



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**Estandarización del proceso para la  
obtención de bioetanol a partir de  
biomasa microalgal cultivada en  
agua residual**

**TESIS**

Que para obtener el título de

**Ingeniera Ambiental**

**P R E S E N T A**

Daira Gillel Aguirre Mota

**DIRECTORA DE TESIS**

M. C. Isaura Yáñez Noguez



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2026



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Titulación con trabajo escrito)**



De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado ESTANDARIZACION DEL PROCESO PARA LA OBTENCION DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL que presenté para obtener el título de INGENIERA AMBIENTAL es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación.

---

**DAIRA GILLEL AGUIRRE MOTA**  
Número de cuenta: 317296196

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Enrique César Valdez  
Vocal: M. C. Isaura Yáñez Noguez  
Secretario: M. I. Alba Beatriz Vázquez González  
1<sup>er</sup>. Suplente: M. I. Marisol Alfonso Romero  
2<sup>do</sup>. Suplente: I.Q. Claudia Julieta Espinosa Pérez

Lugar donde se realizó la tesis:

INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM.

**DIRECTORA DE TESIS:**

---

M. C. Isaura Yáñez Noguez



**El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015**

**No. de Certificado CMX C SGC 285 2023, válido en el período del 12 de octubre de 2023 al 11 de octubre de 2026**

La presente tesis fue desarrollada para el cumplimiento de los objetivos del proyecto de los grupos Interdisciplinarios de Investigación (GII): "Intensificación de los procesos para la obtención de biocompuestos a partir de agua residual" – Proyecto interno 3307 del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

**Asesor técnico:**

**Dr. Ignacio Monje Ramírez**, asesoría especializada en procesos bioquímicos y análisis fisicoquímicos.

## AGRADECIMIENTOS

A mi mami, Diana, y a mi papi, Enrique, por el infinito amor con el que me han criado y apoyado para cumplir este sueño. Por entregar su vida y su trabajo, día tras día, para que yo pudiera alcanzar mis metas y creer que ningún sueño es demasiado grande. No estaría aquí sin ustedes. Con todo mi corazón gracias. Los amo.

A Berit, mi hermana, la mejor compañera de vida y de aventuras que pude pedir. Por creer en mí más que nadie y motivarme cada día a ser una mejor versión de mí. Gracias a ti sé que pase lo que pase jamás estaré sola.

A Misael, el sol de mis días, por hacer cada momento mejor, por estar a mi lado y por cuidarme. Gracias por ayudarme a recordar quién soy en los momentos en que me sentí perdida.

A Candy, Sugar y Honey por sus abrazos y sus patitas que siempre me acompañaron en los momentos difíciles. Por ser mi lugar seguro.

En memoria de mis abuelitos Teresita y Alejandro, Quetita y Gabriel, por ser un gran ejemplo de amor, sabiduría, esperanza y fortaleza. Todas sus enseñanzas las llevo conmigo siempre.

A mi familia, que aun estando lejos, siempre estuvo presente con su apoyo y sus buenos consejos.

A mis amigos Cristian, Fernanda, Noely y Malinalli que hicieron de mi vida universitaria algo memorable. Gracias por enseñarme el valioso significado de la amistad. Los llevo en el alma por siempre.

A la Maestra Isaura, por quien guardo una profunda admiración y un gran cariño, por brindarme la oportunidad de estar en el mundo de la investigación. Gracias por guiarme y creer en mí.

A Sandra Camargo y Ana Cristina por las valiosas enseñanzas y la paciencia que permitieron la realización de este trabajo.

A Alexis por ser un gran equipo y un gran amigo. Por hacer tan divertido el tiempo en el laboratorio.

A Sharon, Alondra, Leslie y César por su colaboración y la dedicación de su tiempo y sus conocimientos a este proyecto.

A mis compañeros del cubículo 410 por hacer de mi estadía en el Instituto de Ingeniería algo tan especial, por su compañía y lo mucho que aprendí de todos ustedes Lidia, Adriana, Mauricio, Arturo, Enrique, Pablo, Sandra, Carlos, Alfonso, Alejandra y Daniela.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ingeniería por permitir mi formación como profesionista y rodearme de profesores, compañeros y amigos que cambiaron mi vida.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN	1
I. MARCO TEÓRICO	4
I.1. Biocombustibles	4
I.2. Microalgas en la producción de biocombustibles	6
I.3. Tratamiento de aguas residuales a partir de microalgas	11
I.4. Composición y función de los carbohidratos en microalgas	13
I.5. Pretratamiento de biomasa microalgal con hidrólisis ácida	15
I.6. Fermentación alcohólica de hidrolizado de microalgas	18
I.7. Estandarización del proceso de obtención de bioetanol	22
I.8. Sostenibilidad y economía circular en la producción de bioetanol a partir de microalgas cultivadas en agua residual	23
II. ANTECEDENTES	26
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	31
III.1. Objetivo general	31
III.2. Objetivos específicos	31
III.3. Hipótesis	31
IV. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	32
IV.1. Metodología general para la obtención de bioetanol	32
IV.2. Métodos analíticos de cuantificación	33
IV.3. Cultivo de microalgas	34
IV.4. Cosecha y secado de biomasa microalgal	36
IV.5. Hidrólisis ácida	36
IV.6. Reactivación de la levadura <i>C. jadinii</i> y preparación del inóculo para la fermentación alcohólica	38
IV.7. Fermentación alcohólica.	41
IV.8. Determinación de bioetanol	43
IV.9. Pruebas complementarias	44
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
V.1. Extracción de carbohidratos totales en la hidrólisis ácida	47
V.2. Sacarificación en la hidrólisis ácida	48
V.3. Agotamiento de azúcares reductores	50
V.4. Obtención de bioetanol	61

V.5. Consistencia y repetibilidad de los resultados experimentales	67
VI. CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXOS	86
Anexo A. Método de cuantificación de carbohidratos totales (CHO)	86
Anexo B. Método de cuantificación de azúcares reductores (DNS)	88
Anexo C. Preparación de soluciones	90
Anexo D. Preparación de medios de cultivo	90
Anexo E. Curva de calibración para la densidad celular de acuerdo con la escala de McFarland	91
Anexo F. Curvas de calibración para la cuantificación de glucosa y etanol por HPLC	92
Anexo G. Rendimiento de producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal	92
GLOSARIO DE TÉRMINOS	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Diagrama de la metodología general para la obtención de bioetanol.</b>	33
<b>Figura 2. Reactores algales de alta tasa (HRAP) de 300 L y 1.2 m<sup>3</sup> de cultivo microalgal en agua residual</b>	35
<b>Figura 3. Biomasa microalgal para la obtención de bioetanol en proceso de secado</b>	36
<b>Figura 4. Cuarteo de la biomasa microalgal para la selección de muestras a hidrolizar</b>	37
<b>Figura 5. Preparación de muestras de biomasa microalgal sometidas a hidrólisis ácida</b>	37
<b>Figura 6. Hidrólisis ácida de biomasa microalgal en autoclave</b>	38
<b>Figura 7. Siembra por método de dilución de <i>C. jadinii</i> en cajas Petri.</b>	39
<b>Figura 8. Siembra por estría de <i>C. jadinii</i> en tubo de agar inclinado</b>	40
<b>Figura 9. Prueba de fermentación alcohólica en incubadora con agitación constante</b>	42
<b>Figura 10. Equipo de HPLC empleado para la determinación de glucosa y etanol en el Instituto de Biotecnología de la UNAM</b>	44
<b>Figura 11. Agotamiento de azúcares reductores en la primera prueba preliminar de fermentación alcohólica (PP<sub>1</sub>)</b>	52
<b>Figura 12. Agotamiento de azúcares reductores en la segunda prueba preliminar de fermentación alcohólica (PP<sub>2</sub>)</b>	52
<b>Figura 13. Agotamiento de azúcares reductores en la tercera prueba preliminar de fermentación alcohólica (PP<sub>3</sub>)</b>	53
<b>Figura 14. Agotamiento de azúcares reductores en las cinco pruebas de estandarización de fermentación alcohólica (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>)</b>	54
<b>Figura 15. Agotamiento de azúcares reductores en la primera prueba complementaria de fermentación alcohólica (PC<sub>1</sub>)</b>	56
<b>Figura 16. Agotamiento de azúcares reductores en la segunda prueba complementaria de fermentación alcohólica (PC<sub>2</sub>)</b>	58
<b>Figura 17. Agotamiento de azúcares reductores en la tercera prueba complementaria de fermentación alcohólica (PC<sub>3</sub>)</b>	60
<b>Figura 18. Agotamiento de azúcares reductores en la tercera prueba complementaria de fermentación alcohólica (PC<sub>4</sub>)</b>	60
<b>Figura 19. Agotamiento de glucosa en la tercera prueba preliminar de fermentación alcohólica (PP<sub>3</sub>)</b>	63
<b>Figura 20. Producción de bioetanol en la tercera prueba preliminar de fermentación alcohólica (PP<sub>3</sub>)</b>	63
<b>Figura 21. Curva de calibración de carbohidratos totales (CHO)</b>	87
<b>Figura 22. Curva de calibración de azúcares reductores</b>	89
<b>Figura 23. Curva de calibración para la densidad celular de acuerdo con la escala de McFarland</b>	91
<b>Figura 24. Curva de calibración para la cuantificación de glucosa por HPLC</b>	92
<b>Figura 25. Curva de calibración para la cuantificación de etanol por HPLC</b>	92

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Composición bioquímica (carbohidratos, lípidos y proteínas) de microalgas</b>	27
<b>Tabla 2. Métodos analíticos de cuantificación. Adaptado de Camargo (2024)</b>	34
<b>Tabla 3. Diluciones de la levadura concentrada medidas a 600 nm-Tercera prueba preliminar (PP<sub>3</sub>)</b>	41
<b>Tabla 4. Cálculo del inóculo para una DO<sub>600nm</sub> de 0.1 –Tercera prueba preliminar (PP<sub>3</sub>)</b>	41
<b>Tabla 5. Diseño experimental para las pruebas de fermentación alcohólica</b>	43
<b>Tabla 6. Configuración de la operación del equipo de HPLC</b>	44
<b>Tabla 7. Condiciones estandarizadas de hidrólisis ácida-Pruebas complementarias (PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub>)</b>	45
<b>Tabla 8. Condiciones estandarizadas de fermentación alcohólica-Prueba complementaria 2 (PC<sub>2</sub>)</b>	45
<b>Tabla 9. Extracción de carbohidratos totales (CHO) en las pruebas de hidrólisis ácida</b>	48
<b>Tabla 10. Dilución de azúcares reductores en el hidrolizado por ajuste de pH</b>	49
<b>Tabla 11. Sacarificación de carbohidratos totales (CHO) en azúcares reductores en las pruebas de hidrólisis ácida</b>	50
<b>Tabla 12. Azúcares reductores en las cinco pruebas de estandarización de fermentación alcohólica (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>)</b>	55
<b>Tabla 13. Agotamiento de azúcares reductores en las cinco pruebas de estandarización de fermentación alcohólica (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>)</b>	55
<b>Tabla 14. Rendimiento de la obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal</b>	65
<b>Tabla 15. Resultados de la curva de calibración de carbohidratos totales (CHO)</b>	87
<b>Tabla 16. Resultados de la curva de calibración de azúcares reductores</b>	89

## INTRODUCCIÓN

Las necesidades energéticas de la población mundial son uno de los desafíos más complejos en la actualidad, los combustibles fósiles han suplido la demanda energética durante varias décadas en un 85%. Sin embargo, el aumento poblacional, estimado en 1.5 veces mayor a la población actual para 2050 (Sajjadi et al., 2018), junto con los impactos ambientales negativos relacionados con el uso de petróleo, gas natural y carbón han generado la necesidad de explorar alternativas que garanticen la seguridad energética y, a su vez, la mitigación de la contaminación de las matrices atmosférica, hídrica y del suelo, así como una explotación sostenible de los recursos naturales en una proyección futura.

La investigación en energías renovables ha propuesto el uso de biocombustibles como una alternativa innovadora que comprende el tratamiento y uso de residuos como materia prima para la producción energética integrando un enfoque de economía circular (González et al., 2020a). Con esta propuesta se busca contribuir a la reducción del cambio climático, uno de los objetivos clave a nivel mundial de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas (2015). Sin embargo, la remediación del agua representa otro aspecto preocupante en la problemática actual, Walls et al. (2019) señala que los riesgos ambientales y de salud pública que conlleva la descarga de aguas residuales no tratadas o sin un tratamiento adecuado, 42% de las aguas residuales generadas globalmente (Organización de las Naciones Unidas, 2024), repercuten principalmente en países en vías de desarrollo donde no existe la infraestructura ni el financiamiento suficiente para lograr un tratamiento eficiente. La eutrofización que, con base en el análisis de datos del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (2016) se estima que ha afectado alrededor del 30-40% de los lagos y embalses del mundo (Zhang et al., 2021), así como la contaminación de cuerpos de agua por metales pesados son algunas de las consecuencias de esta práctica (Cai et al., 2013). Por lo tanto, desarrollar tecnología que optimice el tratamiento de aguas residuales es imperativo.

Al respecto, desde 1946 se ha investigado el tratamiento de aguas residuales con microalgas (Caldwell, 1946), si bien los primeros estudios se centraron en la mejora de la calidad del agua, se ha demostrado que las microalgas desempeñan un papel ambiental relevante en la reducción de emisiones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y que, a su vez, la biomasa de microalgas puede ser

utilizada para la generación de bioproductos de alto valor como los biocombustibles (Velásquez et al., 2024).

Las microalgas asimilan fotosintéticamente nutrientes como N y P que se encuentran generalmente en exceso en las aguas residuales y que de no ser removidos pueden causar efectos negativos al ser descargadas en cuerpos de agua. Estos nutrientes se destinan al crecimiento celular, siendo las microalgas capaces de adaptar su composición bioquímica según la disponibilidad del medio de cultivo. Adicionalmente, durante este proceso metabólico generan oxígeno y fijan CO<sub>2</sub> atmosférico que posteriormente utilizan para la síntesis de biomoléculas: carbohidratos, lípidos y proteínas (Alves et al., 2018; Jimenez & Castillo, 2021; Wang et al., 2017). A su vez, los carbohidratos acumulados en la biomasa de microalgas son sometidos a un proceso de extracción y conversión en azúcares estructuralmente simples que, a través de la fermentación alcohólica dan lugar a la producción de bioetanol.

El bioetanol es principalmente requerido en el sistema de transporte. Este sector representa el 60% del consumo global de petróleo y el 15% y 21% de las emisiones totales de gases de efecto invernadero (GEI) y CO<sub>2</sub> a la atmósfera, respectivamente (Jeswani et al., 2022; Maity & Mallick, 2022). Debido al aumento de la tasa de consumo de petróleo y los impactos ambientales y económicos negativos que conlleva, se ha planteado el uso de biocombustibles como complemento y, a largo plazo, como sustituto de los combustibles fósiles (Maity & Mallick, 2022).

Entre las principales ventajas del uso de microalgas para la producción de bioetanol se destaca que su cultivo que no requiere grandes extensiones de terreno ni el uso de tierras cultivables, no compromete la seguridad alimentaria y contribuye a evitar la contaminación del suelo y de los cuerpos de agua (Jimenez & Castillo, 2021; Sanchez et al., 2017). Así, la producción de bioetanol a partir de microalgas se ha proyectado como una alternativa exitosa y realista, destacándose por ser una tecnología renovable, ambientalmente favorable y con una perspectiva sostenible que además integra el tratamiento de aguas residuales. Se considera que, con la implementación de políticas bioenergéticas adecuadas, la generación de empleo especializado y el establecimiento de un marco regulatorio apoyado gubernamentalmente puede ser altamente escalable y superar las limitantes asociadas a su comercialización ya que, a pesar de ser una tecnología ampliamente

estudiada, en la actualidad no se ha consolidado su producción a gran escala (Hossain & Mahlia, 2019; Maity & Mallick, 2022; Nava et al., 2021; Singh et al., 2019).

Con base en la identificación de esta necesidad, el presente estudio se orienta a la optimización del ámbito operativo del proceso de obtención de bioetanol a partir de microalgas cultivadas en agua residual, mediante la estandarización de la metodología general y de las condiciones de operación. Esta aproximación se plantea como una estrategia para la reducción y control de la variabilidad del proceso, con el objetivo de alcanzar una productividad consistente y reproducible, lo que contribuiría a fortalecer la viabilidad del escalamiento de esta tecnología en una perspectiva de aplicación futura.

## I. MARCO TEÓRICO

### I.1. Biocombustibles

Los biocombustibles han evolucionado progresivamente de acuerdo con la disponibilidad de materias primas, así como los aspectos económicos que involucran la viabilidad de su producción. Estos se clasifican en primera, segunda, tercera y cuarta generación, de acuerdo con la fuente de la materia orgánica utilizada; los biocombustibles de primera generación se producen a partir de sustratos agrícolas y materias primas de azúcar y almidón como la caña de azúcar, maíz, sorgo, palma y semillas oleaginosas, sin embargo, el requerimiento de tierras cultivables y la competencia con la seguridad alimentaria han limitado su aplicación. Aquellos producidos a partir de biomasa de residuos lignocelulósicos (residuos agrícolas, forestales, industriales y urbanos tales como bagazo de caña de azúcar, poda y restos de madera, paja de cereales y aceite de cocina usado) y semillas oleaginosas no comestibles se denominan de segunda generación, no obstante, los métodos de pretratamiento para alterar su estructura y lograr la conversión en biocombustibles tienen altos requerimientos de energía debido a la estructura recalcitrante de la biomasa. A su vez, los biocombustibles de tercera generación, derivados de fuentes microbianas y algas, representan una alternativa prometedora, principalmente al no requerir el uso de suelos fértiles ni tierras cultivables para su producción (Maity & Mallick, 2022; Sajjadi et al., 2018; Silva et al., 2018; Singh et al., 2019).

El uso de microalgas ha destacado en los biocombustibles de tercera generación por su rápida tasa de crecimiento, su rendimiento fotosintético, su alta plasticidad metabólica, un periodo de cosecha más corto en comparación con otros tipos de biomasa, una mayor capacidad de fijación de CO<sub>2</sub>, así como el requerimiento de una menor intensidad operativa en su pretratamiento debido a la composición simple de sus paredes celulares, además de su capacidad de crecimiento en aguas salobres, salinas y residuales mejorando la sostenibilidad del proceso. En lo que respecta a los biocombustibles de cuarta generación, estos se distinguen por la aplicación de microorganismos (bacterias, levaduras y microalgas) optimizados a través de ingeniería genética y metabólica, con el fin de subsanar las limitaciones de eficiencia y rendimiento planteadas en la producción de biocombustibles de tercera generación (González et al., 2020a; Jimenez & Castillo, 2021; Maity & Mallick, 2022; Sajjadi et al., 2018; Silva et al., 2018; Singh et al., 2019; Yilbaşı, 2025).

Actualmente los biocombustibles más convencionales son los de primera generación. Los más comercializados son el bioetanol y el biodiesel y se destinan al sector de transporte sin embargo el consumo intensificado de recursos para su producción impacta negativamente el suministro de alimentos y, a nivel industrial, presentan deficiencias socioeconómicas y ambientales que han incentivado la búsqueda de sustratos que permitan la obtención de estos bioproductos de manera eficiente y barata (Gracida & Pérez, 2014; Jimenez & Castillo, 2021; Romero et al., 2021).

El bioetanol, cuya fórmula química es  $C_2H_5OH$ , se obtiene a través de la fermentación por distintos microorganismos, de azúcares contenidos en la materia orgánica. A nivel global, las materias primas más empleadas en la obtención de bioetanol son el maíz, trigo, sorgo, caña de azúcar, remolacha azucarera y melaza (Gracida & Pérez, 2014). El bioetanol se utiliza principalmente como aditivo en la gasolina para potenciar su octanaje (gasohol) y en mezclas con diésel para reducir las emisiones de gases de combustión (El-Mekkawi et al., 2019). Al respecto, González et al. (2020a) menciona que en el sector de transporte la función de los biocombustibles es complementar, y no sustituir, el uso de combustibles actuales. No obstante, el uso de bioetanol puro, respecto a la gasolina, representa una mejor alternativa debido a su alta biodegradabilidad, hasta un 96% de reducción en las emisiones de GEI y toxicidad nula (Romero et al., 2021).

Estados Unidos es el mayor productor mundial de bioetanol con una cifra de 16.1 mil millones de galones en 2024 producido a partir de maíz, en segunda posición se encuentra Brasil con una producción de 8.8 mil millones de galones de bioetanol a partir de caña de azúcar, en ambos casos el bioetanol es mayormente utilizado como gasohol para transporte vehicular y exportación. (Renewable Fuels Association, 2025). Sin embargo, la competencia con la producción de alimentos, el uso intensivo de tierras agrícolas, el alto consumo de agua y fertilizantes, la deforestación, la pérdida de biodiversidad, así como el impacto limitado en la reducción de emisiones de GEI al considerar el ciclo de vida de los biocombustibles de primera generación, demuestran la imperatividad de migrar hacia el uso de biocombustibles de tercera generación (Jeswani et al., 2020).

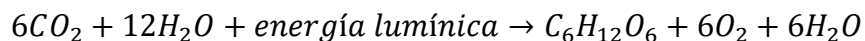
Hasta ahora la producción comercial a gran escala de bioetanol de tercera generación sigue siendo bastante limitada, pues sus técnicas y vías de producción aún se encuentran en fase de investigación, desarrollo y adaptación a escala piloto en las que se han encontrado barreras técnico-

económicas que implican altos costos en la implementación de esta tecnología, por esta razón comúnmente se denomina como un biocombustible avanzado (Jeswani et al., 2020; Jimenez & Castillo, 2021). La aplicación de bioetanol a partir de microalgas más directa que se ha estudiado es su uso para el transporte como gasohol, E10 y E5, principalmente, aunque también en mayores proporciones (E15, E85) y en general para el funcionamiento de motores de combustión interna. La investigación también se ha ampliado a la integración de la producción de bioetanol a partir de microalgas en biorrefinerías mediante la extracción de productos de alto valor, como nutracéuticos, pigmentos y proteínas y la subsecuente conversión de carbohidratos en bioetanol. Otro enfoque interesante es la producción de biocombustibles en rutas combinadas donde inicialmente se produce biodiesel a partir de los lípidos contenidos en las microalgas y posteriormente, se utilizan los residuos en forma de carbohidratos para la producción de bioetanol, maximizando la recuperación energética (Geng et al., 2025; Hossain & Mahlia, 2019).

## I.2. Microalgas en la producción de biocombustibles

Las microalgas, también conocidas como fitoplancton, son organismos microscópicos unicelulares que proliferan en sistemas hídricos como arroyos, ríos, lagos y océanos. En la actualidad se conocen más de 50 mil especies de microalgas clasificadas de acuerdo con su estructura celular interna, componentes bioquímicos, composición de pigmentos, tamaño y ciclo de vida. Dentro de esta clasificación se encuentran las algas verdes pertenecientes al reino Protista que presentan un color verde característico debido a la combinación de moléculas de clorofila A y B. Las microalgas capturan energía solar de 10 a 50 veces más que las plantas terrestres debido a su estructura unicelular o multicelular simplista, se ha reportado que producen el 50% del oxígeno atmosférico y fotosintetizan hasta 2 kg de CO<sub>2</sub> por kg de biomasa producida. Es a través del proceso de fotosíntesis que producen oxígeno, convierten la energía solar en compuestos de energía química como el trifosfato de adenosina (ATP) y el fosfato reducido de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) y fijan CO<sub>2</sub> atmosférico directamente a sus células que actúa como precursor para la síntesis de biomoléculas (carbohidratos, lípidos y proteínas) (Maity & Mallick, 2022; Sajjadi et al., 2018; Velásquez et al., 2024). Este mecanismo de reacción se explica a partir de la ecuación global de la fotosíntesis (Ecuación 1), donde Stirbet et al. (2020) especifica que las moléculas de oxígeno (O<sub>2</sub>) liberadas a la atmósfera son producidas a partir de la oxidación del agua (H<sub>2</sub>O) y no del CO<sub>2</sub>:

### **Ecuación 1**



El uso de microalgas para la producción de biocombustibles ha adquirido relevancia debido a la gran diversidad, historia evolutiva y eficiencia fotosintética de estos organismos, que resultan ventajosas frente a otras tecnologías para la producción de biomasa, así como al enfoque sostenible en el que puede ser aplicado respondiendo al problema mundial del cambio climático y el calentamiento global. Las características intrínsecas de las microalgas les confieren un alto potencial como materia prima para la producción de bioetanol. Su composición celular rica en carbohidratos (11-50%), como celulosa y almidón, así como la ausencia de lignina y un bajo contenido de hemicelulosa, permite procesar un perfil de azúcares más simple en la etapa de pretratamiento para producir azúcares fermentables y viabilizar la obtención de bioetanol en comparación con la biomasa lignocelulósica. Además, de manera general presentan una alta tasa de crecimiento y una rápida acumulación y asimilación de nutrientes del medio de cultivo, mostrando una plasticidad metabólica capaz de adaptarse a la variabilidad de condiciones de cultivo de manera dinámica. (El-Mekkawi et al., 2019; Gómez, 2016; González et al., 2020c; Hossain & Mahlia, 2019; Jimenez & Castillo, 2021; Romero et al., 2021; Sajjadi et al., 2018; Seon et al., 2020; Silva et al., 2018).

El cultivo de microalgas puede clasificarse en fotoautótrofo, donde las microalgas utilizan la luz solar como fuente de energía y el CO<sub>2</sub> como su única fuente de carbono (carbono inorgánico); heterótrofo, donde su energía proviene de compuestos orgánicos (carbono orgánico) en ausencia de luz y mixotrófico, donde su crecimiento se basa en la asimilación de CO<sub>2</sub> y carbono orgánico simultáneamente (Velásquez et al., 2024). Aunque el cultivo autótrofo resulta ambientalmente atractivo por la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> presenta un rendimiento bajo de biomasa, mientras que en un cultivo mixotrófico puede lograrse esta condición además de un aumento en la producción de biomasa y contenido de carbohidratos (Singh et al., 2019). De acuerdo con la disponibilidad nutrimental de carbono, nitrógeno y fósforo, la intensidad lumínica, la temperatura y pH del medio, además de la especie de microalgas se define la cinética de crecimiento, siendo capaces de duplicar su masa en un tiempo de 1 a 10 días (Gómez, 2016; Valentine et al., 2018). Estos parámetros también determinan la composición bioquímica de las microalgas y albergan uno de los principales desafíos en la producción de biocombustibles: lograr una alta tasa de crecimiento de microalgas

con un alto contenido de biomoléculas debido al requerimiento de grandes volúmenes de biocombustibles para hacer el proceso operacional y económicamente viable (Alves et al., 2018; Romero et al., 2021).

En este sentido, el uso de aguas residuales como medio de cultivo para la producción de biomasa microalgal se ha estudiado como una respuesta a esta condicionante integrando la remoción de nutrientes que en términos de calidad del agua resultan contaminantes y que podrían migrar a otras matrices ambientales, atacando otra problemática importante y proporcionando una de las formas más sostenibles de producir biocombustibles (Alves et al., 2018; Komolafe et al., 2014; Nava et al., 2021; Sajjadi et al., 2018).

Algunos géneros de microalgas como *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlamydomonas*, *Nannochloropsis* y *Scenedesmus* han sido frecuentemente seleccionados para la producción de bioetanol por su capacidad de almacenar carbohidratos (Chandrasekhar et al., 2023), el uso de *Scenedesmus* también se ha reportado en el tratamiento efectivo de aguas residuales municipales e industriales (Alves et al., 2018). A su vez, confirmando la plasticidad metabólica de las microalgas, Hernández et al. (2019) empleó un consorcio microbiano con predominancia de *Scenedesmus obliquus* y *Desmodesmus sp.* con el fin de intensificar la acumulación de carbohidratos y lípidos y con ello la potencial producción de biocombustibles a partir de una mezcla de lixiviados de un relleno sanitario con aguas residuales.

Si bien la literatura señala que las aguas residuales son una fuente favorable para el crecimiento de microalgas, así como el agua dulce y el agua salina (Hossain & Mahlia, 2019), someter esta tecnología a condiciones ambientales reales es una labor científica que continúa en proceso. Existen numerosos estudios enfocados al cultivo de microalgas en aguas residuales en condiciones controladas y a nivel de laboratorio no obstante estos no pueden predecir el comportamiento del cultivo en condiciones exteriores, donde se presentan cambios en la composición biológica debido a la coexistencia con otro tipo de microorganismos como bacterias y hongos, así como a las fluctuaciones de irradiación solar, pH y temperatura.

