figura 2.</b> Etapas generales del proceso de producción de bioetanol.....	7
<b>Figura 3.</b> Organización celular de las microalgas.....	9
<b>Figura 4.</b> Especies de microalgas relevantes en la industria biotecnológica .....	11
<b>Figura 5.</b> Vista de las células del consorcio de microalgas en medio BBM.....	27
<b>Figura 6.</b> Curvas de crecimiento del consorcio de microalgas empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo .....	29
<b>Figura 7.</b> Vista de las células del consorcio de microalgas en medio BBM con diferentes fuentes de carbono.....	32
<b>Figura 8.</b> Azúcares reductores obtenidos a partir de la biomasa microalgal utilizando diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	33
<b>Figura 9.</b> Curva de azúcares reductores obtenidos con las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo .....	35
<b>Figura 10.</b> Azúcares reductores obtenidos en el día 15 de cultivo con las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo .....	37
<b>Figura 11.</b> Determinación de la concentración de azúcares reductores mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) .....	63
<b>Figura 12.</b> Curva estándar de glucosa .....	64
<b>Figura 13.</b> Determinación de la concentración de etanol mediante el método de oxidación del dicromato de potasio.....	64
<b>Figura 14.</b> Curva estándar de etanol.....	65
<b>Figura 15.</b> Fermentación de azúcares reductores.....	65
<b>Figura 16.</b> Destilación de los caldos de fermentación .....	66

## RESUMEN

El potencial biotecnológico de las microalgas en la producción de biocombustibles continúa siendo una alternativa prometedora para enfrentar la crisis energética actual. El presente proyecto tuvo como objetivo utilizar la biomasa de un cultivo mixto de microalgas para producir bioetanol, para lo cual se evaluó la generación de biomasa empleando subproductos industriales como fuentes adicionales de carbono, y se determinaron las condiciones óptimas para la hidrólisis ácida de los carbohidratos derivados de la biomasa. Los cultivos mixotróficos, que consistieron en dióxido de carbono y lactosuero o etilenglicol como fuentes de carbono, permitieron generar una mayor cantidad de biomasa (1.38 y 0.60 miligramos por mililitro) en comparación con el cultivo autotrófico empleando únicamente dióxido de carbono (0.50 miligramos por mililitro). Respecto a la hidrólisis de carbohidratos, se obtuvo una mayor liberación de azúcares reductores por biomasa seca (0.27 miligramos por miligramo) utilizando ácido sulfúrico al 2.0 por ciento volumen-volumen. Adicionalmente, se determinó que es posible obtener una mayor cantidad de azúcares reductores (0.30 miligramos por miligramo) a partir de la biomasa derivada del medio de cultivo suplementado con etilenglicol. Finalmente, se obtuvieron 0.35 miligramos de etanol por miligramo de biomasa seca a partir de la fermentación de los azúcares presentes en el hidrolizado de la biomasa generada en el medio con etilenglicol, utilizando levadura *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo fermentador, con un rendimiento del 82 por ciento. Los resultados respaldan la utilización de la biomasa del consorcio de microalgas como una alternativa eficiente para la producción de bioetanol de tercera generación.

**Palabras clave:** Microbiología, microalgas, cultivo mixto, consorcio, biomasa microalgal, biocombustibles, bioetanol.

## ABSTRACT

The biotechnological potential of microalgae in biofuels production continues to be a promising alternative to face the current energy crisis. This research project aimed to use the biomass of a mixed microalgae culture to produce bioethanol, for which the biomass production using industrial by-products as additional sources of carbon in the culture media was evaluated, and the optimal conditions for the acid hydrolysis of the carbohydrates contained in the microalgal biomass were determined. The mixotrophic cultures, composed of carbon dioxide and cheese whey or ethylene glycol as carbon sources, allowed the generation of higher biomass yields (1.38 and 0.60 milligrams per milliliter) in comparison with the autotrophic culture using carbon dioxide solely (0.50 milligrams per milliliter). Regarding the acid hydrolysis of carbohydrates, the higher release of reducing sugars per dry biomass (0.27 milligrams per milligram) was obtained using 2.0 percent volume-volume sulfuric acid. Additionally, it was determined that it is possible to obtain a higher amount of reducing sugars from the biomass obtained in the culture medium supplemented with ethylene glycol (0.30 milligrams per milligram). Finally, ethanol was produced by *Saccharomyces cerevisiae* at a concentration per dry biomass of 0.35 milligrams per milligram with a process yield of 82 percent from the fermentation of the sugars present in the biomass hydrolysate obtained from the culture with ethylene glycol. The results support the use of the biomass of the microalgae consortium as an efficient alternative to produce third-generation bioethanol.

**Keywords:** Microbiology, microalgae, mixed culture, consortium, microalgal biomass, biofuels, bioethanol.

## CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes investigativos

#### 1.1.1 Introducción

La situación energética actual se encuentra claramente marcada por un incremento en la demanda, la disminución en las reservas de combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas natural), los efectos ambientales nocivos y el cambio climático derivado de la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) (**United Nations, 2021**). Se estima que en 2019 el uso de combustibles fósiles suministró el 84% de la energía mundial, y que, según la tasa de consumo actual, las reservas de gas natural y petróleo se agotarían en aproximadamente 50 años (**Khan et al., 2021; Our World in Data, 2020**).

A nivel global, el sector del transporte abarcó el 96% del consumo de combustibles fósiles en 2018, llegando a ser responsable del 24% de emisiones de CO<sub>2</sub> en 2019 (**IEA, 2020; Jeswani et al., 2020**). Por otra parte, en Ecuador este sector representó el 50% del consumo total de energía en 2016, en donde el 90% correspondió al transporte por carretera usando petróleo como principal fuente (**L. Rivera et al., 2020**). En este contexto, resulta imperativo adoptar alternativas de combustibles limpios, de tal manera que se garantice la producción sostenible de energía y se limite el aumento de temperatura global según el Acuerdo de París (**United Nations, 2021**).

Una de las alternativas más estudiadas para responder a la crisis energética ha sido la utilización de biomasa para producir biocombustibles (**Lakatos et al., 2019**). Así, los biocombustibles de primera generación, económicamente viables, se obtienen a partir de cultivos comestibles (maíz, caña de azúcar, semillas oleaginosas, entre otros); sin embargo su producción está relacionada con problemas alimentarios y ambientales (**Mat et al., 2020**). Los biocombustibles de segunda generación son producidos a partir de residuos vegetales no comestibles (paja, madera, hojas, pasto); no obstante, el pretratamiento de esta materia prima es altamente costoso (**Nanda et al., 2018**).

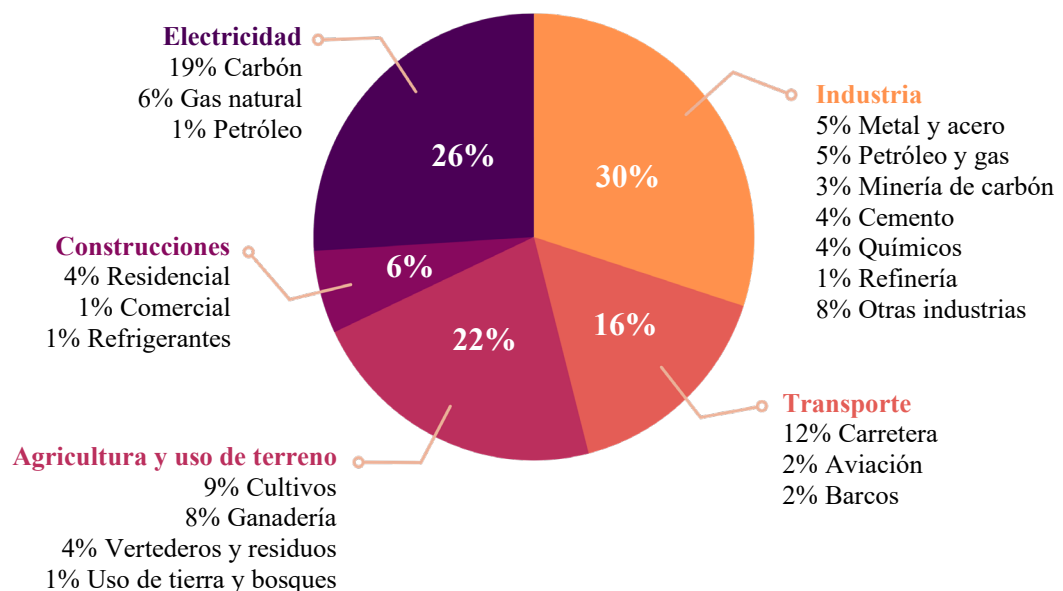
Frente a estos inconvenientes, se ha propuesto el uso de biomasa proveniente de algas para biocombustibles de tercera generación, obteniendo resultados favorables en cuanto a producción sostenible y emisión de carbono cero (**Ganesan et al., 2020**). En

este sentido, el enfoque actual de las investigaciones se centra en el mejoramiento de la eficiencia de la producción, de tal manera que puedan competir económicamente con la producción de combustibles fósiles convencionales (Huang & Reardon, 2022).

## 1.1.2 Escenario energético global

### 1.1.2.1 Combustibles fósiles: producción, demanda y efectos ambientales

El desarrollo económico a escala global depende en gran medida de la producción de energía, proceso predominantemente satisfecho a partir del uso de combustibles fósiles: petróleo, carbón y gas natural (Hassan et al., 2021). En los últimos años, estas fuentes han cubierto más del 80% de la demanda energética primaria a nivel mundial, en donde se estima que dicha demanda aumentaría moderadamente en los próximos años (Zhukovskiy et al., 2021). Según la tasa de producción anual de combustibles fósiles, las reservas de petróleo y gas natural se agotarían en aproximadamente 50 años, mientras que las reservas de carbón en 100 años (Our World in Data, 2020).



**Figura 1.** Emisión global de gases de efecto invernadero (GEI) en 2019

Se presenta el porcentaje de emisión neta de GEI por sector económico. Adaptado de *Preliminary 2020 Global Greenhouse Gas Emissions Estimates*, por A. Rivera et al., 2021, Rhodium Group (<https://rhg.com/wp-content/uploads/2021/12/f4.png>). Copyright © 2018 por Rhodium Group, LLC.



Considerando una producción y combustión continua de combustibles fósiles para la producción de electricidad, transporte, actividades industriales, entre otras (las cuales representan un gran porcentaje de las emisiones globales de GEI como se muestra en la Figura 1); el futuro para el clima difícilmente se mantendría en condiciones seguras (**van Asselt, 2021**). Actualmente el petróleo, carbón y gas natural representan más de las tres cuartas partes de las emisiones mundiales de GEI, incluyendo el 90% de emisiones de CO<sub>2</sub> y 30% de las emisiones de metano (**SEI et al., 2020**). La extracción y quema de estos combustibles agrava la contaminación atmosférica, genera cambios drásticos en las condiciones climáticas, y provoca inconvenientes relacionados con la salud, la seguridad alimentaria y la disponibilidad de agua (**Hoegh et al., 2018**).

### **1.1.2.2 Alternativas de energía renovable**

Con el objetivo de garantizar una producción segura y sostenible de energía, reducir las emisiones de GEI y estabilizar el clima global, varios países han planteado la transición hacia el uso de fuentes renovables de energía (solar, eólica, hidráulica, biomasa, entre otras) como alternativas frente al uso convencional de combustibles fósiles (**Khan et al., 2021**). Estas fuentes renovables de energía presentan características atractivas para enfrentar la crisis energética, son limpias e inagotables, se restituyen a través de procesos naturales y su uso puede extenderse casi por completo a nivel mundial (**Balakrishnan et al., 2020**).

En cuanto a progreso tecnológico, en los últimos años se ha evidenciado un desarrollo notable para la energía eólica y solar fotovoltaica, con alta eficiencia para la producción de electricidad; sin embargo, se requiere del mejoramiento de otras tecnologías, como aquellas destinadas a la producción de biocombustibles en el área del transporte, para reducir las emisiones de carbono (**Gielen et al., 2019**). En la actualidad, se estima que las fuentes de energía renovable proporcionan cerca de la sexta parte de la energía primaria mundial, y que podría llegar a cubrir dos tercios de la producción energética global en 2050, siempre y cuando se incrementen significativamente los esfuerzos para transformar la matriz energética, especialmente con el objetivo de descarbonizar el sector del transporte y calefacción (**IRENA, 2019**).

### **1.1.3 Biocombustibles**

#### **1.1.3.1 Generalidades**

Los biocombustibles pueden ser definidos como combustibles sólidos, líquidos o gaseosos, producidos a partir de materia biogénica orgánica (biomasa) derivada de organismos vivos **(Nanda et al., 2018)**. Utilizando diferentes combinaciones de procesos termoquímicos, bioquímicos, químicos y/o físicos, los compuestos orgánicos (celulosa, hemicelulosa lignina, almidón, sacarosa y aceites) presentes en la materia prima, son transformados en combustibles portadores ricos en carbono (como alcoholes y ésteres) capaces de generar energía **(Correa et al., 2019)**.

A diferencia de las alternativas energéticas renovables como la solar o eólica, que en su mayor parte se utilizan para generar electricidad, los biocombustibles constituyen la opción idónea para sustituir al petróleo y descarbonizar el sector del transporte, representando actualmente cerca del 3% de los combustibles para el transporte a nivel mundial **(Khan et al., 2021)**. Así, las investigaciones contemporáneas se centran en el desarrollo de biocombustibles líquidos (principalmente bioetanol y biodiésel), los cuales pueden transportarse y almacenarse con facilidad, presentan una buena densidad de energía, y pueden acoplarse a motores existentes **(Callegari et al., 2020)**.

Los biocombustibles son clasificados en cuatro categorías según el tipo de materia prima utilizada para su producción, las limitaciones que presenta como fuente energética renovable y su progreso tecnológico **(Khan et al., 2021)**.

#### **1.1.3.2 Biocombustibles de primera generación**

La primera categoría de biocombustibles se basa en el uso de cultivos comestibles como materia prima para su producción; se utiliza maíz y caña de azúcar para producir bioetanol y semillas oleaginosas (soja, aceite de palma, canola y girasol) para obtener biodiésel, a través de procesos ampliamente conocidos y económicamente viables como fermentación, destilación y transesterificación **(Correa et al., 2019)**. Sin embargo, el beneficio obtenido es mínimo respecto al uso de combustibles fósiles debido a la emisión de GEI (el cultivo, recolección y procesamiento de biomasa requieren grandes cantidades de energía) y el riesgo que supone la producción para la

seguridad alimentaria (competencia directa con cultivos alimentarios debido al requerimiento de terreno, fertilizantes y suministro de agua) (**Khan et al., 2021**).

#### **1.1.3.3 Biocombustibles de segunda generación**

La segunda generación de biocombustibles propone el aprovechamiento de materias primas no comestibles como subproductos agrícolas y/o residuos vegetales ricos en celulosa como tallos, madera, hojas y pasto, para evitar la competencia directa con los cultivos alimentarios (**Alam & Tanveer, 2020**). La principal desventaja de este tipo de combustibles radica en los costos de producción, dado que se requiere de una serie de etapas de pretratamiento para recuperar compuestos de interés como azúcares fermentables y grandes inversiones en equipos de procesamiento (**Mat et al., 2020**).

#### **1.1.3.4 Biocombustibles de tercera generación**

Los biocombustibles de tercera generación proponen el uso de biomasa proveniente de microalgas como materia prima para la producción, como una alternativa eficiente frente a las limitaciones de los biocombustibles de primera y segunda generación (**Khan et al., 2021**). Entre las principales ventajas de las microalgas se encuentran su alta tasa de crecimiento en comparación con las plantas, la no dependencia de áreas extensas de tierra cultivable, y su capacidad de absorber CO<sub>2</sub>, lo que contribuye directamente con la reducción global en las emisiones de carbono (**Mat et al., 2020**).

Sin embargo, el cultivo de microalgas requiere una gran cantidad de suministros como agua y nutrientes, lo que puede elevar significativamente los costos de cultivo; para ello se ha planteado el aprovechamiento de residuos industriales como fuentes nutricionales de bajo costo (**Nanda et al., 2018**). Frente a estas limitaciones, recientemente se ha propuesto el desarrollo de biocombustibles de cuarta generación, los cuales proponen la producción a partir de microorganismos creados mediante bioingeniería con el objetivo de capturar mayor cantidad de CO<sub>2</sub>, aumentar la productividad y adaptarse al crecimiento en residuos industriales (**Mat et al., 2020**).

## 1.1.4 Bioetanol

### 1.1.4.1 Generalidades

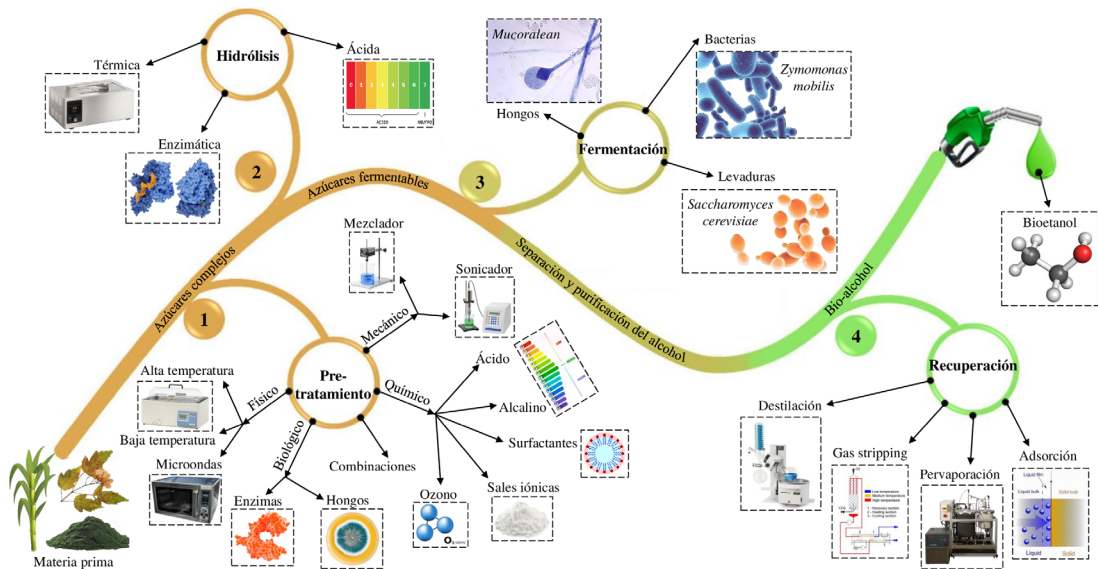
El etanol o alcohol etílico ( $C_2H_5OH$ ), es un disolvente orgánico esencial que se presenta como un líquido inflamable, volátil e incoloro, y que posee un olor característico (**Bajpai, 2021a**). Se utiliza ampliamente a nivel industrial como disolvente y agente deshidratante en la síntesis de productos químicos, como agente antiséptico y desinfectante, como aditivo de combustibles y como principal componente en la elaboración de bebidas alcohólicas (**Karimi & Chisti, 2017**). Según la ruta de producción, el etanol puede clasificarse como bioetanol (obtenido a través de un proceso de fermentación microbiana) y etanol sintético (obtenido a través de reacciones de hidratación catalítica del etileno) (**Yukesh et al., 2020**).