Una estrategia ante estas limitantes es el uso de microalgas nativas que podrían ser adecuadas para los cultivos al aire libre debido a su adaptación a las condiciones ambientales y al exitoso desplazamiento de organismos competidores (Sanchez et al., 2017). En este último aspecto, es

necesario llevar a cabo un análisis de las interacciones microbianas en cada sistema particular, pues en algunos casos la propagación de bacterias inhibe el crecimiento de microalgas al competir por nutrientes limitados o producir metabolitos alguicidas extracelulares (Wang et al., 2017). Asimismo, la contaminación por organismos depredadores como los rotíferos puede afectar la estabilidad y el crecimiento de los cultivos. Al respecto los sistemas de cultivo para el tratamiento de aguas residuales pueden clasificarse como abiertos (al aire libre), cerrados (en interiores) o híbridos. Los sistemas abiertos resultan económicamente atractivos debido a la practicidad de su mantenimiento, así como a su capacidad de operar grandes volúmenes con una menor demanda energética y el alcance de una tasa de crecimiento microbiano comparable con los sistemas cerrados (Velásquez et al., 2024).

La investigación en cultivos de consorcios microbianos al aire libre, a largo plazo y en sistemas reales de aguas residuales es actualmente limitada. Sin embargo, se ha comprobado la simbiosis microalga-bacteria en la degradación y transformación de la materia orgánica, promoviendo el crecimiento de las microalgas, la eliminación de nitrógeno y fósforo y la acumulación de metales pesados (Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Zn) y compuestos tóxicos (pesticidas e hidrocarburos) en cultivos heterotróficos (Gonzalez & de-Bashan, 2023; Zhao et al., 2023). En términos generales, las bacterias oxidan la materia orgánica biodegradable y nutrientes presentes en las aguas residuales, produciendo CO<sub>2</sub>, nitratos y fosfatos que son sintetizados y aprovechados por las microalgas para su crecimiento (Gómez, 2016).

La coexistencia de bacterias en el tratamiento de aguas residuales municipales con microalgas propicia la remoción de nitrógeno en forma de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y N orgánico. Las microalgas asimilan NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en mayor proporción para su crecimiento, además la remoción de nitrógeno se ve favorecida debido a la nitrificación y desnitrificación bacteriana mediante su conversión en N<sub>2</sub>, cerrando así el ciclo biogeoquímico del N. Este también puede ser removido por la volatilización de amoníaco (NH<sub>3</sub>) cuando existe un aumento de pH, temperatura o condiciones de agitación en el cultivo (Wang et al., 2017).

A su vez, el mecanismo de remoción de fósforo, siendo los ortofosfatos solubles (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) la forma asimilable por las microalgas, se potencia a través de la acumulación bacteriana intracelular de polifosfatos, la liberación de enzimas fosfatasas y en algunos casos, el aumento de la

disponibilidad catiónica en aguas residuales ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) promoviendo la precipitación de fósforo (Fallahi et al., 2021; Komolafe et al., 2024; Wang et al., 2017). En conjunto, esto propicia el desarrollo de un sistema biológico capaz de operar bajo diferentes condiciones ambientales y de cargas de nutrientes, reemplazando la necesidad de enriquecer el medio de cultivo con sustratos orgánicos por el uso de aguas residuales con alto contenido de materia orgánica (Montaño et al., 2022; Velásquez et al., 2024).

Otra de las ventajas de los consorcios microalga-bacteria es la optimización del tiempo de retención hidráulica (TRH) (Domínguez, 2018). Este parámetro es fundamental ya que determina el tiempo de residencia de la biomasa en el cultivo, si el TRH se prolonga demasiado los nutrientes pueden ser insuficientes para el crecimiento de las microalgas por otro lado, si el periodo es demasiado corto, la remoción de N y P de aguas residuales puede ser ineficiente (Wang et al., 2017). La determinación del TRH depende de la especie y cepa de los microorganismos presentes en el cultivo, así como las condiciones climáticas durante su crecimiento, variando de 5 a 25 días (Hossain & Mahlia, 2019). Al respecto, Alves et al. (2018) reportó una correlación inversa entre la fase exponencial de crecimiento de microalgas *Scenedesmus* sp. y el alto consumo de N ( $\text{NH}_4^+$ ) y P ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en el día 12 de cultivo, a partir de este día se registró una fase estacionaria debido a la escasez de nutrientes y desde el día 14, una fase de decaimiento y muerte. Cabe mencionar que en este estudio se recomienda llevar a cabo la recolección de biomasa durante la fase estacionaria del cultivo ya que se presenta una menor actividad metabólica y movilidad celular.

En sistemas abiertos la productividad de la biomasa depende en gran medida del tipo de agua residual empleada como medio de cultivo, el pH, el TRH, la irradiación solar y la temperatura que representa un factor reductivo en la eliminación de nutrientes y que puede incluso dirigir al colapso del metabolismo de las microalgas en condiciones de calor o frío extremo. Asimismo, es importante la agitación adecuada del cultivo ya que promueve una mejor transferencia de masa, evita la sedimentación celular y elimina la estratificación térmica. Respecto a la recolección, es necesaria la selección de un método eficiente que reduzca al mínimo la pérdida de biomasa valorizable en estos sistemas (Velásquez et al., 2024; Wang et al., 2017).

Una de las etapas que más dificulta la viabilidad económica y, con ello, la comercialización del proceso de obtención de bioetanol a partir de microalgas es precisamente la recolección o cosecha

de biomasa que representa hasta el 20-30% de los costos totales de la producción de biocombustibles (González et al., 2020a). Esta se asocia con la baja eficiencia de recuperación, los grandes requerimientos de energía y algunos métodos empleados que contaminan la biomasa mediante la adición de productos químicos (sales metálicas) que interfieren en las etapas posteriores (Valeriano et al., 2020; Vielma et al. 2022). En la mayoría de los casos se añade el proceso de secado de biomasa, reduciendo su contenido de agua en un 50-70% para la obtención de un material sólido y estable, preferentemente triturado, que pueda ser manejado y almacenado fácilmente, evitando así la degradación de la biomasa, lo que aumenta sustancialmente los costos operativos (Debnath et al., 2021; Vielma et al., 2022).

Con el propósito de optimizar la recuperación de biomasa se han planteado ciertas recomendaciones. Walls et al. (2019) propone el uso de cultivos combinados de microalgas y levaduras para la biofloculación de biomasa, facilitando su sedimentación y prescindiendo de procesos intensivos para su recuperación. En cuanto al almacenamiento de biomasa, González et al. (2020a) y Debnath et al. (2021) sugieren la extracción viable de los compuestos microalgales de interés a partir de biomasa húmeda, omitiendo el proceso de secado que también representa altos requerimientos energéticos. Es importante señalar que dichas estrategias tienen una mayor factibilidad cuando se consideran aplicaciones a gran escala.

Al respecto, en la producción de biomasa a gran escala, se ha implementado el uso de reactores algales de alta tasa (HRAP). Estos son estanques de canal abierto en los que circulan aguas residuales poco profundas (0.2-0.7 m) mediante una rueda de paletas que genera una mezcla continua y homogénea, permitiendo el crecimiento de microalgas, así como el tratamiento de aguas residuales mediante la remoción del 90% de  $\text{NH}_4^+$ , 70% de materia orgánica (DQO) y 50% de  $\text{PO}_4^{3-}$ . Los HRAP se prefieren para el cultivo de microalgas ya que en comparación con otras tecnologías de cultivo requieren de bajos costos de construcción, operación y mantenimiento (Li et al., 2023; Velásquez et al., 2024).

### I.3. Tratamiento de aguas residuales a partir de microalgas

A pesar de que la producción de biomasa es el enfoque primordial en la obtención de bioetanol a partir de microalgas, el tratamiento de aguas residuales ha adquirido gran importancia en la implementación de esta tecnología debido a los beneficios económicos y ambientales que ofrece.

Se denominan aguas residuales aquellas que, tras su uso en actividades domésticas, industriales, comerciales o ganaderas, presentan una alteración en su composición que afecta negativamente su calidad original. De acuerdo con su procedencia, las aguas residuales contienen distintas proporciones de materia orgánica, sólidos suspendidos (arenas, grasas, fibras textiles) así como otras sustancias químicas y radiactivas, es por eso que deben ser tratadas antes de reusarse en servicios al público o reintegrarse al ambiente (Comisión Nacional del Agua, 2024; Secretaría del Medio Ambiente, 2014).

Se estima, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas (2017) que alrededor del 80% de las aguas residuales a nivel mundial se descargaban sin un tratamiento adecuado, causando afectaciones a la salud, la economía y el ambiente. Sin embargo, en 2024, esta cifra rondaba el 42% (Organización de las Naciones Unidas, 2024) lo que representa un avance sustancial en esta problemática durante los últimos años. No obstante, aunque a nivel global se observa un progreso en el tratamiento de aguas residuales, los países en vías de desarrollo que aún no cuentan con las capacidades de infraestructura, tecnología e inversión suficiente para lograr un tratamiento seguro y adecuado, continúan siendo afectados por esta situación (Walls et al., 2019).

En México solamente el 51% de las aguas residuales son tratadas de manera adecuada. Sin embargo, se cuenta con un marco regulatorio que ha promovido la evolución de este indicador especialmente en esta última década (Comisión Nacional del Agua, 2024). Al respecto se destacan la NOM-001-SEMARNAT-2021 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, la NOM-002-SEMARNAT-1996 para la descarga en los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, la NOM-003-SEMARNAT-1997 para aguas tratadas que se reúsen en servicios al público y la NOM-014-CONAGUA-2003 que establece los requisitos para la recarga artificial de acuíferos con agua residual tratada (Comisión Nacional del Agua, 2024, situación del subsector).

El tratamiento de aguas residuales con microalgas se ha estudiado desde 1946 (Caldwell, 1946). Fue en 1957 que se identificó que el costo del tratamiento biológico con microorganismos tenía un menor costo al tratamiento químico, no obstante, los costos operativos globales en una planta de tratamiento incrementan considerablemente debido al funcionamiento de reactores biológicos (Oswald & Gotaas, 1957; Obaidullah et al., 2024).

En la actualidad, los procesos biológicos convencionales en las plantas de tratamiento corresponden al tratamiento de lodos activados y de filtros percoladores que, si bien son efectivos en la remoción de contaminantes orgánicos, en sus efluentes persisten remanentes de N y P en concentraciones significativas. La descarga de aguas residuales con estas características puede causar el fenómeno de eutrofización en cuerpos de agua de flujo lento y relativamente cerrados (lagos, embalses, ríos, humedales). Debido al exceso de nutrientes se estimula la proliferación de flora acuática en la superficie de estos cuerpos de agua, impidiendo la transferencia de oxígeno y luz solar a las zonas profundas, generando así condiciones hipóxicas que resultan en malos olores, el incremento en la turbidez del agua y la muerte de fauna de importancia ecológica (Hernández et al., 2019; Obaidullah et al., 2024; Wang, 2024).

En este sentido, en los últimos años se ha propuesto el tratamiento de aguas residuales con microalgas como un tratamiento terciario posterior al sistema de lodos activados, con el fin de mejorar la calidad de las aguas residuales y cumplir con los límites permisibles de contaminantes establecidos en las normas de descarga (Komolafe et al., 2014). La aplicación de esta tecnología al tratamiento de efluentes municipales tratados a nivel secundario resulta bastante prometedora debido a su posible reutilización en cuerpos de agua, así como en funciones ornamentales, recreativas, de embalse y humidificación, además de considerar que el suministro de aguas residuales municipales es continuo y se produce con una alta tasa volumétrica, desplazando la necesidad de asignar agua de uso primario para estos fines (Obaidullah et al., 2024; Wang et al., 2017).

#### I.4. Composición y función de los carbohidratos en microalgas

En el aprovechamiento de la biomasa microalgal los compuestos de interés se clasifican en carbohidratos, lípidos y proteínas. La concentración y proporción de estas biomoléculas varían de acuerdo con la especie de microalgas, las características del cultivo y las condiciones ambientales, siendo la biomasa con predominancia de carbohidratos la más adecuada para la producción de bioalcoholes, mientras que aquella con mayor contenido de lípidos se prefiere para la producción de biodiesel y aquella con un nivel más elevado de proteínas para el desarrollo de bioplásticos (El-Dalatony et al., 2017; Singh et al., 2019; Vielma et al., 2022).

Con base en el análisis de más de 40 especies de microalgas (diatomeas, primnesiofitas, prasinofitas, clorofitas, eustigmatofitas y criptomonadas) reportado por Brown et al. (1997), la composición bioquímica de estos microorganismos varía, en términos generales, entre 5-23% de carbohidratos, 7-23% de lípidos y 6-52% de proteínas en peso seco de biomasa. Los géneros *Desmodesmus* y *Scenedesmus*, pertenecientes a las clorofitas, presentan una amplia aplicación biotecnológica y ambiental, especialmente en sistemas abiertos de aguas residuales, debido a su alta tolerancia a las variaciones en las condiciones de cultivo (Acevedo et al., 2017; Wang et al., 2023). En cuanto al contenido de carbohidratos este se encuentra entre 14-25% en el género *Desmodesmus* (Bomer & Leverett, 2024; González et al., 2021; Sriram & Seenivasan, 2015) y entre 6-55% en el género *Scenedesmus* (Alves et al., 2018; Castaño, 2015; Oraby et al., 2023; Romero et al., 2021; Silva et al., 2018; Singh et al., 2019; Uguz et al., 2025) dependiendo fundamentalmente de las condiciones de cultivo.

Los carbohidratos son el sustrato para la producción de bioetanol, encontrándose principalmente en la pared celular de las microalgas en forma de celulosa, hemicelulosa y pectina y de manera intracelular en forma de almidón o glucógeno como materiales de reserva energética (Chen et al., 2013; Gómez, 2016). Estos carbohidratos de almacenamiento son empleados para el mantenimiento de su metabolismo en ausencia de energía fotosintética (Raven & Beardall, 2003) mientras que los carbohidratos estructurales sirven como barrera frente a moléculas alquicidas que pueden causar la ruptura de la célula (Debnath et al., 2021).

El fundamento bioquímico de la acumulación de carbohidratos en microalgas consiste en la síntesis de CO<sub>2</sub> a través de ciclos de luz y oscuridad. En los ciclos de luz los sistemas fotosintéticos de las microalgas llevan a cabo la fotólisis del agua, produciendo energía y liberando O<sub>2</sub>. A su vez en los periodos de oscuridad, a través del ciclo de fijación del carbono (ciclo de Calvin-Benson), utilizan NADPH y ATP, moléculas de energía obtenidas del ciclo de luz, para la formación de triosas (carbohidratos de tres carbonos) a partir de CO<sub>2</sub> inorgánico, siendo estas las precursoras de la formación de carbohidratos más complejos (Debnath et al., 2021; Stirbet et al., 2020).

Profundizando en este aspecto, los carbohidratos, también llamados azúcares, se componen de tres elementos: carbono, hidrógeno y oxígeno y se clasifican en tres grupos de acuerdo con su complejidad estructural: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos son

las moléculas más simples formadas de 3 a 7 carbonos en cadenas lineales con un grupo hidroxilo (OH) en su extremo. Según su número de carbonos se denominan triosas (3C), tetrasas (4C), pentosas (5), hexosas (6C), siendo la glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) uno de los monosacáridos más importantes debido a su valor energético. A su vez, mediante enlaces glicosídicos entre 2 y 20 unidades de monosacáridos se da la formación de oligosacáridos, entre los cuales los disacáridos representan la forma más conocida como la sacarosa, la lactosa y la maltosa. En cuanto a los polisacáridos, estos son carbohidratos complejos compuestos por cientos o miles de monosacáridos lineales o ramificados que pueden clasificarse por su función como estructurales o de reserva. La celulosa, una molécula lineal, larga y rígida, es un componente de las paredes celulares vegetales y la molécula orgánica individual que más abunda en la naturaleza (Gracida & Pérez, 2014; Niaz et al., 2020). Por otro lado, el almidón, compuesto en su mayor parte por moléculas ramificadas (amilopectina) y una fracción menor de moléculas lineales (amilosa), actúa como la principal forma de almacenamiento de glucosa y con ello, reserva de energía, en las plantas (Kossmann & Lloyd, 2000).

#### I.5. Pretratamiento de biomasa microalgal con hidrólisis ácida

Una de las principales estrategias en la optimización de la producción de biocombustibles líquidos radica en el incremento del contenido de carbohidratos de la biomasa microalgal (Debnath et al., 2021) sin embargo la etapa de su extracción es otro factor limitante. Debido a que la biomasa microalgal no es directamente consumible por los microorganismos fermentadores, se requiere un proceso de disrupción celular para la extracción de los carbohidratos contenidos en las células de las microalgas (Vielma et al., 2022). Además, por su complejidad química, los carbohidratos estructurales y de reserva que se encuentran en forma de polisacáridos deben someterse a un proceso de pretratamiento para el aumento de su área de superficie efectiva, su transformación en monosacáridos fácilmente fermentables y la subsecuente obtención de bioetanol (Chen et al., 2013; Maity & Mallick, 2022; Sanchez et al., 2017).

El pretratamiento de biomasa microalgal para la producción de bioetanol puede llevarse a cabo por métodos físicos, químicos y biológicos. La selección debe realizarse de tal manera que el proceso sea rentable, energéticamente eficiente, de fácil implementación y que evite la conversión de los azúcares fermentables en compuestos no aprovechables (El-Dalatony et al., 2017). La hidrólisis

química ácida o alcalina son ampliamente utilizadas como pretratamiento de biomasa. En términos generales, la hidrólisis ácida produce el debilitamiento y ruptura de la pared celular de las microalgas, así como la sacarificación de los carbohidratos extraídos mediante su conversión en monosacáridos, mientras que en la hidrólisis alcalina se produce la alteración estructural a través de la saponificación de los lípidos de la pared celular de las microalgas, sin embargo, la liberación directa de monosacáridos no es su principal objetivo y por lo tanto, se considera menos eficiente (Debnath et al., 2021; Martín et al., 2019). Así, para la obtención de bioetanol es preferido el proceso de hidrólisis ácida, además de mostrar una alta eficiencia aplicando bajas concentraciones de ácido (Maity & Mallick, 2022).

Los ácidos que se emplean comúnmente son el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) y ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (Maity & Mallick, 2022; Markou et al., 2013). No obstante, no se recomienda el uso de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ya que se ha reportado un bajo rendimiento de sacarificación de carbohidratos en la hidrólisis (Markou et al., 2013). Tampoco se sugiere  $\text{HCl}$  debido a su alta toxicidad, volatilidad y corrosividad que podrían complicar su implementación a escala industrial (Consejo Nacional de Investigación, 1998). Por lo que se propone el uso de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{HNO}_3$  en diluciones de 1-3% v/v sometidas a temperaturas de 100-130°C con un tiempo de reacción de 15 a 30 minutos, que informan rendimientos de liberación y sacarificación de carbohidratos entre 70-80% (Agustini et al., 2019; González et al., 2020a; Silva et al., 2018).

No obstante, en algunos estudios se han evaluado concentraciones de ácido que varían entre 4-10% v/v (Romero, 2019; Hernández et al., 2015; Suárez et al., 2021). Al respecto Suárez et al. (2021) menciona que la extracción de carbohidratos y su conversión en azúcares reductores resultó superior al emplear  $\text{H}_2\text{SO}_4$  6% v/v comparado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2% y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4% llevando a cabo hidrólisis en autoclave. A su vez, Romero (2019) obtuvo una extracción del 70% y sacarificación de carbohidratos del 81% al usar  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% v/v en un sistema de reflujo por enfriamiento. Si bien, estos estudios podrían indicar resultados favorables al aumentar la concentración de ácido, la evaluación de Hernández et al. (2015) al aplicar  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4% v/v,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7% y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% reportó que el rendimiento de extracción y sacarificación disminuyó al sobrepasar la concentración de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4% v/v, lo que sugiere el uso de ácido a bajas concentraciones. Cabe mencionar que incluso en las mismas condiciones de hidrólisis los rendimientos pueden variar de acuerdo con la

composición biológica de la biomasa, por lo que el proceso debe adaptarse para diferentes cepas o especies de microalgas que puedan estar presentes (Seon et al., 2020).

En la bibliografía se reitera que el uso de altas concentraciones de ácido promueve la producción de compuestos inhibidores de la fermentación debido a la excesiva degradación de los polisacáridos, limitando así la obtención de bioetanol (Maity & Mallick, 2022). Aunque la hidrólisis ácida es un proceso práctico y económico puede conducir a la formación de inhibidores del proceso de fermentación debido a la descomposición descontrolada de azúcares cuando se emplea una alta concentración de ácido o los tiempos de reacción no son controlados con precisión (Romero et al., 2021). Esto da lugar a la generación de compuestos derivados del furano como el 5-hidroximetilfurfural (HMF) y furaldehídos (furfural), formados a partir de la deshidratación de hexosas y pentosas, respectivamente. Asimismo, se producen ácidos alifáticos (acético, fórmico y levunílico). Estos compuestos resultan tóxicos para el metabolismo de los microorganismos que llevan a cabo el proceso posterior de fermentación (Agustini et al., 2019; Gracida & Pérez, 2014; Jaramillo et al., 2012), causando daños en el DNA celular e interfiriendo con la actividad enzimática de la glucólisis (Ask et al., 2013). Una alternativa ante esta complicación es la remoción de inhibidores a través de métodos físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, estos no son completamente efectivos y, en general, causan la pérdida de azúcares o formación de precipitados que requieren retirarse de manera subsecuente (Jaramillo et al., 2012).

Análogamente, después de la hidrólisis ácida, es necesario neutralizar el hidrolizado o caldo ácido a un pH entre 5-6.5 para optimizar la actividad metabólica de los microorganismos fermentadores (Maity & Mallick, 2022; Silva et al., 2018; Yang et al., 2019). El hidróxido de sodio (NaOH) es generalmente utilizado para la neutralización de hidrolizado de microalgas con  $H_2SO_4$ . Sin embargo, la reacción produce sulfato de sodio ( $Na_2SO_4$ ) que debe ser removido antes del proceso de fermentación (Seon et al., 2020; Silva et al., 2018).

A pesar de que la hidrólisis química se reconoce como una gran opción para el pretratamiento de biomasa microalgal, la hidrólisis enzimática se ha estudiado de manera paralela y actualmente, se considera técnicamente viable. Este método biológico consiste en la aplicación de enzimas específicas (amilasas, celulasas, hemicelulasas, entre otras) que rompen de manera selectiva diferentes tipos de enlaces glucosídicos de los polisacáridos presentes en la pared celular de las

microalgas y de manera intracelular, logrando su conversión en monosacáridos sin la generación de compuestos inhibidores de la fermentación (Gómez, 2016; Padil et al., 2023).

Algunas otras ventajas del uso de hidrólisis enzimática son los altos rendimientos de conversión de polisacáridos en azúcares fermentables, el uso de temperaturas y presiones suaves, así como su bajo impacto ambiental debido al menor requerimiento energético y la mínima generación de subproductos contaminantes frente al proceso de hidrólisis ácida. Sin embargo, esta tecnología no resulta económicamente factible a escala industrial debido al costo elevado de las enzimas y la dificultad de su recuperación, lo que se asocia a la complejidad de los sistemas de producción biológica (Debnath et al., 2021; Gómez, 2016; Maity & Mallick, 2022; Seon et al., 2020). Además, los tiempos de operación en la hidrólisis enzimática son más largos y a menudo se requiere de pretratamientos complementarios para lograr su eficiencia (Gómez, 2016; Padil et al., 2023).

Es así como la hidrólisis ácida se considera técnica y económicamente más adecuada a escala industrial (Seon et al., 2020). A pesar de las desventajas que conlleva su aplicación, se ha reportado la practicidad y reproducibilidad de llevar a cabo hidrólisis ácida de biomasa microalgal en autoclave debido a las condiciones estándar de operación de 120-121°C, siendo la concentración del ácido, la carga orgánica y el tiempo de reacción parámetros ajustables del proceso (Camargo, 2024; Chng et al., 2019; Hammann et al., 2024; Ho et al. 2013). Además, Hammann et al. (2024) afirma que la optimización de este proceso puede alcanzar rendimientos de hasta 91% en la extracción de carbohidratos. Una estrategia prometedora en el pretratamiento de biomasa microalgal para la producción de bioetanol.

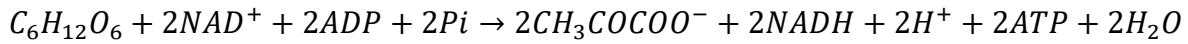
#### I.6. Fermentación alcohólica de hidrolizado de microalgas

Una vez obtenida la solución rica en azúcares fermentables estos son transformados en bioetanol mediante el proceso de fermentación alcohólica, un proceso anaerobio llevado a cabo por microorganismos. En su mayoría se emplean levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia stipitis*, aunque también algunas bacterias como *Zymomonas mobilis* o *Escherichia coli* genéticamente modificada (El-Dalatony et al., 2017; Harun et al., 2014).

El mecanismo bioquímico de la fermentación alcohólica consiste en tres reacciones principales. Comienza con la glucólisis, donde una molécula de glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) es transformada en dos

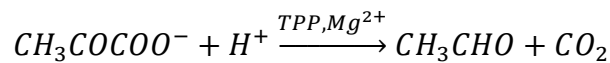
moléculas de piruvato ( $\text{CH}_3\text{COCOO}^-$ ), produciendo a su vez la reducción de dos moléculas de difosfato de adenosina (ADP) a dos moléculas de ATP, así como la reducción de dos moléculas de dinucleótido de nicotinamida y adenina ( $\text{NAD}^+$ ) a dos moléculas de NADH. En este proceso también se produce agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) (Chandel, 2021; Cuellar et al., 2015):

### Ecuación 2



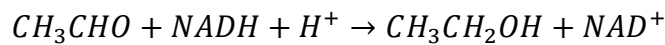
Posteriormente se da la descarboxilación del piruvato, donde cada molécula de piruvato es convertida en acetaldehído ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ) por la enzima piruvato descarboxilasa, que requiere tiaminpirifosfato (TPP) y  $\text{Mg}^{2+}$ , liberando a su vez  $\text{CO}_2$  (Carbonero, 1975; Cuellar et al., 2015):

### Ecuación 3



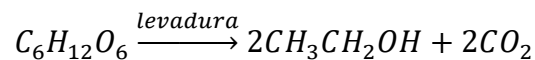
Después, el acetaldehído se reduce a ion etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^-$ ) mediante la coenzima NADH producida en el proceso de glucólisis, generando también  $\text{NAD}^+$ . Finalmente, el ion etanol se protona para producir etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ). Esta reacción es catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (Carbonero, 1975; Cuellar et al., 2015):

### Ecuación 4



De tal manera que, en la reacción global de la fermentación alcohólica, los microorganismos a partir de una molécula de glucosa producen dos moléculas de etanol y dos moléculas de  $\text{CO}_2$  como subproducto (Cuellar et al., 2015):

### Ecuación 5



Al respecto Carbonero (1975) menciona que diferentes tipos de carbohidratos pueden ser utilizados por microorganismos como sustrato fermentable, desde hexosas como glucosa y fructosa; disacáridos como maltosa y sacarosa y polisacáridos como almidón y celulosa. También

indica que la selección de levaduras a nivel industrial se realiza con base en el tipo de carbohidrato que actúa como sustrato inicial, *Candida utilis* se emplea frecuentemente en la fermentación de pentosas, mientras que *S. cerevisiae* en la de hexosas, y *Candida pseudotropicalis* en la de lactosa, alcanzando rendimientos de alcohol superiores al 90% en cepas caracterizadas por su gran tolerancia alcohólica.

La producción comercial de bioetanol se basa principalmente en el uso de *S. cerevisiae*, siendo una tecnología plenamente establecida (El-Dalatony et al., 2017). Esta especie tiene la capacidad de producir y acumular altas concentraciones de etanol, así como metabolizarlo por respiración a través de las rutas de gluconeogénesis y glioxilato. Sin embargo, esto último debe evitarse para lograr mayores eficiencias de etanol (Romero et al., 2021). Algunas otras ventajas son su alta eficiencia en la fermentación de hidrolizados celulósicos y hemicelulósicos y su capacidad de crecer y sostener la fermentación en ausencia de oxígeno, lo que la hace especialmente adecuada para procesos industriales (El-Dalatony et al., 2017; Zhang et al., 2023).

En los últimos años se ha propuesto el uso de levaduras no convencionales o nativas debido a que poseen ciertas propiedades de interés tecnológico, tales como el aprovechamiento de sustratos complejos y de bajo costo para su nutrición, así como su tolerancia al estrés, a compuestos inhibidores de la fermentación y a condiciones ambientales extremas (Radecka et al., 2015). Al respecto, Sousa et al. (2021) reporta la metabolización efectiva de carbohidratos y ácidos orgánicos por el género de relevancia emergente *Cyberlindnera*, destacándose *Cyberlindnera jadinii* como una especie capaz de crecer en diversos sustratos y en un amplio rango de temperatura, además de asimilar diferentes azúcares como arabinosa, D-xilosa, glucosa, sacarosa y rafinosa y presentar tolerancia a las alteraciones ambientales que ocurren en el transcurso del proceso fermentativo.

*C. jadinii* es una levadura que puede reproducirse sexualmente a partir de un solo individuo (Kurtzman, 2011), pertenece al filo Ascomycota, subfilo Saccharomycotina, clase Saccharomycetes, orden Saccharomycetales, familia Saccharomycetaceae y género *Cyberlindnera*. Cabe mencionar que, *C. utilis*, como también se le ha denominado en algunos estudios, es su estado anamorfo que representa la etapa asexual de un hongo, mientras que *C. jadinii* es el estado teleomorfo que especifica la etapa sexual del mismo hongo (Deak, 2007).

Además de la selección del microorganismo fermentador, se ha reportado que la producción de bioetanol está sujeta a diversos parámetros operativos, principalmente la concentración del inóculo (3-15% v/v), la concentración de azúcares fermentables (2-18 g/L), la velocidad de agitación (120-180 rpm), la temperatura (28-32°C), el pH (5-6.5) y el tiempo óptimo de fermentación (4-48 horas) (Camargo, 2024; Chng et al., 2019; El-Mekkawi et al., 2019; Ho et al., 2013; Megawati et al., 2022; Romero et al., 2021; Silva et al., 2018; Shokrkar et al., 2017; Phwan et al., 2019).

Una de las técnicas más aplicadas en la optimización del proceso de fermentación es el ajuste de la concentración del inóculo del microorganismo a usar (Shokrkar et al., 2017). Silva et al. (2018) informó el alcance de la concentración máxima de etanol a las 2.5 horas de fermentación de hidrolizados de microalgas aplicando un inóculo de 12.5 g/L de un consorcio de *S. cerevisiae* y *P. stipitis* en comparación con inóculos de 0.1 g/L y 0.5 g/L que requirieron 12 horas. Aunque las concentraciones finales resultaron las mismas en todos los casos, se comprobó que al aumentar el inóculo inicial aumentó la velocidad de alcance de la concentración máxima de etanol.

Otro aspecto importante en los experimentos de fermentación alcohólica de hidrolizados de microalgas es que se ha demostrado que el óptimo rendimiento en la producción de bioetanol está relacionado con un mayor crecimiento celular y consumo de azúcares fermentables en los hidrolizados (Seon et al., 2020). En varios estudios el seguimiento de azúcares fermentables se lleva a cabo con la determinación de azúcares reductores (Camargo, 2024; Silva et al., 2018; Phwan et al., 2019; Shokrkar et al., 2017).

En términos generales, los azúcares reductores son carbohidratos que poseen un grupo funcional aldehído o un grupo cetona libre que puede ser metabolizado por enzimas de levaduras durante la fermentación alcohólica, presentando una estructura simple y accesible para ellas. Algunos ejemplos son la glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, maltosa, fructosa y lactosa. Hay azúcares que, aunque no son reductores, pueden considerarse fermentables a través de la intervención de enzimas adicionales que liberen un grupo funcional reductor antes de fermentar, como es el caso de la sacarosa (Zoecklein et al., 1990).

## I.7. Estandarización del proceso de obtención de bioetanol

En función de las limitantes que presenta la producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal como una tecnología técnica y económicamente viable a gran escala, surge la necesidad de establecer procedimientos operativos uniformes que reduzcan la variabilidad de los rendimientos obtenidos en el proceso de manera general. Si bien la literatura reporta una eficiencia competitiva en la acumulación de carbohidratos durante el cultivo de microalgas, así como en su extracción y conversión en azúcares fermentables a través del pretratamiento de la biomasa y la posterior producción de bioetanol mediante la fermentación alcohólica, se observa una gran variación en las condiciones experimentales empleadas.

En este sentido la estandarización del proceso se considera indispensable para garantizar la validez y confiabilidad de la metodología, generar conocimiento científico, reducir errores sistemáticos y lograr la optimización del uso de recursos y costos operativos (Jain & Kumar, 2024). En un contexto tecnológico también se busca disminuir el consumo de energía y la generación de residuos, mientras se mejora la calidad del producto final (González et al., 2020b), en este caso, bioetanol.

La estandarización puede explicarse como la definición y documentación de características específicas para adaptar un proceso a un modelo o patrón (Yi et al., 2025), por lo que el análisis de la variabilidad experimental es un factor clave en el establecimiento de las condiciones óptimas de la obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal. Como referente, Guzmán (2014) a través de un estudio metodológico de la producción de bioetanol a partir de mucilago de café propuso un protocolo claramente detallado sobre los procesos de tratamiento, pasteurización, fermentación y destilación, optimizando así la operación de una planta de biocombustibles.

En términos de la obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal es importante definir los parámetros metodológicos a lo largo de todas las etapas del proceso. Esto contempla la selección de la especie microalgal y las condiciones de cultivo que determinan la productividad y el contenido de carbohidratos, los métodos de cosecha y acondicionamiento de la biomasa, los parámetros de pretratamiento que promueven la liberación de azúcares fermentables, así como las condiciones de fermentación alcohólica que influyen en la eficiencia de conversión a bioetanol.

## I.8. Sostenibilidad y economía circular en la producción de bioetanol a partir de microalgas cultivadas en agua residual

La producción de bioetanol a partir de microalgas cultivadas en agua residual puede enmarcarse en los principios de economía circular, una clave en el cumplimiento de políticas públicas y marcos regulatorios internacionales orientados al desarrollo sostenible (Khanna et al., 2022). En este sentido es conveniente el análisis del alcance de esta tecnología en la solución de las problemáticas que comprometen el equilibrio ambiental, social y económico que integran el concepto de sostenibilidad.

La sostenibilidad fue definida por la Organización de las Naciones Unidas (1987) como la satisfacción de las necesidades del presente que no compromete la capacidad de las futuras generaciones para satisfacer sus propias necesidades. A su vez, la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (2025) explica la sostenibilidad a partir del principio de que lo que se necesita para la supervivencia y bienestar depende directa o indirectamente del entorno natural, de manera que es necesario establecer condiciones que permitan la armonía productiva entre los humanos y la naturaleza. Este concepto comprende el equilibrio de tres dimensiones: ambiental, enfocada a la preservación de recursos naturales y ecosistemas; social, orientada a la calidad de vida e integración social, y económica, dirigida hacia la eficiencia y viabilidad de actividades productivas a largo plazo (Purvis et al., 2019). Al respecto, también se destaca el desarrollo sostenible como el conjunto de políticas, estrategias y modelos de acción necesarios para lograr la sostenibilidad como un objetivo final (Mensah, 2019).

La producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual está relacionada con el cumplimiento de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible (Organización de las Naciones Unidas, 2015) de la que México es país miembro, respondiendo a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) específicamente a través del tratamiento de aguas residuales mediante la fijación de nutrientes, metales pesados y contaminantes orgánicos por el cultivo de microalgas (ODS 6.3), la utilización de biomasa microalgal como fuente de energía renovable (ODS 7.2), la modernización de infraestructura en las plantas de tratamiento para la implementación de la producción de biomasa microalgal (ODS 9.4), el fomento del modelo de

economía circular al transformar una corriente de residuos en un producto de valor (ODS 12.5) y la reducción en las emisiones de GEI al sustituir combustibles fósiles (ODS 13.2).

En algunas ocasiones el término de sostenibilidad se emplea indistintamente de la sustentabilidad sin embargo es importante diferenciarlos por la magnitud de su ámbito. Como ya se comentó, la sostenibilidad está dirigida hacia la armonía de la dimensión ambiental, social y económica a largo plazo. No obstante, la sustentabilidad tiene una perspectiva operativa asociada a la capacidad de un sistema de autoabastecerse mediante la regeneración de sus insumos y la gestión eficiente de sus residuos, por lo que su alcance se limita a la dimensión ambiental y en ciertos casos económica (Zarta, 2018).

La producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual, como tecnología, se considera sustentable ya que su enfoque es principalmente ambiental y económico debido al aprovechamiento de corrientes de residuos renovables (aguas residuales), su tratamiento para mejorar la calidad del agua y la simultánea producción de microalgas y obtención de un bioproducto (bioetanol) altamente valorizable. No obstante, de manera aplicativa y con una perspectiva a largo plazo, su contribución a las tres dimensiones de la sostenibilidad constituye una estrategia fundamental para el desarrollo sostenible pues orienta las prácticas productivas hacia la reducción de impactos ambientales, mejorar la calidad de vida y sostener los sistemas económicos a través de la innovación tecnológica y la economía circular.

En cuanto a la economía circular, esta se define como un modelo de producción y consumo que implica el uso responsable y cíclico de recursos, materiales y productos existentes en el sistema productivo todas las veces que sea posible para crear un valor añadido, promoviendo la minimización de la generación de residuos desde el diseño de bienes y servicios y la desvinculación del crecimiento económico del uso de los recursos naturales. Al respecto se establecen diez estrategias de economía circular en un marco R: rechazar, repensar, reducir, reusar, reparar, reacondicionar, remanufacturar, readaptar, recuperar y reciclar (Ministerio de Ambiente y Energía, s.f.; Moraga et al., 2019; Parlamento Europeo, 2023).

La producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual actúa, a su vez, en el marco de economía circular a través de la potencial sustitución de combustibles fósiles por biocombustibles renovables (rechazar); la integración del tratamiento de aguas residuales con

la producción energética en un sistema unificado (repensar); el reúso del agua residual como medio de cultivo para las microalgas (reusar) y la fijación de nutrientes presentes en las aguas residuales principalmente nitrógeno y fósforo en las microalgas, así como su aprovechamiento en la producción de energía renovable (recuperar y readaptar) (Domínguez, 2018; Wang et al., 2017). A su vez, se puede incluir la estrategia de reciclar ampliando el enfoque de esta tecnología a través del uso de la biomasa residual de la obtención de bioetanol para la producción de biocombustibles gaseosos (biogás y biohidrógeno) (Jimenez & Castillo, 2021).

En relación con lo anterior, diversos estudios han orientado sus investigaciones hacia el desarrollo de sistemas de biorrefinería, donde no se limita el uso de la biomasa a la producción de un solo biocombustible, sino que se busca el aprovechamiento de las porciones residuales para la obtención de numerosos bioproductos de valor a través de procesos en serie, consolidando así la viabilidad económica de la producción de biocombustibles de tercera generación, la principal barrera en su implementación a gran escala. Sin dejar de lado la importancia de su compromiso con la minimización de impactos ambientales y la mitigación del cambio climático (Dasan et al., 2019; El-Dalatony et al., 2017; González et al., 2020a; Hammann et al., 2024; Jimenez & Castillo, 2021).

Cabe mencionar que, para comprender y delimitar los alcances de la economía circular, la Comisión Europea (s.f.) ha establecido un marco de seguimiento basado en indicadores de economía circular clasificados en 5 categorías, dentro de las que son aplicables para la producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual: 1. Producción y consumo: la productividad de los recursos. 2. Gestión de residuos: las tasas de reciclaje para corrientes de residuos específicos. 3. Materias primas secundarias: la tasa de uso circular de materiales y el comercio de materias primas reciclables. 4. Competitividad e información: la promoción de procesos industriales innovadores, así como la inversión privada, el empleo y el valor añadido bruto relacionados con los sectores de economía circular. 5. Sostenibilidad y resiliencia globales: la huella de consumo, las emisiones de GEI derivadas de las actividades productivas y la autosuficiencia de materias primas seleccionadas para la producción (D'Adamo et al., 2024). Por lo que para evaluar la eficiencia de este proceso en su contribución a la economía circular resulta pertinente la determinación de estos indicadores.

## II. ANTECEDENTES

La producción de bioetanol a partir de microalgas ha sido ampliamente investigada. Sin embargo, en la mayoría de los estudios se emplean sistemas cerrados y en condiciones estériles para el cultivo de microalgas, controlando su composición biológica y utilizando medios de cultivo sintéticos que, generalmente, resultan en un alto contenido de carbohidratos aprovechables para la obtención de bioetanol. Este factor es clave en la determinación del rendimiento global del proceso, por lo que es pertinente analizarlo en condiciones ambientales reales, haciendo uso de aguas residuales como medio de cultivo. Esto permite comprender de manera precisa los alcances de la tecnología y, en particular, identificar las áreas de oportunidad orientadas a la optimización del proceso, con el fin de lograr un rendimiento global ambiental y económicamente satisfactorio.

Al respecto, en la Tabla 1 se muestra la composición bioquímica (carbohidratos, lípidos y proteínas) de cultivos de *Scenedesmus* y *Desmodesmus* bajo distintas condiciones de crecimiento, donde se observa que los cultivos crecidos en aguas residuales presentan un menor contenido de carbohidratos (6-16% en peso seco de biomasa) respecto a los que fueron enriquecidos con medio nutritivo sintético (21-55%), a excepción de Alves et al. (2021) que obtuvo un porcentaje de hasta 44% de carbohidratos empleando aguas residuales como fuente de nutrientes.

**Tabla 1. Composición bioquímica (carbohidratos, lípidos y proteínas) de microalgas**

Especies de microalgas	Condiciones de cultivo	CHO (%)*	Lípidos (%)*	Proteínas (%)*	Referencia
<i>Desmodesmus</i> sp. VIT	Medio nutritivo sintético. Fotobiorreactor de placa plana continua (PBR). Iluminación artificial.	25.4	12.5	SD	Sriram & Seenivasan (2015)
<i>S. obliquus</i>	Medio nutritivo sintético. Fotobiorreactor de placa plana continua (PBR). Iluminación artificial	45.9 ± 4.5	25.34 ± 0.64	33.63 ± 4.04	Silva et al. (2018)
<i>S. obliquus</i> UTEX 393	Medio nutritivo sintético. Fotobiorreactores (2L). Iluminación artificial.	55.4	22.6	20.2	Singh et al. (2019)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Medio nutritivo sintético. Matraces (0.5L). Iluminación artificial.	22	SD	SD	Oraby et al. (2023)
<i>Desmodesmus</i> XB	Medio nutritivo sintético. Iluminación artificial.	21± 6.3	32± 3.4	50± 0.9	Bomer & Leverett (2024)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Medio nutritivo sintético. Fotobiorreactor de placa plana continua (PBR) 10 L. Iluminación artificial.	54	34.8	SD	Uguz et al. (2025)
Consorcio con predominancia de <i>Scenedesmus</i> sp.	Agua residual municipal. Fotobiorreactores de PET (5L) Iluminación artificial	7.0± 0.9	SD	SD	Romero et al. (2021)
Consorcio con predominancia de <i>Desmodesmus</i> sp.	Agua residual municipal. Reactores (10 L). Iluminación artificial	14.3± 0.9	11.2±0.4	26±0.5	González et al. (2021)
Consorcio con predominancia de <i>S. obliquus</i>	Agua residual municipal. HRAP	15.7	3.8	33.4	Castaño (2015)
Consorcio con predominancia de <i>Scenedesmus</i> sp.	Agua residual municipal. HRAP (30 L). Iluminación artificial	6-44	3-7.5	SD	Alves et al. (2018)
Consorcio con predominancia de <i>Desmodesmus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>S. obliquus</i> .	Agua residual municipal. HRAP (30 L). Iluminación artificial	11.7± 1.5	6.1±0.2	30±0.4	Nava et al. (2021)
Consorcio con predominancia de <i>Desmodesmus</i> sp. y <i>S. obliquus</i>	Agua residual municipal. HRAP (30 L). Iluminación natural y artificial	6.33-8.57	SD	SD	Camargo (2024)

\*% en peso seco de biomasa

CHO: carbohidratos

SE: sin especificar

SD: sin determinar

PET: tereftalato de polietileno

HRAP: reactores algales de alta tasa

Otro factor determinante en la producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal corresponde a la extracción de carbohidratos y su conversión en azúcares simples susceptibles de ser fermentados en una etapa posterior. La hidrólisis ácida es un método comúnmente utilizado para este fin, Ho et al. (2013) empleó hidrólisis ácida en autoclave (121°C, 20 min) de un cultivo de *S. obliquus* (CNW-N) con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2% v/v obteniendo un rendimiento de glucosa del 96-98%, además determinó una eficiencia de hidrólisis similar entre el uso de biomasa húmeda y biomasa seca, recomendado omitir el proceso de secado para la disminución de costos operativos. A su vez, bajo condiciones análogas de hidrólisis en autoclave (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2% v/v, 120°C, 30 min), Sanchez et al. (2017) logró la recuperación más alta de carbohidratos correspondiente al 95% empleando una carga de biomasa de 100 g/L de *Desmodesmus* sp., su estudio comprendió la variabilidad de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5-4% v/v), carga de biomasa (25-100 g/L), así como temperatura (60-120°C) y tiempo en autoclave (15-60 min).

Por su parte, Silva et al. (2018) alcanzó la recuperación de carbohidratos entre 70-80% utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3% v/v, 120°C y 30 min en autoclave, así como una carga óptima de biomasa de 50 g/L de *S. obliquus*, indicando que al exceder tal carga de biomasa se produjo una viscosidad que limitó la extracción de carbohidratos. En su caso, comparó la efectividad del ácido clorhídrico frente al ácido sulfúrico en la hidrólisis ácida, resultando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> el más adecuado para la obtención de azúcares reductores. De manera general, en los estudios de hidrólisis ácida de biomasa microalgal se observa una mayor extracción de carbohidratos y conversión en azúcares reductores, así como una menor producción de compuestos inhibidores de la fermentación al emplear H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1-3% v/v en un sistema de hidrólisis en autoclave (120°C-121°C, 20-30 min), recomendado por su eficiencia y practicidad (Camargo, 2024; El-Mekkawi et al., 2019; Hammann et al., 2024; Ho et al., 2013; Sanchez et al., 2017; Silva et al., 2018; Tu et al., 2026)

En el caso particular de Romero (2019) que empleó un sistema de hidrólisis de reflujo por enfriamiento, el uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v a 90°C durante 120 min resultó en la recuperación del 70% de carbohidratos y 81% de conversión en azúcares reductores de un consorcio microalgal con predominancia de *Scenedesmus* sp. Sin embargo, Camargo (2024) que profundizó en el estudio de un consorcio microalgal con predominancia de *Desmodesmus* sp. y *S. obliquus*, determinó la obtención de una mayor cantidad azúcares reductores al emplear H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v frente a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v en un sistema de hidrólisis en autoclave (120°C, 25 min), infiriendo que una mayor

concentración de ácido promueve la formación de compuestos inhibidores y, con ello, la limitación de la recuperación de azúcares reductores. No obstante, en este estudio la biomasa fue sometida a un pretratamiento con ozonación que incrementó la eficiencia de la recuperación de azúcares.

Respecto a la fermentación de azúcares reductores y la obtención de bioetanol a partir de microalgas, Sanchez et al. (2017) empleó *S. cerevisiae* como microorganismo fermentador a una densidad óptica medida a 600 nm ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) de 0.25 en hidrolizados de *Desmodesmus* sp. produciendo 0.23 g etanol/ g biomasa a las 30 horas de fermentación comprobando la eficiencia de esta levadura, la cual es ampliamente utilizada en la industria fermentativa (Hossain & Mahlia, 2019). De manera similar, Chng et al. (2019) recuperó 0.21 g etanol/ g biomasa con el uso de *Saccharomyces diastaticus* en hidrolizados de *Scenedesmus dimorphus* (UTEX 1237), en este estudio se observó un mejor rendimiento de etanol a las 24 horas de fermentación respecto a las 48 horas, pues se detectó una disminución en el contenido de etanol al prolongar el tiempo de reacción sugiriendo que, al agotarse los carbohidratos disponibles en el medio, las levaduras lo consumieron para su propio crecimiento. A su vez, Ho et al. (2013) utilizó *Z. mobilis* a una DO de 2.0 obteniendo 0.21 g etanol/g biomasa de *S. obliquus* (CNW-N) en un tiempo de 4 h, lo que indica que la reducción del tiempo de fermentación resulta una opción viable para optimizar el proceso de obtención de bioetanol.

En cuanto al uso de microalgas cultivadas en aguas residuales la productividad de bioetanol es significativamente menor, esencialmente por la baja acumulación de carbohidratos en los cultivos, Romero (2019) reporta 0.022 g etanol/g biomasa de un consorcio microalgal con predominancia de *Scenedesmus* sp. con un contenido inicial de carbohidratos equivalente al 7% en peso seco de biomasa, para el que empleó *Candida* sp. como microorganismo fermentador a una  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0.1, presentando un tiempo óptimo de 30 h de fermentación equivalente a la producción de 0.46 g de etanol/ g glucosa. Por su parte, Camargo (2024) que utilizó un consorcio microalgal con predominancia de *Desmodesmus* sp. y *S. obliquus* con un contenido inicial de 8.6% de carbohidratos, registra 0.066 g etanol/ g biomasa a las 8 horas de fermentación utilizando *C. utilis* a una  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0.1. En contraste, El-Mekkawi et al. (2019) obtuvo 0.188 g etanol/g biomasa a las 44 horas de fermentación de un cultivo con predominancia de *Microcystis* sp. desarrollado en aguas residuales sin embargo la mayor productividad en este caso se atribuye a la elevada

acumulación inicial de carbohidratos, correspondiente al 45%, así como al empleo de *S. cerevisiae* como levadura fermentativa.

En conjunto, estudios previos han demostrado el potencial de la biomasa microalgal para la producción de bioetanol de tercera generación integrando el uso de aguas residuales como medio de cultivo. No obstante, la literatura indica una limitada estandarización de los parámetros asociados a la hidrólisis como método de pretratamiento de la biomasa, así como al aprovechamiento de los carbohidratos microalgales, además de presentar una variabilidad significativa en los rendimientos reportados. Dicha inconsistencia metodológica dificulta la comparación de resultados y, con ello, la evaluación integral del proceso desde un enfoque de sostenibilidad y economía circular. A partir de lo anterior, el presente estudio resulta relevante al aportar datos sistematizados que fortalecen la base científica orientada a la optimización del proceso y a la viabilidad de su escalamiento en la producción de bioetanol de tercera generación.

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### III.1. Objetivo general

Estandarizar el proceso de obtención de bioetanol a partir de microalgas cultivadas en agua residual, afinando la metodología experimental tanto para el pretratamiento con hidrólisis ácida como para la fermentación alcohólica, con el fin de establecer un patrón de repetibilidad en la totalidad del proceso.

#### III.2. Objetivos específicos

- Promover la liberación de carbohidratos contenidos en biomasa microalgal y su conversión en azúcares reductores mediante el pretratamiento con hidrólisis ácida, aplicando dos diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2.7% v/v y 5% v/v).
- Afinar el proceso de fermentación alcohólica para el aprovechamiento de los azúcares reductores obtenidos de la biomasa hidrolizada utilizando la levadura *C. jadinii*.
- Establecer un patrón de agotamiento de azúcares reductores en el proceso de fermentación alcohólica con base en la concentración del inóculo.
- Determinar el rendimiento de la obtención de bioetanol mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Comprobar la repetibilidad del proceso para la obtención de bioetanol bajo las condiciones experimentales propuestas.

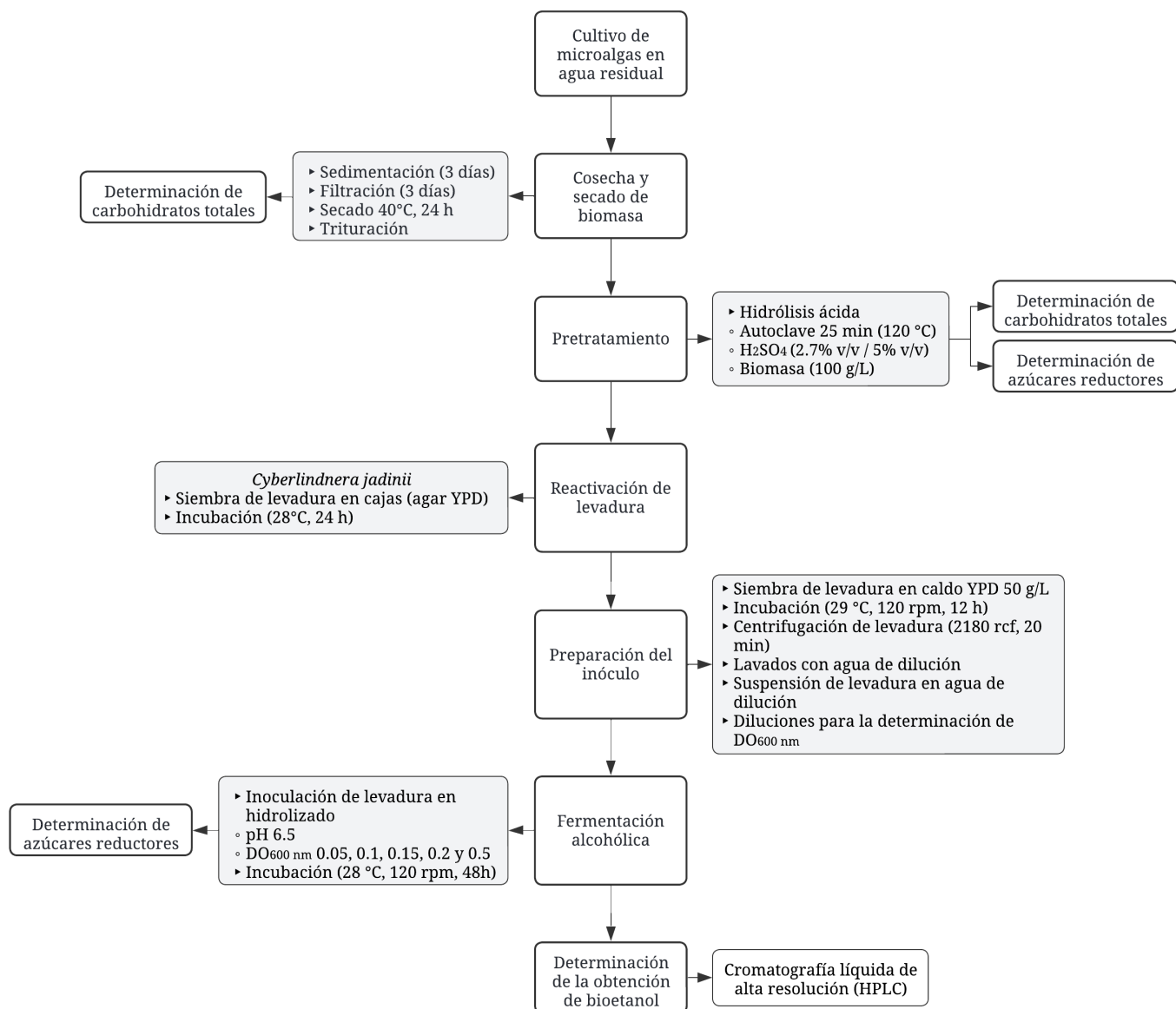
#### III.3. Hipótesis

La estandarización del proceso para la obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal permitirá establecer un patrón específico para la extracción de carbohidratos totales durante la hidrólisis ácida, así como un patrón para el agotamiento de azúcares reductores en la etapa de fermentación alcohólica, asegurando de este modo la repetibilidad del proceso experimental.

## IV. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### IV.1. Metodología general para la obtención de bioetanol

En este estudio se llevó a cabo la obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual a través de una metodología general (Figura 1) que consistió en el cultivo de microalgas en agua residual, la cosecha y secado de biomasa microalgal, el pretratamiento de la biomasa microalgal con hidrólisis ácida, la reactivación de la levadura *C. jadinii* como microorganismo fermentador, la preparación del inóculo de levadura para el proceso de fermentación, la fermentación alcohólica y la determinación de la obtención de bioetanol por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).



**Figura 1. Diagrama de la metodología general para la obtención de bioetanol.**

YPD: yeast peptide dextrose (levadura peptona dextrosa)

#### IV.2. Métodos analíticos de cuantificación

Los métodos analíticos de cuantificación indicados en la Tabla 2 se utilizaron para la determinación de la extracción de carbohidratos totales (CHO) de la biomasa microalgal recuperada del cultivo, así como la conversión de CHO en azúcares reductores (sacarificación) y su agotamiento durante la fermentación alcohólica. También se llevó a cabo la cuantificación de sólidos suspendidos totales (SST) con la finalidad de determinar el contenido de CHO en % en peso seco de la biomasa microalgal y la concentración del inóculo de la levadura *C. jadinii* en la

etapa de fermentación alcohólica. A su vez, se realizó la medición de pH para el ajuste del sobrenadante de la hidrólisis ácida de biomasa microalgal (hidrolizado) a pH de 6.5 requerido en la etapa de fermentación alcohólica.