En la actualidad, el bioetanol juega un papel importante como energía renovable para transporte, siendo este el biocombustible más utilizado a nivel mundial. Se estima que representa aproximadamente más del 80% de toda la producción de biocombustibles líquidos, y se prevé una producción global superior a 135 000 millones de litros para 2024, siendo las industrias de EE.UU. (42%) y Brasil (31%) las principales contribuyentes (**Bajpai, 2021c; Khan et al., 2021**). Su uso extendido se debe a sus ventajas frente a combustibles convencionales (biodegradabilidad, menor toxicidad y producción reducida de contaminantes) y a su capacidad para acoplarse a los sistemas de combustible existentes (se puede mezclar con gasolina o sustituirla para favorecer la combustión y disminuir la emisión de gases de escape) (**Bajpai, 2021c**).

### 1.1.4.2 Producción

En cuanto a materia prima, a nivel industrial, el bioetanol de primera generación se obtiene de materia prima rica en sacarosa (caña de azúcar, remolacha azucarera y frutas) y almidón (maíz, trigo, arroz, papa, cebada). Por otra parte, el bioetanol de segunda generación proviene de biomasa lignocelulósica (madera, paja y pasto), mientras que el bioetanol de tercera generación se obtiene a partir de biomasa de micro y macroalgas (**Azhar et al., 2017**). En general, la producción consta de cuatro pasos (Figura 2): i) pretratamiento de materia prima, ii) hidrólisis de carbohidratos,

iii) fermentación de azúcares y producción etanol, y iv) procesos de purificación para recuperar etanol anhidro (Yukesh et al., 2020).



**Figura 2.** Etapas generales del proceso de producción de bioetanol

Se presentan diferentes metodologías utilizadas en las etapas de obtención de bioetanol: pretratamiento, hidrólisis, fermentación, y recuperación. Adaptado de *Valorization of food waste for bioethanol and biobutanol production* (p. 41), por R. Yukesh et al., 2020, Academic Press. Copyright © 2020 por Elsevier Inc.

Las primeras etapas de la producción, pretratamiento e hidrólisis de la materia prima, tienen como objetivo mejorar la digestibilidad de carbohidratos complejos para recuperar azúcares fermentables (Karimi & Chisti, 2017). Se incluyen procesos físicos (molienda, tratamientos térmicos, ultrasonido), químicos (tratamientos ácidos, alcalinos o solventes), fisicoquímicos (tratamientos con vapor o CO<sub>2</sub>), biológicos (hidrólisis enzimática) y combinaciones de los procesos anteriores (Tse et al., 2021).

Para la posterior etapa de fermentación, se aprovecha el metabolismo de microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), *Zymomonas mobilis* (bacteria), *Mucoralean* (hongos), entre otros microorganismos, con el objetivo de convertir los azúcares fermentables recuperados (principalmente glucosa) en etanol (Yukesh et al., 2020). Para optimizar tiempo y recursos, otro enfoque utilizado en la producción de bioetanol es la sacarificación y fermentación simultánea, en donde la hidrólisis se combina con la fermentación en el mismo biorreactor (Miah et al., 2022).

La destilación es la técnica más empleada para la recolección de bioetanol, dado que permite eliminar agua y sólidos no volátiles para producir una solución de etanol con una concentración de 90–95% v/v; en este proceso el caldo de fermentación se calienta por debajo del punto de ebullición del agua para evaporar el alcohol, y posteriormente recuperarlo en fase líquida por condensación (**Karimi & Chisti, 2017**). Otras técnicas utilizadas para la extracción y purificación de bioetanol incluyen la extracción por arrastre con gases, adsorción y pervaporación; además, dos o más de estas técnicas pueden combinarse para crear sistemas integrados, reducir el costo del proceso y obtener bioetanol con una concentración >99% v/v (**Yukesh et al., 2020**).

#### **1.1.4.3 Aplicaciones como biocombustible**

El bioetanol es considerado un sustituto potencial de los combustibles convencionales, entre sus ventajas destacan su alto índice de octanaje (mejor eficiencia y rendimiento del motor), bajo punto de ebullición, amplia inflamabilidad, mayor relación de compresión y calor de vaporización, contenido de energía razonable y menor tiempo de combustión (**Edeh, 2020**). Actualmente, la mayor parte del bioetanol se usa en una mezcla al 10% con gasolina (denominada gasohol o E10) con el objetivo de mejorar el octanaje y promover una quema de combustible más completa capaz de reducir las emisiones de escape nocivas como el monóxido de carbono (**Bajpai, 2021b**).

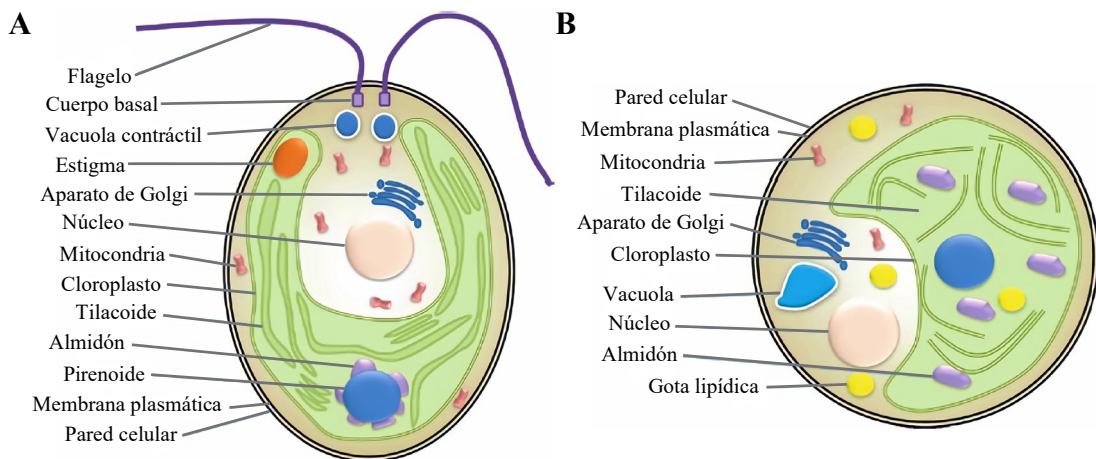
E10 y otras mezclas bajas como E5 (etanol 5% y 95% de gasolina) se pueden utilizar sin modificaciones en motores convencionales; mientras que mezclas mayores como E85 (85% de etanol y 15% de gasolina) y E100 (100% de etanol con o sin aditivos), se pueden usar solamente en motores diseñados o modificados específicamente para tal fin (**Liu et al., 2020**). Otras aplicaciones del bioetanol son el *Oxydiesel* (una mezcla de 80% de diésel, 10% de etanol y 10% de aditivos), celdas de combustible, E-diésel (diésel más limpio que contiene hasta un 15% de etanol), combustible para motores de aviación, botes, cortadoras de césped, motosierras, entre otros (**Bajpai, 2021b**).

## 1.1.5 Producción de bioetanol a partir de biomasa de microalgas

### 1.1.5.1 Biología de las microalgas

Las microalgas son un grupo de organismos fotosintéticos de tamaño microscópico (desde menos de 1  $\mu\text{m}$  hasta 1 mm) que utilizan energía luminosa,  $\text{CO}_2$  y sales inorgánicas para su crecimiento (Duran et al., 2021). Se estima que existen alrededor de 300 000 especies de microalgas, pero solo se ha estudiado y analizado un número limitado de alrededor de 30 000 especies (Montero et al., 2018). Las microalgas viven en ambientes acuáticos (agua marina, salobre, dulce), ambientes terrestres húmedos y/o aéreos (suelos, árboles, construcciones, etc.); y se caracterizan por una gran diversidad morfológica (unicelulares, coloniales y/o filamentosas) (Fleurence, 2021).

Su estructura presenta las principales características de una célula eucariota vegetal (Figura 3): pared celular, membrana plasmática, citoplasma, núcleo, plástidos y orgánulos (Chai et al., 2021). Además, las microalgas pueden ser inmóviles o no (según la presencia o ausencia de flagelo) y su reproducción puede ser vegetativa (fragmentación), asexual (esporas) y sexual (gametos) (Kumar & Singh, 2021).



**Figura 3.** Organización celular de las microalgas

Se presentan la estructura celular general de (A) *Chlamydomonas* sp. (célula flagelada) y (B) *Chlorella* sp. (célula no flagelada). Adaptado de *Microalgae: From Future Food to Cellular Factory* (p. 3), por J. Fleurence, 2021, John Wiley & Sons. Copyright © 2021 por ISTE Ltd.

Las células de microalgas son capaces de crecer solas, asociarse para formar colonias u organismos multicelulares indiferenciados, o a su vez, en simbiosis con otros organismos; además, pueden tolerar una amplia gama de condiciones ambientales normales y extremas en cuanto a temperatura, intensidad de luz, salinidad y pH (**Mutanda et al., 2020**). Las microalgas presentan clorofila A como pigmento común, y taxonómicamente (según los pigmentos adicionales o supernumerarios) se pueden distinguir tres *phyla*: Chlorophyta (algas verdes, presentan clorofila B), Chromophyta (algas marrón-dorado, presentan carotenoides y clorofila C, E) y Rhodophyta (algas rojas, presentan ficoeritrina R o B y clorofila D) (**Morançais et al., 2018**).

### **1.1.5.2 Potencial biotecnológico de las microalgas**

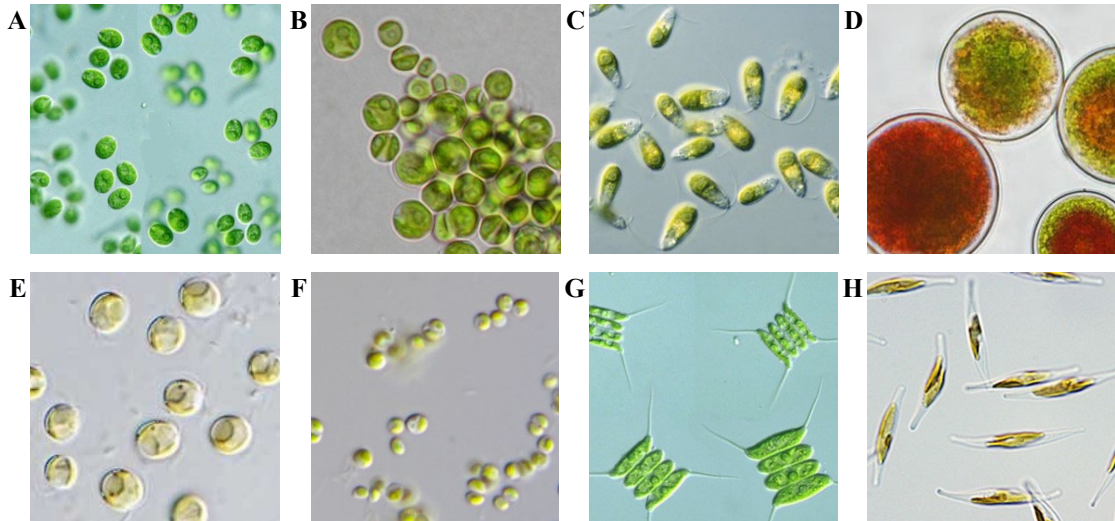
Las investigaciones relacionadas con microalgas han tenido un crecimiento notable en años recientes debido a que presentan características atractivas para la industria, como la capacidad para sintetizar sustancias bioactivas, corta tasa de duplicación y la capacidad de ajustar su composición bioquímica en función de las condiciones de cultivo (**Morais et al., 2020**). Otras ventajas de estos microorganismos incluyen su capacidad fotosintética para producir biomasa a partir de sustancias inorgánicas, la absorción de CO<sub>2</sub>, y la optimización del espacio utilizado para su crecimiento (**Dolganyuk et al., 2020**).

A partir de microalgas es posible obtener una amplia gama de bioproductos de interés que incluyen polisacáridos, lípidos, pigmentos, proteínas, vitaminas y antioxidantes (**Rahman, 2020**). Actualmente existen dos áreas principales en el uso de microalgas: la producción de biomasa como aditivo nutricional y/o funcional; y el cultivo de microalgas para el aislamiento de sustancias bioactivas a partir de la biomasa (antibacterianos, antivirales, antitumorales, antihipertensivos, neuroprotectores e inmunoestimulantes) (**Dolganyuk et al., 2020; Fabris et al., 2020**). La importancia biotecnológica de las microalgas está asociada con diversas aplicaciones en la industria alimentaria, energética, médica, cosmética, y agrícola (**Chisti, 2020**).

Entre los géneros de microalgas más representativos y estudiados en el área biotecnológica se puede destacar a *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Haematococcus*, y *Nannochloropsis* (**Carneiro et al., 2021; Lee et al., 2017**). Dentro de las especies más relevantes a nivel investigativo en diferentes áreas, y comercial



para la obtención de de bioproductos se encuentran: *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis oculata* y *Scenedesmus quadricauda* (Mutanda et al., 2020). Estas especies se presentan a continuación en la Figura 4.



**Figura 4.** Especies de microalgas relevantes en la industria biotecnológica

Se presentan algunas especies relevantes para la obtención de bioproductos: (A) *Chlamydomonas reinhardtii*, (B) *Chlorella vulgaris*, (C) *Dunaliella salina*, (D) *Haematococcus pluvialis*, (E) *Isochrysis galbana*, (F) *Nannochloropsis oculata*, (G) *Scenedesmus quadricauda* y (H) *Phaeodactylum tricornutum*. Fotografías tomadas de *Microalgae strain catalogue*, por G. Figueroa et al., 2021, Zenodo. Copyright © 2021 por The University of Manchester.

Una de las áreas que ha recibido mayor atención en las últimas décadas en cuanto al cultivo de microalgas a escala industrial ha sido la producción de biocombustibles (Rahman, 2020). Algunas ventajas del uso de microalgas para biocombustibles incluyen las altas productividades de lípidos y carbohidratos (Tabla 1) (superiores a las obtenidas con cultivos vegetales convencionales), el aprovechamiento de diferentes medios acuosos (agua salina, salobre, residual, etc.) que no compiten con el agua destinada a cultivos comestibles y consumo humano, la recuperación de subproductos de interés a partir de la biomasa residual, y la posibilidad de regular las condiciones de cultivo con el fin de obtener determinados productos (Colling et al., 2018).

**Tabla 1.** Composición de lípidos y carbohidratos de varias especies de microalgas

Especies	Composición (%)		Referencias
	Lípidos	Carbohidratos	
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	15	27	(Milledge, 2011)
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	21	17	(Christaki et al., 2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	14–22	12–17	(Wolkers et al., 2011)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2	26	(Milledge, 2011)
<i>Diacronema vlkianum</i>	6	32	(Bleakley & Hayes, 2017)
<i>Dunaliella salina</i>	6	32	(Milledge, 2011)
<i>Dunaliella bioculata</i>	8	4	(Van Krimpen et al., 2013)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	15	27	(Bleakley & Hayes, 2017)
<i>Isochrysis galbana</i>	12–14	10–17	(Milledge, 2011)
<i>Porphyridium cruentum</i>	9–14	40–57	(Milledge, 2011; Van Krimpen et al., 2013)
<i>Prymnesium parvum</i>	22–38	25–33	(Van Krimpen et al., 2013)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	12–14	10–17	(Christaki et al., 2011; Wallace, 2000)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16–40	21–52	(Milledge, 2011; Van Krimpen et al., 2013)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9	21–52	(Van Krimpen et al., 2013)
<i>Spirogyra sp.</i>	11–21	33–64	(Van Krimpen et al., 2013)
<i>Tetraselmis maculata</i>	3	15	(Van Krimpen et al., 2013)

*Nota.* Se presenta la composición en porcentaje sobre una base de biomasa microalgal seca. Adaptado de *Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans* (p. 17), por, A. Koyande et al., 2019, Elsevier. CCBY-NC-ND

### **1.1.5.3 Requerimientos nutricionales y sistemas de cultivo para la generación de biomasa microalgal**

Los principales requisitos para la generación de biomasa en un cultivo de microalgas son la luz (natural o artificial), los nutrientes (carbono, nitrógeno y fósforo) y las condiciones ambientales (temperatura y pH) (**Menegazzo & Fonseca, 2019**). Los productos de la fotosíntesis son acumulados como componentes celulares o sustancias de almacenamiento y representan del 20 al 50% de la biomasa (**Shurtz et al., 2017**). Además de N y P (que representan entre el 10 y el 20 % de la biomasa), las microalgas requieren otros macronutrientes, como Na, Mg, Ca y K, micronutrientes, como Mo, Mn, B, Co, Fe y Zn, y otros oligoelementos adicionales (**Duran et al., 2021**). También se ha evidenciado que las aguas residuales y efluentes con residuos industriales son una buena fuente de nutrientes para el cultivo de microalgas (**Ansari et al., 2017**).