**Tabla 2. Métodos analíticos de cuantificación. Adaptado de Camargo (2024)**

Parámetro	Método	Técnica	Referencia
Carbohidratos totales (CHO)	Colorimétrico. Fenol-sulfúrico (Anexo A)	Absorbancia a 490 nm. Espectrofotómetro Hach DR 3900	DuBois et al. (1956)
Azúcares reductores	Colorimétrico. Ácido 3,5-dinitrosalicílico. Reactivo DNS (Anexo B)	Absorbancia a 540 nm. Espectrofotómetro Hach DR 3900	Miller (1959)
Sólidos suspendidos totales (SST)	Gravimétrico. 2540D	Filtración con filtros de fibra de vidrio (1.6 µm) Secado a 105°C Horno Precision Econotherm 51221126	APHA-AWWA-WEF (2005)
pH	Electrométrico. 4500 HB	Medición con potenciómetro	APHA-AWWA-WEF (2005)

### IV.3. Cultivo de microalgas

La etapa correspondiente al cultivo de microalgas se llevó a cabo en la planta piloto para la valorización de agua residual y producción de biomasa microalgal - Atzintli, operada por el Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y construida en colaboración con la Universidad de Newcastle, Reino Unido. El cultivo consistió en el crecimiento de un consorcio microbiano originario del lago Nabor Carrillo ubicado en Texcoco, México, el cual se alimentó con efluentes de dos lagunas facultativas de una planta de tratamiento de aguas residuales (González et al., 2021; Nava et al., 2021; Velásquez et al., 2014). En este estudio, el consorcio microbiano se cultivó en agua residual municipal procedente de la Planta de Tratamiento de Agua Residual de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la UNAM, que maneja un efluente biológico secundario. El consorcio microbiano fue caracterizado como parte del cumplimiento de los objetivos del proyecto “Intensificación de los procesos para la obtención de biocompuestos a partir de agua residual” de los Grupos Interdisciplinarios de Investigación (GII) del Instituto de Ingeniería - UNAM mediante la extracción y secuenciación de ácido

desoxirribonucleico (DNA). En la identificación se determinó la predominancia de las especies microalgales *Desmodesmus* sp. y *S. obliquus*.

Para el cultivo de microalgas se operaron simultáneamente dos reactores algales de alta tasa (HRAP), uno de 300 L y otro de 1.2 m<sup>3</sup> (Figura 2), que contenían agua residual en la que periódicamente se inoculó un concentrado del consorcio microbiano. La concentración del inóculo se estableció en 50 mg/L por lo que, con base en la determinación de SST del concentrado del consorcio microbiano, se adicionaron 25 mL en el HRAP de 300 L y 100 mL en el HRAP de 1.2m<sup>3</sup> para iniciar el periodo de cultivo. Ambos reactores operaron con agitación constante para suministrar aireación al cultivo y favorecer su crecimiento.



**Figura 2. Reactores algales de alta tasa (HRAP) de 300 L y 1.2 m<sup>3</sup> de cultivo microalgal en agua residual**

El HRAP de 300 L se manejó como un sistema en continuo, con un TRH de 12 días. A su vez, el HRAP de 1.2m<sup>3</sup> se manejó por lotes con un TRH de 14 días. En ambos casos, el TRH se estableció a partir del monitoreo de los parámetros de turbiedad, pH, temperatura, flujo, radiación incidente y SST en el que el máximo crecimiento del cultivo y la máxima remoción de nutrientes del agua residual se alcanzó en el día 12 y 14, respectivamente. Asimismo, cada tercer día se compensó la pérdida de agua por evaporación.

#### IV.4. Cosecha y secado de biomasa microalgal

Una vez concluido el TRH, la biomasa microalgal del HRAP de 300 L se concentró en bidones de tereftalato de polietileno (PET) de 10 L mientras que la del HRAP de 1.2 m<sup>3</sup> se concentró en una cisterna de polietileno de alta densidad (HDPE). Al cabo de tres días se recuperó la biomasa sedimentada por gravedad y se filtró, también por gravedad, utilizando tela de algodón, formándose una pasta densa de biomasa microalgal que posteriormente fue secada a 40°C (González et al., 2021) por 24 horas en un desecador eléctrico (Figura 3).



**Figura 3. Biomasa microalgal para la obtención de bioetanol en proceso de secado**

Posteriormente, se obtuvieron placas de biomasa seca que se fraccionaron hasta conseguir gránulos que, a su vez, fueron triturados en un molino eléctrico hasta obtener un polvo fino con la finalidad de homogeneizar el tamaño de partícula y tener una mayor superficie de contacto en el proceso de hidrólisis ácida, la siguiente etapa experimental. La biomasa recuperada del 5 de marzo al 30 de julio de 2024 se mezcló y se almacenó a 4°C en un recipiente con tapa hermética y aluminio, con el fin de evitar el humedecimiento y garantizar la conservación hasta su uso.

#### IV.5. Hidrólisis ácida

Como pretratamiento de la biomasa microalgal se llevó a cabo hidrólisis ácida en autoclave por 25 minutos a 120°C (Camargo, 2024), empleando ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 5% v/v (Anexo C) y una concentración de biomasa de 100 g/L (Romero, 2019). Cabe mencionar que las muestras sometidas a hidrólisis fueron seleccionadas mediante el cuarteo de la totalidad de la biomasa almacenada (Figura 4).



**Figura 4. Cuarteo de la biomasa microalgal para la selección de muestras a hidrolizar**

Se generó una reserva suficiente de muestras hidrolizadas para las pruebas de fermentación. En la Figura 5 se observa la preparación de las muestras a hidrolizar en las que se agregaron 500 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% v/v y 50 g de biomasa seca en cada matraz de 1L.



**Figura 5. Preparación de muestras de biomasa microalgal sometidas a hidrólisis ácida**

Estas muestras fueron introducidas en la autoclave por 25 minutos a partir de alcanzar una presión de 18 psi y una temperatura de  $120^\circ\text{C}$  (Figura 6).



**Figura 6. Hidrólisis ácida de biomasa microalgal en autoclave**

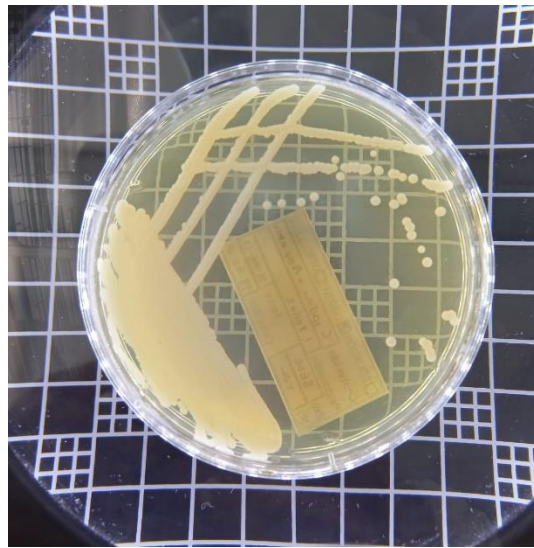
Una vez concluida la hidrólisis, la manipulación del resto del experimento se realizó en condiciones de asepsia que comprenden el uso de un mechero de Fisher, la esterilización del material utilizado, la desinfección del área de trabajo y el lavado de manos. De esta manera se homogeneizaron las muestras hidrolizadas en una jarra de plástico y se distribuyó el contenido en matraces de 1L que fueron almacenados a 4°C hasta las pruebas de fermentación.

Para cada prueba de fermentación, se tomó un matraz de la reserva y se separó el sobrenadante (hidrolizado) de la biomasa residual centrifugando por 15 minutos a 1500 RCF (fuerza centrífuga relativa). Después se realizó el ajuste de pH del hidrolizado llevándolo a un pH de ~6.3 utilizando hidróxido de sodio (NaOH) 5M (Anexo C). Para un volumen de 700 mL de hidrolizado se agregaron 200 mL de NaOH 5M. Posteriormente se retiraron las sales producidas por la neutralización bajo las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente se verificó que el hidrolizado se encontrara en un pH de  $6.5 \pm 0.05$ . A su vez, se realizaron tres lavados de la biomasa residual de hidrólisis ácida con agua destilada para el análisis del balance de la extracción de CHO correspondiente.

#### IV.6. Reactivación de la levadura *C. jadinii* y preparación del inóculo para la fermentación alcohólica

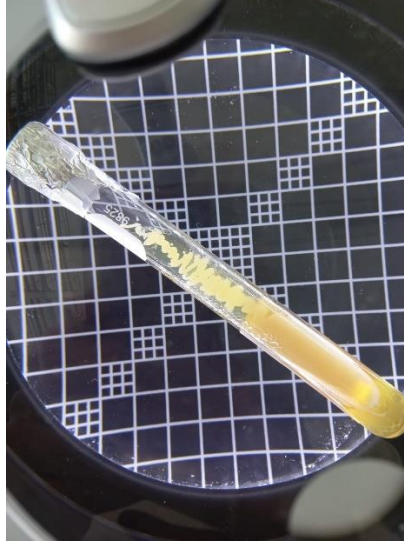
La levadura *C. jadinii* fue seleccionada para este estudio como microorganismo fermentador de un conjunto de especies de levaduras previamente aisladas de agua residual proveniente de la Planta de Tratamiento de Agua Residual de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la UNAM. El

aislamiento e identificación de las levaduras recuperadas también se llevó a cabo como parte del cumplimiento de los objetivos del proyecto “Intensificación de los procesos para la obtención de biocompuestos a partir de agua residual” mediante la extracción de DNA y su posterior amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la etapa de reactivación del microorganismo fermentador en este estudio, se prepararon cajas Petri con caldo YPD ( $50 \text{ gL}^{-1}$ ) y agar bacteriológico al 2% (Anexo D) y se llevó a cabo la siembra de la levadura *C. jadinii* por método de dilución (Figura 7). Posteriormente se incubó a  $28^\circ\text{C}$  por 24 horas.



**Figura 7. Siembra por método de dilución de *C. jadinii* en cajas Petri.**

La resiembra se llevó a cabo cada dos semanas como método de conservación a corto plazo con el fin de prevenir la inactividad celular en el cultivo y evitar la contaminación con otros microorganismos. Para la conservación a largo plazo y el mantenimiento de la cepa pura, se sembró por estría en tubos con agar inclinado (Figura 8) incubados a  $28^\circ\text{C}$  por 72 horas y posteriormente almacenados a  $4^\circ\text{C}$ .



**Figura 8. Siembra por estría de *C. jadinii* en tubo de agar inclinado**

A su vez, en cada prueba experimental, se resembró la levadura y se incubó a 28°C por 24 horas. Una vez crecida la cepa, se sembró una asada del cultivo en 50 mL de caldo YPD (50 gL<sup>-1</sup>) (Anexo D) y se incubó a 29°C por 12 horas suministrando agitación constante de 120 RPM (revoluciones por minuto). Posteriormente se separó la levadura del caldo YPD por centrifugación a 2180 RCF durante 20 minutos, realizando tres lavados posteriores con agua de dilución (Anexo D) para retirar residuos del medio de cultivo. Por último, la pastilla de levadura concentrada se suspendió en 10 mL de agua de dilución para su uso como inóculo en la etapa de fermentación.

El inóculo de la levadura *C. jadinii* para la fermentación alcohólica se estableció con base en el estudio de Romero et al. (2021) donde el hidrolizado se enriqueció con células de levadura a una densidad óptica medida a 600 nm (DO<sub>600 nm</sub>) de 0.1, esto a su vez corresponde a una densidad celular de 3×10<sup>6</sup> celmL<sup>-1</sup> (Romero, 2019). Por lo que, para este estudio, se realizaron diluciones de la levadura concentrada de 1:10, 1:100 y 1:1000 con agua de dilución en un volumen total de 10 mL y se determinó la DO<sub>600 nm</sub> por espectrofotometría (Tabla 3). A partir de lo anterior, se estableció el volumen del inóculo a utilizar en la fermentación tal como se muestra en la memoria de cálculo a continuación.

**Tabla 3. Diluciones de la levadura concentrada medidas a 600 nm-Tercera prueba preliminar (PP3)**

Dilución	Levadura concentrada (µL)	DO <sub>600nm</sub>
1:10	1000	1.375
1:100	100	0.219
1:1000	10	0.024

Se seleccionaron las diluciones 1:100 y 1:1000 correspondientes al rango que contenía una DO<sub>600 nm</sub> de 0.1 y se calculó la relación a partir de la Ecuación 6,

**Ecuación 6**

$$\frac{V_{Levc}}{DO_{600nm}} \cdot 0.1 = V_{LevcDO0.1}$$

Donde,

V<sub>Levc</sub>: volumen de levadura concentrada (µL)

DO<sub>600nm</sub>: densidad óptica medida a 600 nm

V<sub>LevcDO0.1</sub>: volumen de levadura concentrada requerida para una DO<sub>600nm</sub> de 0.1

Considerando que la levadura concentrada fue suspendida en 10 mL y que el volumen de hidrolizado a inocular en la fermentación se fijó en 100 mL, el volumen de inóculo requerido fue de 437 µL (Tabla 4).

**Tabla 4. Cálculo del inóculo para una DO<sub>600nm</sub> de 0.1 –Tercera prueba preliminar (PP3)**

Dilución	V <sub>LevcDO0.1</sub> (µL) 10 mL	$\bar{x}$ V <sub>LevcDO0.1</sub> (µL) 10 mL	V <sub>LevcDO0.1</sub> (µL) 100 mL
1:100	45.66	43.67	437
1:1000	41.67		

Este cálculo se realizó para cada prueba de fermentación. Además, con fines de estandarizar la concentración del inóculo, se determinaron SST y la densidad celular de la levadura concentrada, ésta última de acuerdo con la escala de McFarland (Anexo E).

**IV.7. Fermentación alcohólica.**

La fermentación alcohólica se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de hidrolizado. El hidrolizado fue inoculado con la levadura concentrada según el cálculo realizado en el apartado IV.6. Una vez colocado el inóculo, los matraces se sellaron con papel aluminio y

papel Parafilm y se incubaron a 28°C por 48 horas suministrando agitación constante de 120 RPM en una incubadora New Brunswick Scientific modelo Excella E24 (Figura 9).



**Figura 9. Prueba de fermentación alcohólica en incubadora con agitación constante**

En el diseño experimental se propuso variar la concentración del inóculo para comparar el agotamiento de azúcares reductores en las pruebas de fermentación, estas se clasificaron en tres pruebas preliminares, cinco pruebas de estandarización y cuatro pruebas complementarias tal como se indica en la Tabla 5.

**Tabla 5. Diseño experimental para las pruebas de fermentación alcohólica**

Pruebas experimentales		Concentración del inóculo (DO <sub>600nm</sub> )		
Pruebas preliminares	PP <sub>1</sub>	0.05	0.1	0.15
	PP <sub>2</sub>			
	PP <sub>3</sub>	0.1	0.2	0.5
Pruebas de estandarización	PE <sub>1</sub>	0.1	0.2	0.5
	PE <sub>2</sub>			
	PE <sub>3</sub>			
	PE <sub>4</sub>			
	PE <sub>5</sub>			
Pruebas complementarias	PC <sub>1</sub>	0.5		
	PC <sub>2</sub>			
	PC <sub>3</sub>			
	PC <sub>4</sub>			

En cada prueba de fermentación se manejaron dos muestras adicionales, una muestra control de hidrolizado sin levadura (B-) y otra muestra control de glucosa disuelta en agua de dilución (B+) que fue inoculada a una DO<sub>600nm</sub> de 0.1 en las pruebas preliminares y las pruebas de estandarización, y a una DO<sub>600nm</sub> de 0.5 en las pruebas complementarias.

Para analizar el agotamiento de azúcares reductores se tomaron muestras por duplicado en tubos Eppendorf de 1.5 mL, estos se centrifugaron por 15 min a 8000 RPM. El sobrenadante fue transferido a tubos Eppendorf que posteriormente se sellaron con papel Parafilm y se almacenaron a 4°C hasta la determinación de azúcares reductores y a -18°C hasta la determinación de glucosa y etanol por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

#### IV.8. Determinación de bioetanol

Para la cuantificación de la obtención de bioetanol se llevó a cabo la determinación de glucosa y etanol por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se empleó un muestreador automático Waters Alliance e2695 Separations Module (Figura 10) con las condiciones de operación indicadas en la Tabla 6.



**Figura 10. Equipo de HPLC empleado para la determinación de glucosa y etanol en el Instituto de Biotecnología de la UNAM**

**Tabla 6. Configuración de la operación del equipo de HPLC**

<b>Parámetro</b>	<b>Condición</b>
<b>Columna</b>	BioRad AMINEX HPX-87H Organic acid Analyses
<b>Flujo</b>	0.6 mL/min
<b>Fase móvil</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5mM
<b>Temperatura</b>	50°C
<b>Detector</b>	IR 16X 30°C / UV/Vis (210 nm)
<b>Inyección</b>	10 µL de muestra
<b>Tiempo de corrida</b>	27 min

Para la determinación de glucosa se utilizó un detector de índice de refracción (IR) 16 X a 30°C, mientras que para la determinación de etanol se utilizó un detector de longitud de onda variable (UV/Vis) a 210 nm. En el Anexo F se muestran las curvas de calibración construidas a partir de soluciones estándar de glucosa y etanol de 0 a 20 g/L.

#### IV.9. Pruebas complementarias

Con base en las pruebas preliminares y de estandarización, se fijaron las condiciones estandarizadas de la metodología experimental para la obtención de bioetanol y se llevaron a cabo cuatro pruebas complementarias. En la primera prueba complementaria (PC<sub>1</sub>) la concentración de la levadura utilizada como inóculo para la fermentación alcohólica se fijó en DO<sub>600nm</sub> de 0.5 según el cálculo realizado en el apartado IV.6, tal como se realizó en las pruebas anteriores.

Sin embargo, en la segunda prueba complementaria (PC<sub>2</sub>) se establecieron dos variantes. Una de ellas fue el uso de biomasa microalgal de cultivos de reciente recuperación (4 de febrero-4 de abril de 2025) provenientes de la planta Atzintli. La otra variante consistió en establecer la relación del inóculo en mg de levadura por litro de hidrolizado correspondiente a una DO<sub>600nm</sub> de 0.5, a partir de la determinación de SST de la levadura concentrada en 10 mL de agua de dilución. Asimismo, se estableció su densidad celular de acuerdo con la escala de McFarland (Anexo E). Lo anterior se realizó con el fin de aumentar la practicidad en el cálculo del inóculo para la fermentación alcohólica. Las condiciones estandarizadas de hidrólisis ácida y fermentación alcohólica se especifican en la Tabla 7 y la Tabla 8, respectivamente.

**Tabla 7. Condiciones estandarizadas de hidrólisis ácida-Pruebas complementarias (PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub>)**

Hidrólisis ácida			
Ácido sulfúrico (%v/v)	Carga orgánica (g/L)	Temp (°C)	Tiempo (min)
5.0	100	120	25

Temp: temperatura

**Tabla 8. Condiciones estandarizadas de fermentación alcohólica-Prueba complementaria 2 (PC<sub>2</sub>)**

Fermentación alcohólica								
Tiempo óptimo (h)	Temp (°C)	Agit (rpm)	pH	Vol <sub>H</sub> (mL)	Microorganismo fermentador	Inóculo		
						DO <sub>600nm</sub>	Densidad celular (cel/mL)*	Concentración (mg <sub>Lev</sub> /L <sub>Hidrolizado</sub> )
8	28	120	6.5	100	<i>C. jadinii</i>	0.5	6.7×10 <sup>8</sup>	284.5

Temp: temperatura

Agit: agitación

Vol<sub>H</sub>: volumen de hidrolizado

mg<sub>Lev</sub>: miligramos de levadura

\*Densidad celular establecida de acuerdo con la escala de McFarland (Anexo E)

A su vez, en la tercera y cuarta prueba complementaria (PC<sub>3</sub> y PC<sub>4</sub>) se realizaron adecuaciones experimentales en la hidrólisis ácida y la fermentación alcohólica, con el fin de analizar de manera exploratoria si al emplear un ácido menos concentrado en la hidrólisis ácida se producía una menor cantidad de compuestos inhibidores de la fermentación y con ello, un mejor aprovechamiento de los azúcares reductores por la levadura *C. jadinii* para lograr una obtención más eficiente de bioetanol. Por lo tanto, en estas dos últimas pruebas se empleó ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2.7% v/v

en la hidrólisis ácida con base en las recomendaciones de Chng et al. (2019) y Camargo (2024). Además, con el fin de reducir la dilución del hidrolizado durante el ajuste de pH, se añadieron 10 g de hidróxido de sodio (NaOH) granular a un volumen de hidrolizado de 500 mL sustituyendo el uso de NaOH 5M, posteriormente se retiraron las sales producidas por la neutralización centrifugando por 15 minutos a 1500 RCF, tal como se realizó en las pruebas anteriores y se verificó que el hidrolizado se encontrara en un pH de  $6.5 \pm 0.05$ .

Respecto a la fermentación se manejó una muestra de 50 mL de hidrolizado inoculado con la levadura *C. jadinii* para cada hora de monitoreo del agotamiento de azúcares reductores 0, 8, 24, 30 y 48 horas. El inóculo se estableció en una concentración de 284.5 mg de levadura por litro de hidrolizado a partir de la relación establecida en la segunda prueba complementaria (PC<sub>2</sub>) correspondiente a una DO<sub>600nm</sub> de 0.5. Además, las muestras para la determinación de bioetanol por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se filtraron en filtros para jeringa de 0.22 µm. Las muestras filtradas se preservaron a -18°C en viales analíticos de 1.5 mL previamente sometidos a un proceso de lavado mediante inmersión en agua destilada y secado en horno a 180°C durante 24 horas, para eliminar impurezas y humedad que pudieran alterar el análisis correspondiente.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan los resultados obtenidos para el proceso de obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual. Estos resultados comprenden la extracción de CHO y su conversión en azúcares reductores (sacarificación) en la hidrólisis ácida, el agotamiento de azúcares reductores y la obtención de bioetanol durante la fermentación alcohólica y, finalmente, la interpretación del coeficiente de variación como criterio para evaluar la consistencia y repetibilidad de los resultados experimentales.

### V.1. Extracción de carbohidratos totales en la hidrólisis ácida

La determinación de la extracción de CHO se llevó a cabo mediante el análisis de los CHO contenidos en la biomasa microalgal previa a la hidrólisis ácida, así como los CHO presentes en el hidrolizado (sobrenadante) y la biomasa residual de la hidrólisis. De acuerdo con los resultados de las cinco pruebas de estandarización (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>) empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v, de la biomasa microalgal con un contenido de 11.12 %m/m de CHO iniciales se logró la extracción del 74.1% de CHO, presentes en el hidrolizado. A su vez, se cuantificó el 28.5% de CHO en la biomasa residual lo que, con el ajuste por desviación estándar, permite establecer el balance de CHO en la etapa de hidrólisis (Tabla 9). El análisis de CHO anterior también se llevó a cabo para las dos pruebas complementarias (PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub>) empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v resultando en la extracción del 74.3% de CHO, mientras que en la tercera y cuarta prueba complementaria (PC<sub>3</sub> y PC<sub>4</sub>) empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v, se obtuvo una extracción de CHO correspondiente al 70.0%.

Respecto al contenido de CHO en la biomasa residual, en las pruebas complementarias PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub> empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v se cuantificó el 27.3%, mientras que en las pruebas PC<sub>3</sub> Y PC<sub>4</sub> empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v se cuantificó el 29.3% que, con los ajustes estadísticos correspondientes, confirman el balance de CHO en la etapa de hidrólisis ácida. En primera instancia se observa que se obtuvo una mayor extracción de CHO empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v en la hidrólisis ácida (74.3%), sin embargo, al comparar con la extracción de CHO empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v (70.0%) la diferencia no se considera significativa.

**Tabla 9. Extracción de carbohidratos totales (CHO) en las pruebas de hidrólisis ácida**

P <sub>exp</sub>	CHO <sub>in</sub> %*	CHO en el hidrolizado				CHO ext				CHO en BR			
		g/L	$\bar{x}$	s	CV	%**	$\bar{x}$	s	CV	% ***	$\bar{x}$	s	CV
PE <sub>1</sub>	11.12	8.49	8.2	0.2	3%	76.4	74.1	2.0	3%	31.46	28.6	2.7	10%
PE <sub>2</sub>		8.45				76.0				24.27			
PE <sub>3</sub>		8.11				72.9				27.91			
PE <sub>4</sub>		8.13				73.1				29.87			
PE <sub>5</sub>		7.99				71.9				29.53			
PC <sub>1</sub>	11.19	8.24	8.3	0.1	1%	74.1	74.3	0.4	1%	28.39	27.3	1.5	5%
PC <sub>2</sub>		8.35				74.6				26.30			
PC <sub>3</sub>	11.42	7.94	8.0	0.3	3%	69.5	70.0	0.7	1%	29.51	29.3	0.3	1%
PC <sub>4</sub>		8.04				70.4				29.06			

\* mgCHO/mgbiomasa

\*\* mgCHO<sub>ext</sub>/mgCHO<sub>in</sub>

\*\*\* mgCHO<sub>BR</sub>/mgCHO<sub>in</sub>

P<sub>exp</sub>: pruebas experimentales

PE: prueba estandarizada

PC: prueba complementaria

CHO<sub>in</sub>: carbohidratos iniciales en la biomasa microalgal

CHO<sub>ext</sub>: carbohidratos extraídos

CHO<sub>BR</sub>: carbohidratos en la biomasa residual de hidrólisis ácida

$\bar{x}$ : media aritmética

s: desviación estándar

CV: coeficiente de variación

## V.2. Sacarificación en la hidrólisis ácida

En cuanto a la determinación de la sacarificación en la hidrólisis ácida, se llevó a cabo un análisis de la conversión de CHO en azúcares reductores mediante la cuantificación de azúcares reductores presentes en el hidrolizado después de realizar el ajuste de pH a  $6.5 \pm 0.05$  (hidrolizado neutro), considerando el factor de dilución por ajuste de pH con NaOH 5M. En la Tabla 10 se observa la estimación del factor de dilución a partir del contenido de CHO en el hidrolizado neutro respecto al contenido de CHO en el hidrolizado previo al ajuste de pH, equivalente al 30.6% en las pruebas de estandarización (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>). Esta estimación se comparó con el factor asociado al volumen de 200 mL de NaOH 5M añadidos a un volumen de 700 mL de hidrolizado, lo que equivale a una dilución del 28.6%, que representa un ajuste del 7% por desviación estándar del factor de 30.6%. En las pruebas complementarias (PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub>) se observó un factor de dilución del 34.5% que, con el respectivo ajuste estadístico respalda los resultados obtenidos en las pruebas de hidrólisis ácida. Respecto a la tercera y cuarta prueba complementaria (PC<sub>3</sub> y PC<sub>4</sub>) se anuló el factor de dilución al sustituir NaOH 5M con NaOH granular para el ajuste de pH.