Las microalgas pueden ser cultivadas en condiciones autótrofas, heterótrofas o mixotróficas (**Menegazzo & Fonseca, 2019**). El procedimiento que se utiliza con mayor frecuencia es el cultivo autótrofo, en donde la luz y el CO<sub>2</sub> constituyen la fuente de energía y carbono (**A. Ray et al., 2022**). Para algunas especies, capaces de crecer en condiciones de oscuridad, se emplean cultivos heterótrofos, en donde fuentes de carbono orgánico como glucosa, acetato y aguas residuales se utilizan como sustratos (**X. Tan et al., 2018**). Por último, en el cultivo mixotrófico las microalgas utilizan combinaciones de CO<sub>2</sub> (durante la fotosíntesis) y fuentes de carbono orgánico (durante la respiración) para producir biomasa (**Rashid et al., 2019**).

Los sistemas de cultivo de microalgas se pueden dividir en dos categorías: sistemas o estanques abiertos y sistemas cerrados o fotobiorreactores (**J. Tan et al., 2020**). El sistema abierto permite facilidad de operación, accesibilidad al CO<sub>2</sub> atmosférico y a la luz, y costos de operación bajos; sin embargo, puede presentar inconvenientes como el riesgo de contaminación y cambios de temperatura (**Zhan et al., 2017**). Por otra parte, los fotobiorreactores permiten mantener condiciones altamente controladas (temperatura y luz) y evitar la contaminación en el cultivo; su principal desventaja radica en los altos costos de producción (**A. Ray et al., 2022**).

#### **1.1.5.4 Estrategias para la acumulación de carbohidratos**

En las microalgas, el contenido de carbohidratos (estructurales y de almacenamiento) representa entre el 15 y 60% de la biomasa, los cuales se encuentran principalmente en forma de almidón en plástidos, celulosa, glucógeno, polisacáridos en la pared celular, agar, entre otros (**Shahid et al., 2020**). Estas moléculas obtenidas como producto directo de la fijación de CO<sub>2</sub> a través del ciclo de Calvin, durante la fotosíntesis, son la opción más utilizada para la producción de biohidrógeno, bioetanol y biobutanol, debido a la elevada disponibilidad de azúcares fermentables, bajo contenido de hemicelulosa y ausencia de lignina (**Carnovale et al., 2021**).

Macronutrientes como nitrógeno, fósforo y azufre son esenciales para el crecimiento óptimo de las microalgas, sin embargo, las condiciones de falta o limitación de nutrientes son comúnmente empleadas para alterar la composición de metabolitos (**Cheng et al., 2017**). Limitar el nitrógeno y el fósforo puede cambiar el carbono fijado durante el ciclo de Calvin hacia la producción de compuestos no nitrogenados como polisacáridos (principalmente almidón) y lípidos (**de Farias et al., 2019**).

Otras estrategias que permiten la acumulación de carbohidratos son la temperatura alta, que puede permitir alcanzar una mayor producción de sacarosa; y la irradiación alta, la cual influye directamente en la tasa de crecimiento, la tasa de fijación de CO<sub>2</sub>, y por ende, en la producción de carbohidratos (**Barati et al., 2019; Shahid et al., 2020**). Adicionalmente, se ha observado que el cultivo de consorcios mixtos de microalgas puede permitir obtener mayores rendimientos de biomasa, lo que resulta prometedor para la generación de biocombustibles frente a monocultivos (**A. Ray et al., 2022**).

#### **1.1.5.5 Procesamiento de la biomasa y recuperación de azúcares fermentables**

El pretratamiento de la biomasa microalgal implica la degradación de la biomasa para convertir, acumular y procesar los carbohidratos, generalmente, por medio de hidrólisis ácida o enzimática para obtener bioetanol (**de Farias et al., 2020**). Algunos estudios sugieren el uso de métodos mecánicos, como ultrasonidos y microondas, los cuales se pueden combinar con métodos químicos para mejorar el proceso de pretratamiento y reducir los desechos químicos (**Velazquez et al., 2018**).

La hidrólisis ácida (utilizando ácidos fuertes como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido nítrico) por medio de altas temperaturas (entre 120 y 140 °C) permite degradar la biomasa de algas y convertir los azúcares complejos en unidades monoméricas con una eficiencia mayor a métodos físicos (**Agustini et al., 2019**). Por otro lado, para la hidrólisis enzimática se utilizan amilasas, celulasas e invertasas para romper selectivamente los enlaces entre las unidades de polisacáridos; sin embargo, debido al uso de enzimas, este método resulta altamente costoso (**C. González et al., 2020**).

#### **1.1.5.6 Fermentación y extracción de bioetanol**

En esta última etapa, los azúcares fermentables (principalmente glucosa y otros monosacáridos como galactosa, manosa, xilosa, ribosa y arabinosa) derivados de la hidrólisis de polisacáridos presentes en la biomasa microalgal, son utilizados por microorganismos fermentadores como sustrato para obtener etanol y CO<sub>2</sub> (**C. González et al., 2020**). Es importante considerar algunos factores que afectan directamente la obtención de etanol, como la temperatura, el pH, oxígeno, la concentración de sustrato y el organismo fermentador utilizado (**Azhar et al., 2017**).

Tradicionalmente, el microorganismo fermentador más utilizado para obtener etanol es la levadura *S. cerevisiae*. Otros incluyen a bacterias como *Z. mobilis* e incluso microorganismos recombinantes capaces de tolerar altas concentraciones de etanol (**Sharma et al., 2018**). Los microorganismos fermentadores dependen del sustrato existente; por lo tanto, utilizar una combinación de microorganismos es una estrategia efectiva mejorar el rendimiento de etanol. También, es importante ajustar el pH del hidrolizado para que sea óptimo para el microorganismo utilizado (**Miah et al., 2022**).

Finalmente, el bioetanol obtenido en el caldo de fermentación es recuperado generalmente a través de un proceso de destilación (**C. González et al., 2020**). Este proceso puede ser complementado por procesos de deshidratación adicionales como la rectificación u otros como el tamizado molecular, la pervaporación, extracción de gases, e inclusive sistemas híbridos con el objetivo de incrementar la pureza del etanol, reducir el costo e incrementar la eficiencia del proceso (**Zentou et al., 2019**).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo General**

Producir bioetanol utilizando biomasa de un cultivo mixto de microalgas como materia prima

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Evaluar la generación de biomasa microalgal empleando dióxido de carbono, etilenglicol y/o lactosuero, como fuentes de carbono en el medio de cultivo.
- Determinar las condiciones óptimas para la hidrólisis ácida de los carbohidratos contenidos en la biomasa microalgal.
- Obtener bioetanol a partir de la fermentación de los carbohidratos hidrolizados derivados de la biomasa microalgal.

## **CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA**

### **2.1 Materiales**

Los materiales empleados para el desarrollo del presente trabajo de investigación (equipos de laboratorio, reactivos y material fungible) se presentan a continuación:

#### **2.1.1 Equipos de laboratorio**

- Cámara de cultivo (incluye lámparas, aireadores, reguladores de flujo de aire, mangueras de silicona y temporizador)
- Autoclave
- Vórtex
- Centrífuga (para microtubos de 1.5 mL)
- Centrífuga (para tubos de 15 mL y 50 mL)
- Plancha de agitación y calentamiento
- Hemocitómetro de Neubauer
- Horno
- Micropipetas (2 – 20  $\mu$ L; 20 – 200  $\mu$ L; 100 – 1000  $\mu$ L; 1 – 10 mL)
- Microscopio óptico
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Potenciómetro
- Incubadora
- Incubadora con agitación
- Cámara de flujo laminar
- Baño térmico seco
- Rotavapor
- Termómetro
- Refrigerador/congelador
- Microondas
- Biorreactor

### 2.1.2 Reactivos

- Medio Basal de Bold (BBM)
- Medio Basal de Bold ( $\text{NaNO}_3$  125  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
- Agua Milli-Q
- Agua destilada
- Etilenglicol (EG)
- Lactosuero
- Peptona
- Dextrosa
- Extracto de levadura
- Agar
- Aceite de inmersión
- Etanol 70 %
- Etanol 96 %
- Etanol absoluto (99.9%)
- Ácido sulfúrico concentrado 96% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- Ácido clorhídrico fumante 37% ( $\text{HCl}$ )
- Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ )
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
- Tartrato doble de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
- Dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )

### 2.1.3 Material fungible

- Botellas (100 mL; 250 mL; 500 mL; 1 L)
- Balones aforados (25 y 250 mL)
- Probetas (100 mL)
- Vasos de precipitación (100 mL; 250 mL; 500 mL)
- Matraces Erlenmeyer (250 mL)
- Puntas para micropipeta (2 – 20  $\mu\text{L}$ ; 20 – 200  $\mu\text{L}$ ; 100 – 1000  $\mu\text{L}$ ; 1 – 10 mL)
- Lámpara de alcohol
- Tubos Falcon (15 mL y 50 mL)
- Microtubos Eppendorf (1.5 mL)



- Gradilla para tubos Falcon
- Gradilla para microtubos
- Placas Petri
- Placa de 96 pocillos

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Establecimiento del cultivo inicial de microalgas

Un consorcio de microalgas provisto por la docente-investigadora MSc. Alejandra Cruz de la Universidad de las Américas (UDLA), aislado de una muestra de agua proveniente de Mindo, fue cultivado en Medio Basal de Bold (BBM, por sus siglas en inglés) modificado en el presente estudio con respecto a la fuente de molibdeno. El medio fue compuesto por  $\text{NaNO}_3$ ,  $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $175 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{NaCl}$ ,  $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; solución alcalina de EDTA,  $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  (5 g de  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  y 3.1 g de  $\text{KOH}$  en 100 mL de agua Milli-Q); solución de hierro  $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  (0.498 g de  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en 100 mL de agua Milli-Q); solución de metales traza,  $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $8.82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.49 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.57 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), solución de boro,  $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  (0.11 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  en 100 mL de Milli-Q) (Figueroa et al., 2021). Las sales y las soluciones se disolvieron con agitación constante en agua Milli-Q, el pH del medio fue ajustado a  $6.8 \pm 0.3$  empleando  $\text{HCl}$  o  $\text{NaOH}$ , y finalmente el medio se esterilizó por calor húmedo en autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  y 15 psi durante 20 minutos.

El cultivo inicial consistió en un inóculo al 5% p/v de la muestra liofilizada del consorcio de microalgas en una botella de cristal con un contenido de 100 mL de BBM estéril. Esta botella se mantuvo en la cámara de cultivo bajo condiciones ambientales de temperatura ( $20 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ), luz fluorescente blanca  $\sim 3000 \text{ lx}$  con un fotoperiodo luz/oscuridad alternado (16 h/8 h), y aireación constante ( $\sim 200 \text{ mL}/\text{min}$ ) mediante una bomba de acuario con un suministro de  $\text{CO}_2 \sim 0.04\%$  (v/v), hasta obtener un cultivo denso (durante aproximadamente 15 días). Posteriormente, se incrementó el volumen de medio de cultivo hasta 500 mL para alcanzar una densidad adecuada para el inóculo en los experimentos posteriores (Ansari et al., 2017; Sánchez et al., 2017).

Este cultivo inicial se mantuvo en un sistema semicontinuo, en el cual cada 15 días se retiró el 50% del volumen del cultivo (~250 mL) y se reemplazó con el mismo volumen de medio fresco y estéril. La pérdida de agua por evaporación en las botellas se restituyó cada 2 días empleando agua Milli-Q estéril. Adicionalmente, se realizaron subcultivos sólidos en placa Petri a partir de 50  $\mu$ L del cultivo inicial del consorcio de microalgas empleando BBM con agar bacteriológico al 20%, y se observaron las células del consorcio de microalgas bajo el microscopio óptico.

### **2.2.2 Evaluación de la generación de biomasa microalgal empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo**

En este apartado se utilizó BBM con una concentración de nitrógeno limitada en la composición total ( $\text{NaNO}_3$  125  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como medio de cultivo base para los diferentes tratamientos, dado que previamente se ha observado que la limitación de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo permite incrementar la acumulación de carbohidratos (Sánchez et al., 2017).

Para el diseño experimental (Tabla 2), se consideró la fuente de carbono como variable independiente y la generación de biomasa como variable dependiente. Se evaluaron por triplicado tres diferentes tratamientos del medio de cultivo: (1) BBM sin suplementar, en donde el cultivo recibió  $\text{CO}_2$  proveniente de la aireación como fuente de carbono; (2) BBM suplementado con suero de leche al 40% (v/v) (previamente se ajustó el pH del lactosuero a 6.8 utilizando NaOH, se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 20 minutos, y se centrifugó a 14 000  $\times g$  durante 30 minutos para remover el precipitado) (Boumaiza et al., 2018; Girard et al., 2014); y (3) BBM suplementado con 2.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de etilenglicol (EG) (Kishi et al., 2015), en donde el cultivo recibió carbono proveniente del EG y el  $\text{CO}_2$  en donde el cultivo recibió carbono proveniente del lactosuero y el  $\text{CO}_2$ . Adicionalmente, se incluyó un control negativo que consistió en BBM sin inóculo de microalgas.

**Tabla 2.** *Tratamientos propuestos para la generación de biomasa microalgal utilizando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo*

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>	<b>Réplicas</b>
Fuente de carbono en el medio de cultivo BBM (NaNO <sub>3</sub> 125 mg·L <sup>-1</sup> )	1. CO <sub>2</sub> (0.04% v/v)	3
	2. CO <sub>2</sub> (0.04% v/v) + Lactosuero (40% v/v)	3
	3. CO <sub>2</sub> (0.04% v/v) + EG (2.5 g·L <sup>-1</sup> )	3

Para los diferentes tratamientos se realizó un procedimiento similar al descrito por **Toyama et al. (2019)**, en donde se tomaron alícuotas de 50 mL del cultivo inicial de microalgas y se centrifugaron a  $3\ 600 \times g$  durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 5 mL de Medio Basal Bold con bajo contenido de nitrógeno (NaNO<sub>3</sub> 125 mg·L<sup>-1</sup>). Finalmente, la suspensión se agitó en vórtex por 15 segundos. El proceso de centrifugación ( $3600 \times g$  por 5 minutos), resuspensión (en 5 mL de BBM NaNO<sub>3</sub> 125 mg·L<sup>-1</sup>) y agitación en vórtex (15 segundos) se repitió para garantizar el lavado de las células de microalgas.

Cada tratamiento descrito en la Tabla 2 fue inoculado con la suspensión celular hasta obtener una densidad celular inicial de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células·mL<sup>-1</sup> en 500 mL de medio de cultivo (día 0). Las condiciones de incubación para los diferentes tratamientos propuestos fueron las mismas que se describieron previamente para el cultivo inicial del consorcio de microalgas.

Para evaluar la generación de biomasa en los diferentes tratamientos se tomó como referencia el peso seco de las células microalgales, el cual fue determinado durante 15 días de cultivo. Para su determinación se utilizaron microtubos de 1.5 mL, los cuales se secaron en un horno a 60 °C hasta obtener peso constante. Posteriormente se tomaron muestras de cultivo de microalgas de 10 mL y se colocaron en tubos Falcon de 15 mL, los cuales se sometieron a centrifugación a  $14000 \times g$  durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en los microtubos de 1.5 mL de peso conocido y secado en un horno a 60 °C hasta obtener peso constante (durante 2-3 días). El peso seco del tubo vacío se restó del peso del tubo cargado para obtener finalmente el peso de la biomasa seca (**Sánchez et al., 2017**). Adicionalmente, se realizaron conteos celulares empleando la cámara de Neubauer durante el periodo de

cultivo y se realizaron observaciones bajo el microscopio óptico de las células del consorcio cultivadas utilizando las diferentes fuentes de carbono.

### 2.2.3 Determinación de las condiciones óptimas para la hidrólisis ácida de los carbohidratos contenidos en la biomasa microalgal

Para determinar el mejor método de hidrólisis ácida de carbohidratos derivada de la biomasa de microalgas se utilizó un cultivo de prueba que consistió en 500 mL de BBM, CO<sub>2</sub> proveniente de la aireación como única fuente de carbono, y siguiendo las mismas condiciones descritas previamente para el cultivo inicial. Para secar la biomasa se tomaron alícuotas de 50 mL de cultivo mixto de microalgas en el día 15, se centrifugaron a 14 000 × g durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet se secó en un horno a 70 °C hasta obtener un peso constante (durante 2-3 días).

En el diseño experimental (Tabla 3) se consideró a la concentración de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) como variable independiente y la cantidad de azúcares reductores liberados a partir de la hidrólisis como variable dependiente. Se evaluaron tres diferentes tratamientos de hidrólisis ácida: (1) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.5% (v/v); (2) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% (v/v); y (3) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2% (v/v) (Ho et al., 2013). Además, se incluyó un control que consistió en un tratamiento en ausencia de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cada tratamiento fue ensayado por triplicado.

**Tabla 3.** *Tratamientos propuestos para la hidrólisis de carbohidratos utilizando diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*

Factor	Niveles	Réplicas
Concentración de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.0% v/v	3
	2. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5% v/v	3
	3. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0% v/v	3
	4. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2.0% v/v	3

Para los diferentes tratamientos se diluyó el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado en microtubos de 1.5 mL según las concentraciones requeridas (0.5%, 1% y 2% v/v), utilizando micropipetas para obtener el volumen y concentración exactos. La hidrólisis se realizó en microtubos de 1.5 mL, cubiertos con papel aluminio para soportar alta presión en

autoclave. En cada tubo se colocó el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido con una carga de biomasa microalgal seca de 10% (p/v), agitando en vórtex para garantizar un buen mezclado. Posteriormente, los tubos se incubaron en autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Finalmente, los hidrolizados fueron enfriados a temperatura ambiente y clarificados por centrifugación a 12 000 × g a 4 °C durante 15 minutos (Sánchez et al., 2017).

La concentración de azúcares reductores en cada hidrolizado se analizó utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Se tomaron muestras de 100 µL de hidrolizado diluido (factor de dilución 50x) para mezclarlas con 100 µL de reactivo DNS en microtubos de 1.5 mL, los cuales se calentaron en baño seco a 100 °C durante 5 minutos. A continuación, las muestras fueron incubadas en hielo por 10 minutos y su absorbancia fue determinada utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 540 nm, empleando una curva estándar con glucosa para determinar el contenido de azúcares (Anexo C. Figura 12) (Phwan et al., 2019).

#### **2.2.4 Evaluación de los carbohidratos contenidos en la biomasa microalgal generada empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo**

La concentración óptima de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.0 % v/v) fue aplicada para evaluar el contenido de azúcares reductores presentes en la biomasa seca proveniente del cultivo mixto de microalgas con las diferentes fuentes de carbono descritas en la Tabla 2: (1) BBM sin suplementar; (2) BBM suplementado con lactosuero; y (3) BBM suplementado con EG. La hidrólisis de carbohidratos fue ensayada por triplicado.

Se siguió el procedimiento y condiciones descritas previamente para la obtención de biomasa microalgal seca y para la hidrólisis de biomasa. También se utilizó el método DNS para determinar la concentración de azúcares reductores obtenida con los diferentes tratamientos de la fuente de carbono en el medio de cultivo.

### 2.2.5 Obtención de bioetanol a partir de la fermentación de los carbohidratos hidrolizados derivados de la biomasa microalgal

Esta etapa se llevó a cabo a partir del cultivo mixotrófico en medio BBM, utilizando CO<sub>2</sub> proveniente de la aireación y EG 2.5 g·L<sup>-1</sup>, dado que este sistema de cultivo permitió obtener la mayor cantidad de azúcares reductores. Inicialmente se utilizaron cultivos del consorcio de microalgas en botellas de cristal con un volumen de cultivo de 500 mL, utilizando las mismas condiciones descritas para los cultivos previos. Con el objetivo obtener una cantidad considerable de biomasa para llevar a cabo la etapa de fermentación, el cultivo del consorcio de microalgas se escaló a un biorreactor con un volumen total de 10 L, utilizando una temperatura de 20 ± 2 °C, luz fluorescente blanca ~7 000 lx con un fotoperiodo luz/oscuridad alternado (16 h/8 h), y una tasa de aireación constante de 0.4 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto) (Aslanbay et al., 2020; Chowdury et al., 2020).

La biomasa seca se obtuvo bajo las mismas condiciones utilizadas para la evaluación de la generación de biomasa y la hidrólisis se llevó a cabo utilizando la dilución óptima de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.0% v/v) utilizando las condiciones de presión, temperatura y tiempo descritas anteriormente. El método DNS fue utilizado para determinar la concentración de azúcares reductores antes de iniciar la fermentación y una vez concluida.

La levadura seca, *S. cerevisiae*, fue utilizada como microorganismo fermentador. Inicialmente, la levadura se activó en un microtubo de 1.5 mL agregando 50 µL de agua Milli-Q estéril y mezclándola por agitación en vórtex. Posteriormente, se realizó un cultivo sólido en condiciones estériles usando placas Petri con agar YPD compuesto por 1 g de extracto de levadura, 2 g de peptona, 2 g de glucosa y 1.5 g de agar en 100 mL de agua Milli-Q. Los cultivos de levadura se incubaron a 30 °C durante 48 horas antes de utilizarlos en la posterior etapa de fermentación (Phwan et al., 2019). Después del crecimiento en medio sólido, las levaduras se transfirieron a medio YPD líquido (1 g de extracto de levadura, 2 g de peptona y 2 g de glucosa en 100 mL de agua Milli-Q) y se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm y 30 °C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> inicial de 0.25 (Constantino et al., 2021; Sánchez et al., 2017).

Las fermentaciones se llevaron a cabo con 10% (v/v) de inóculo de levadura en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un contenido de 1000 mL de medio de cultivo compuesto por el hidrolizado de microalgas, suplementado con 20 g·L<sup>-1</sup> de peptona, 10 g·L<sup>-1</sup> de extracto de levadura y agua Milli-Q para completar el volumen de cultivo. El pH del medio se ajustó a 6.5 ± 0.2 con NaOH o HCl y se autoclavó durante 20 min a 121 °C; los cultivos se incubaron a 30 °C durante aproximadamente 96 h (**Constantino et al., 2021**). Adicionalmente se realizaron dos controles diferentes. El primero consistió en medio de cultivo con glucosa en lugar del hidrolizado (utilizando la misma concentración de azúcares reductores), y el segundo consistió en medio sin fuente de azúcares fermentables (ausencia de hidrolizado y/o glucosa).

Una vez concluido el tiempo de cultivo, se extrajo el etanol mediante un proceso de destilación simple, para lo cual se utilizó un evaporador rotatorio a una temperatura de 65 °C, presión de 186 bar y rotación de 120 rpm (**Phwan et al., 2019**). Para determinar la concentración de etanol en los productos de destilación se utilizó el método de oxidación de dicromato, para lo cual se tomaron muestras de 200 µL de y se mezclaron con 200 µL del reactivo de dicromato (que contenía 10% p/v de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> disuelto en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 M) en microtubos de 1.5 mL, se mezclaron vigorosamente en vórtex durante 1 minuto y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Se realizó una dilución 1:10 a partir de los productos de reacción utilizando agua Milli-Q y su absorbancia fue determinada utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 595 nm, empleando una curva estándar con glucosa para determinar el contenido de etanol (Anexo D. Figura 14) (**Seo et al., 2009; Sriariyanun et al., 2019**). El rendimiento del proceso de fermentación se determinó en base al rendimiento teórico según la estequiometría de Gay-Lussac utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Concentración de etanol producido (g} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}}{0.511 \times \text{Concentración inicial de azúcares (g} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

en donde 0.511 es la fracción teórica máxima de conversión de glucosa en etanol (**de Farias, Meneghello, et al., 2018**).

### **2.2.6 Análisis de datos**

Para el análisis de los datos obtenidos en las etapas de generación de biomasa e hidrólisis de carbohidratos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA de un factor) con un nivel de confianza del 95% empleando software estadístico. Para establecer las diferencias significativas y determinar el mejor tratamiento en cuanto a la cantidad de biomasa microalgal obtenida con las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo, y la concentración de azúcares reductores obtenida con las diferentes diluciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y con las diferentes fuentes de carbono a partir de la dilución óptima, se empleó una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

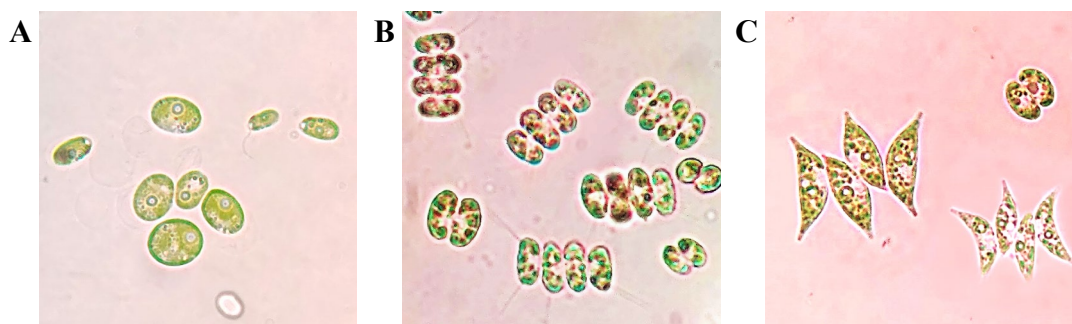


## CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Análisis y discusión de los resultados

#### 3.1.1 Observación de la morfología de las células del consorcio de microalgas

Las microalgas verdes, pertenecientes al *phylum* Chlorophyta, son microorganismos unicelulares, eucariotas y fotosintéticos que contienen clorofila A y B, cloroplastos que llevan a cabo la fotosíntesis y pirenoides que intervienen en el almacenamiento de almidón (Afify et al., 2018). A pesar de que la diversidad de las microalgas verdes se ha estudiado desde hace bastante tiempo, el conocimiento de sus relaciones taxonómicas y filogenéticas aún es limitado. En este sentido, su identificación se ha llevado a cabo principalmente en función de rasgos morfológicos específicos (forma general de las células, posición de cloroplastos, tipo de reproducción, formación de colonias, flagelos, entre otros) (Lortou & Gkelis, 2019). En la Figura 5, se presentan observaciones bajo el microscopio óptico de las principales morfologías de las células de microalgas que forman parte del consorcio utilizado en la presente investigación.



**Figura 5.** Vista de las células del consorcio de microalgas en medio BBM

Se presenta la morfología de las células del consorcio de microalgas observadas bajo el microscopio óptico, presumiblemente pertenecientes al género *Scenedesmus*. (A) Células derivadas de un cultivo sólido en placa Petri. (B) Células derivadas de un cultivo líquido con morfología similar a *Scenedesmus quadricauda*. (C) Células derivadas de un cultivo líquido con morfología similar a *Scenedesmus dimorphus*.

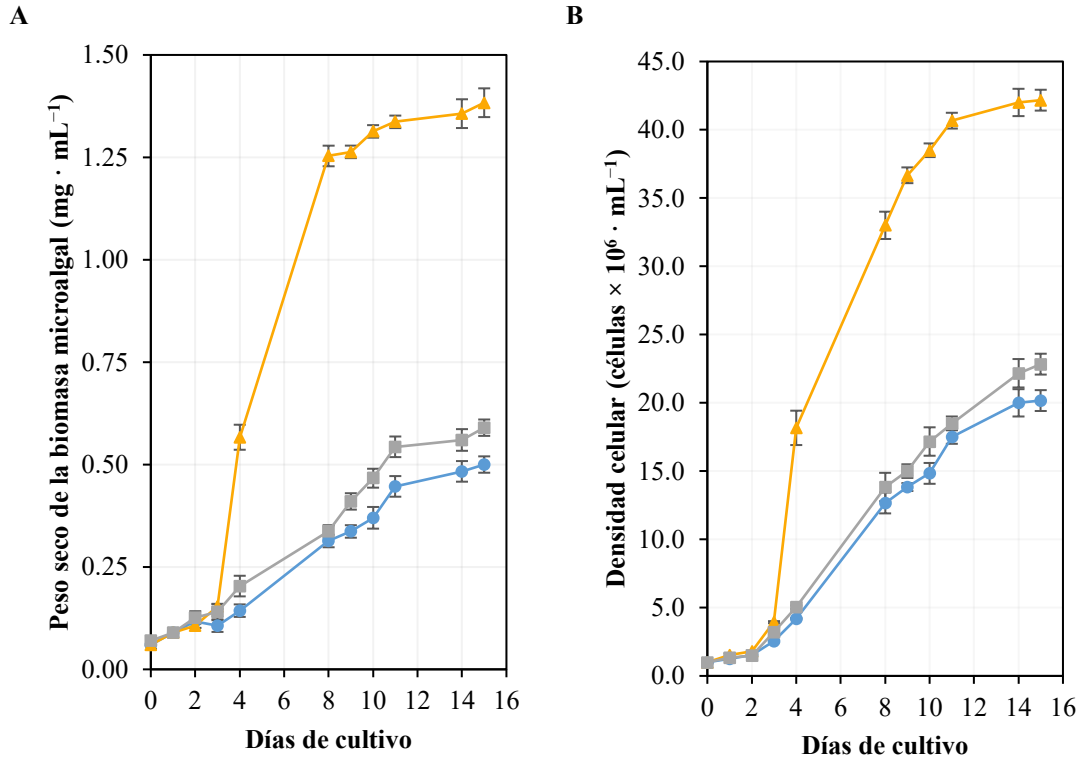
Uno de los géneros más comunes dentro de las microalgas verdes corresponde a *Scenedesmus*, caracterizado por una gran variabilidad polimórfica, pleomórfica y fenotípica (Turiel et al., 2021). De manera general, su morfología se caracteriza por cenobios laminares rectos o ligeramente curvados en los que las células se disponen en múltiplos de dos, siendo bastante comunes las organizaciones en grupos de cuatro u ocho células (Toledo et al., 2018). En las Figuras 5B y 5C, se puede apreciar la agrupación de células en grupos de cuatro, una característica distintiva del género *Scenedesmus*. Sin embargo, el crecimiento del consorcio en medio sólido mostró la presencia de células no agrupadas (Figura 5A), las cuales probablemente se encontraban en una etapa de crecimiento previa a la formación de colonias. De forma similar, estudios previos han reportado que *Scenedesmus* puede generar un crecimiento unicelular en diferentes medios de cultivo (Afify et al., 2018).

Según las observaciones realizadas, se puede evidenciar que las células de la Figura 5B presentan características morfológicas similares a las de la especie *Scenedesmus quadricauda*, en donde las células se presentan como cenobios formados por cuatro células de forma cilíndrica que se disponen de manera lineal y poseen cuatro flagelos largos que se extienden desde la pared celular (Rajput et al., 2021; Yong et al., 2019). Por otra parte, las células presentadas en la Figura 5C muestran características morfológicas aparentemente similares a las de la especie *Scenedesmus dimorphus*, cuyas células presentan una forma esférica lanceolada y forman colonias típicas de cuatro u ocho células (Gour et al., 2016). Sin embargo, a pesar de las similitudes observadas, es importante considerar que este género de microalgas presenta una gran plasticidad morfológica, por lo que se deben utilizar técnicas moleculares para una identificación precisa a nivel de especie (Turiel et al., 2021). De manera preliminar, con base a estas observaciones, se puede concluir que el consorcio de microalgas empleado en el presente estudio está compuesto por especies del género *Scenedesmus*.

### **3.1.2 Evaluación de la generación de biomasa microalgal empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo**

Para evaluar la generación de biomasa empleando CO<sub>2</sub>, lactosuero y/o etilenglicol como fuentes de carbono en el medio de cultivo BBM con fuente limitada de nitrógeno (NaNO<sub>3</sub> 125 mg·L<sup>-1</sup>), se tomaron muestras de 10 mL del cultivo del consorcio de

microalgas durante un periodo de cultivo de 15 días. A continuación (Figura 6) se presenta el crecimiento del consorcio en los diferentes medios de cultivo, según la cantidad de biomasa seca obtenida ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) y la densidad celular obtenida por medio de conteo celular empleando la cámara de Neubauer ( $\text{células} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).



**Figura 6.** Curvas de crecimiento del consorcio de microalgas empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo

Se presentan las curvas de crecimiento a partir de (A) peso seco de la biomasa por volumen de cultivo ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) y (B) densidad celular por volumen de cultivo ( $\text{células} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo:  $\text{CO}_2$  (0.04% v/v) [●];  $\text{CO}_2$  (0.04% v/v) + Lactosuero (40% v/v) [▲]; y  $\text{CO}_2$  (0.04% v/v) + Etilenglicol (2.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) [■]. Las líneas sobre cada punto representan la desviación estándar respecto a la media.

Según los resultados obtenidos en el día 15 de cultivo (Tabla 4) (en donde se alcanzó la mayor cantidad de biomasa y número de células), el análisis de varianza ANOVA evidenció que la fuente de carbono en el medio de cultivo fue altamente significativa tanto para la generación de biomasa como para la densidad celular ( $P < 0.05$ ); además, la prueba de comparación de Tukey mostró que existen diferencias significativas entre las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo (Anexo A. Tablas 7 – 10).

El crecimiento observado del consorcio de microalgas, según la determinación de peso seco y la densidad celular, revela que los cultivos mixotróficos que recibieron CO<sub>2</sub> suplementado con lactosuero o EG como fuentes orgánicas de carbono, permitieron obtener una mayor cantidad de biomasa, a diferencia del cultivo autotrófico. Este comportamiento podría deberse a la sinergia entre las vías metabólicas autótrofas que permiten la fijación de CO<sub>2</sub> y las vías fotoheterótrofas y quimioheterótrofas que permiten la asimilación de carbono orgánico (Nair & Chakraborty, 2020).

**Tabla 4.** Generación de biomasa en el día 15 de cultivo con las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo

Fuente de carbono	Peso seco (mg·mL <sup>-1</sup> )	Densidad celular (células·mL <sup>-1</sup> )
CO <sub>2</sub> + Lactosuero	1.383 ± 0.035 <sup>A</sup>	4.22 × 10 <sup>7</sup> ± 7.6 × 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>
CO <sub>2</sub> + Etilenglicol	0.590 ± 0.020 <sup>B</sup>	2.28 × 10 <sup>7</sup> ± 7.6 × 10 <sup>5</sup> <sup>B</sup>
CO <sub>2</sub>	0.500 ± 0.020 <sup>C</sup>	2.02 × 10 <sup>7</sup> ± 7.6 × 10 <sup>5</sup> <sup>C</sup>

*Nota.* Se presenta la cantidad de biomasa obtenida en el último día de cultivo según el peso seco (mg·mL<sup>-1</sup>) y la densidad celular (células·mL<sup>-1</sup>) por volumen de cultivo. Los superíndices con letras mayúsculas (A, B, C) corresponden a los niveles de significancia según la prueba de Tukey.

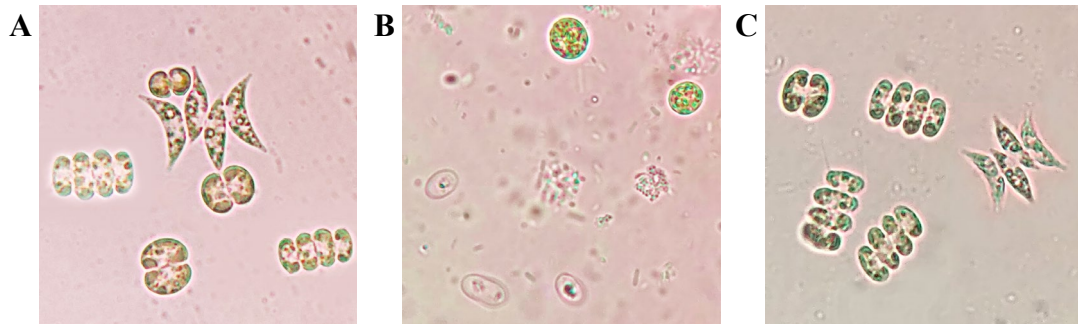
En cuanto a generación de biomasa, la mayor tasa de crecimiento se obtuvo con el cultivo mixotrófico en donde el medio de cultivo se sustituyó parcialmente con lactosuero al 40% (v/v). Investigaciones previas en las que se empleó lactosuero en la misma proporción concuerdan con la obtención de una mayor cantidad de biomasa de *Scenedesmus obliquus*, respecto a cultivos autótrofos; sin embargo, en dichos casos se obtuvo una mayor cantidad de biomasa microalgal (3.5 mg·mL<sup>-1</sup>) en un periodo de cultivo similar (14 – 16 días), respecto a la cantidad de biomasa obtenida en la presente investigación (1.38 mg·mL<sup>-1</sup>) (Bentahar et al., 2019; Girard et al., 2014). Este efecto podría explicarse por la limitación en la fuente de nitrógeno y su impacto negativo en la generación de biomasa (Wang et al., 2019); o a su vez, por una relación competitiva entre las microalgas y bacterias del consorcio (J. González et al., 2022).