**Tabla 10. Dilución de azúcares reductores en el hidrolizado por ajuste de pH**

P <sub>exp</sub>	Dilución por ajuste de pH				
	%*	%Dilución	$\bar{x}$	s	CV
PE <sub>1</sub>	71.1	28.9			
PE <sub>2</sub>	69.8	30.2			
PE <sub>3</sub>	69.0	31.0	<u>30.6</u>	2.9	9%
PE <sub>4</sub>	64.7	35.3			
PE <sub>5</sub>	72.2	27.8			
PC <sub>1</sub>	62.3	37.7			
PC <sub>2</sub>	68.7	31.3	<u>34.5</u>	4.5	13%
PC <sub>3</sub>	-	-	-	-	-
PC <sub>4</sub>	-	-	-	-	-

P<sub>exp</sub>: pruebas experimentales

PE: prueba estandarizada

PC: prueba complementaria

AR: azúcares reductores

CHO<sub>H</sub>: carbohidratos en el hidrolizado

CHO<sub>HN</sub>: carbohidratos en el hidrolizado neutro

$\bar{x}$ : media aritmética

s: desviación estándar

CV: coeficiente de variación

\* mgCHO<sub>HN</sub>/mgCHO<sub>H</sub>

Con base en lo anterior, se ajustó el contenido de azúcares reductores del hidrolizado neutro considerando un factor de dilución del 28.6%, con excepción de las pruebas PC<sub>3</sub> y PC<sub>4</sub>. Así, la sacarificación en la hidrólisis ácida se determinó a partir de la relación del contenido de azúcares reductores en el hidrolizado respecto al contenido de CHO (Tabla 11). En las pruebas de estandarización (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>) se obtuvieron 8.5±0.4 g/L de azúcares reductores en el hidrolizado equivalente al 103.2% de sacarificación, sin embargo, al considerar el ajuste estadístico correspondiente, puede fijarse una conversión de CHO en azúcares reductores del 97.7%. En las pruebas complementarias (PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub>) la sacarificación resultó de 100.2%, no obstante, el ajuste estadístico permite corroborar el resultado previo de sacarificación. A su vez, en la tercera y cuarta prueba complementaria (PC<sub>3</sub> y PC<sub>4</sub>) donde se anuló el factor de dilución, se obtuvieron 8.30 g/L de azúcares reductores equivalentes al 97.9% de sacarificación. Con base en el análisis de azúcares reductores al emplear H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v en la hidrólisis ácida (PC<sub>3</sub> y PC<sub>4</sub>) se obtuvo un porcentaje de sacarificación ligeramente mayor (97.9%) que al emplear H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v (97.7%), sin embargo, la diferencia se considera nuevamente despreciable en el rendimiento de la sacarificación.

En comparación con estudios previos, Camargo (2024) reportó una concentración de 1.6 g/L de azúcares reductores en un hidrolizado de microalgas obtenido mediante hidrólisis ácida en autoclave, utilizando una carga orgánica de 25 g/L. Por su parte, Romero et al. (2021) informaron la producción de 5 g/L de azúcares fermentables, principalmente glucosa, a partir de hidrólisis ácida en un sistema de reflujo por enfriamiento con una carga orgánica de 100 g/L. Con base en lo anterior, la combinación de hidrólisis en autoclave y una carga orgánica de 100 g/L empleada en el presente estudio permitió alcanzar 8.5 g/L de azúcares reductores, lo que sugiere una mayor eficiencia del proceso en términos de la sacarificación de CHO.

**Tabla 11. Sacarificación de carbohidratos totales (CHO) en azúcares reductores en las pruebas de hidrólisis ácida**

P <sub>exp</sub>	AR en el hidrolizado neutro				AR en el hidrolizado*				Sacarificación			
	(g/L)	$\bar{x}$	s	CV	(g/L)	$\bar{x}$	s	CV	%AR <sub>H</sub> /CHO <sub>H</sub>	$\bar{x}$	s	CV
PE <sub>1</sub>	7.00				9.00				106.0			
PE <sub>2</sub>	6.26				8.04				95.2			
PE <sub>3</sub>	6.41	6.6	0.3	5%	8.25	8.5	0.4	5%	101.7	<u>103.2</u>	5.5	5%
PE <sub>4</sub>	6.52				8.39				103.1			
PE <sub>5</sub>	6.85				8.80				110.1			
PC <sub>1</sub>	6.13				7.89				95.8			
PC <sub>2</sub>	6.79	6.5	0.5	7%	8.73	8.3	0.6	7%	104.6	<u>100.2</u>	6.3	6%
PC <sub>3</sub>	8.00				-	-	-	-	100.8			
PC <sub>4</sub>	8.60	8.3	0.4	5%	-	-	-	-	111.8	<u>106.3</u>	8.4	8%

\*Ajuste correspondiente al 28.6% de dilución por ajuste de pH

P<sub>exp</sub>: pruebas experimentales

PE: prueba de estandarización

PC: prueba complementaria

AR: azúcares reductores

AR<sub>H</sub>: azúcares reductores en el hidrolizado

CHO<sub>H</sub>: carbohidratos en el hidrolizado

CHO<sub>HN</sub>: carbohidratos en el hidrolizado neutro

$\bar{x}$ : media aritmética

s: desviación estándar

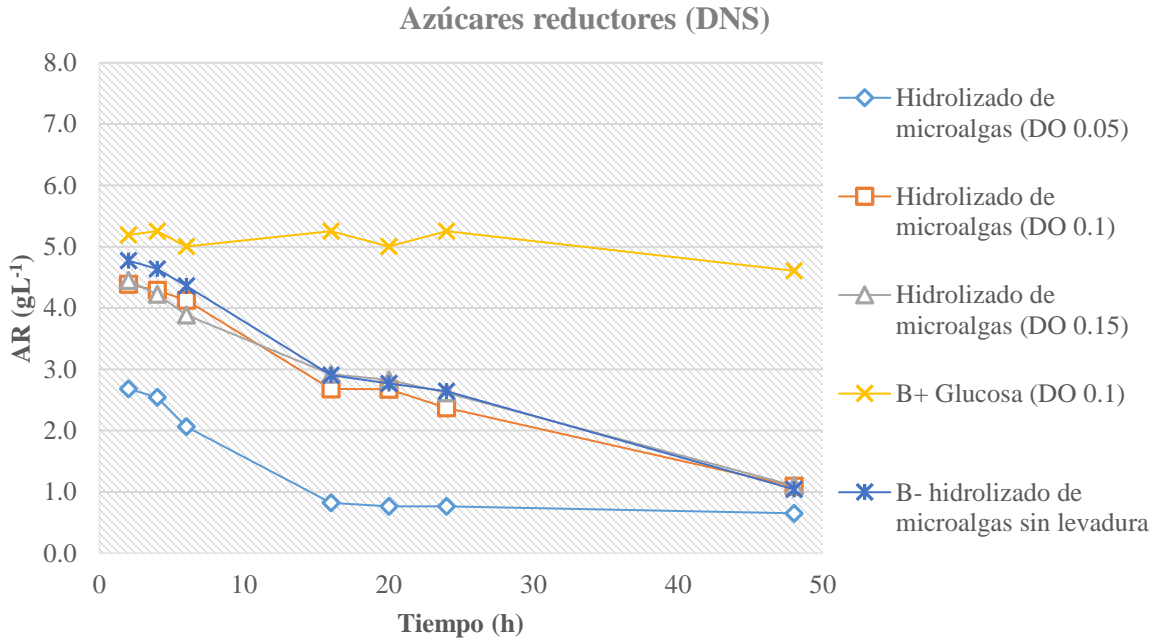
CV: coeficiente de variación

### V.3. Agotamiento de azúcares reductores

En las pruebas de fermentación alcohólica se realizó el seguimiento de la cinética del agotamiento de azúcares reductores potencialmente aprovechables en la obtención de bioetanol. En la primera y segunda prueba preliminar (PP<sub>1</sub> y PP<sub>2</sub>) se varió la concentración del inóculo en DO<sub>600nm</sub> 0.05, DO<sub>600nm</sub> 0.1 y DO<sub>600nm</sub> 0.15. En la primera prueba preliminar (PP<sub>1</sub>) se observa de manera general

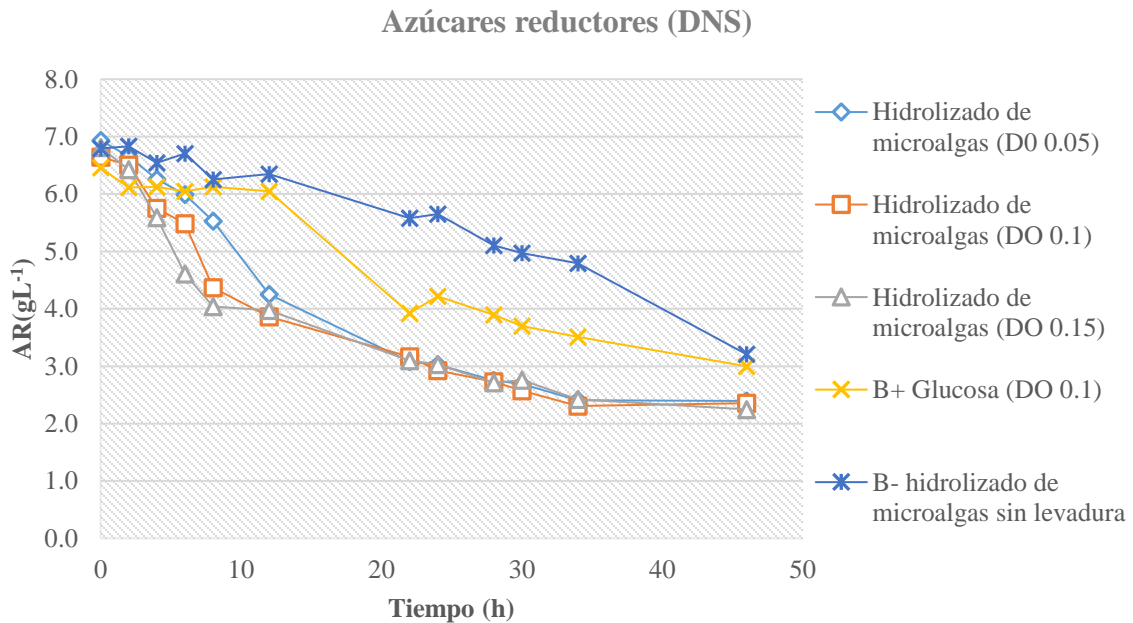
el máximo agotamiento de azúcares reductores entre las 6-16 horas del proceso de fermentación (Figura 11), en esta prueba el muestreo se realizó a las 0, 2, 4, 6, 16, 20, 24 y 48 horas con fines exploratorios.

De manera similar y más detallada, en la segunda prueba preliminar (PP<sub>2</sub>) el muestreo se realizó a las 0, 2, 4, 6, 8, 12, 22, 24, 28, 30, 34 y 46 horas en las que se observa un máximo agotamiento de azúcares reductores entre las 8-30 horas del proceso de fermentación, sin embargo, a partir de una concentración homogénea de azúcares reductores iniciales (6.73 g/L) se aprecia que el inóculo de DO<sub>600nm</sub> 0.15 presenta un mayor agotamiento respecto al de DO<sub>600nm</sub> 0.1 y éste, a su vez, respecto al de DO<sub>600nm</sub> 0.05 (Figura 12). Por lo que, en la tercera prueba preliminar (PP<sub>3</sub>) se propuso variar el inóculo en un mayor rango, correspondiente a una DO<sub>600nm</sub> de 0.1, 0.2 y 0.5. El muestreo fue realizado a las 0, 4, 8, 12, 24, 30, 36 y 48 horas en las que el máximo agotamiento de azúcares reductores ocurrió a las 8 horas del proceso de fermentación (Figura 13) ya que en adelante no se observa un agotamiento significativo, a excepción de la muestra control de hidrolizado sin levadura (B-), en la que se observa un agotamiento entre las 30-48 horas. Esta prueba fue realizada en duplicado de manera que se confirmó el comportamiento observado en las pruebas anteriores, el mayor agotamiento de azúcares reductores corresponde a un inóculo de DO<sub>600nm</sub> 0.5 a las 8 horas del proceso de fermentación alcohólica.



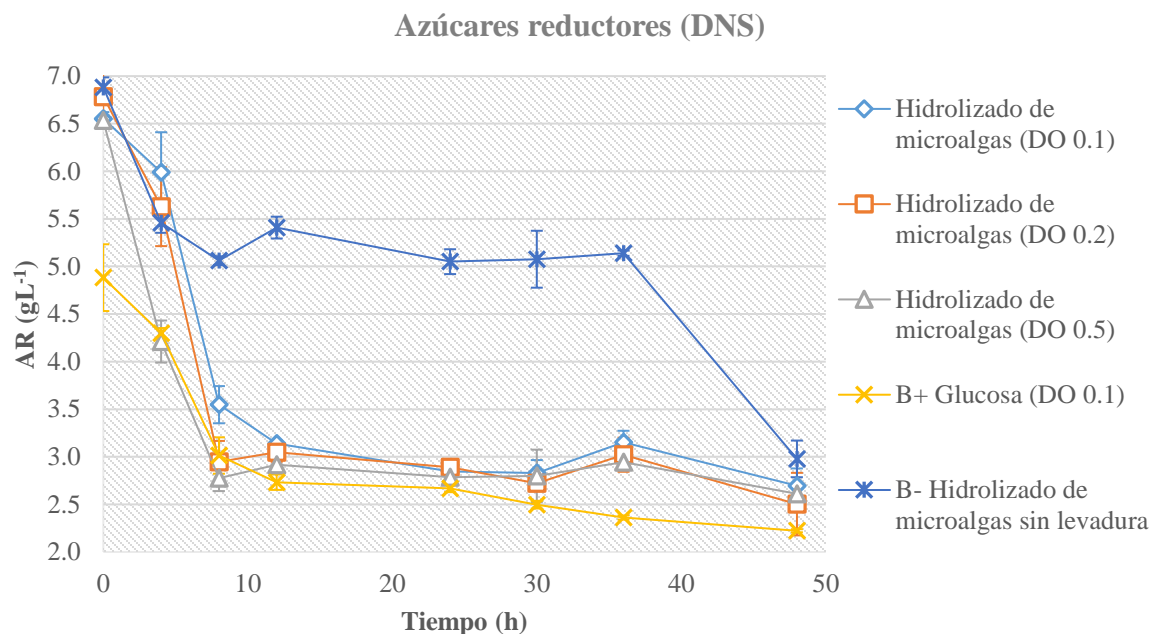
**Figura 11. Agotamiento de azúcares reductores en la primera prueba preliminar de fermentación alcohólica (PP1)**

AR: azúcares reductores  
DO: DO<sub>600 nm</sub>



**Figura 12. Agotamiento de azúcares reductores en la segunda prueba preliminar de fermentación alcohólica (PP2)**

AR: azúcares reductores  
DO: DO<sub>600nm</sub>



**Figura 13. Agotamiento de azúcares reductores en la tercera prueba preliminar de fermentación alcohólica (PP<sub>3</sub>)**

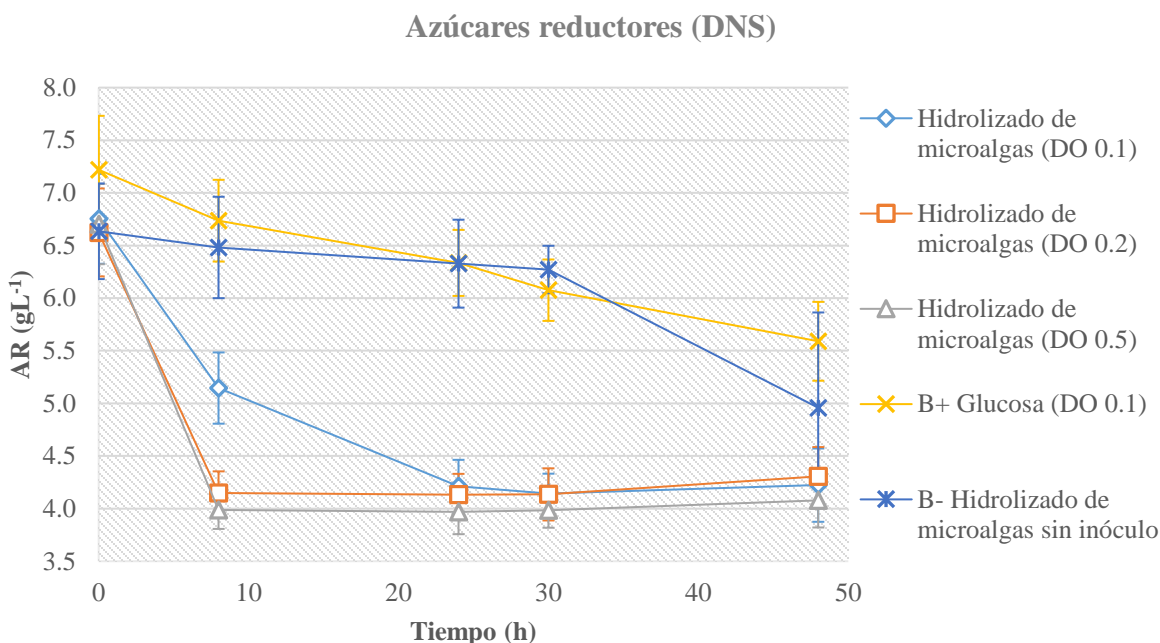
AR: azúcares reductores

DO: DO<sub>600nm</sub>

Con base en la tercera prueba preliminar (PP<sub>3</sub>) se llevaron a cabo cinco pruebas de estandarización bajo las mismas condiciones de fermentación (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>) variando el inóculo en DO<sub>600nm</sub> 0.1, DO<sub>600nm</sub> 0.2 y DO<sub>600nm</sub> 0.5 (Figura 14). El muestreo fue realizado a las 0, 8, 24, 30 y 48 horas del proceso de fermentación alcohólica en las que se observa el máximo agotamiento de azúcares reductores a las 8 horas para el inóculo de DO<sub>600nm</sub> 0.1 (1.61 g/L: 24%), DO<sub>600nm</sub> 0.2 (2.48 g/L: 37%) y DO<sub>600nm</sub> 0.5 (2.72 g/L: 41%). Sin embargo, el inóculo de DO<sub>600nm</sub> 0.1 experimenta un cambio significativo en el agotamiento de azúcares reductores (0.93 g/L: 14%) a las 24 horas mientras que en el caso de los inóculos de DO<sub>600nm</sub> 0.2 y DO<sub>600nm</sub> 0.5 no se identifican variaciones en el agotamiento de azúcares reductores después de las 8 horas, sino que el comportamiento tiende a ser constante.

Respecto a lo anterior, existen factores limitantes en la fermentación alcohólica que afectan el consumo de azúcares reductores y, con ello, la producción de etanol, tales como la producción de compuestos inhibidores como furfural y 5-hidroximetilfufural durante el pretratamiento con hidrólisis ácida (Silva et al. 2018; González, 2020;) así como la exposición al oxígeno del aire ambiente durante la manipulación de las muestras que puede alterar las condiciones anaerobias del

proceso fermentativo y favorecer un desplazamiento del metabolismo de la levadura hacia rutas respiratorias (Aceituno et al., 2012; Rintala et al., 2011).



**Figura 14. Agotamiento de azúcares reductores en las cinco pruebas de estandarización de fermentación alcohólica (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>)**

AR: azúcares reductores  
DO: DO<sub>600nm</sub>

En la Tabla 12 se presentan de manera específica los resultados de azúcares reductores para cada variante del inóculo y las muestras control, así como la desviación estándar y el coeficiente de variación correspondiente a las cinco pruebas de estandarización llevadas a cabo. Es apreciable que la mejor condición para el agotamiento de azúcares reductores en el hidrolizado es un consumo de 6.70 g/L a 3.99 g/L (2.72 g/L: 41%) entre las 0-8 horas de fermentación alcohólica con un inóculo correspondiente a una concentración de DO<sub>600nm</sub> 0.5. En el caso de la muestra control B+, con inóculo de DO<sub>600nm</sub> 0.1, el agotamiento de glucosa continúa hasta las 48 horas sin embargo se presenta un consumo total de 1.63 g/L: 23%, notablemente inferior en comparación con el agotamiento de azúcares reductores en las muestras de hidrolizado (Tabla 13). A su vez, en la muestra control B- de hidrolizado sin levadura se identifica un agotamiento de azúcares reductores de 0.36 g/L: 5% en el transcurso de 0-30 horas, prácticamente nulo. No obstante, de las 30-48 horas se observa un consumo de 1.31 g/L: 20%, sin embargo, considerando el ajuste por desviación

estándar, el consumo de las 30-48 horas puede estimarse en 0.41 g/L, lo cual no representa una variación circunstancial en el comportamiento antes descrito.

**Tabla 12. Azúcares reductores en las cinco pruebas de estandarización de fermentación alcohólica (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>)**

T (h)	Azúcares reductores														
	H (DO 0.1)			H (DO 0.2)			H (DO 0.5)			B+ (DO 0.1)			B-		
	$\bar{x}$ (g/L)	s	CV	$\bar{x}$ (g/L)	s	CV	$\bar{x}$ (g/L)	s	CV	$\bar{x}$ (g/L)	s	CV	$\bar{x}$ (g/L)	s	CV
0	6.75	0.43	6%	6.62	0.42	6%	6.70	0.38	6%	7.22	0.51	7%	6.64	0.45	7%
8	5.15	0.34	7%	4.15	0.20	5%	3.99	0.18	5%	6.74	0.39	6%	6.48	0.48	7%
24	4.21	0.25	6%	4.13	0.20	5%	3.97	0.21	5%	6.33	0.31	5%	6.33	0.42	7%
30	4.14	0.19	5%	4.14	0.25	6%	3.98	0.16	4%	6.08	0.29	5%	6.27	0.23	4%
48	4.22	0.35	8%	4.31	0.28	6%	4.08	0.26	6%	5.59	0.37	7%	4.96	0.91	18%

T: tiempo

H: hidrolizado

B+: glucosa

B-: hidrolizado sin levadura

DO: DO<sub>600nm</sub>

$\bar{x}$ : media aritmética

s: desviación estándar

CV: coeficiente de variación

**Tabla 13. Agotamiento de azúcares reductores en las cinco pruebas de estandarización de fermentación alcohólica (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>)**

T (h)	Agotamiento de azúcares reductores*				
	H (DO 0.1)	H (DO 0.2)	H (DO 0.5)	B+ (DO 0.1)	B-
	$\bar{x}$ (g/L)	$\bar{x}$ (g/L)	$\bar{x}$ (g/L)	$\bar{x}$ (g/L)	$\bar{x}$ (g/L)
0-8	1.61	2.48	2.72	0.48	0.15
0-24	0.93	0.02	0.02	0.40	0.15
24-30	0.07	0.00	0.03	0.26	0.06
30-48	0.05	0.00	0.03	0.49	0.41

\*Se considera el error por desviación estándar en los valores de agotamiento de azúcares reductores

T: tiempo

H: hidrolizado

B+: glucosa

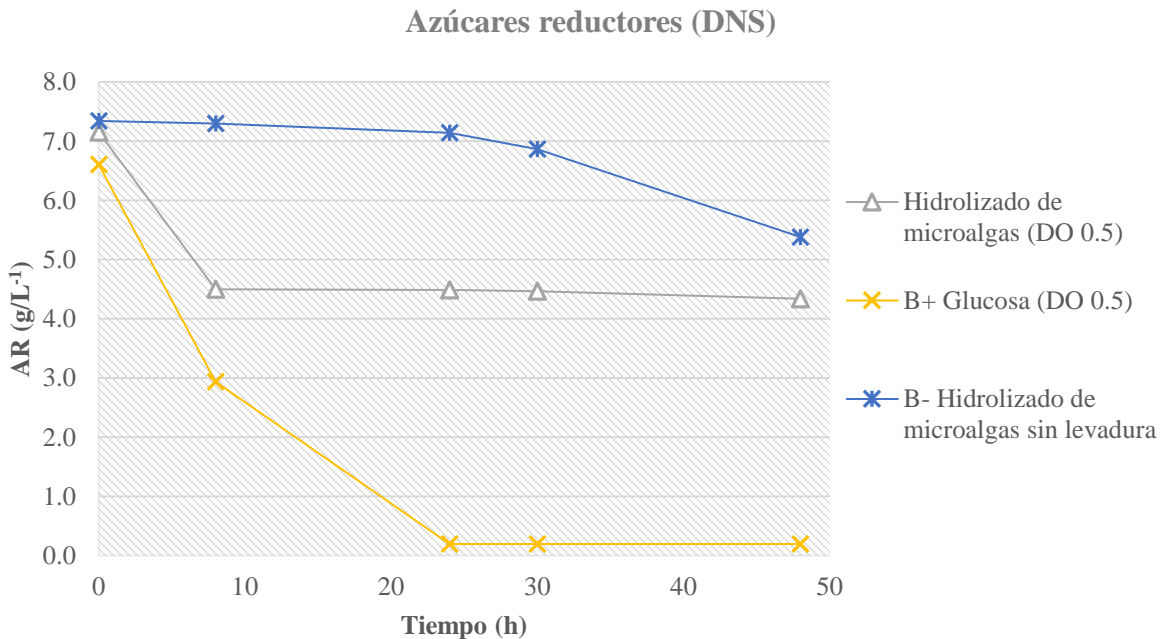
B-: hidrolizado sin levadura

DO: DO<sub>600nm</sub>

$\bar{x}$ : media aritmética

Adicionalmente, en la primera y segunda prueba complementaria de fermentación alcohólica (PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub>) se identificó un patrón de agotamiento de azúcares reductores similar al observado en las pruebas de estandarización (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>). En la primera prueba complementaria (PC<sub>1</sub>) se observa un agotamiento de 7.15 g/L a 4.49 g/L (2.66 g/L: 37%) de las 0-8 horas de fermentación en el hidrolizado con inóculo de DO<sub>600nm</sub> de 0.5 (Figura 15). A partir de las 8 horas y hasta las 48 horas

de fermentación el consumo de azúcares reductores varió con escasa relevancia entre 0.01 g/L y 0.13 g/L (0-2%). Por otra parte, en la muestra control B+ con inóculo de  $DO_{600nm}$  0.5, el máximo agotamiento de glucosa 3.67 g/L (56%) ocurrió a las 8 horas de fermentación, sin embargo, de las 8-24 horas se registró un consumo de 2.74 g/L (41%) y, a partir de las 24 horas, no se detectaron variaciones de glucosa. Este comportamiento no fue observado en las pruebas anteriores al emplear un inóculo de menor concentración ( $DO_{600nm}$  0.1), lo que sugiere que al emplear un inóculo de  $DO_{600nm}$  de 0.5 se alcanza un agotamiento de glucosa significativamente mayor correspondiente al 97%. Cabe mencionar que en esta prueba el cálculo de la concentración del inóculo se llevó a cabo con base en la determinación de la densidad óptica medida a 600 nm, tal como se indica en el procedimiento del apartado IV.6. Respecto a la muestra control B- de hidrolizado sin levadura, se detectó un agotamiento de azúcares reductores entre 0.05 g/L y 0.28 g/L (1-4%) de las 0-30 horas de fermentación, no obstante, de las 30-48 horas ocurrió un agotamiento de 1.48 g/L (20%) que resulta atípico en comparación con el patrón de agotamiento de azúcares reductores identificado en la muestra control B- de las pruebas anteriores.



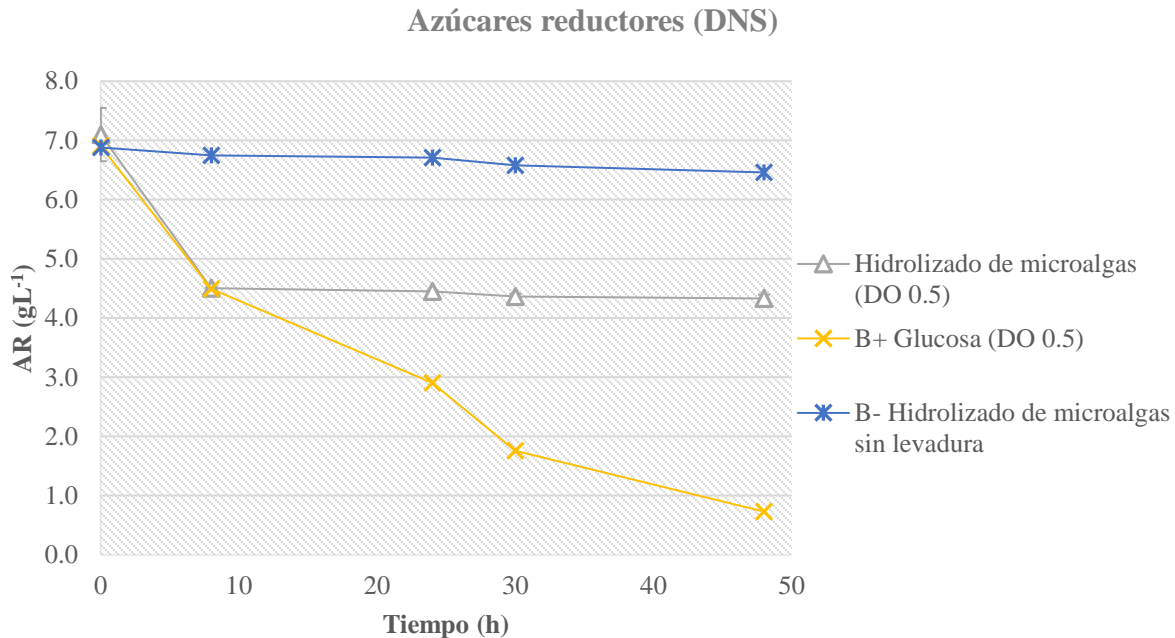
**Figura 15. Agotamiento de azúcares reductores en la primera prueba complementaria de fermentación alcohólica (PC<sub>1</sub>)**

AR: azúcares reductores

DO:  $DO_{600nm}$

A su vez, en la segunda prueba complementaria (PC<sub>2</sub>) el máximo agotamiento de azúcares reductores del hidrolizado con inóculo de DO<sub>600nm</sub> de 0.5 ocurre entre las 0-8 horas, de 7.10 g/L a 4.50 g/L (2.60 g/L: 37%), mientras que de las 8-48 horas el agotamiento varió de manera irrelevante entre 0.04 g/L y 0.08 g/L (1%) (Figura 16). En esta prueba se empleó la relación del inóculo en 284.5 mg de levadura por litro de hidrolizado correspondiente a una DO<sub>600nm</sub> de 0.5, como se indica en el apartado IV.9 y para probar esta condición, el volumen de hidrolizado se varió en 50mL y 100 mL, sin embargo, se observa un comportamiento análogo en el agotamiento de azúcares reductores independientemente del volumen de hidrolizado, lo que valida dicha relación.