Adicionalmente, dado que se utilizó un cultivo no axénico, se presentó una proliferación significativa de biomasa bacteriana asociada al consorcio en el medio de con lactosuero (Figura 6B). Se sabe que la relación simbiótica entre microalgas y

bacterias puede ser cooperativa o competitiva, siendo las principales interacciones el intercambio de nutrientes (generalmente O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>), la transducción de señales (activación o inhibición de la expresión génica y/o actividades fisiológicas) y la transferencia de genes (**Amin et al., 2022**). Estudios previos han reportado que tanto el intercambio de nutrientes como la transducción de señales en el cocultivo entre microalgas y bacterias permite mejorar la producción de biomasa de microalgas, lo que podría respaldar los resultados obtenidos (**Jiang et al., 2021**).

Por otra parte, el cultivo mixotrófico suplementado con EG como fuente de carbono orgánica presentó una cantidad de biomasa menor (0.59 mg·mL<sup>-1</sup>) a la obtenida en el medio con lactosuero (1.38 mg·mL<sup>-1</sup>), pero significativamente superior a la obtenida con el cultivo autotrófico. Previamente se ha reportado que utilizando una concentración similar de EG (2.59 g·L<sup>-1</sup>) en el cultivo de *Chlorella protothecoides* se obtuvo una menor cantidad de biomasa (0.24 mg·mL<sup>-1</sup>) en un periodo de 10 días de cultivo, respecto a la cantidad obtenida con el consorcio de microalgas en el presente estudio (**Kishi et al., 2015**). Otro estudio en el que se emplearon concentraciones de EG entre 0 y 50 g·L<sup>-1</sup>, demostró el efecto tóxico del EG sobre el crecimiento de *Selenastrum capricornutum*; sin embargo, se mostró que a bajas concentraciones de EG (5 g·L<sup>-1</sup>) la densidad celular obtenida (1.4 × 10<sup>6</sup> células·mL<sup>-1</sup>) fue superior a la obtenida en ausencia de EG (0.95 × 10<sup>6</sup> células·mL<sup>-1</sup>) (**Pillard & DuFresne, 1999**).

Finalmente, en el cultivo autotrófico que recibió solamente CO<sub>2</sub> proveniente de la aireación como fuente de carbono inorgánico, se observó la menor generación de biomasa del consorcio de microalgas. En estudios en donde se evaluó el crecimiento autotrófico de *Chlorella sorokiniana* y *S. obliquus* en medio BBM, utilizando una concentración similar de CO<sub>2</sub> atmosférico (0.04% v/v), se obtuvo una cantidad de biomasa seca superior (entre 1.3 mg·mL<sup>-1</sup> y 1.9 mg·mL<sup>-1</sup>) a la obtenida en el presente estudio (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>) (**Girard et al., 2014; Nair & Chakraborty, 2020**). Esta diferencia en la cantidad de biomasa obtenida puede deberse a diversos factores de cultivo, principalmente a la reducción en la concentración de NaNO<sub>3</sub> empleado en el medio de cultivo, limitando la producción de biomasa microalgal (**Wang et al., 2019**).



**Figura 7.** Vista de las células del consorcio de microalgas en medio BBM con diferentes fuentes de carbono

Se presenta la morfología de las células con las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo, observadas bajo el microscopio óptico en el día 15 de cultivo. **(A)** Células derivadas del cultivo autotrófico con CO<sub>2</sub>. **(B)** Células derivadas del cultivo mixotrófico con CO<sub>2</sub> y lactosuero. **(C)** Células derivadas del cultivo mixotrófico con CO<sub>2</sub> y etilenglicol.

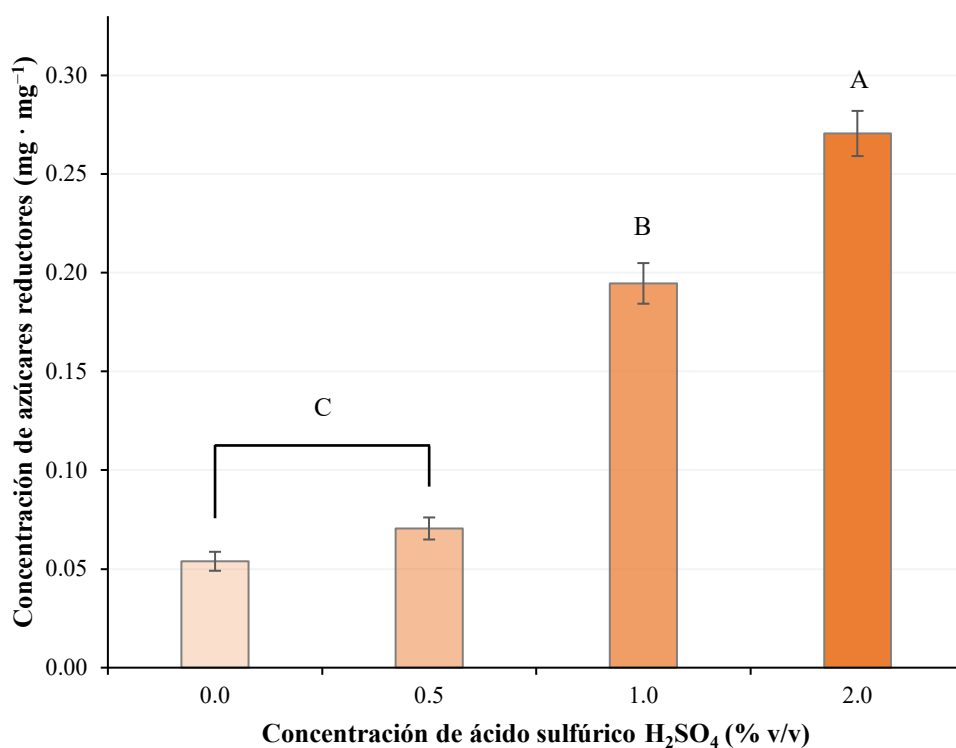
Respecto a las observaciones en el microscopio óptico (Figura 7), se puede evidenciar que las células predominantes del consorcio de microalgas, tanto en el medio de cultivo autotrófico que utiliza únicamente CO<sub>2</sub> como fuente de carbono (Figura 7A) y en el cultivo mixotrófico que utiliza CO<sub>2</sub> y EG como fuente de carbono orgánico (Figura 7C), corresponden a la morfología de *Scenedesmus* sp. observada previamente en el cultivo líquido inicial (Gour et al., 2016; Rajput et al., 2021). Por otra parte, en el cultivo mixotrófico que utiliza CO<sub>2</sub> y lactosuero como fuente de carbono orgánico (Figura 7B), se puede apreciar claramente la proliferación de bacterias asociadas al consorcio y una morfología de microalgas similar a las del género *Chlorella*, dado que se presentan como algas verdes unicelulares cocoides con forma globular u ovoide y que carecen de flagelos en cualquier etapa de crecimiento (Ciurli et al., 2021).

Adicionalmente, en el cultivo con lactosuero (Figura 7B) se observaron células de microalgas con una morfología similar a la *Scenedesmus* sp.; sin embargo, estas células no formaron colonias y no presentaron la coloración verde característica, lo que podría indicar una menor acumulación de clorofila en este sistema de cultivo mixotrófico. Estudios previos realizados en *C. vulgaris* muestran que el contenido de clorofila se reduce bajo condiciones mixotróficas en comparación con el crecimiento autotrófico (Vidotti et al., 2020). En otras especies como *Chromochloris zofingiensis*, se ha mostrado que la presencia de glucosa puede degradar el aparato fotosintético y reducir la cantidad de proteínas de las membranas de los tilacoides en condiciones de luz, lo

que podría explicar la despigmentación de las células microalgales por la presencia de lactosa en el medio de cultivo utilizado (Roth et al., 2019).

### 3.1.3 Determinación de las condiciones óptimas para la hidrólisis ácida de los carbohidratos contenidos en la biomasa microalgal

Para determinar las condiciones de hidrólisis que permiten una mayor liberación de azúcares reductores a partir de la biomasa microalgal seca se utilizaron diferentes concentraciones de  $H_2SO_4$  (0.0 %, 0.5%, 1.0% y 2.0%). Las diluciones se prepararon a partir de  $H_2SO_4$  concentrado y fueron utilizadas para hidrolizar la biomasa seca obtenida de un cultivo empleando BBM y  $CO_2$  como única fuente de carbono. La concentración de azúcares reductores liberados se presenta en la Figura 8.



**Figura 8.** Azúcares reductores obtenidos a partir de la biomasa microalgal utilizando diferentes concentraciones de  $H_2SO_4$

Diagrama de barras en donde se presenta la cantidad de azúcares reductores liberados a partir de la biomasa microalgal seca ( $mg \cdot mg^{-1}$ ), utilizando diluciones de  $H_2SO_4$  (0.0 %, 0.5%, 1.0% y 2.0%). Las líneas sobre cada barra representan la desviación estándar respecto a la media. Las letras mayúsculas (A, B, C) corresponden a los niveles de significancia según la prueba de Tukey.

Según los resultados obtenidos, el análisis de varianza ANOVA evidenció que la liberación de azúcares reductores a partir de la biomasa microalgal es dependiente de la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> empleada durante la hidrólisis ( $P < 0.05$ ). Además, la prueba de comparación de Tukey mostró tres niveles de significancia, donde únicamente no existen diferencias significativas entre los tratamientos con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.0 % y 0.5 %, por lo que se encuentran en el mismo grupo (Anexo A. Tablas 11 – 12).

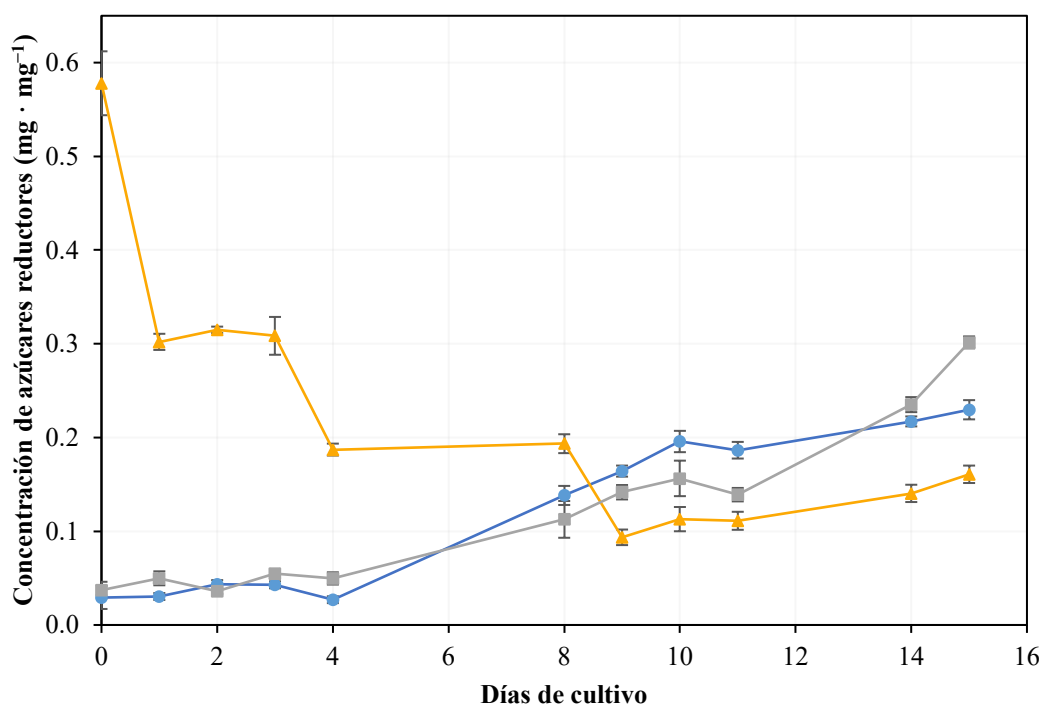
La hidrólisis ácida de carbohidratos ha probado ser un método sencillo y eficiente para liberar azúcares fermentables a partir de la biomasa de microalgas, permitiendo obtener rendimientos entre 80% y 95% (**de Farias, Meneghello, et al., 2018**). En los resultados presentados se puede observar claramente que a medida que incrementa la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizada en la hidrólisis, se obtiene una mayor cantidad de azúcares reductores a partir de la biomasa seca, siendo la dilución de ácido al 2% v/v la más óptima. Estudios realizados en *Chlorella vulgaris* con concentraciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entre 0.1% y 5.0%, muestran que al utilizar ácido al 2.0% o en concentraciones superiores, se puede recuperar cerca del 100% de azúcares reductores a partir de los carbohidratos totales presentes en la biomasa microalgal (**Ho et al., 2013**).

Varios estudios han demostrado que al utilizar concentraciones superiores de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido al 2% (entre 4% y 7% v/v) es posible obtener una mayor concentración de azúcares reductores a partir de *Chlorella* sp., *C. sorokiniana* y *Nannochloropsis gaditana* (**Hernández et al., 2015; Phwan et al., 2019**). Sin embargo, cuando se hidrolizó biomasa de *C. vulgaris* con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.36% v/v se obtuvo una concentración menor de azúcares reductores (0.14 mg·mg<sup>-1</sup>) que la obtenida con la dilución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2% v/v (0.23 mg·mg<sup>-1</sup>), un resultado similar al de la cantidad obtenida en el presente estudio con la misma concentración (0.27 mg·mg<sup>-1</sup>) (**El-Souod et al., 2021**). Esta disminución en la cantidad de azúcares reductores liberados al incrementar la concentración de ácido en la hidrólisis puede explicarse por la degradación de monosacáridos en productos no favorables para la fermentación como furfural, hidroximetilfurfural, ácido propiónico, acético, fórmico y láctico (**Bušić et al., 2018**).



### 3.1.4 Evaluación de los carbohidratos contenidos en la biomasa microalgal generada empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo

Utilizando la concentración óptima de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2.0 % v/v) se llevó a cabo la hidrólisis de la biomasa microalgal obtenida con las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo ( $\text{CO}_2$ , lactosuero y/o etilenglicol). En la Figura 9 se muestra una curva con la acumulación de azúcares reductores ( $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$  de biomasa seca) durante el periodo de evaluación, mientras que en la Figura 10 se presenta la cantidad de azúcares reductores obtenida durante el último día de cultivo.



**Figura 9.** Curva de azúcares reductores obtenidos con las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo

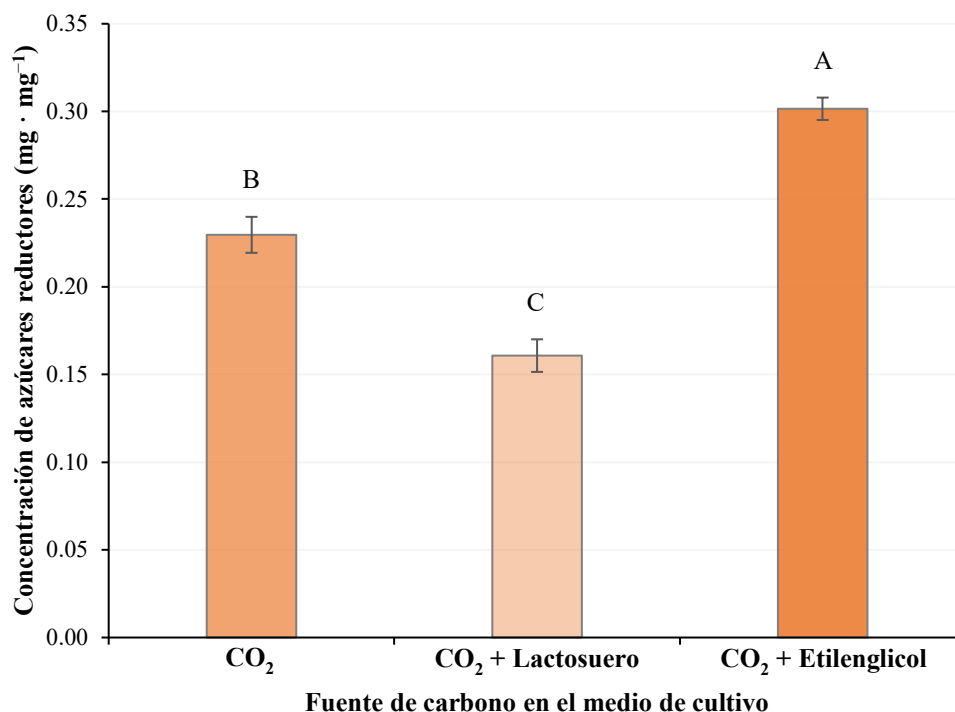
La curva presenta la acumulación de azúcares reductores obtenidos a partir de la biomasa microalgal seca empleando diferentes fuentes de carbono ( $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ):  $\text{CO}_2$  (0.04% v/v) [●];  $\text{CO}_2$  (0.04% v/v) + Lactosuero (40% v/v) [▲]; y  $\text{CO}_2$  (0.04% v/v) + Etilenglicol (2.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) [■]. Las líneas sobre cada punto representan la desviación estándar respecto a la media.

Con el objetivo de favorecer la acumulación de carbohidratos, en el presente estudio se redujo la concentración en la fuente de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$ ) en el medio de cultivo a la mitad ( $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) respecto a la composición del medio BBM. Estudios realizados en especies de microalgas como *C. sorokiniana*, *Chlorella zofingiensis*, *Scenedesmus acuminatus*, *Tetradismus obliquus*, *Porphyridium purpureum*, entre otras, han demostrado que la limitación y/o la privación de nitrógeno es uno de los métodos más eficientes para promover la acumulación de carbohidratos (principalmente en forma de almidón), dado que de esta manera se induce una reducción significativa de la producción de proteínas, y la energía absorbida en exceso se acumula como reserva energética (de Farias, Sforza, et al., 2018; Debnath et al., 2021).