Por otro lado, la muestra control B+, con inóculo de DO<sub>600nm</sub> 0.5, presentó el máximo agotamiento de glucosa (2.41 g/L: 35%) a las 8 horas de fermentación, aunque el agotamiento continuó de manera constante de las 8-48 horas (entre 1.03 g/L y 1.59 g/L: 15-23%) alcanzando un consumo total del 89.4% de glucosa a las 48 horas de fermentación alcohólica. En comparación con la primera prueba complementaria (PC<sub>1</sub>) en la que se alcanzó un consumo de glucosa del 97.0%, se obtuvo un agotamiento semejante, no obstante, en un mayor tiempo de fermentación alcohólica. Referente a la muestra control B- de hidrolizado sin levadura, puede observarse un agotamiento de azúcares reductores prácticamente nulo (entre 0.04 g/L y 0.13 g/L: 1-2%), tal y como se determinó en las pruebas de estandarización (PE<sub>1</sub>-PE<sub>5</sub>).



**Figura 16. Agotamiento de azúcares reductores en la segunda prueba complementaria de fermentación alcohólica (PC<sub>2</sub>)**

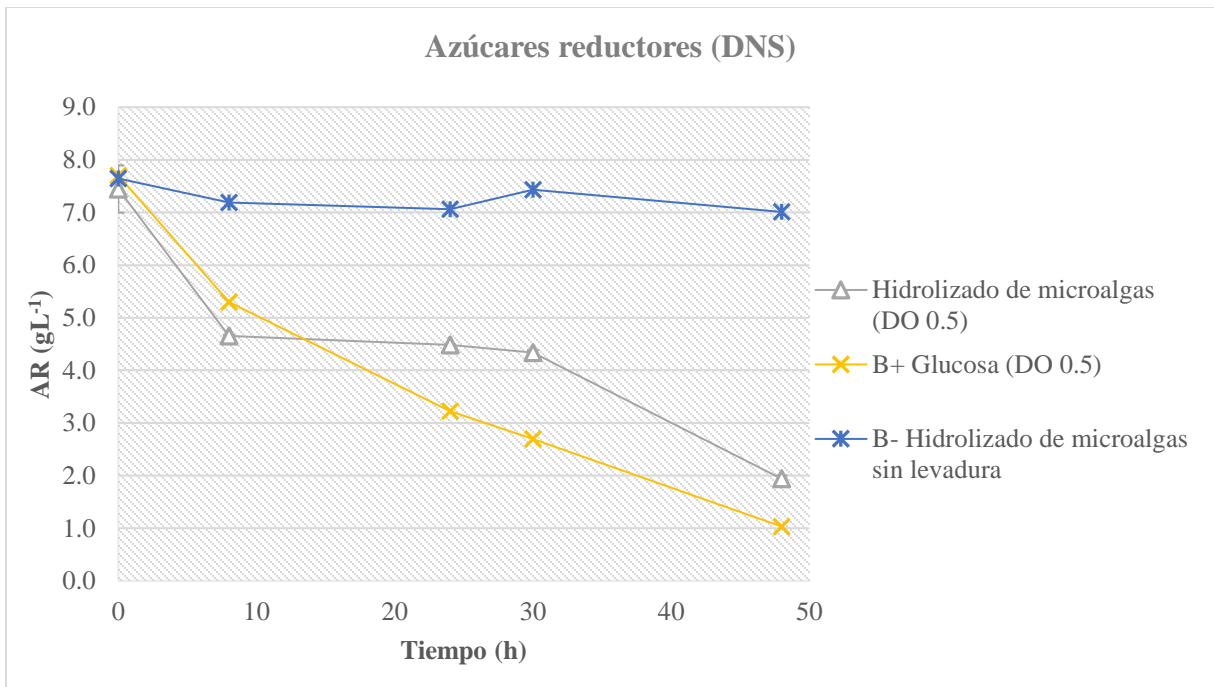
AR: azúcares reductores

DO: DO<sub>600nm</sub>

En la tercera y cuarta prueba complementaria (PC<sub>3</sub> y PC<sub>4</sub>), en la que se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v en la hidrólisis ácida, se observó un comportamiento de agotamiento de azúcares reductores más eficiente respecto a las pruebas en las que se empleó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v. A pesar de que el máximo agotamiento de azúcares reductores del hidrolizado con inóculo de DO<sub>600nm</sub> de 0.5 se dio nuevamente entre las 0-8 horas, de 7.45 g/L a 4.65 g/L (2.79 g/L: 38%) en la PC<sub>3</sub> (Figura 17) y de 9.00 a 6.01 g/L (2.99 g/L: 33%) en la PC<sub>4</sub> (Figura 18), este continuó de las 8-30 horas y, a diferencia del comportamiento antes registrado, de las 30-48 h presentó un agotamiento de 4.34 g/L a 1.94 g/L (2.40 g/L: 32%) en la PC<sub>3</sub> y de 5.86 g/L a 3.08 g/L (2.78 g/L: 31%) en la PC<sub>4</sub>. Estas pruebas resultaron en el agotamiento total de 5.51 g/L (74%) y 5.91 g/L (66%) de los azúcares reductores presentes en el hidrolizado de microalgas al inicio de la fermentación en la prueba PC<sub>3</sub> y PC<sub>4</sub>, respectivamente. Lo anterior sugiere que al emplear un ácido más diluido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v) se promueve una reacción de hidrólisis menos agresiva y, por lo tanto, la formación de menos de compuestos inhibidores de la fermentación que permiten un mayor consumo de azúcares reductores (70%) llevado a cabo por la levadura *C. jadinii*, en comparación con las pruebas de hidrólisis ácida empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v (37%).

En cuanto a la muestra control B+, con inóculo de  $DO_{600nm}$  0.5, el máximo agotamiento de glucosa (2.41 g/L: 31%) se presentó a las 8 horas de fermentación, y de manera similar a la segunda prueba complementaria (PC<sub>2</sub>), el agotamiento continuó hasta las 48 horas alcanzando un consumo total del 87% de glucosa. Respecto a la muestra control B- de hidrolizado sin levadura, a las 48 horas de fermentación se observó un agotamiento total de 0.64 g/L (8%) de azúcares reductores en la PC<sub>3</sub> y de 0.47 g/L (5%) en la PC<sub>4</sub>, sin embargo, no se detectaron variaciones significativas en el transcurso de la prueba de fermentación.

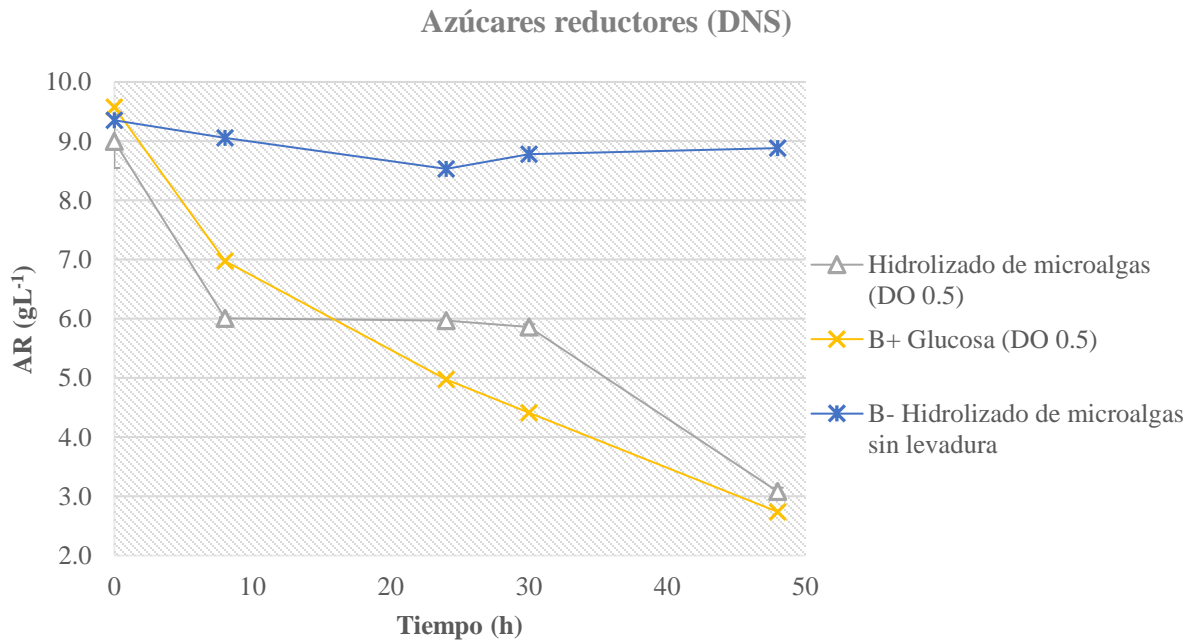
De manera general, el agotamiento de azúcares reductores observado en la muestra control B- resulta un comportamiento inesperado en ausencia de levadura, aun cuando este es mínimo. Sin embargo, este efecto podría estar relacionado con procesos químicos derivados del pretratamiento de la biomasa microalgal mediante hidrólisis ácida, independientes de la actividad microbiana, particularmente la reacción de Maillard, la cual es favorecida por la presencia simultánea de azúcares reductores y grupos amino liberados a partir de la desnaturalización e hidrólisis parcial de proteínas. La interacción entre estos componentes, bajo condiciones de incubación prolongada, puede contribuir al agotamiento de azúcares reductores mediante la formación de compuestos nitrogenados y carbonílicos (Changi et al., 2015; El Hosry et al., 2025).



**Figura 17. Agotamiento de azúcares reductores en la tercera prueba complementaria de fermentación alcohólica (PC<sub>3</sub>)**

AR: azúcares reductores

DO: DO<sub>600nm</sub>



**Figura 18. Agotamiento de azúcares reductores en la tercera prueba complementaria de fermentación alcohólica (PC<sub>4</sub>)**

AR: azúcares reductores

DO: DO<sub>600nm</sub>

#### V.4. Obtención de bioetanol

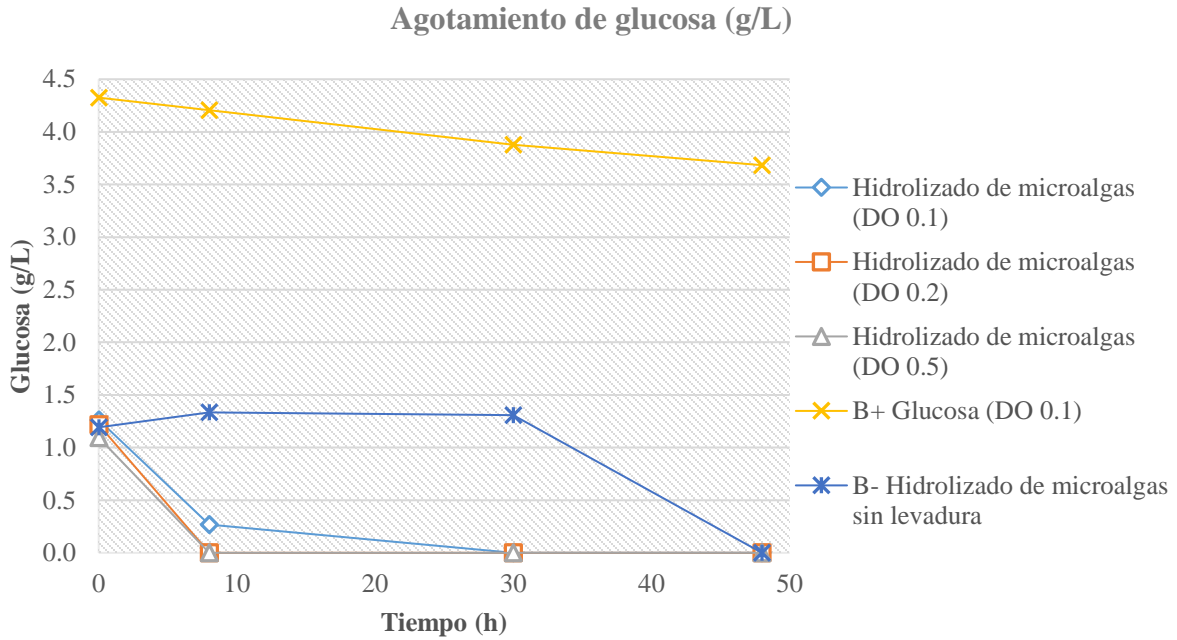
La obtención de bioetanol se determinó con base en la tercera prueba preliminar de fermentación alcohólica (PP<sub>3</sub>) a través de la cuantificación de glucosa y etanol por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). De manera general, los resultados obtenidos muestran una correlación negativa entre el agotamiento de glucosa (Figura 19) y la producción de bioetanol (Figura 20). Las determinaciones corresponden a las 0, 8, 30 y 48 horas del proceso fermentativo, en las que se observó el máximo consumo de glucosa a las 8 horas para el hidrolizado con inóculo de DO<sub>600nm</sub> 0.1 (71%), y un consumo total de glucosa en el caso de los inóculos DO<sub>600nm</sub> 0.2 y DO<sub>600nm</sub> 0.5 (100%). A su vez, a las 8 horas de fermentación se obtuvo la máxima producción de bioetanol correspondiente a 0.71 g/L en el inóculo de DO<sub>600nm</sub> 0.1, 0.95 g/L en el inóculo DO<sub>600nm</sub> 0.2 y 1.02 g/L en el inóculo DO<sub>600nm</sub> 0.5, resultando esta última la mejor condición de obtención de bioetanol en este estudio.

Al respecto, la literatura indica que una mayor eficiencia en la obtención de bioetanol se relaciona con concentraciones más elevadas del inóculo inicial de levadura y con fermentaciones de menor duración (Tesfaw & Assefa, 2014; Zabed et al., 2014), tal como se observó en este estudio, donde a las 8 horas de fermentación, dentro de un periodo total de 48 horas, se alcanzó el mayor rendimiento empleando un inóculo de *C. jadinii* de DO<sub>600nm</sub> 0.5 (0.28 g/L). De manera similar, Silva et al. (2018) reportaron la máxima concentración de etanol al utilizar 12.5 g/L de *S. cerevisiae* a las 2.5 horas de fermentación, mientras que inóculos de 0.1 g/L y 0.5 g/L requirieron al menos 12 horas para alcanzar dicho valor. Asimismo, Seon et al. (2020) informaron que la mayor producción de bioetanol se registró a las 8 horas de fermentación, asociada con un mayor crecimiento celular de *S. cerevisiae* KL17 y un consumo más eficiente de azúcares, lo que respalda la tendencia identificada.

En este sentido, el control del tiempo de fermentación se considera un factor crítico. Romero et al. (2021) utilizaron un inóculo de *Candida* sp., una levadura con un metabolismo comparable al de *C. jadinii*, a una concentración de DO<sub>600nm</sub> 0.1, alcanzando la mayor producción de bioetanol (5 g/L) a las 30 horas de fermentación. En contraste, en el presente estudio, el incremento del inóculo a una concentración de DO<sub>600nm</sub> 0.5 permitió obtener la producción máxima de bioetanol en un tiempo considerablemente menor (8 horas), aunque con una concentración final inferior (1.02 g/L).

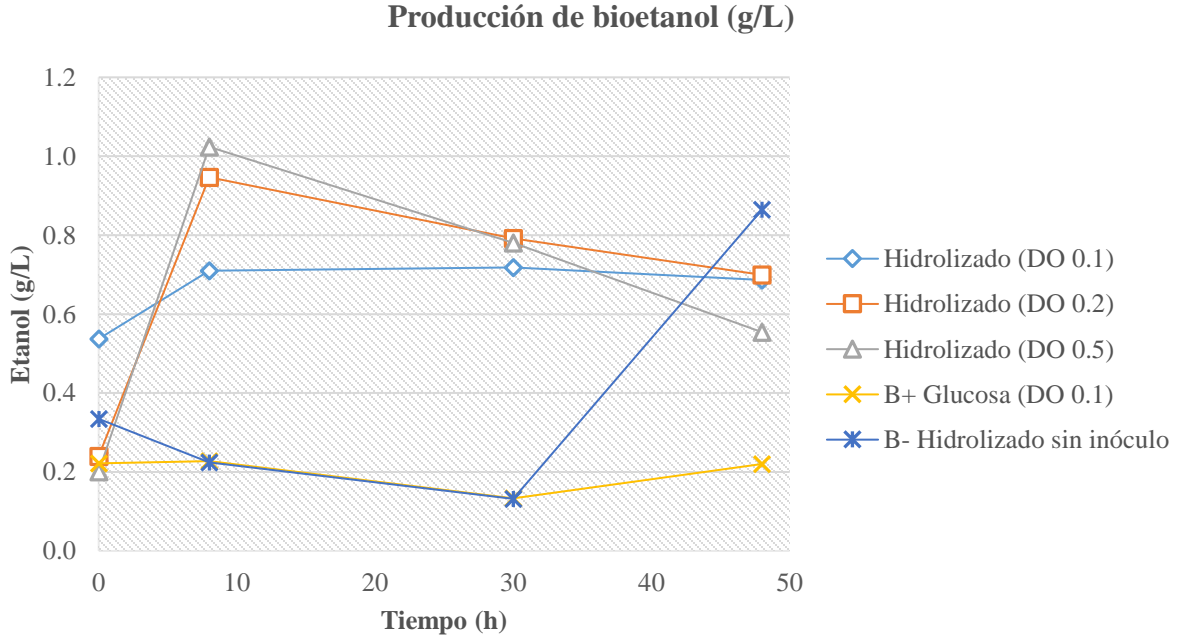
Estos resultados concuerdan con la literatura, la cual, como se mencionó anteriormente, señala que el aumento del inóculo de levadura disminuye el tiempo de fermentación requerido para alcanzar la máxima producción de bioetanol, debido a una mayor disponibilidad inicial de células metabólicamente activas (Tesfaw & Assefa, 2014; Zabed et al., 2014).

Referente a la muestra control B+, con inóculo de  $DO_{600nm}$  0.1, se presentó un consumo constante de glucosa hasta las 48 horas (entre 0.12 y 0.33 g/L: 3-8%), mientras que en la producción de bioetanol se alcanzó el máximo de 0.23 g/L a las 8 horas, ambos resultados inferiores a los registrados en las muestras de hidrolizado. A su vez en la muestra control B-, de hidrolizado sin levadura, no se observa un consumo significativo de glucosa sino hasta las 30-48 horas que corresponde a la producción de 0.86 g/L de bioetanol. La actividad fermentativa detectada en esta muestra, de carácter inesperado, puede explicarse por la ocurrencia de fermentación espontánea, asociada tanto a la supervivencia de microorganismos resistentes al proceso de hidrólisis ácida en autoclave (bacterias formadoras de endosporas y especies acidotolerantes) particularmente en medios con alta carga orgánica (Pahalagedara et al., 2024), como a la contaminación microbiana introducida accidentalmente durante la manipulación experimental posterior al pretratamiento (Beckner et al., 2011). Este fenómeno favorece el consumo de los azúcares liberados y da lugar a la producción de bioetanol en ausencia de un inóculo intencional (Holešínský et al., 2020).



**Figura 19. Agotamiento de glucosa en la tercera prueba preliminar de fermentación alcohólica (PP3)**

DO: DO<sub>600nm</sub>



**Figura 20. Producción de bioetanol en la tercera prueba preliminar de fermentación alcohólica (PP3)**

DO: DO<sub>600nm</sub>

Con base en la cuantificación de glucosa, se determinó un rendimiento de producción de bioetanol de 0.93 g etanol/g glucosa equivalente al 182.8% respecto al rendimiento teórico máximo (Anexo G) para la mejor condición de fermentación alcohólica de hidrolizado, establecida en una concentración de inóculo de  $DO_{600nm}$  0.5 a las 8 horas de fermentación. El rendimiento mayor al 100% podría atribuirse a la presencia de otros azúcares reductores aprovechables en la fermentación alcohólica (xilosa, maltosa, fructosa) que en términos de cuantificación de glucosa arrojan un rendimiento mayor al teórico máximo para la producción de bioetanol. Sousa et. al (2021) mencionan que la levadura *C. jadinii* tiene la capacidad de asimilar glucosa, sacarosa y D-xilosa en procesos fermentativos. A su vez, el método de cuantificación de azúcares reductores (DNS) comprende la detección de azúcares distintos a la glucosa (xilosa, maltosa y fructosa), lo que resulta en una mayor concentración de azúcares reductores respecto a la concentración de glucosa cuantificada por HPLC.

A partir del rendimiento de producción de bioetanol de 0.93 g etanol/g glucosa, la extracción de CHO correspondiente al 74.1% y la sacarificación de CHO en azúcares reductores correspondiente al 97.7%, el rendimiento de producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal en este estudio es equivalente a 0.075 g etanol/ g biomasa microalgal (Anexo G). Respecto a estudios previos en esta línea de investigación, Camargo (2024) registró un rendimiento de 0.066 g etanol/ g biomasa microalgal empleando pretratamiento con ozono e hidrólisis ácida, mientras que Romero (2019) obtuvo un rendimiento de 0.022 g etanol/ g biomasa microalgal empleando solamente hidrólisis ácida (Tabla 14), lo que sugiere un resultado prometedor en el rendimiento correspondiente a este estudio.

**Tabla 14. Rendimiento de la obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal**

Biomasa microalgal	Pretratamiento	Fermentación alcohólica	Rendimiento bioetanol	Referencia
<i>S. obliquus</i> (CNW-N) aislada de agua dulce	Hidrólisis con ácido sulfúrico 2% v/v, 40 g/L biomasa, autoclave 121 °C, 20 min	<i>Z. mobilis</i> (DO 2.0/700 mg <sub>Levadura</sub> /L <sub>Hidrolizado</sub> ). Temperatura 30°C. pH 6.0 Tiempo óptimo 4 h	0.213 g etanol/ g biomasa	Ho et al. (2013)
<i>Desmodesmus</i> sp. aislada de agua dulce	Hidrólisis con ácido sulfúrico 2% v/v, 100 g/L biomasa, autoclave 120 °C, 30 min	<i>S. cerevisiae</i> (DO <sub>600nm</sub> 0.25). Vol. hidrolizado 1 mL. Temperatura 28°C. pH 6.0 Tiempo óptimo 30 h	0.23 g etanol/ g biomasa	Sanchez et al. (2017)
<i>S. dimorphus</i> (UTEX 1237)	Hidrólisis con ácido fosfórico 2.5% v/v, 20 g/L biomasa, autoclave 120 °C, 30 min	<i>S. diastaticus</i> (5 mL). Vol. hidrolizado 50 mL. Temperatura 30°C. pH 6.0 Tiempo óptimo 24 h	0.214 g etanol/ g biomasa	Chng et al. (2019)
Consorcio con predominancia de <i>Microcystis</i> sp. cultivado en agua residual	Hidrólisis con ácido sulfúrico 1.4% v/v, 120 °C, 4 h	<i>S. cerevisiae</i> (15% v/v). Temperatura 30°C. pH 4.5 Tiempo óptimo 43.6 h	0.188 g etanol/ g biomasa	El-Mekawi et al. (2019)
Consorcio con predominancia de <i>Scenedesmus</i> sp. cultivado en agua residual	Hidrólisis con ácido sulfúrico 5% v/v, 100 g/L biomasa, Sistema de reflujo por enfriamiento 90°C, 120 min	<i>Candida</i> sp. (DO <sub>600nm</sub> 0.1). Vol. hidrolizado 50 mL. Temperatura 28°C. pH 6.5 Tiempo óptimo 30 h	0.022 g etanol/ g biomasa*	Romero (2019)
Consorcio con predominancia de <i>Desmodesmus</i> sp., <i>S. obliquus</i> cultivado en agua residual	Ozonación 0.1 mgO <sub>3</sub> /mg biomasa. Hidrólisis con ácido sulfúrico 2.7% v/v, 25 g/L biomasa, autoclave 120°C, 25 min	<i>C. utilis</i> (DO <sub>600nm</sub> 0.1). Vol. hidrolizado 50 mL. Temperatura 28°C. pH 6.5 Tiempo óptimo 8 h	0.066 g etanol/ g biomasa	Camargo (2024)
Consorcio microbiano con predominancia de <i>Desmodesmus</i> sp., <i>S. obliquus</i> cultivado en agua residual	Hidrólisis con ácido sulfúrico 5% v/v, 100 g/L biomasa, autoclave 120°C, 25 min	<i>C. jadinii</i> (DO <sub>600nm</sub> 0.5/284.5 mg <sub>Levadura</sub> /L <sub>Hidrolizado</sub> ). Vol. hidrolizado 100 mL. Temperatura 28°C. pH 6.5±0.05 Tiempo óptimo 8 h	0.075 g etanol/ g biomasa	Este estudio

\*Valores calculados a partir de la eficiencia reportada en la extracción de carbohidratos, conversión en azúcares reductores/glucosa y obtención de bioetanol

Por otro lado, al obtener un mayor porcentaje de agotamiento de azúcares reductores en la fermentación de las pruebas sometidas a hidrólisis ácida con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2.7% v/v, se infirió la potencial obtención de una mayor cantidad de bioetanol. No obstante, en estas pruebas complementarias ( $\text{PC}_3$  y  $\text{PC}_4$ ) no se detectó la producción de bioetanol. Como se indicó anteriormente, la hidrólisis ácida con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% v/v y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2.7% v/v mostró rendimientos comparables en la extracción de CHO y su conversión en azúcares reductores.

Sin embargo, aunque la sustitución de NaOH 5M por NaOH granular durante la neutralización redujo el factor de dilución de azúcares reductores, probablemente limitó la precipitación de compuestos inhibidores y promovió el aumento de la concentración de sales solubles ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) que generan estrés osmótico en la levadura. Lo anterior se refiere a un desequilibrio en la presión osmótica entre el interior de la célula de la levadura y el medio externo, lo que propicia la desviación energética del metabolismo de la levadura hacia mecanismos de adaptación y supervivencia entre ellos la síntesis de glicerol, el bombeo activo de iones y la remodelación de membrana (Tilloy et al., 2014), sugiriendo que el consumo de azúcares reductores observado no fue dirigido hacia la producción de bioetanol.

En consecuencia, aunque la condición con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2.7% v/v promovió un mayor agotamiento de azúcares reductores, la producción de bioetanol pudo verse comprometida al modificar las condiciones de neutralización. Al respecto se recomienda el uso de NaOH 5M o la sustitución por bases alcalinas de baja solubilidad, como el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , que favorecen la precipitación de sales y compuestos inhibidores y, por lo tanto, viabilizan el proceso fermentativo (Seon et al., 2020).

## V.5. Consistencia y repetibilidad de los resultados experimentales

De manera general se utilizó el coeficiente de variación (CV) como referente para el análisis de variabilidad y estabilidad de los resultados obtenidos en las pruebas experimentales, utilizando la Ecuación 7 que se presenta a continuación,

### **Ecuación 7**

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Donde,

$\bar{x}$ : media aritmética

s: desviación estándar

CV: coeficiente de variación

El CV se ha utilizado como medida de precisión en ensayos experimentales cuantitativos, incluso preferentemente a la desviación estándar, entendiéndose como una herramienta para evaluar la dispersión de datos comparando la cercanía en una medición respecto a otra de diferentes muestras entre sí, por lo que entre más bajo se encuentre el CV se asocia una mayor repetibilidad y calidad de los datos, así como una mayor fiabilidad del modelo de interés (Brenes, 2024; Reed et al., 2002; Schneider et al., 2025).