En la curva (Figura 9) se puede apreciar la liberación de azúcares reductores a partir de la biomasa recolectada. Tanto en el cultivo autotrófico como en el cultivo mixotrófico que utiliza EG como fuente de carbono orgánico, se observa un incremento en la cantidad de azúcares reductores, alcanzando su nivel máximo en el último día de cultivo. El contenido de carbohidratos en la biomasa depende del tipo de microalgas y las condiciones de cultivo (Andreeva et al., 2021). En la presente investigación se ha observado una acumulación progresiva de carbohidratos, principalmente durante la fase exponencial de crecimiento, a medida que incrementa el tiempo de cultivo; sin embargo, en estudios realizados en especies de *Scenedesmus* y *Neochloris*, se ha observado que la acumulación de carbohidratos se da principalmente durante la fase estacionaria de crecimiento (Sepulveda et al., 2019).

Por otro parte, en el cultivo mixotrófico que utiliza lactosuero como fuente de carbono orgánico se puede observar una elevada concentración de azúcares reductores durante los primeros días de cultivo, la cual disminuye a medida que incrementa el periodo de incubación. La alta concentración inicial de azúcares podría explicarse por la unión de las moléculas de lactosa derivadas del lactosuero a las células del consorcio de microalgas, dado que se ha reportado que microalgas como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, y *Chlorococcum*, poseen lectinas, proteínas capaces de unirse con alta afinidad y especificidad a determinados carbohidratos (Silva et al., 2020). La disminución progresiva de los azúcares reductores podría deberse al crecimiento bacteriano en este sistema cultivo, en donde estos microorganismos heterótrofos asimilaron la lactosa y minerales presentes en el lactosuero, además de los exudados

(materia orgánica disuelta) de las microalgas (Poddar et al., 2018). Finalmente, el incremento en la concentración de azúcares en los últimos días de incubación (a partir del día 9) podría derivarse netamente del crecimiento de las microalgas del consorcio.



**Figura 10.** Azúcares reductores obtenidos en el día 15 de cultivo con las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo

Diagrama de cajas en donde se presenta la cantidad de azúcares reductores (mg · mg<sup>-1</sup>) liberados a partir de la biomasa microalgal seca generada con las diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo: (1) CO<sub>2</sub>; (2) CO<sub>2</sub> + Lactosuero; y (3) CO<sub>2</sub> + Etilenglicol. Las líneas sobre cada barra representan la desviación estándar respecto a la media. Las letras mayúsculas (A, B, C) corresponden a los niveles de significancia según la prueba de Tukey.

Según los resultados obtenidos en el día 15 de cultivo, el análisis de varianza ANOVA evidenció que la fuente de carbono en el medio de cultivo tiene un efecto altamente significativo sobre la liberación de azúcares reductores a partir de la biomasa microalgal ( $P < 0.05$ ); además, la prueba de comparación de Tukey mostró que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ensayados respecto a la fuente de carbono (Anexo A. Tablas 13 –14).

En la Figura 10 se puede notar una clara diferencia entre la cantidad de azúcares reductores obtenida con los tres sistemas de cultivo, siendo el cultivo mixotrófico con EG como fuente de carbono orgánico el que presentó la mayor liberación de azúcares reductores a partir de la biomasa seca ( $0.30 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Estudios relacionados con el aprovechamiento de efluentes industriales para potenciar el crecimiento de microalgas han evidenciado que estos microorganismos son capaces de metabolizar glicoles y otros solventes orgánicos, sin embargo las investigaciones relacionadas con la utilización de EG son bastante limitadas (**Miazek et al., 2017**).

Anteriormente se ha estudiado y demostrado el efecto tóxico del EG en altas concentraciones sobre el crecimiento de *S. capricornutum* y su utilización en bajas concentraciones para estimular la generación de biomasa a partir de *C. protothecoides* (**Kishi et al., 2015; Pillard & DuFresne, 1999**). Los resultados sugieren que utilizar EG en una concentración de  $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  favorece la liberación de azúcares reductores a partir del consorcio de microalgas respecto a cultivos autotróficos; se puede destacar que en este sistema de cultivo se obtuvo una concentración de azúcares reductores superior a la reportada en sistemas autotróficos en especies como *C. vulgaris* y *S. obliquus* a partir de la hidrólisis ácida de carbohidratos contenidos en la biomasa seca (entre  $0.10$  y  $0.20 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) (**El-Souod et al., 2021; Ismail et al., 2020**).

Por otra parte, se puede observar que en el cultivo autotrófico se obtuvo una cantidad de azúcares reductores relativamente menor ( $0.23 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) a la obtenida a partir del cultivo autotrófico utilizando medio BBM completo en la etapa de la determinación de dilución óptima de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0.27 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). En este caso, la limitación en la fuente de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$   $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no favoreció completamente a la acumulación de carbohidratos. Estudios realizados *Scenedesmus* sp. y *Neochloris* sp., han demostrado que la acumulación de carbohidratos se da principalmente durante la fase estacionaria de crecimiento, por lo que sería recomendable incrementar el periodo de evaluación (**Sepulveda et al., 2019**). Finalmente, se puede observar que en el cultivo mixotrófico con lactosuero se obtuvo la menor cantidad de azúcares reductores a partir de la biomasa seca ( $0.16 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), resultado que podría explicarse principalmente por la proliferación de bacterias asociadas al consorcio (**Poddar et al., 2018**).

### 3.1.5 Obtención de bioetanol a partir de la fermentación de los carbohidratos derivados de la hidrólisis de la biomasa microalgal

Los resultados de la reducción en la concentración de azúcares reductores, debido al consumo de azúcares por parte de *S. cerevisiae* durante el proceso de fermentación, se presentan en la Tabla 5. Se puede apreciar que, durante el periodo de incubación, en el medio preparado a partir del hidrolizado se consumió aproximadamente el 83% de los azúcares reductores presentes, en el medio preparado con glucosa se consumió cerca del 87% de este azúcar, y en el control no se detectaron azúcares reductores.

**Tabla 5.** Consumo de azúcares reductores durante la fermentación

Medio de fermentación	Azúcares reductores (mg·mL <sup>-1</sup> )	
	<i>t</i> = 0 h	<i>t</i> = 96 h
Hidrolizado	20.526 ± 0.206	3.369 ± 0.211
Glucosa	20.526 ± 0.000	2.720 ± 0.141
Control	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000

*Nota.* Se presenta la concentración de azúcares reductores (mg·mL<sup>-1</sup>) antes de iniciar la fermentación y una vez concluida, en los diferentes tratamientos de fermentación.

La cantidad de azúcares reductores remanente en el medio preparado a partir del hidrolizado puede explicarse por la presencia de azúcares no fermentables generados como productos de la hidrólisis ácida, ya sean subproductos de degradación como hidroximetilfurfural o azúcares correspondientes a pentosas no fermentables como xilosa o arabinosa (Constantino et al., 2021). Sin embargo, este resultado demuestra que una gran cantidad de los azúcares liberados a partir de la hidrólisis pueden ser metabolizados y convertidos en etanol. Por otra parte, en el medio preparado con glucosa se obtuvo una menor cantidad remanente de azúcares debido a que la glucosa es la fuente de carbono preferida para *S. cerevisiae* y se puede fermentar más rápidamente y con mayor eficiencia que cualquier otro azúcar (Turner et al., 2018). Tomando en consideración que la fermentación de la glucosa no fue completa, se puede inferir que i) la concentración de azúcares reductores remanentes tanto en el medio de cultivo con hidrolizado como en el medio suplementado con glucosa es insuficiente para promover la producción de etanol adicional, o ii) que el tiempo de

fermentación podría extenderse hasta conseguir una disminución de los azúcares reductores cercana al 100%.

A partir de la concentración de etanol determinada por el método de oxidación del dicromato se calculó el rendimiento del proceso según la estequiometría de Gay-Lussac, la concentración de etanol en los productos de destilación y el rendimiento de etanol obtenido por biomasa seca. Los resultados del rendimiento de la obtención de bioetanol y el proceso de fermentación se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** *Producción y rendimiento del etanol obtenido*

<b>Medio de fermentación</b>	<b>Rendimiento del proceso (%)</b>	<b>Concentración de etanol (mg·mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimiento de etanol (mg·mg<sup>-1</sup>)</b>
Hidrolizado	82.048 ± 1.138	8.605 ± 0.087	0.347 ± 0.004
Glucosa	87.509 ± 1.149	9.179 ± 0.121	N/A
Control	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	N/A

*Nota.* Se presenta la concentración de etanol (mg·mL<sup>-1</sup>) y el rendimiento teórico del proceso de fermentación (determinado mediante Ec. 1) obtenidos con los diferentes tratamientos de fermentación. Adicionalmente se presenta el rendimiento de etanol por biomasa seca (mg·mg<sup>-1</sup>).

Los resultados del rendimiento de la fermentación muestran un porcentaje alto, tanto para el medio de fermentación preparado con el hidrolizado (82%) como para el medio en el que se utilizó glucosa (87.5%), siendo este último el que presentó una mayor conversión de azúcares reductores, lo que corresponde con los resultados del consumo de azúcares presentados en la Tabla 5 y la preferencia de la glucosa como fuente de carbono por parte de la levadura (**de Farias, Meneghello, et al., 2018**).

Según las condiciones de hidrólisis, fermentación y la especie de microalgas utilizada, se han reportado diferentes rendimientos de etanol. Un estudio realizado a partir de la biomasa de *S. dimorphus* muestra un rendimiento de etanol por biomasa seca de 0.178 mg·mg<sup>-1</sup> a partir de un proceso de hidrólisis ácida y 0.183 mg·mg<sup>-1</sup> a partir de un proceso de hidrólisis enzimática (**Chng et al., 2017**), mientras que otro estudio realizado en la misma especie a partir de una extracción previa de lípidos permitió obtener un rendimiento de etanol de 0.26 mg·mg<sup>-1</sup> (**Chng et al., 2016**); resultados

menores a los obtenidos en el presente estudio ( $0.347 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Sin embargo, también se han reportado rendimientos de etanol por biomasa seca superiores a  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$  en especies de *Chlorella* y *Chlamydomonas* a partir de procesos combinados de hidrólisis ácida y enzimática a partir de la biomasa microalgal (Sánchez et al., 2017).

### **3.2 Verificación de hipótesis**

Según el análisis de los resultados obtenidos durante el desarrollo del trabajo de investigación, es posible aceptar la hipótesis alternativa; dado que, por medio de la fermentación de los carbohidratos hidrolizados, derivados de la biomasa microalgal producida a partir de un cultivo mixto, fue posible obtener bioetanol.

## CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

Utilizando la biomasa generada a partir del cultivo de un consorcio de microalgas se produjo bioetanol con un rendimiento relativamente alto. Los resultados obtenidos sugieren que utilizar la biomasa de microalgas generada en un sistema de cultivo mixotrófico con CO<sub>2</sub> y EG como materia prima, resulta prometedor para la obtención de azúcares fermentables y la producción de bioetanol de tercera generación.

Se evaluó la generación de biomasa microalgal empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo: dióxido de carbono, etilenglicol y/o lactosuero. En los sistemas de cultivo mixotróficos que consistieron en CO<sub>2</sub> como fuente de carbono inorgánico y lactosuero o EG como fuente de carbono orgánico, se obtuvo una mayor cantidad de biomasa (1.38 mg·mL<sup>-1</sup> y 0.60 mg·mL<sup>-1</sup>, respectivamente) en comparación con el cultivo autotrófico con CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono (0.50 mg·mL<sup>-1</sup>).

Se determinó la concentración óptima de ácido sulfúrico que permite la mayor liberación de azúcares reductores (0.27 mg·mg<sup>-1</sup>) derivados de la hidrólisis ácida de la biomasa microalgal, siendo esta equivalente a 2.0% v/v. Utilizando esta concentración de ácido, también se determinó que es posible obtener una mayor cantidad de azúcares reductores (0.30 mg·mg<sup>-1</sup>) a partir de la biomasa del consorcio de microalgas obtenida a partir de cultivo mixotrófico en el medio suplementado con etilenglicol.

Se obtuvo bioetanol a partir de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el hidrolizado de la biomasa generada en el medio suplementado con EG. Utilizando la levadura *S. cerevisiae* como microorganismo fermentador se obtuvo un rendimiento de etanol por biomasa seca de 0.35 mg·mg<sup>-1</sup> con un rendimiento del proceso de fermentación del 82%. Este resultado respalda la utilización de la biomasa de microalgas como una alternativa eficiente para la producción de bioetanol.



## **4.2 Recomendaciones**

Estudiar la relación simbiótica en el consorcio de microalgas y bacterias. Al desconocer si la relación es de tipo cooperativa o competitiva, la producción de biomasa y acumulación de carbohidratos podría verse beneficiada o perjudicada, lo que tiene repercusiones directas en la fermentación y obtención de bioetanol.

Utilizar un consorcio axénico de microalgas empleando antibióticos y antifúngicos en el cultivo para el inóculo inicial, de manera que se pueda evaluar únicamente el potencial de las microalgas sobre la producción de bioetanol. Adicionalmente se pueden aislar las especies del consorcio para evaluar su efectividad individual.

Evaluar el efecto de la limitación en la fuente de nitrógeno y el efecto de diferentes concentraciones de las fuentes orgánicas de carbono (lactosuero y etilenglicol) sobre la generación de biomasa y la acumulación de azúcares reductores.

Analizar los productos obtenidos en el hidrolizado, de manera que se pueda determinar si estos podrían inhibir el proceso de producción de bioetanol. Adicionalmente se podrían emplear y evaluar diferentes estrategias para incrementar el rendimiento de etanol en el proceso de fermentación (inóculo inicial, consorcios de microorganismos fermentadores, inmovilización de células, entre otras).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afify, A., El Baroty, G., El Baz, F., Abd El Baky, H., & Murad, S. (2018). *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.01.002>
- Agustini, N., Hidayati, N., & Wibisono, S. (2019). Effect of hydrolysis time and acid concentration on bioethanol production of microalga *Scenedesmus* sp. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 308(1), 12029. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/308/1/012029>
- Alam, M., & Tanveer, M. (2020). Chapter 5 - Conversion of biomass into biofuel: a cutting-edge technology. En L. Singh, A. Yousuf, & D. Mahapatra (Eds.), *Bioreactors: Sustainable design and industrial applications in mitigation of GHG emissions* (pp. 55–74). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821264-6.00005-X>
- Amin, M., Tahir, F., Ashfaq, H., Akbar, I., Razzaque, N., Haider, M., Xu, J., Zhu, H., Wang, N., & Shahid, A. (2022). Decontamination of industrial wastewater using microalgae integrated with biotransformation of the biomass to green products. *Energy Nexus*, 6, 100089. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100089>
- Andreeva, A., Budenkova, E., Babich, O., Sukhikh, S., Dolganyuk, V., Michaud, P., & Ivanova, S. (2021). Influence of carbohydrate additives on the growth rate of microalgae biomass with an increased carbohydrate content. *Marine Drugs*, 19(7), 381. <https://doi.org/10.3390/md19070381>
- Ansari, A., Khoja, A., Nawar, A., Qayyum, M., & Ali, E. (2017). Wastewater treatment by local microalgae strains for CO<sub>2</sub> sequestration and biofuel production. *Applied Water Science*, 7(7), 4151–4158. <https://doi.org/10.1007/s13201-017-0574-9>
- Aslanbay, B., Deniz, I., Demirel, Z., Oncel, S., & Imamoglu, E. (2020). Computational fluid dynamics modelling of stirred tank photobioreactor for *Haematococcus pluvialis* production: Hydrodynamics and mixing conditions. *Algal Research*, 47,

101854. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101854>

- Azhar, S., Abdulla, R., Jambo, S., Marbawi, H., Gansau, J., Mohd, A., & Rodrigues, K. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *10*, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
- Bajpai, P. (2021a). Chemistry, types and sources of ethanol. En P. Bajpai (Ed.), *Developments in bioethanol* (pp. 27–39). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-8779-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-15-8779-5_4)
- Bajpai, P. (2021b). Ethanol markets. En P. Bajpai (Ed.), *Developments in bioethanol* (pp. 145–159). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-8779-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-15-8779-5_7)
- Bajpai, P. (2021c). General background and introduction. En P. Bajpai (Ed.), *Developments in bioethanol* (pp. 1–13). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-8779-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-8779-5_1)
- Balakrishnan, P., Shabbir, M., Siddiqi, A., & Wang, X. (2020). Current status and future prospects of renewable energy: A case study. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, *42*(21), 2698–2703. <https://doi.org/10.1080/15567036.2019.1618983>
- Barati, B., Gan, S., Lim, P., Beardall, J., & Phang, S. (2019). Green algal molecular responses to temperature stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, *41*(2), 26. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2813-1>
- Bentahar, J., Doyen, A., Beaulieu, L., & Deschênes, J.-S. (2019). Acid whey permeate: An alternative growth medium for microalgae *Tetradismus obliquus* and production of  $\beta$ -galactosidase. *Algal Research*, *41*, 101559. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101559>
- Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, *6*(5), 3. <https://doi.org/10.3390/foods6050033>
- Boumaiza, M., Colarusso, A., Parrilli, E., Garcia, E., Casillo, A., Arís, A., Corsaro,

- M., Picone, D., Leone, S., & Tutino, M. (2018). Getting value from the waste: recombinant production of a sweet protein by *Lactococcus lactis* grown on cheese whey. *Microbial Cell Factories*, *17*(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0974-z>
- Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić, M., Komes, D., Novak, S., & Šantek, B. (2018). Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. *Food Technology and Biotechnology*, *56*(3), 289–311. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>
- Callegari, A., Bolognesi, S., Cecconet, D., & Capodaglio, A. (2020). Production technologies, current role, and future prospects of biofuels feedstocks: A state-of-the-art review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *50*(4), 384–436. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1629801>
- Carneiro, M., Ranglová, K., Lakatos, G., Câmara, J., Grivalský, T., Kozhan, D., Toribio, A., Moreno, J., Otero, A., Varela, J., Malcata, X., Suárez, F., Acien, F., Molnár, Z., Ördög, V., & Masojídek, J. (2021). Growth and bioactivity of two chlorophyte (*Chlorella* and *Scenedesmus*) strains co-cultured outdoors in two different thin-layer units using municipal wastewater as a nutrient source. *Algal Research*, *56*, 102299. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102299>
- Carnovale, G., Rosa, F., Shapaval, V., Dzurendova, S., Kohler, A., Wicklund, T., Horn, S., Barbosa, M., & Skjånes, K. (2021). Starch rich *Chlorella vulgaris*: high-throughput screening and up-scale for tailored biomass production. *Applied Sciences*, *11*(19), 9025. <https://doi.org/10.3390/app11199025>
- Chai, W., Tan, W., Halimatul, H., Gupta, V., Ho, S., & Show, P. (2021). Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: A review. *Environmental Pollution*, *269*, 116236. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116236>
- Cheng, D., Li, D., Yuan, Y., Zhou, L., Li, X., Wu, T., Wang, L., Zhao, Q., Wei, W., & Sun, Y. (2017). Improving carbohydrate and starch accumulation in *Chlorella* sp. AE10 by a novel two-stage process with cell dilution. *Biotechnology for*

*Biofuels*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0753-9>

- Chisti, Y. (2020). Chapter 1 - Microalgae biotechnology: A brief introduction. En E. Jacob, M. Maroneze, M. Queiroz, & L. Zepka (Eds.), *Handbook of microalgae-based processes and products* (pp. 3–23). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00001-4>
- Chng, L. M., Chan, D. J. C., & Lee, K. T. (2016). Sustainable production of bioethanol using lipid-extracted biomass from *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of Cleaner Production*, 130, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.02.016>
- Chng, L. M., Lee, K. T., & Chan, D. J. C. (2017). Synergistic effect of pretreatment and fermentation process on carbohydrate-rich *Scenedesmus dimorphus* for bioethanol production. *Energy Conversion and Management*, 141, 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.10.026>
- Chowdury, K., Nahar, N., & Deb, U. (2020). The growth factors involved in microalgae cultivation for biofuel production: A review. *Computational Water, Energy, and Environmental Engineering*, 9(4), 185–215. <https://doi.org/10.4236/CWEEE.2020.94012>
- Christaki, E., Florou, P., & Bonos, E. (2011). Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(8), 794–799. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.582460>
- Ciurli, A., Modeo, L., Pardossi, A., & Chiellini, C. (2021). Multidisciplinary integrated characterization of a native *Chlorella*-like microalgal strain isolated from a municipal landfill leachate. *Algal Research*, 54, 102202. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102202>
- Colling, B., Bonomi, A., & Maciel, R. (2018). Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 1376–1392. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.063>
- Constantino, A., Rodrigues, B., Leon, R., Barros, R., & Raposo, S. (2021). Alternative chemo-enzymatic hydrolysis strategy applied to different microalgae species for

bioethanol production. *Algal Research*, 56, 102329.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102329>

Correa, D., Beyer, H., Fargione, J., Hill, J., Possingham, H., Thomas, S., & Schenk, P. (2019). Towards the implementation of sustainable biofuel production systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 250–263.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.03.005>

de Farias, C., Barbera, E., & Bertucco, A. (2019). Chapter 17 - Biorefinery as a promising approach to promote ethanol industry from microalgae and cyanobacteria. En R. Ray & S. Ramachandran (Eds.), *Bioethanol production from food crops* (pp. 343–359). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813766-6.00017-5>

de Farias, C., Meneghello, D., & Bertucco, A. (2018). A systematic study regarding hydrolysis and ethanol fermentation from microalgal biomass. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 172–182.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.02.016>

de Farias, C., Meneghello, D., de Souza, A., & Bertucco, A. (2020). Pretreatment of microalgal biomass to improve the enzymatic hydrolysis of carbohydrates by ultrasonication: Yield vs energy consumption. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 606–613. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.09.007>

de Farias, C., Sforza, E., & Bertucco, A. (2018). Stability of carbohydrate production in continuous microalgal cultivation under nitrogen limitation: effect of irradiation regime and intensity on *Tetradesmus obliquus*. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 261–270. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1252-x>

Debnath, C., Bandyopadhyay, T., Bhunia, B., Mishra, U., Narayanasamy, S., & Muthuraj, M. (2021). Microalgae: Sustainable resource of carbohydrates in third-generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 150, 111464. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111464>

Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., & Sukhikh, S. (2020). A promising source of valuable bioproducts.

*Biomolecules*, 10(8), 1153. <https://doi.org/10.3390/biom10081153>

- Duran, S., Kumar, P., & Sandhu, S. (2021). A review on microalgae strains, cultivation, harvesting, biodiesel conversion and engine implementation. *Biofuels*, 12(1), 91–102. <https://doi.org/10.1080/17597269.2018.1457314>
- Edeh, I. (2020). Bioethanol production: An overview. En F. Inambao (Ed.), *Bioethanol technologies* (pp. 1–22). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94895>
- El-Souod, G., Morsy, E., Hassan, L., & El-Sheekh, M. (2021). Efficient saccharification of the microalga *Chlorella vulgaris* and its conversion into ethanol by fermentation. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 45(3), 767–774. <https://doi.org/10.1007/s40995-021-01097-1>
- Fabris, M., Abbriano, R., Pernice, M., Sutherland, D., Commault, A., Hall, C., Labeeuw, L., McCauley, J., Kuzhiuparambil, U., Ray, P., Kahlke, T., & Ralph, P. (2020). Emerging technologies in algal biotechnology: toward the establishment of a sustainable, algae-based bioeconomy. *Frontiers in Plant Science*, 11, 279. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00279>
- Figuerola, G., Bermejo, E., Pittman, J., & Constantinos, T. (2021). *Microalgae strain catalogue: A strain selection guide for microalgae users*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.3780067>
- Fleurence, J. (2021). *Microalgae: From future food to cellular factory*. John Wiley & Sons.
- Ganesan, R., Manigandan, S., Samuel, M., Shanmuganathan, R., Brindhadevi, K., Lan, N., Duc, P., & Pugazhendhi, A. (2020). A review on prospective production of biofuel from microalgae. *Biotechnology Reports*, 27, e00509. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00509>
- Gielen, D., Boshell, F., Saygin, D., Bazilian, M., Wagner, N., & Gorini, R. (2019). The role of renewable energy in the global energy transformation. *Energy Strategy Reviews*, 24, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.esr.2019.01.006>

- Girard, J., Roy, M., Hafsa, M., Gagnon, J., Fauchoux, N., Heitz, M., Tremblay, R., & Deschênes, J. (2014). Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research*, 5(1), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.03.002>
- González, C., García, F., Jawiarczyk, N., Fernández, J., & Acién, F. (2020). Valorization of microalgae and energy resources. En B. Llamas, M. Ortega, & E. Sillero (Eds.), *Sustainable mobility* (pp. 61–76). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90072>
- González, J., Aparicio, S., Pachés, M., Borrás, L., & Seco, A. (2022). Comprehensive assessment of the microalgae-nitrifying bacteria competition in microalgae-based wastewater treatment systems: Relevant factors, evaluation methods and control strategies. *Algal Research*, 61, 102563. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102563>
- Gour, R., Chawla, A., Singh, H., Chauhan, R., & Kant, A. (2016). Characterization and screening of native *Scenedesmus* sp. isolates suitable for biofuel feedstock. *PloS One*, 11(5), e0155321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155321>
- Hassan, A., Ilyas, S., Jalil, A., & Ullah, Z. (2021). Monetization of the environmental damage caused by fossil fuels. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(17), 21204–21211. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12205-w>
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., & García, M. (2015). Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, 262, 939–945. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.049>
- Ho, S., Huang, S., Chen, C., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, 135, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>
- Hoegh, O., Jacob, D., Taylor, M., Bindi, M., Brown, S., Camilloni, I., Diedhiou, A., Djalante, R., Ebi, K., Engelbrecht, F., Guiot, J., Hijjoka, Y., Mehrotra, S., Payne,



- A., Seneviratne, S., Thomas, A., Warren, R., & Zhou, G. (2018). Special report on global warming of 1.5 °C - Chapter 3: Impacts of 1.5° C global warming on natural and human systems. En *World Meteorological Organization Technical Document*. <https://www.ipcc.ch/sr15/chapter/chapter-3/>
- Huang, X., & Reardon, K. (2022). Strategies to achieve high productivity, high conversion, and high yield in yeast fermentation of algal biomass hydrolysate. *Engineering in Life Sciences*, 22(3–4), 119–131. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100095>
- IEA. (2020). *Tracking transport 2020*. <https://www.iea.org/reports/tracking-transport-2020>
- IRENA. (2019). *Global energy transformation: A roadmap to 2050*. <https://www.irena.org/publications/2019/Apr/Global-energy-transformation-A-roadmap-to-2050-2019Edition>
- Ismail, M., Ismail, G., & El-Sheekh, M. (2020). Potential assessment of some micro- and macroalgal species for bioethanol and biodiesel production. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/15567036.2020.1758853>
- Jeswani, H., Chilvers, A., & Azapagic, A. (2020). Environmental sustainability of biofuels: a review. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 476(2243), 20200351. <https://doi.org/10.1098/rspa.2020.0351>
- Jiang, L., Li, Y., & Pei, H. (2021). Algal–bacterial consortia for bioproduct generation and wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 149, 111395. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111395>
- Karimi, K., & Chisti, Y. (2017). Bioethanol production and technologies. En M. Abraham (Ed.), *Encyclopedia of sustainable technologies* (pp. 273–284). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10111-3>
- Khan, M., Bonifacio, S., Clowes, J., Foulds, A., Holland, R., Matthews, J., Percival,

- C., & Shallcross, D. (2021). Investigation of biofuel as a potential renewable energy source. *Atmosphere*, 12(10), 1289. <https://doi.org/10.3390/atmos12101289>
- Kishi, M., Kawai, M., & Toda, T. (2015). Heterotrophic utilization of ethylene glycol and propylene glycol by *Chlorella protothecoides*. *Algal Research*, 11, 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.020>
- Koyande, A., Chew, K., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D., & Show, P. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>
- Kumar, A., & Singh, J. (2021). Microalgae II: Cell structure, nutrition and metabolism. En A. Kumar & J. Singh (Eds.), *Microalgae in waste water remediation* (pp. 21–40). CRC Press.
- Lakatos, G., Ranglová, K., Manoel, J., Grivalský, T., Kopecký, J., & Masojídek, J. (2019). Bioethanol production from microalgae polysaccharides. *Folia Microbiologica*, 64(5), 627–644. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00732-0>
- Lee, S., Cho, J., Chang, Y., & Oh, Y. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244, 1317–1328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>
- Liu, F., Short, M., Álvarez, J., Guo, X., Duan, J., Saint, C., Chen, G., & Hou, L. (2020). Environmental life cycle assessment of lignocellulosic ethanol-blended fuels: A case study. *Journal of Cleaner Production*, 245, 118933. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118933>
- Lortou, U., & Gkelis, S. (2019). Polyphasic taxonomy of green algae strains isolated from Mediterranean freshwaters. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 26(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40709-019-0105-y>
- Mat, N., Khoo, K., Chew, K., Show, P., Chen, W.-H., & Nguyen, H. (2020). Sustainability of the four generations of biofuels – A review. *International*

*Journal of Energy Research*, 44(12), 9266–9282. <https://doi.org/10.1002/er.5557>

- Menegazzo, M., & Fonseca, G. (2019). Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 87–107. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.064>
- Miah, R., Siddiqa, A., Chakraborty, U., Tuli, J., Barman, N., Uddin, A., Aziz, T., Sharif, N., Dey, S., Yamada, M., & Talukder, A. (2022). Development of high temperature simultaneous saccharification and fermentation by thermosensitive *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Scientific Reports*, 12(1), 3630. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07589-3>
- Miazek, K., Kratky, L., Sulc, R., Jirout, T., Aguedo, M., Richel, A., & Goffin, D. (2017). Effect of organic solvents on microalgae growth, metabolism and industrial bioproduct extraction: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1429. <https://doi.org/10.3390/ijms18071429>
- Milledge, J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9214-7>
- Montero, Z., Vázquez, M., Navarro, F., Fuentes, J., Bermejo, E., Garbayo, I., Vilchez, C., & Cuaresma, M. (2018). Chemically-induced production of anti-inflammatory molecules in microalgae. *Marine Drugs*, 16(12), 478. <https://doi.org/10.3390/md16120478>
- Morais, W., Gorgich, M., Corrêa, P., Martins, A., Mata, T., & Caetano, N. (2020). Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. *Aquaculture*, 528, 735562. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735562>
- Morançais, M., Mouget, J., & Dumay, J. (2018). Chapter 7 - Proteins and pigments. En I. Levine & J. Fleurence (Eds.), *Microalgae in health and disease prevention* (pp. 145–175). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00007-4>

- Mutanda, T., Naidoo, D., Bwapwa, J., & Anandraj, A. (2020). Biotechnological applications of microalgal oleaginous compounds: current trends on microalgal bioprocessing of products. *Frontiers in Energy Research*, 8, 598803. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.598803>
- Nair, A., & Chakraborty, S. (2020). Synergistic effects between autotrophy and heterotrophy in optimization of mixotrophic cultivation of *Chlorella sorokiniana* in bubble-column photobioreactors. *Algal Research*, 46, 101799. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101799>
- Nanda, S., Rana, R., Sarangi, P., Dalai, A., & Kozinski, J. (2018). A broad introduction to first-, second-, and third-generation biofuels. En P. Sarangi, S. Nanda, & P. Mohanty (Eds.), *Recent advancements in biofuels and bioenergy utilization* (pp. 1–25). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1307-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1307-3_1)
- Our World in Data. (2020, abril 13). *Fossil fuels*. Years of fossil fuel reserves left. <https://ourworldindata.org/fossil-fuels>
- Phwan, C., Chew, K., Sebayang, A., Ong, H., Ling, T., Malek, M., Ho, Y., & Show, P. (2019). Effects of acids pre-treatment on the microbial fermentation process for bioethanol production from microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1533-5>
- Pillard, D., & DuFresne, D. (1999). Toxicity of formulated glycol deicers and ethylene and propylene glycol to *Lactuca sativa*, *Lolium perenne*, *Selenastrum capricornutum*, and *Lemna minor*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(1), 29–35. <https://doi.org/10.1007/s002449900486>
- Poddar, N., Sen, R., & Martin, G. (2018). Glycerol and nitrate utilisation by marine microalgae *Nannochloropsis salina* and *Chlorella* sp. and associated bacteria during mixotrophic and heterotrophic growth. *Algal Research*, 33, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.002>
- Rahman, K. (2020). Food and high value products from microalgae: market opportunities and challenges. En Mohammad Alam, J. Xu, & Z. Wang (Eds.), *Microalgae biotechnology for food, health and high value products* (pp. 3–27).

Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_1)

- Rajput, A., Singh, D., Khattar, J., Swatch, G., & Singh, Y. (2021). Evaluation of growth and carotenoid production by a green microalga *Scenedesmus quadricauda* PUMCC 4.1.40. under optimized culture conditions. *Journal of Basic Microbiology*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100285>
- Rashid, N., Lee, B., & Chang, Y. (2019). Recent trends in microalgae research for sustainable energy production and biorefinery applications. En M. A. Alam & Z. Wang (Eds.), *Microalgae biotechnology for development of biofuel and wastewater treatment* (pp. 3–20). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_1)
- Ray, A., Nayak, M., & Ghosh, A. (2022). A review on co-culturing of microalgae: A greener strategy towards sustainable biofuels production. *Science of The Total Environment*, 802, 149765. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149765>
- Rivera, A., Movalia, S., Pitt, H., & Larsen, K. (2021). *Preliminary 2020 global greenhouse gas emissions estimates*. Rhodium Group. <https://rhg.com/research/preliminary-2020-global-greenhouse-gas-emissions-estimates/>
- Rivera, L., Bolonio, D., Mazadiego, L. F., Naranjo, S., & Escobar, K. (2020). Long-term forecast of energy and fuels demand towards a sustainable road transport sector in ecuador (2016–2035): A leap model application. *Sustainability*, 12(2), 472. <https://doi.org/10.3390/su12020472>
- Roth, M., Gallaher, S., Westcott, D., Iwai, M., Louie, K., Mueller, M., Walter, A., Foflonker, F., Bowen, B., Ataii, N., Song, J., Chen, J., Blaby, C., Larabell, C., Auer, M., Northen, T., Merchant, S., & Niyogi, K. (2019). Regulation of oxygenic photosynthesis during trophic transitions in the green alga *Chromochloris zofingiensis*. *The Plant Cell*, 31(3), 579–601. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00742>
- Sánchez, L., Sanz, M., Do Nascimento, M., Salerno, G., & Curatti, L. (2017). Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the

- production of bioethanol. *Algal Research*, 22, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.021>
- SEI, IISD, ODI, E3G, & UNEP. (2020). *The production gap report: 2020 special report*. <https://productiongap.org/2020report/>
- Seo, H., Kim, H., Lee, O., Ha, J., Lee, H., & Jung, K. (2009). Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 285–292. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0497-4>
- Sepulveda, C., Gómez, C., Bahraoui, N., & Acién, G. (2019). Comparative evaluation of microalgae strains for CO<sub>2</sub> capture purposes. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 30, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.02.004>
- Shahid, A., Khan, F., Ahmad, N., Farooq, M., & Mehmood, M. (2020). Microalgal carbohydrates and proteins: Synthesis, extraction, applications, and challenges. En M. Alam, J. Xu, & Z. Wang (Eds.), *Microalgae biotechnology for food, health and high value products* (pp. 433–468). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_14)
- Sharma, S., Varghese, E., Arora, A., Singh, K., Singh, S., Nain, L., & Paul, D. (2018). Augmenting pentose utilization and ethanol production of native *Saccharomyces cerevisiae* LN using medium engineering and response surface methodology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 132. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00132>
- Shurtz, B., Wood, B., & Quinn, J. (2017). Nutrient resource requirements for large-scale microalgae biofuel production: Multi-pathway evaluation. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 19, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2016.11.003>
- Silva, A., Cavalcanti, V., Porto, A., Gama, W., Brandão, R., & Bezerra, R. (2020). The green microalgae *Tetradismus obliquus* (*Scenedesmus acutus*) as lectin source in the recognition of ABO blood type: purification and characterization. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 103–110. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01923->

- Sriariyanun, M., Mutrakulcharoen, P., Tapaamorndech, S., Cheenkachorn, K., & Rattanaporn, K. (2019). A rapid spectrophotometric method for quantitative determination of ethanol in fermentation products. *Oriental Journal of Chemistry*, *35*(2), 744.
- Tan, J., Lee, S., Chew, K., Lam, M., Lim, J., Ho, S., & Show, P. (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, *11*(1), 116–129. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626>
- Tan, X., Lam, M., Uemura, Y., Lim, J., Wong, C., & Lee, K. (2018). Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *26*(1), 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2017.08.010>
- Toledo, A., Garduño, G., Campos, J., Martínez, M., & Morales, M. (2018). Characterization of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for high-energy molecules accumulation: deeper insight into biotechnological potential of strains of the same species. *Biotechnology Reports*, *17*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.11.009>
- Toyama, T., Hanaoka, T., Yamada, K., Suzuki, K., Tanaka, Y., Morikawa, M., & Mori, K. (2019). Enhanced production of biomass and lipids by *Euglena gracilis* via co-culturing with a microalga growth-promoting bacterium, *Emticicia* sp. EG3. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1544-2>
- Tse, T., Wiens, D., & Reaney, M. (2021). Production of bioethanol—A review of factors affecting ethanol yield. *Fermentation*, *7*(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation7040268>
- Turiel, S., Garrido, J., Gómez, C., Ación, F., Carretero, L., & Blanco, S. (2021). A polyphasic characterisation of *Tetradesmus almeriensis* sp. nov. (Chlorophyta: Scenedesmaceae). *Processes*, *9*(11), 2006. <https://doi.org/10.3390/pr9112006>

- Turner, T., Kim, H., Kong, I., Liu, J., Zhang, G., & Jin, Y. (2018). Engineering and evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to produce biofuels and chemicals. En H. Zhao & A. Zeng (Eds.), *Synthetic Biology – Metabolic Engineering* (pp. 175–215). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/10\\_2016\\_22](https://doi.org/10.1007/10_2016_22)
- United Nations. (2021). *Leveraging energy action for advancing the sustainable development goals*. <https://sdgs.un.org/publications/report-2021-sdg7-tag-policy-briefs-leveraging-energy-action-advancing-sustainable>
- van Asselt, H. (2021). Governing fossil fuel production in the age of climate disruption: Towards an international law of “leaving it in the ground”. *Earth System Governance*, 9(100118). <https://doi.org/10.1016/j.esg.2021.100118>
- Van Krimpen, M., Bikker, P., Van der Meer, I., Van der Peet, C., & Vereijken, J. (2013). *Cultivation, processing and nutritional aspects for pigs and poultry of European protein sources as alternatives for imported soybean products*. Wageningen UR Livestock Research. <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/437524>
- Velazquez, J., Rodríguez, R., Colla, L., Sáenz, A., Cervantes, D., Aguilar, C., Fernandes, B., & Ruiz, H. (2018). Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: A review. *Biofuel Research Journal*, 5(1), 780–791. <https://doi.org/10.18331/BRJ2018.5.1.5>
- Vidotti, A., Riaño, D., Mattiello, L., Giraldi, L., Winck, F., & Franco, T. (2020). Analysis of autotrophic, mixotrophic and heterotrophic phenotypes in the microalgae *Chlorella vulgaris* using time-resolved proteomics and transcriptomics approaches. *Algal Research*, 51, 102060. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102060>
- Wallace, J. (2000). Increasing agricultural water use efficiency to meet future food production. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 82(1), 105–119. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00220-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00220-6)
- Wang, X., Fosse, H., Li, K., Chauton, M., Vadstein, O., & Reitan, K. (2019). Influence of nitrogen limitation on lipid accumulation and EPA and DHA content in four



marine microalgae for possible use in aquafeed. *Frontiers in Marine Science*, 6(95). <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00095>

Wolkers, H., Barbosa, M., Kleinegris, D., Bosma, R., & Wijffels, R. (2011). *Microalgae: the green gold of the future? Large-scale sustainable cultivation of microalgae for the production of bulk commodities*. Wageningen UR-Food & Biobased Research. <https://edepot.wur.nl/170781>

Yong, W., Sim, K., Poong, S., Wei, D., Phang, S., & Lim, P. (2019). Physiological and metabolic responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to nickel toxicity and warming. *3 Biotech*, 9(8), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1848-8>

Yukesh, R., Sivashanmugham, P., Kavitha, S., & Rajesh, J. (2020). Chapter 3 - Valorization of food waste for bioethanol and biobutanol production. En J. Banu, G. Kumar, M. Gunasekaran, & S. Kavitha (Eds.), *Food waste to valuable resources* (pp. 39–73). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818353-3.00003-1>

Zentou, H., Abidin, Z., Yunus, R., Awang, D., & Korelskiy, D. (2019). Overview of alternative ethanol removal techniques for enhancing bioethanol recovery from fermentation broth. *Processes*, 7(7), 458. <https://doi.org/10.3390/pr7070458>

Zhan, J., Rong, J., & Wang, Q. (2017). Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8505–8517. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.12.021>

Zhukovskiy, Y., Batueva, D., Buldysko, A., Gil, B., & Starshaia, V. (2021). Fossil energy in the framework of sustainable development: analysis of prospects and development of forecast scenarios. *Energies*, 14(17), 5268. <https://doi.org/10.3390/en14175268>

## ANEXOS

### Anexo A. Análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey

**Tabla 7.** Análisis de varianza del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre el peso seco

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Fuente de carbono	2	1.41776	0.708878	1045.89	<0.0001
Error	6	0.00407	0.000678		
Total	8	1.42182			

**Tabla 8.** Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre el peso seco

Fuente de carbono	N	Media	Agrupación
CO <sub>2</sub> + LS	3	1.3833	A
CO <sub>2</sub> + EG	3	0.5900	B
CO <sub>2</sub>	3	0.5000	C

**Tabla 9.** Análisis de varianza del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre el número de células

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Fuente de carbono	2	$8.64889 \times 10^{14}$	$4.32444 \times 10^{14}$	741.33	<0.0001
Error	6	$3.50000 \times 10^{12}$	$5.83333 \times 10^{11}$		
Total	8	$8.68389 \times 10^{14}$			

**Tabla 10.** Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre el número de células

Fuente de carbono	N	Media	Agrupación
CO <sub>2</sub> + LS	3	42166667	A
CO <sub>2</sub> + EG	3	22833333	B
CO <sub>2</sub>	3	20166667	C

**Tabla 11.** *Análisis de varianza del efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la liberación de azúcares reductores*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Concentración H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	0.096185	0.032062	440.50	<0.0001
Error	8	0.000582	0.000073		
Total	11	0.096768			

**Tabla 12.** *Comparación de medias de Tukey del efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la liberación de azúcares reductores*

<b>Concentración H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
2.0%	3	0.27058	A
1.0%	3	0.19464	B
0.5%	3	0.07050	C
0.0%	3	0.05389	C

**Tabla 13.** *Análisis de varianza del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la liberación de azúcares reductores*











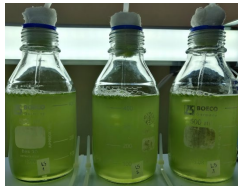









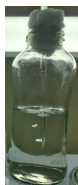







<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Fuente de carbono	2	0.029723	0.014862	191.80	<0.0001
Error	6	0.000465	0.000077		
Total	8	0.030188			

















**Tabla 14.** *Comparación de medias de Tukey del efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo sobre la liberación de azúcares reductores*

<b>Fuente de carbono</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
CO <sub>2</sub> + EG	3	0.30152	A
CO <sub>2</sub>	3	0.22964	B
CO <sub>2</sub> + LS	3	0.16076	C

## Anexo B. Evaluación de la generación de biomasa microalgal

**Tabla 15.** Cultivo de consorcio de microalgas durante el periodo de evaluación de la generación de biomasa microalgal empleando diferentes fuentes de carbono

Tiempo de cultivo	Fuente de carbono en el medio de cultivo			
	Control	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> + LS	CO <sub>2</sub> + EG
Día 0				
Día 1				
Día 2				
Día 3				
Día 4				
Día 8				
Día 9				

Tiempo de cultivo	Fuente de carbono en el medio de cultivo			
	Control	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> + LS	CO <sub>2</sub> + EG
Día 10				
Día 11				
Día 14				
Día 15				

*Nota.* Se presentan fotografías tomadas durante la evaluación de la generación de biomasa microalgal empleando diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo: CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> + LS (lactosuero), y CO<sub>2</sub> + EG (etilenglicol).

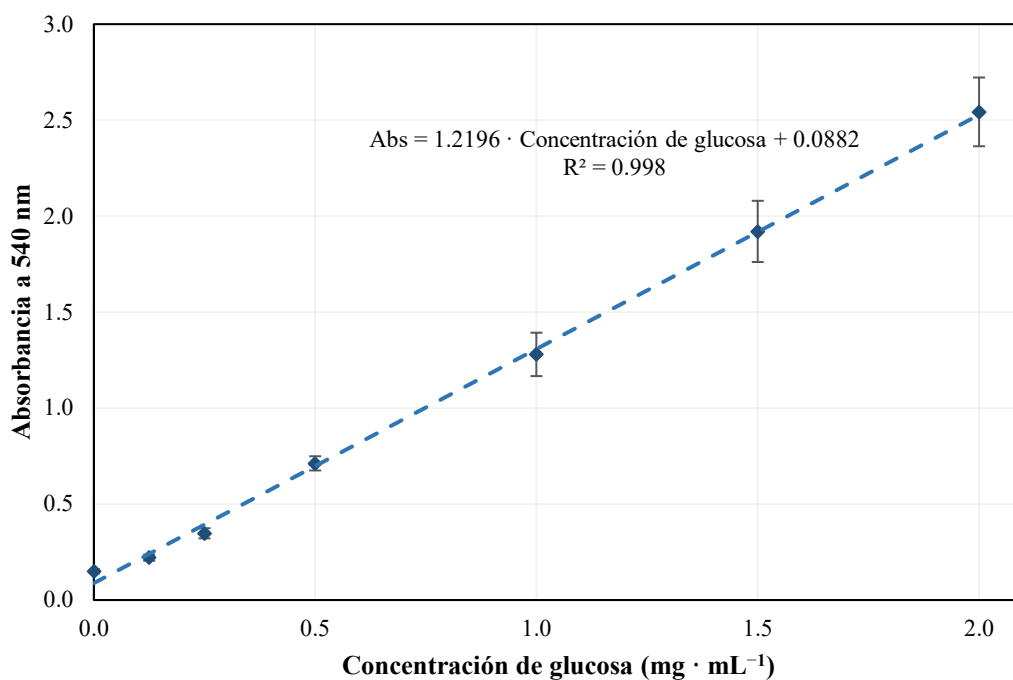
### Anexo C. Determinación de la concentración de azúcares reductores



**Figura 11.** Determinación de la concentración de azúcares reductores mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Se presenta la reacción con las diluciones de glucosa (entre 0.0 y 2.0 mg·mL<sup>-1</sup>) en una placa de 96 pocillos para la elaboración de la curva de calibración.

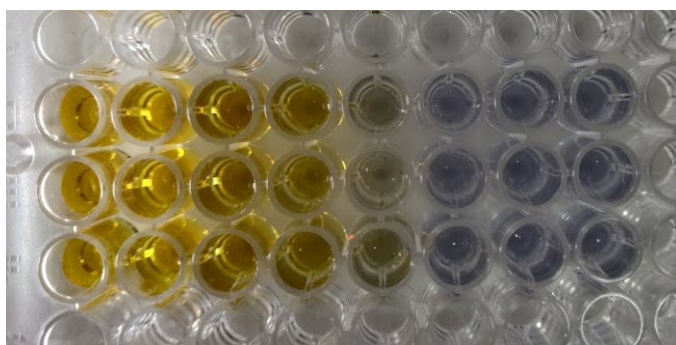




**Figura 12.** *Curva estándar de glucosa*

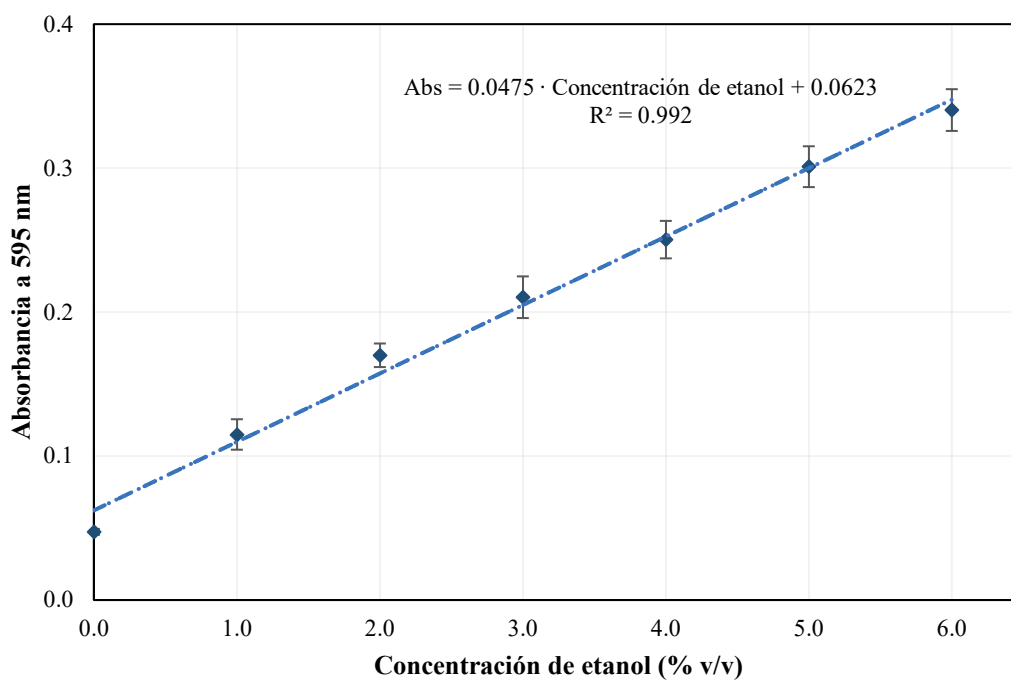
Se presenta la curva estándar utilizada para la determinación de azúcares reductores que representa la absorbancia a 540 nm vs. la concentración de glucosa ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) construida a partir de una regresión lineal. Las líneas sobre cada punto representan la desviación estándar respecto a la media. Además, se muestra la ecuación de la recta con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.998$ .

#### **Anexo D. Determinación de la concentración etanol**



**Figura 13.** *Determinación de la concentración de etanol mediante el método de oxidación del dicromato de potasio*

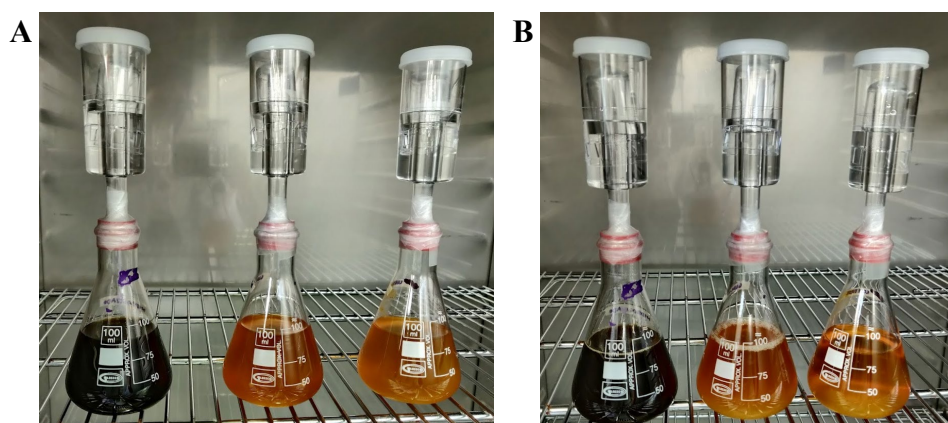
Se presenta la reacción con las diluciones de etanol en un rango entre 0.0 y 6.0% v/v en una placa de 96 pocillos para la elaboración de la curva de calibración.



**Figura 14.** *Curva estándar de etanol*

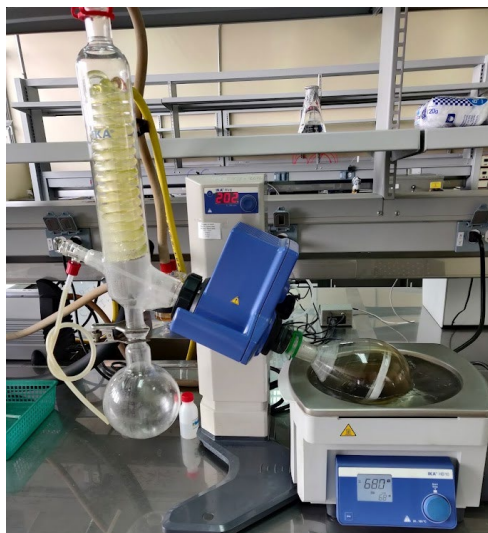
Se presenta la curva estándar utilizada para la determinación de etanol que representa la absorbancia a 595 nm vs. la concentración de etanol (% v/v), construida a partir de una regresión lineal. Las líneas sobre cada punto representan la desviación estándar respecto a la media. Además, se muestra la ecuación de la recta con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.992$ .

## Anexo E. Obtención de bioetanol



**Figura 15.** *Fermentación de azúcares reductores*

Se muestran los medios de fermentación (de izquierda a derecha): hidrolizado, glucosa y control. (A) Inicio de la fermentación (B) Fin de la fermentación (96 horas).



**Figura 16.** *Destilación de los caldos de fermentación*

Se muestran el sistema empleado para la obtención de bioetanol a partir de la destilación de los caldos de fermentación empleando el evaporador rotatorio.