En este estudio, respecto a la extracción de CHO a partir del pretratamiento de biomasa microalgal con hidrólisis ácida, definida en 74.1% empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v y 70.0% empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v, se obtuvo un CV de 1-10%, mientras que, para la sacarificación de CHO en azúcares reductores, establecida en 97.7% empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v y 97.9% empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v, se obtuvo un CV de 5-8%. A su vez, en el agotamiento de azúcares reductores durante las pruebas de fermentación alcohólica la variación de los resultados corresponde a un CV de 5-8% empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v, con excepción de la muestra control B- de hidrolizado sin levadura, en la que a las 48 horas de fermentación alcohólica el CV varió a 18%. No obstante, el incremento observado en el CV de esta muestra puede asociarse a la interferencia de procesos químicos y biológicos que afectan la dinámica del sistema ante tiempos prolongados de incubación, en particular la reacción de Maillard y la fermentación espontánea, descritas previamente en los apartados V.3 y V.4.

Respecto a las pruebas empleando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2.7% v/v ( $\text{PC}_3$  y  $\text{PC}_4$ ) se obtuvo un CV correspondiente al 1-13% en el agotamiento de azúcares reductores, con excepción de las muestras de hidrolizado de microalgas a las 24 y 30 horas y la muestra control B- de hidrolizado sin levadura a las 48 horas de fermentación alcohólica, en las que el CV varió a 20%, 21% y 17% respectivamente. El aumento del CV en las pruebas empleando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2.7% v/v se atribuye a que el tamaño estadístico de la muestra (2 pruebas experimentales) es menor en comparación con las pruebas empleando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% v/v (5 pruebas experimentales). Sin embargo, el comportamiento cinético del agotamiento de azúcares reductores en el hidrolizado de microalgas, observado en las pruebas  $\text{PC}_3$  y  $\text{PC}_4$ , presentó tres fases claramente diferenciadas: fase inicial (0-8 horas), meseta (8-30 horas) y reactivación (30-48 horas), lo cual es consistente con una adecuada repetibilidad del proceso fermentativo. En cuanto a la muestra control B- de hidrolizado sin levadura, el CV estimado (17%) no compromete la repetibilidad del proceso ya que en ambas pruebas se registró un agotamiento mínimo de azúcares reductores.

Con base en la interpretación del coeficiente de variación según Schneider et al. (2025) los valores del CV se consideran aceptables por debajo del 15% en sistemas biológicos. En los resultados obtenidos en este estudio la mayoría de los valores del CV se encuentran entre el 1-13% en la extracción de CHO, sacarificación de CHO en azúcares reductores y agotamiento de azúcares reductores, por lo que pueden considerarse aceptables bajo el criterio antes mencionado.

En síntesis, el presente estudio abordó la estandarización del proceso para la obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual mediante la realización de doce experimentos, en los cuales se afinó progresivamente la metodología experimental y se observó un patrón de repetibilidad en el proceso a partir del análisis del coeficiente de variación de los resultados obtenidos en cada una de las etapas experimentales correspondiente al 1-13% en su mayoría, cumpliendo con el criterio de aceptabilidad en ensayos de sistemas biológicos de acuerdo con Schneider et al. (2025). Por lo que se estableció una alta estabilidad y con ello, una baja variabilidad en los datos reportados.

Al llevar a cabo el pretratamiento de la biomasa microalgal con hidrólisis ácida en autoclave por 25 minutos, empleando ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 5% v/v y 2.7% v/v, utilizando una carga orgánica de 100 g/L, se obtuvo la extracción del 74.1% y 70.0% de CHO, respectivamente, presentes en el

sobrenadante (hidrolizado de microalgas). De manera complementaria, en la biomasa residual de hidrólisis ácida se cuantificó el contenido de CHO de 27.3% al emplear H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v y 29.3% al emplear H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v, lo que permitió establecer un balance de CHO en esta etapa experimental.

A su vez, considerando un factor de dilución del hidrolizado equivalente al 28.6% por ajuste de pH a 6.5 se logró una conversión de CHO en azúcares reductores (sacarificación) del 97.7% al emplear H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v. Adicionalmente, con los ajustes propuestos en la metodología experimental para anular el factor de dilución del hidrolizado de microalgas por ajuste de pH se corroboró la sacarificación al 97.9% empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v. Por lo que, tanto para la extracción de CHO de la biomasa microalgal, así como su conversión en azúcares reductores, potencialmente aprovechables en la fermentación alcohólica, no existe una diferencia significativa en los rendimientos obtenidos al emplear H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v.

Respecto a las pruebas de fermentación alcohólica, se empleó la levadura *C. jadinii* como microorganismo fermentador con un crecimiento de 24 horas y una posterior reactivación del inóculo de 12 horas previas a la fermentación. El hidrolizado de microalgas fue inoculado, inicialmente, en una concentración correspondiente a una densidad óptica medida a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) de 0.1, 0.2 y 0.5, resultando esta última condición (DO<sub>600nm</sub> 0.5) la más efectiva para el agotamiento de azúcares reductores, indicando que al aumentar la concentración de levadura se obtiene un mayor consumo de azúcares reductores en un menor tiempo de fermentación alcohólica. Con la finalidad de aumentar la practicidad en la etapa de fermentación alcohólica, se estableció la equivalencia de la concentración óptima del inóculo (DO<sub>600nm</sub> 0.5) en 284.5 mg de levadura por litro de hidrolizado.

Asimismo, se realizó un estricto seguimiento del agotamiento de los azúcares reductores que permitió realizar diversos ajustes en la etapa de fermentación alcohólica. En las pruebas de estandarización, en las que se empleó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v en la hidrólisis ácida, se registró el máximo agotamiento de azúcares reductores de 2.72 g/L en el hidrolizado de microalgas en un tiempo de 8 horas de fermentación alcohólica, equivalente al consumo del 41%. Sin embargo, en las pruebas complementarias se alcanzó un agotamiento más eficiente de azúcares reductores al emplear H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v, que se atribuye a una menor producción de compuestos inhibidores que

permitieron el agotamiento de 5.71 g/L de azúcares reductores en el hidrolizado equivalente al consumo del 70% a las 48 horas del proceso fermentativo. No obstante, no se detectó la producción de bioetanol bajo el uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v en la hidrólisis ácida, atribuible a la modificación de las condiciones de neutralización que probablemente causaron el desvío energético del metabolismo de *C. jadinii* hacia mecanismos de adaptación y supervivencia debido a una alta concentración de sales solubles en el hidrolizado (Tilloy et al., 2014).

Con base en lo anterior, se recomienda el uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v frente al H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v integrando la neutralización del hidrolizado microalgal con bases alcalinas de baja solubilidad que, que podrían resultar en la producción eficiente de bioetanol. Cabe mencionar que en estudios previos se ha recomendado el uso de una baja concentración de ácidos (1-3% v/v) en el pretratamiento de biomasa con hidrólisis ácida con fines fermentativos (Camargo, 2024; Chng et al., 2019; El-Mekawi et al., 2019; Ho et al., 2013).

Respecto a las pruebas de estandarización con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v, se determinó el rendimiento de producción de bioetanol de 0.93 g etanol/g glucosa equivalente al 182.8% respecto al rendimiento teórico máximo mediante el análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la mejor condición de fermentación alcohólica de hidrolizado de microalgas y, con ello, se infirió la presencia de otros azúcares reductores que en términos de glucosa arrojan un rendimiento mayor al teórico máximo para la producción de bioetanol. Lo que representa una oportunidad para dirigir el desarrollo investigativo posterior hacia la caracterización detallada de la composición de los azúcares presentes en el hidrolizado microalgal. Sin embargo, se obtuvo un rendimiento de producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal de 0.075 g etanol/ g biomasa microalgal, un resultado competitivo de acuerdo con la bibliografía consultada en esta línea de investigación en la que se continúan realizando esfuerzos orientados a la implementación de tecnología ambiental sustentable y de vanguardia en la producción de biocombustibles de tercera generación.

## VI. CONCLUSIONES

En el presente estudio se estandarizó un proceso reproducible para la obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual, evidenciando alta estabilidad y baja variabilidad experimental al emplear H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v en el pretratamiento de la biomasa con hidrólisis ácida. La fermentación alcohólica del hidrolizado mostró un desempeño adecuado de *C. jadinii*, identificándose como condición óptima un inóculo equivalente a una DO<sub>600nm</sub> de 0.5, al favorecer un mayor consumo de azúcares reductores. Bajo estas condiciones, se alcanzaron rendimientos de bioetanol comparables con los reportados en la literatura, confirmando el potencial de la biomasa microalgal como materia prima para la producción de bioetanol de tercera generación en el marco de tecnologías ambientales sustentables, integrando la valorización de efluentes con la generación de energía renovable.

Adicionalmente, las pruebas complementarias confirmaron la recuperación y sacarificación eficientes de carbohidratos, sin diferencias significativas entre las concentraciones de ácido evaluadas. Sin embargo, el uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7% v/v sugirió una potencial optimización del rendimiento de bioetanol, a reserva de realizar pruebas posteriores manteniendo las condiciones sugeridas de neutralización del hidrolizado microalgal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aceituno, F., Orellana, M., Torres, J., Mendoza, S., Slater, A., Melo, F. & Agosin, E. (2012). Oxygen Response of the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 Grown under Carbon-Sufficient, Nitrogen-Limited Enological Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23). <https://doi.org/10.1128/AEM.02305-12>
2. Acevedo, S., Pino, N. & Peñuela, G. (2017). Biomass production of *Scenedesmus* sp and removal of nitrogen and phosphorus in domestic wastewater. *Ingeniería Y Competitividad*, 19(1), 177-185. <https://doi.org/10.25100/iyc.v19i1.2142>
3. Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (2025). *Sustainability*. EPA. <https://www.epa.gov/sustainability/learn-about-sustainability>
4. 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, 012029. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/308/1/012029>
5. Alves, G., Carissimi, E., Monje, I., Velásquez, S., Teixeira, R., Orta, M. (2018). Comparison between coagulation-flocculation and ozone-flotation for *Scenedesmus* microalgal biomolecule recovery and nutrient removal from wastewater in a high-rate algal pond. *Bioresource Technology*, 259, 334-342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.072>
6. American Public Health Association (APHA) (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (21st ed., 1220 p). Washington, DC: American Public Health Association.
7. Beckner, M., Ivey, M. & Phister, T. (2011). Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4), 387-394. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03124.x>
8. Bomer, L. & Leverett, B. (2024). Growth Characteristics of a *Desmodesmus* Species from the San Antonio Springs and Its Short-Term Impact on Soil Microbial Dynamics. *Life*, 14(9), 1053. <https://doi.org/10.3390/life14091053>
9. Brenes, A. (2024). Calculating and Reporting Coefficients of Variation for DIA-Based Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 23(12), 5274-5278. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.4c00461>

10. Brown, M., Jeffrey, S., Volkman, J. & Dunstan, G. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151, 315-331. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01501-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01501-3)
11. Bruton, T., Lyons, H., Lerat, Y., Stanley, M. & Rasmussen, M. (2009). *A review of the potential of Marine Algae as a Source of Biofuel in Ireland*. Sustainable Energy Ireland. [https://www.researchgate.net/publication/309185965\\_A\\_review\\_of\\_the\\_potential\\_of\\_Marine\\_Algae\\_as\\_a\\_Source\\_of\\_Biofuel\\_in\\_Ireland\\_Sustainable\\_Energy](https://www.researchgate.net/publication/309185965_A_review_of_the_potential_of_Marine_Algae_as_a_Source_of_Biofuel_in_Ireland_Sustainable_Energy)
12. Cai, T. Park, S. & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>
13. Caldwell, D. (1946) Sewage oxidation ponds: performance, operation and design. *Sewage Works Journal*, 18(3), 433–458. <https://www.jstor.org/stable/25030250>
14. Camargo, S. (2024). *Intensificación del proceso para la obtención de bioetanol a partir de biomasa de microalgas cultivadas en agua residual y fermentación con levaduras nativas*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ingeniería]. [https://tesiunamdocumentos.dgb.unam.mx/ptd2024/oct\\_dic/0862861/Index.html](https://tesiunamdocumentos.dgb.unam.mx/ptd2024/oct_dic/0862861/Index.html)
15. Carbonero, P. (1975). *Bioquímica de las fermentaciones*. Universidad Politécnica de Madrid. <https://oa.upm.es/55235/1/FERMENTACIONES.pdf>
16. Castaño, L. (2015). *Estudio del Efecto del Pretratamiento Básico con Peróxido de Hidrógeno en la Liberación de Azúcares de Microalgas*. [Tesis de Maestría, Universidad de Valladolid, Escuela de Ingenierías Industriales]. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/13769/TFM-I-304.pdf>
17. Chandel, N. (2021). Glycolysis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040535>
18. Chandrasekhar, T., Varaprasad, D., Gnaneswari, P., Swapna, B., Riazunnisa, K., Anu, V., Korivi, M., Wee, Y. & Lebaka, V. (2023). Algae: The Reservoir of Bioethanol. *Fermentation*, 9(8), 712. <https://doi.org/10.3390/fermentation9080712>
19. Changi, S., Faeth, J., Mo, N. & Savage, P. (2015). Hydrothermal Reactions of Biomolecules Relevant for Microalgae Liquefaction. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(47), 11733-11758. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.iecr.5b02771>

20. Chen, C., Zhao, X., Yen, H., Ho, S., Cheng, C., Lee, D., Bai, F. & Chang, J. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>
21. Chng, L., Teo, K., Chieh, D., Lee, K. & Toh, P. (2019). Fermentation of Microalgae Biomass through Mild Acid Pretreatment for Bioethanol Production. *Journal of Energy and Safety Technology*, 1(2-2). <https://doi.org/10.11113/jest.v1n2-2.27>
22. Comisión Europea (s.f.) *Circular economy. Information on data: Selection of indicators*. Eurostat. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/circular-economy/information-data>
23. Comisión Nacional del Agua. (2024). *Estadísticas del Agua en México 2023*. CONAGUA. [https://sinav30.conagua.gob.mx:8080/Descargas/pdf/EAM2023\\_f.pdf](https://sinav30.conagua.gob.mx:8080/Descargas/pdf/EAM2023_f.pdf)
24. Comisión Nacional del Agua. (2024). *Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento edición 2024*. CONAGUA. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/960719/DSAPAS-2024-c.pdf>
25. Consejo Nacional de Investigación. (1998). Executive Summary. En *Assessment of Exposure-Response Functions for Rocket-Emission Toxicants*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/4053>.
26. Cuellar, S., García, J., Rittmann, B. & Parra, R. (2015). Photosynthetic bioenergy utilizing CO<sub>2</sub>: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. *Journal of Cleaner Production*, 98, 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.03.034>
27. D'Adamo, I., Favari, D., Gastaldi, M., Kirchherr, J. (2024). Towards circular economy indicators: Evidence from the European Union. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy*, 42(8), 670-680. <https://doi.org/10.1177/0734242X241237171>
28. Dasan, Y., Lam, M., Yusup, S., Lim, J. & Lee, K. (2019). Life cycle evaluation of microalgae biofuels production: Effect of cultivation system on energy, carbon emission and cost balance analysis. *Science of the Total Environment*, 688, 112-128. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.181>
29. Deak, T. (2007). Characteristics and Properties of Foodborne Yeasts. En *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420044942>
30. 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>
31. Domínguez, M. (2018). *Optimización de un reactor HRAP para la depuración de aguas residuales urbanas*. [Tesis de Maestría, Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales]. <http://hdl.handle.net/10498/20814>
32. DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
33. El Hosry, L., Elias, V., Chamoun, V., Halawi, M., Cayot, P., Nehme, A. & Bou-Maron, E. (2025). Maillard Reaction: Mechanism, Influencing Parameters, Advantages, Disadvantages, and Food Industrial Applications: A Review. *Foods*, 14(11), 1881. <https://doi.org/10.3390/foods14111881>
34. El-Dalatony, M., Salama, E., Kurade, M., Hassan, S., Oh, S., Kim, S., & Jeon, B. (2017). Utilization of Microalgal Biofractions for Bioethanol, Higher Alcohols, and Biodiesel Production: A Review. *Energies*, 10(12), 2110. <https://doi.org/10.3390/en10122110>
35. El-Mekkawi, S., Abdo, S., Samhan, F., Ali, G. (2019). Optimization of some fermentation conditions for bioethanol production from microalgae using response surface method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43, 164. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0205-8>
36. Fallahi, A., Rezvani, F., Asgharnejad, H., Nazloo, E., Hajinajaf, N. & Higgins, B. (2021). Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. *Chemosphere*, 272, 129878. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129878>
37. Geng, Y., Shaukat, A., Azhar, W., Raza, Q., Tahir, A., Abideen, M., Bakar, M., Bashir, M. & Rehim, A. (2025) Microalgal biorefineries: a systematic review of technological trade-offs and innovation pathways. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 18, 93. <https://doi.org/10.1186/s13068-025-02694-7>
38. Gómez, G. (2016). *Estudio de hidrólisis enzimática en biomasa microalgal procedente del tratamiento de aguas residuales con purines*. [Tesis de Licenciatura, Universidad de Valladolid, Escuela de Ingenierías Industriales]. <http://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/18242/1/TFG%20-I-418.pdf>

39. González, C., García, F., Jawiarczyk, N., Fernández, J., & G. Ación, F. (2020a). Valorization of Microalgae and Energy Resources. *IntechOpen*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90072>
40. Gonzalez, L. & de-Bashan, L. (2023). The Potential of Microalgae–Bacteria Consortia to Restore Degraded Soils. *Biología*, 12(5), 693. <https://doi.org/10.3390/biology12050693>
41. González, R. (2020). *Disrupción de microalgas por ultrasonido y ozono para incrementar la recuperación de biocomponentes valorizables*. [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ingeniería]. <https://tesiunamdocumentos.dgb.unam.mx/ptd2020/enero/0800144/Index.html>
42. González, R. Velásquez, S., Valdez, I. & Orta, M. (2020b). Intensified recovery of lipids, proteins, and carbohydrates from wastewater-grown microalgae *Desmodesmus* sp. by using ultrasound or ozone. *Ultrasonics Sonochemistry*, 62, 104852. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104852>
43. González, R., Felix, M., Bengoechea, C., Orta, M., Guerrero, A., Velásquez, S. (2021). Development of composites based on residual microalgae biomass cultivated in wastewater. *European Polymer Journal*, 160, 110766. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110766>
44. González, R., Velásquez, S., Valdez, I. & Orta, M. (2020c). Sequential pretreatment to recover carbohydrates and phosphorus from *Desmodesmus* sp. cultivated in municipal wastewater. *Water Science & Technology*, 82(6), 1237–1246. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.404>
45. Gracida, J., & Pérez, B. (2014). Factores previos involucrados en la producción de bioetanol, aspectos a considerar. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30(2), 213-227. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37030754008>
46. Guzmán, C. (2014). *Estandarización de producción de bio-etanol a base de mucilago de café en la planta de biocombustibles del tecno-parque Yamboro del Sena Pitalito Huila*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería]. <http://repository.unad.edu.co/retrieve/4119/83258559.pdf>
47. Hammann, W., Ross, A. & Seames, W. (2024). Sequential Extraction of Carbohydrates and Lipids from *Chlorella vulgaris* Using Combined Physical and Chemical Pre-Treatments. *ChemEngineering*, 8(1), 11. <https://doi.org/10.3390/chemengineering8010011>

48. Harun, R., Yip, J., Thiruvankadam, S., Ghani, W., Cherrington, T. & Danquah, M. (2014). Algal biomass conversion to bioethanol – a step-by-step assessment. *Biotechnology Journal*, 9(1), 73-86. <https://doi.org/10.1002/biot.201200353>
49. Hernández, A., Velásquez, S., Novelo, E., Yáñez, I., Monje, I., Orta, M. (2019). Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 435-444. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.052>
50. 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>
51. Hirano, A., Ueda, R., Hirayama, S. & Ogushi, Y. (1997). CO<sub>2</sub> fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy*, 22(2-3), 137-142. [https://doi.org/10.1016/S0360-5442\(96\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0360-5442(96)00123-5)
52. Ho, S., Li, P., Liu, C. & Chang, J. (2013). Bioprocess development on microalgae-based CO<sub>2</sub> fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 145, 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.119>
53. Holešínský, R., Průšová, B., Baroň, M., Fiala, J., Kubizniakova, P., Paulíček, V., & Sochor, J. (2020). Spontaneous fermentation in wine production as a controllable technology. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 692–703. <https://doi.org/10.5219/1280>
54. Hossain, N., & Mahlia, T. (2019). Progress in physicochemical parameters of microalgae cultivation for biofuel production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(6), 835–859. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1624945>
55. Jain, S. & Kumar, S. (2024). A comprehensive review of bioethanol production from diverse feedstocks: Current advancements and economic perspectives. *Energy*, 296, 131130. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2024.131130>
56. Jaramillo, O., Gómez, M., & Fontalvo, J. (2012). Remoción de los inhibidores de la fermentación etanólica usando membranas de polidimetilsiloxano (PDMS) por pervaporación. *Revista ION*, 25(1), 51-59. <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistaion/article/view/2770>
57. Jeswani, H., Chilvers, A. & Azapagic, A. (2020). Environmental sustainability of biofuels: a review. *Proceedings A Reviews and Perspectives*, 476(2243), 20200351. <https://doi.org/10.1098/rspa.2020.0351>

58. Jimenez, M., & Castillo, A. (2021). Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 265-282. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.030>
59. Khanna, M., Gusmerotti, N., Frey, M. (2022). The Relevance of the Circular Economy for Climate Change: An Exploration through the Theory of Change Approach. *Sustainability*, 14(7), 3991. <https://doi.org/10.3390/su14073991>
60. Komolafe, O., Velásquez, S., Monje, I., Yáñez, I., Harvey, A., Orta, M. (2014). Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. *Bioresource Technology*, 154, 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.048>
61. Kossmann, J., & Lloyd, J. (2000). Understanding and Influencing Starch Biochemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(3), 171–226. <https://doi.org/10.1080/07352680091139204>
62. Kurtzman, C. (2011). Chapter 42—Lindnera. En C. Kurtzman, J. Fell, T. Boekhout (Eds.) *The Yeasts: A Taxonomic Study* (pp. 521–543). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00042-2>
63. Li, M., Wang, Y., Zhang, J., Liu, B., Xue, H., Wu, L. & Li Z. (2023). Knowledge Mapping of High-Rate Algal Ponds Research. *Water*, 15(10). <https://doi.org/10.3390/w15101916>
64. Maity, S. & Mallick, N. (2022). Trends and advances in sustainable bioethanol production by marine microalgae: A critical review. *Journal of Cleaner Production*, 345, 131153. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131153>
65. Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E. & Georgakakis, D. (2013). Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of *Arthrospira* (Spirulina) *platensis*. *Energies*, 6(8), 3937-3950. <https://doi.org/10.3390/en6083937>
66. Martín, J., Vega, M., Riol, E., Muñoz, R. & Bolado, S. (2019). Optimisation of the production of fermentable monosaccharides from algal biomass grown in photobioreactors treating wastewater. *Bioresource Technology*, 281, 239-249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.082>
67. Megawati, Bahlawan, Z., Damayanti, A., Artanti, R., Triwibowo, B., Prasetiawan, H., Kusuma, S & Prawisnu, A. (2022). Bioethanol production from glucose obtained from enzymatic hydrolysis of *Chlorella* microalgae. *Materials Today: Proceedings*, 63, 5373-5378. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.03.551>

68. Mensah, J. (2019). Sustainable development: Meaning, history, principles, pillars, and implications for human action: Literature review. *Cogent Social Sciences*, 5(1). <https://doi.org/10.1080/23311886.2019.1653531>
69. Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
70. Ministerio de Energía y Ambiente (s.f.) *¿Qué es economía circular?* <https://cambioclimatico.minae.go.cr/que-es-economia-circular/>
71. Montaña, D., Orta, M., Monje, I., Yáñez, I., Luna, V. & Velásquez, S. (2022). A non-sterile heterotrophic microalgal process for dual biomass production and carbon removal from swine wastewater. *Renewable Energy*, 181, 592-603. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.09.028>
72. Moraga, G., Huysveld, S., Mathieux, F., Andrea Blengini, G., Alaerts, L., Van Acker, K., De Meester, S. & Dewulf, J. (2019). Circular economy indicators: What do they measure? *Resources, Conservation and Recycling*, 146, 452-461. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.03.045>
73. Nava, I., Velásquez, S., Monje, I., Güereca, L., Harvey, A., Cuevas, R., Yáñez, I., Orta, M. (2021). Catalytic hydrothermal liquefaction of microalgae cultivated in wastewater: Influence of ozone-air flotation on products, energy balance and carbon footprint. *Energy Conversion and Management*, 249, 114806. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2021.114806>
74. Niaz, K., Khan, F. & Shah, M. (2020). Analysis of carbohydrates (monosaccharides, polysaccharides). En A. Sanches, S. Fazel, M. Saeedi, S. Mohammad (Eds.) *Recent Advances in Natural Products Analysis* (pp. 621-633). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00018-4>
75. Obaidullah, M., Harvey, A., Orta, M. & Velásquez, S. (2024). Bioremediation of waste by yeast strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 69, 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2024.01.005>
76. Oraby, S., Hegazy, M., Labeeb, H., & Mahdy, A. (2023). Biochemical responses of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. under nutrient limitation. *Sinai Journal of Applied Sciences*, 12(1), 9-26. <https://doi.org/10.21608/sinjas.2023.190718.1186>
77. Organización de las Naciones Unidas (1987). *Report of the World Commission on Environment and Development: Our Common Future*. UNAI. <http://www.un-documents.net/our-common-future.pdf>

78. Organización de las Naciones Unidas. (2015). Resolución de la Asamblea General de las Naciones Unidas (70/1) *Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible*. Adoptada el 25 de septiembre de 2015. <https://docs.un.org/es/A/RES/70/1>
79. Organización de las Naciones Unidas. (2017). *The United Nations World Water Development Report. Wastewater: The Untapped Resource*. UNESCO. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000247647>
80. Organización de las Naciones Unidas. (2024). *Progress on Wastewater Treatment – 2024 Update*. UN-Water. <https://www.unwater.org/publications/progress-wastewater-treatment-2024-update>
81. Oswald, W & Gotaas, H. (1957) Photosynthesis in Sewage Treatment. *Transactions of the American Society of Civil Engineers*, 122(1). <https://doi.org/10.1061/TACEAT.0007483>
82. Padil, M., Putra, M., Hidayat, M., Kasiamdari, R., Mutamima, A., Iwamoto, K., Darmawan, M. & Gozan, M. (2023). Mechanism and kinetic model of microalgal enzymatic hydrolysis for prospective bioethanol conversion. *RSC Advances*, 31, 21403-21413. <https://doi.org/10.1039/D3RA01556D>
83. Pahalagedara, A., Gkogka, E. & Hammershøj, M. (2024). A review on spore-forming bacteria and moulds implicated in the quality and safety of thermally processed acid foods: Focusing on their heat resistance. *Food control*, 166, 110716. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110716>
84. Parlamento Europeo (2023, 24 mayo). *Economía circular: definición, importancia y beneficios*. <https://www.europarl.europa.eu/topics/es/article/20151201STO05603/economia-circular-definicion-importancia-y-beneficios>
85. 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(191). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1533-5>
86. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (2016). *A snapshot of the world's water quality: Towards a global assessment*. United Nations Environment Programme. <https://wedocs.unep.org/items/fe73c41e-2043-4ab6-88e2-c00d2a3b0c7b>

87. Purvis, B., Mao, Y. & Robinson, D. (2019) Three pillars of sustainability: in search of conceptual origins. *Sustainability Science*, *14*, 681–695. <https://doi.org/10.1007/s11625-018-0627-5>
88. Radecka, D., Mukherjee, V., Quintilla, R., Stojiljkovic, M., Foulquié, M. & Thevelein, J. (2015) Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, *15*(6). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>
89. Raven, J. & Beardall, J. (2003). Carbohydrate Metabolism and Respiration in Algae. En A. Larkum, S. Douglas, J. Raven (Eds.) *Photosynthesis in Algae. Advances in Photosynthesis and Respiration* (vol. 14, pp. 205-224). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1038-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1038-2_10)
90. Reed, G., Lynn, F. & Meade, B. (2002). Use of Coefficient of Variation in Assessing Variability of Quantitative Assays. *Clinical and Vaccine Immunology*, *9*(6). <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1235-1239.2002>
91. Renewable Fuels Association (2025) *2025 Ethanol industry Outlook* [Archivo PDF]. <https://ethanolrfa.org/file/2912/2025%20Outlook.pdf>
92. Rintala, E., Jouhten, P., Toivari, M., Wiebe, M., Maaheimo, H., Penttilä, M. & Ruohonen, L. (2011). Transcriptional Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to Shift from Respiratory and Respirofermentative to Fully Fermentative Metabolism. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, *15*(7-8), 461-476. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0082>
93. Romero, E. (2019). *Generación de biomasa microalgal crecida en agua residual doméstica para la producción de bioetanol empleando levaduras silvestres*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ingeniería]. <http://132.248.9.195/ptd2019/agosto/0794022/0794022.pdf>
94. Romero, E., Velásquez, S., Escobar, V., Tinoco, R. & Orta, M. (2021) Bioprospecting of wild type ethanologenic yeast for ethanol fuel production from wastewater-grown microalgae. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, *14*, 93. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01925-x>
95. Sajjadi, B., Chen, W., Raman, A. & Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects

- on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 200-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>
96. Sanchez, 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>
97. Schneider, M., Melcher, F., Fimmen, R., Mertens, J., Garbe, D., Paper, M., Ringel, M. & Brück, T. (2025). Influence of process parameters on single-cell oil production by *Cutaneotrichosporon oleaginosus* using response surface methodology. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 18, 115. <https://doi.org/10.1186/s13068-025-02717-3>
98. Secretaría del Medio Ambiente (2014) *Agua residual*. SEDEMA. <http://data.sedema.cdmx.gob.mx:9000/datos/glosario-definicion/Agua%20residual>
99. Seon, G., Kim, H., Cho, J. Kim, M., Won-Kun, P., & Chang, Y. (2020). Effect of post-treatment process of microalgal hydrolysate on bioethanol production. *Scientific Reports*, 10, 16698. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73816-4>
100. Shokrkar, H., Ebrahimi, S. & Zamani, M. (2017). Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture. *Fuel*, 200, 380-386. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.03.090>
101. Silva, 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>
102. Singh, H., Varanasi, J., Banerjee, S. & Das, D. (2019). Production of carbohydrate enrich microalgal biomass as a bioenergy feedstock. *Energy*, 188, 116039. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.116039>
103. Sousa, M., Vieira, D., Soares, P., Casal, M., & Soares, I. (2021). Expanding the Knowledge on the Skillful Yeast *Cyberlindnera jadinii*. *Journal of Fungi*, 7(1), 36. <https://doi.org/10.3390/jof7010036>
104. Sriram, S. & Seenivasan, R. (2015). Biophotonic perception on *Desmodesmus* sp. VIT growth, lipid and carbohydrate content. *Bioresource Technology*, 198, 626-633. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.065>
105. Stirbet, A., Lazár, D., Guo, Y., Govindjee, G. (2020). Photosynthesis: basics, history and modelling. *Annals of Botany*, 126(4), 511-537. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz171>

106. Suárez, J., Castillo, A. & Souza, R. (2021) Obtención de azúcares reductores por hidrólisis ácida a partir de un consorcio de microalgas amazónicas cultivadas en agua residual. *SCIÉNDO INGENIUM*, 17(4), 45-51. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/4064>
107. Tesfaw, A. & Assefa, F. (2014). Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *International Scholarly Research Notices*, 532852. <https://doi.org/10.1155/2014/532852>
108. Tilloy, V., Ortiz, J. & Dequin, S. (2014). Reduction of Ethanol Yield and Improvement of Glycerol Formation by Adaptive Evolution of the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae* under Hyperosmotic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8). <https://doi.org/10.1128/AEM.03710-13>
109. Tu, W., Huang, J. & Ou, C. (2026). Lactic acid production from green microalgal biomass hydrolysates via dilute acid pretreatment and fermentation. *BioResources*, 21(1), 535-546. <https://doi.org/10.15376/biores.21.1.535-546>
110. Uguz, S., Sozcu, A., Simsek, E. & Yaslioglu, E. (2025). Nutritional and Amino Acid Composition of *Scenedesmus* sp. Cultivated Under Various Light Intensities. *Current Microbiology*, 82(274). <https://doi.org/10.1007/s00284-025-04248-4>
111. Valentine, C., Velásquez, S., Hernández, A., Monje, I., Orta, M. (2018). Kinetic modelling of microalgae cultivation for wastewater treatment and carbon dioxide sequestration. *Algal Research*, 32, 131-141. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.015>
112. Valeriano, M., Orta, M., Velásquez, S. & Monje, I. (2020). Harvesting microalgae using ozone-air flotation for recovery of biomass, lipids, carbohydrates, and proteins. *Environmental Technology*, 42(21), 3267–3277. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1725144>
113. Velásquez, S., García, R., Monje, I., Harvey, A. & Orta, M. (2014). Microalgae harvesting using ozoflotation: Effect on lipid and FAME recoveries. *Biomass and Bioenergy*, 70, 356-363. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.08.022>
114. Velásquez, S., Yáñez, I., Monje, I. & Orta, M. (2024). Pilot-scale microalgae cultivation and wastewater treatment using high-rate ponds: a meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 31, 46994–47021. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-34000-7>

115. Vielma, E., Monje, I., Velásquez, S., Gracia, J. & Orta, M. (2022) Surface activity of biomolecules released from microalgae harvested by ozone-flotation. *Environmental Technology & Innovation*, 26, 102354. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102354>
116. Walls, L., Velásquez, S., Romero, E., Leary, P., Yáñez, I., Orta, M. (2019). Non-sterile heterotrophic cultivation of native wastewater yeast and microalgae for integrated municipal wastewater treatment and bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 151, 107319. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107319>
117. Wang, J., Zhang, T., Dao, G., Xu, X., Wang, X., & Hu, H. (2017). Microalgae-based advanced municipal wastewater treatment for reuse in water bodies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 2659–2675. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8184-x>
118. Wang, P., Shao, Y., Geng, Y., Mushtaq, R., Li, M., Sun, X., Wang, H. & Chen, G. (2023). Advanced treatment of secondary effluent from wastewater treatment plant by a newly isolated microalga *Desmodesmus* sp. SNN1. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1111468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1111468>
119. Wang, W. (2024). Eutrophication Mechanisms and Their Impacts on Coastal Marine Ecosystems. *International Journal of Marine Science*, 14(4), 285-294. <https://doi.org/10.5376/ijms.2024.14.0032>
120. Yang, M., Wang, J., Nan, Y., Zhang, J., Li, L., Liu, G., Vepsäläinen, J., Kuittinen, S. & Pappinen, A. (2019). Effect of salts formed by neutralization for the enzymatic hydrolysis of cellulose and acetone–butanol–ethanol fermentation. *RSC Advances*, 9(58), 33755-33760. <https://doi.org/10.1039/C9RA06869D>
121. Yilbaşı, Z. (2025). Biofuels, E-Fuels, and Waste-Derived Fuels: Advances, Challenges, and Future Directions. *Sustainability*, 17(13), 6145. <https://doi.org/10.3390/su17136145>
122. Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J., Azirun, M., Hashim, R. & Nasrulhaq, A. (2014). Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice. *The Scientific World Journal*, 957102. <https://doi.org/10.1155/2014/957102>
123. Zarta, P. (2018). La sustentabilidad o sostenibilidad: un concepto poderoso para la humanidad. *Tabula Rasa*, 28, 409-423. <https://doi.org/10.25058/20112742.n28.18>
124. Zhang, B., Lin, N., Chen, X., Fan, Q., Chen, X., Ren, T., Zou, R., & Guo, H. (2021). Nonlinear Water Quality Response to Numerical Simulation of In Situ Phosphorus Control Approaches. *Water*, 13(5), 725. <https://doi.org/10.3390/w13050725>

125. Zhang, H., Zhang, P., Wu, T. & Ruan, H. (2023). Bioethanol Production Based on *Saccharomyces cerevisiae*: Opportunities and Challenges. *Fermentation*, 9(8), 709. <https://doi.org/10.3390/fermentation9080709>
126. Zhao, D., Cheah, W., Lai, S., Ng, E., Khoo, K., Show, P., Ling, T., (2023). Symbiosis of microalgae and bacteria consortium for heavy metal remediation in wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(3), 109943. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109943>
127. Zoecklein, B., Fugelsang, K., Gump, B., & Nury, F. (1990). Carbohydrates: Reducing Sugars. En *Production Wine Analysis* (pp. 114-128). Boston: Van Nostrand Reinhold. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8146-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8146-8_6)

## ANEXOS

### Anexo A. Método de cuantificación de carbohidratos totales (CHO)

La cuantificación de carbohidratos totales se llevó a cabo de acuerdo con el método colorimétrico de DuBois et al. (1956) que se basa en la hidrólisis de carbohidratos por medio de ácido sulfúrico que, al reaccionar con fenol, forman un complejo amarillo-marrón. La intensidad del color, medida espectrofotométricamente a 490 nm, es proporcional a la concentración de carbohidratos en la muestra. Esta absorbancia se compara con una curva de calibración, lo que permite cuantificar los CHO presentes.

#### Preparación de la muestra

1. Suspender 0.15 g de biomasa microalgal en 20 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer. Suministrar agitación constante hasta homogeneizar la muestra. Se recomienda un mínimo de 8 horas. Trasvasar a un tubo Falcon.
2. Agregar 1 mL de agua destilada a un tubo roscado para la preparación del blanco.
3. Agitar la muestra de biomasa microalgal. Agregar 1 mL de la muestra a un tubo roscado en una dilución 1:10 (100  $\mu$ L de muestra y 900  $\mu$ L de agua destilada). Realizar por triplicado.

#### Cuantificación de carbohidratos totales

1. Dentro de la campana de extracción, agregar con una pipeta 1 mL de fenol 5% m/v a cada muestra.
2. Agregar 5 mL de ácido sulfúrico concentrado a cada muestra, utilizando una bureta sujeta por una pinza tipo mariposa a un soporte universal.
3. Agitar 3 veces. Dejar reposar 10 minutos. Introducir en un baño de agua a temperatura ambiente.
4. Encender el espectrofotómetro Hach DR 3900, seleccionar longitud de onda única y ajustar a 490 nm.
5. Introducir el tubo con el blanco y ajustar a cero. Secar el tubo previamente con un paño de microfibras.
6. Introducir cada muestra y medir absorbancia. Secar los tubos previamente con un paño de microfibras.
7. Calcular el contenido de CHO con la Ecuación 8:

#### Ecuación 8

$$CHO \left[ \frac{mg}{L} \right] = \frac{Abs - 0.0327}{0.0119}$$

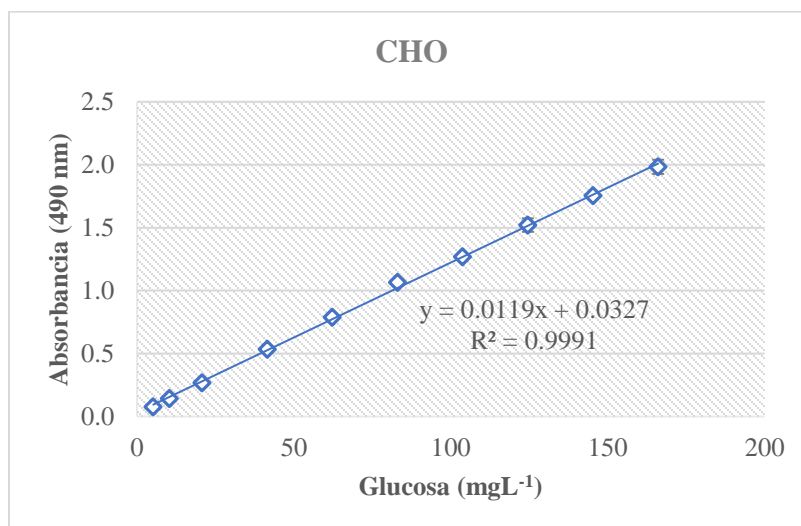
Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos totales

La curva de calibración (Figura 21) se preparó a partir de una solución madre de glucosa (estándar) de 519 mg/L. Se prepararon 10 soluciones con una concentración real de 5.19-166.08 mg/L. A cada punto de la curva se le agregó 1 mL de fenol 5% m/v y 5 mL de ácido sulfúrico. Se dejó reposar por 10 minutos y se introdujo en un baño de agua a temperatura ambiente. Por último, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Hach DR 3900 a 490 nm (Tabla 15).

**Tabla 15. Resultados de la curva de calibración de carbohidratos totales (CHO)**

Concentración real (mg/L)	Absorbancia			$\bar{x}$ Absorbancia	DESVEST	CV (%)
5.19	0.072	0.080	0.079	0.077	0.004	5.66
10.38	0.143	0.140	0.147	0.143	0.004	2.45
20.76	0.272	0.268	0.263	0.268	0.005	1.68
41.52	0.553	0.508	0.543	0.535	0.024	4.42
62.28	0.805	0.780	0.786	0.790	0.013	1.65
83.04	1.062	1.046	1.090	1.066	0.022	2.09
103.80	1.280	1.278	1.251	1.270	0.016	1.28
124.56	1.554	1.459	1.549	1.521	0.053	3.52
145.32	1.766	1.765	1.733	1.755	0.019	1.07
166.08	1.962	1.941	2.047	1.983	0.056	2.83

DESVEST: Desviación estándar  
CV: Coeficiente de variación



**Figura 21. Curva de calibración de carbohidratos totales (CHO)**

## Anexo B. Método de cuantificación de azúcares reductores (DNS)

La cuantificación de azúcares reductores se llevó a cabo de acuerdo con el método colorimétrico de Miller (1959) que se basa en la reacción de los azúcares reductores con el reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) bajo calor, reduciéndolo a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de tonalidad amarillo-anaranjada. La intensidad del color, medida espectrofotométricamente a 540 nm, es proporcional a la concentración de azúcares reductores en la muestra. Esta absorbancia se compara con una curva de calibración, lo que permite cuantificar los azúcares reductores presentes.

### Preparación de la muestra

1. Agitar la muestra a cuantificar.
2. Agregar asepticamente 0.5 mL de la muestra a un tubo roscado cubierto con aluminio en una dilución 1:5 (100 µL de muestra y 400 µL de agua destilada). Realizar por triplicado.
3. Agregar 0.5 mL de agua destilada a un tubo roscado cubierto con aluminio para la preparación del blanco.

### Cuantificación de azúcares reductores

1. Agregar con una pipeta 0.5 mL de reactivo DNS a cada muestra. El reactivo DNS debe colocarse en un baño de hielo durante su uso.
2. Colocar los tubos cubiertos con aluminio en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Los tubos deben estar correctamente cerrados.
3. Retirar del baño de agua y agregar 5 mL de agua destilada a cada muestra, utilizando una bureta sujeta por una pinza tipo mariposa a un soporte universal. Agitar 3 veces. Dejar reposar 15 minutos.
4. Encender el espectrofotómetro Hach DR 3900, seleccionar longitud de onda única y ajustar a 540 nm.
5. Introducir el tubo con el blanco y ajustar a cero. Retirar el aluminio y secar el tubo previamente con un paño de microfibra.
6. Introducir cada muestra y medir absorbancia. Retirar el aluminio y secar los tubos previamente con un paño de microfibra.
7. Calcular el contenido de azúcares reductores con la Ecuación 9:

#### **Ecuación 9**

$$\text{Azúcares reductores } \left[ \frac{mg}{L} \right] = \frac{Abs + 0.0253}{0.0007}$$

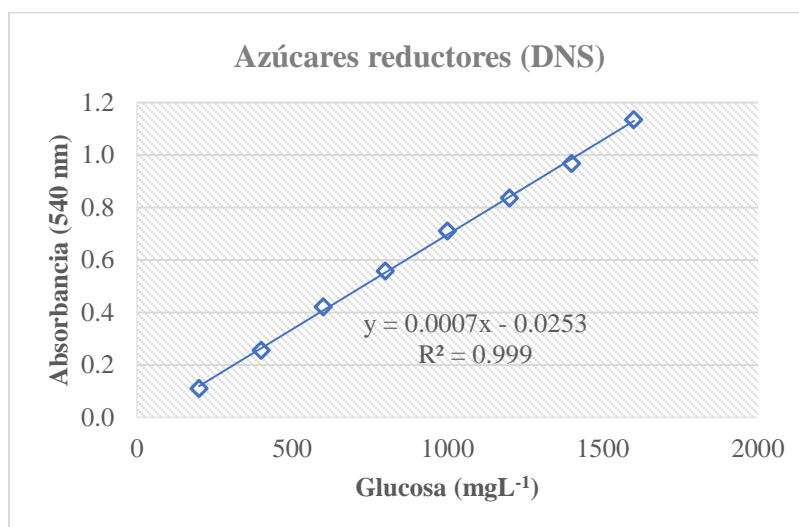
### Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores

La curva de calibración (Figura 22) se preparó a partir de una solución madre de glucosa (estándar) de 20.008 g/L. Se prepararon 8 soluciones con una concentración real de 200.08-1600.64 mg/L. A cada punto de la curva se le agregó 0.5 mL de reactivo DNS y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Se agregaron 5 mL de agua destilada y se dejó reposar por 15 minutos. Por último, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Hach DR 3900 a 540 nm (Tabla 16).

**Tabla 16. Resultados de la curva de calibración de azúcares reductores**

Concentración real (mg/L)	Absorbancia			$\bar{x}$ Absorbancia	DESVEST	CV (%)
200.08	0.108	0.107	0.116	0.110	0.005	4.47
400.16	0.249	0.257	0.262	0.256	0.007	2.56
600.24	0.416	0.418	0.431	0.422	0.008	1.93
800.32	0.556	0.554	0.565	0.558	0.006	1.05
1000.40	0.706	0.703	0.722	0.710	0.010	1.44
1200.48	0.827	0.836	0.846	0.836	0.010	1.14
1400.56	0.954	0.988	0.962	0.968	0.018	1.84
1600.64	1.137	1.15	1.119	1.135	0.016	1.37

DESVEST: desviación estándar  
CV: coeficiente de variación



**Figura 22. Curva de calibración de azúcares reductores**

## Anexo C. Preparación de soluciones

**Fenol 5% m/v.** Dentro de la campana de extracción, añadir 10 g de fenol a 100 mL de agua destilada en un vaso de precipitados. Agitar hasta disolver. Llevar a un volumen final de 200 mL en un matraz aforado, realizando lavados del vaso de precipitados. Almacenar en un recipiente de vidrio ámbar.

**Reactivo DNS (Ácido dinitrosalicílico).** Añadir 8 g de NaOH a 250 mL de agua destilada en un vaso de precipitados y agitar hasta disolver. Añadir 150 g de tartrato de sodio y potasio y agitar hasta disolver. Cubrir un matraz aforado de 500 mL con aluminio impidiendo la entrada de luz. Añadir 5 g de ácido, 3-5 dinitrosalicílico. Disolver con agitación y leve calentamiento. Llevar a un volumen final de 500 mL. Agitar 3 veces para mezclar. Almacenar a 4°C en un recipiente de plástico cubierto con aluminio.

**Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 5% v/v.** Dentro de la campana de extracción, agregar 500 mL de agua destilada a un matraz aforado de 1L. Añadir lentamente 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y aforar a 1L con agua destilada. Agitar 3 veces para mezclar. Almacenar en un recipiente de vidrio ámbar.

**Hidróxido de sodio (NaOH) 5M.** Añadir 100 g de NaOH a 250 mL de agua destilada en un vaso de precipitados. Agitar en baño de agua fría hasta disolver. Cuando la solución esté fría, llevar a un volumen final de 500 mL en un matraz aforado, realizando lavados del vaso de precipitados. Almacenar en un recipiente de plástico.

## Anexo D. Preparación de medios de cultivo

**Agar YPD (levadura peptona dextrosa) 2%.** Añadir 12.5 g de caldo YPD a 250 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer. Disolver con agitación y calentamiento (sin llegar a ebullición). Añadir 5 g de agar bacteriológico y disolver nuevamente. Colocar en autoclave a 120°C (18 psi) por 15 minutos. Distribuir asepticamente el agar en 10 cajas Petri (25 mL c/u) con ayuda de una probeta estéril. Dejar enfriar el medio de cultivo. Someter a prueba de esterilidad en incubadora a 28°C por 24 horas. Almacenar a 4°C para su conservación.

### Agua de dilución

#### Solución patrón A.

Añadir 3.4 g de fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 50 mL de agua destilada. Disolver. Almacenar en una botella lechera.

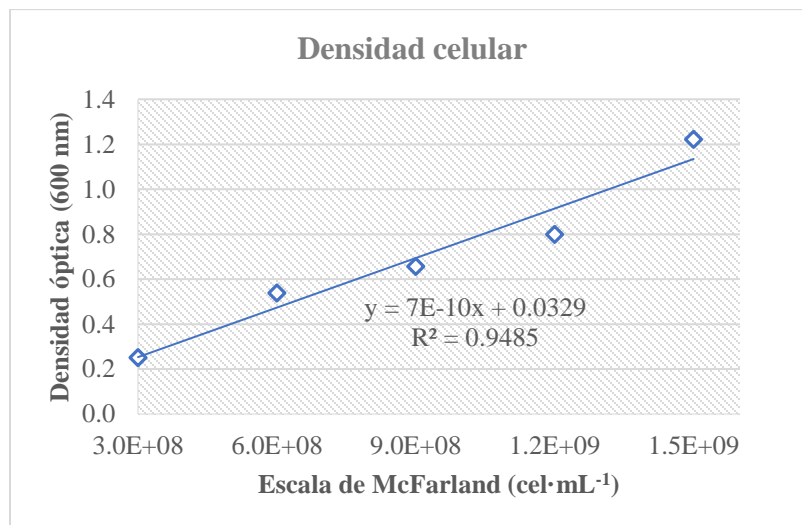
### Solución patrón B.

Añadir 50 g de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 100 mL de agua destilada. Disolver. Almacenar en una botella lechera.

Agregar 0.625 mL de la solución patrón A y 2.5 mL de la solución patrón B a 500 mL de agua destilada. Distribuir en botellas lecheras (90 mL c/u) y colocar en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  (18 psi) por 15 minutos. Dejar enfriar. Almacenar a  $4^\circ\text{C}$  para su conservación.

**Caldo YPD (levadura peptona dextrosa) 50 g/L.** Añadir 2.5 g de caldo YPD a 50 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer. Disolver con agitación y calentamiento (sin llegar a ebullición). Colocar en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  (18 psi) por 15 minutos. Dejar enfriar. Someter a prueba de esterilidad en incubadora a  $28^\circ\text{C}$  por 24 horas. Almacenar a  $4^\circ\text{C}$  para su conservación.

Anexo E. Curva de calibración para la densidad celular de acuerdo con la escala de McFarland



**Figura 23. Curva de calibración para la densidad celular de acuerdo con la escala de McFarland**

Anexo F. Curvas de calibración para la cuantificación de glucosa y etanol por HPLC

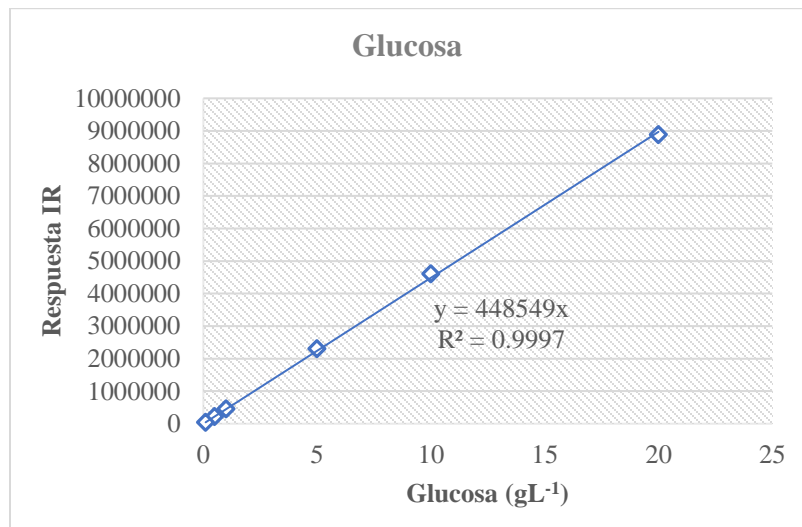


Figura 24. Curva de calibración para la cuantificación de glucosa por HPLC

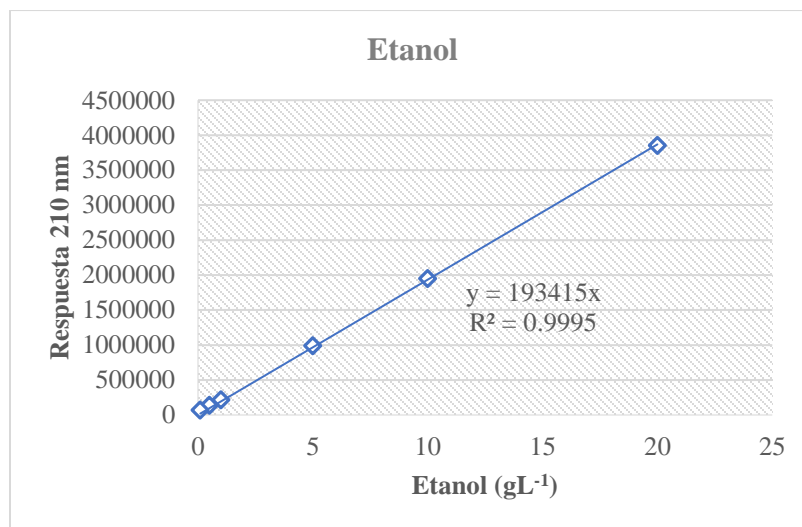


Figura 25. Curva de calibración para la cuantificación de etanol por HPLC

Anexo G. Rendimiento de producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal

Se presenta la memoria de cálculo para el rendimiento de producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal.

La concentración de CHO iniciales en la biomasa microalgal corresponde al 11.12%,

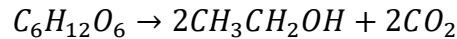
$$11.12\% = 0.1112 \frac{g_{CHOtot}}{g_{biomasa}}$$

De acuerdo con las pruebas experimentales en este estudio, la extracción de CHO corresponde al 74.1% y la sacarificación de CHO en azúcares reductores corresponde al 97.7%,

$$0.1112 \frac{g_{CHO_{tot}}}{g_{biomasa}} \cdot 0.741 \frac{g_{CHO_{ext}}}{g_{CHO_{tot}}} = 0.0824 \frac{g_{CHO_{ext}}}{g_{biomasa}}$$

$$0.0824 \frac{g_{CHO_{ext}}}{g_{biomasa}} \cdot 0.977 \frac{g_{glucosa}}{g_{CHO_{ext}}} = 0.0805 \frac{g_{glucosa}}{g_{biomasa}}$$

De acuerdo con la reacción química de la fermentación alcohólica (Ecuación 5),



Y la masa molar del reactivo: glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) y los productos: etanol ( $CH_3CH_2OH$ ) y dióxido de carbono ( $CO_2$ ),

$$MM_{C_6H_{12}O_6} = 180.156 \frac{g}{mol}$$

$$MM_{CH_3CH_2OH} = 46.069 \frac{g}{mol}$$

$$MM_{CO_2} = 44.009 \frac{g}{mol}$$

$$180.156 \frac{g_{C_6H_{12}O_6}}{mol} \rightarrow 2 \left( 46.069 \frac{g_{CH_3CH_2OH}}{mol} \right) + 2 \left( 44.009 \frac{g_{CO_2}}{mol} \right)$$

$$\frac{92.138 \frac{g_{CH_3CH_2OH}}{mol}}{180.156 \frac{g_{C_6H_{12}O_6}}{mol}} = 0.511 \frac{g_{CH_3CH_2OH}}{g_{C_6H_{12}O_6}}$$

El valor para el rendimiento teórico máximo en la fermentación alcohólica es de 0.511 g etanol/g glucosa. Con base en la cuantificación de glucosa y etanol por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se obtuvo un rendimiento de 0.93 g etanol/g glucosa, equivalente al 182.8% para la mejor condición de fermentación alcohólica. Así, el rendimiento de producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal corresponde a 0.075 g etanol/ g biomasa microalgal en el presente estudio.

$$0.0805 \frac{g_{glucosa}}{g_{biomasa}} \cdot 0.93 \frac{g_{EtOH}}{g_{glucosa}} = 0.075 \frac{g_{EtOH}}{g_{biomasa}}$$

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Agua residual.** Efluente secundario de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales principalmente compuesto de materia orgánica biodegradable.

**Azúcares reductores.** Carbohidratos que actúan como agentes reductores al tener un aldehído o cetona libre en su composición molecular.

**Bioetanol.** Alcohol de origen biológico producido por la fermentación de azúcares contenidos en la materia orgánica.

**Biomasa microalgal.** Materia orgánica compuesta predominantemente por microalgas y que se utiliza como fuente de energía para la producción de biocombustibles.

**Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).** Técnica analítica para la separación y cuantificación de los analitos de una muestra que es inyectada en una columna, donde una fase móvil líquida bombeada a alta presión propicia la interacción de los componentes con una fase estacionaria generando picos en un cromatograma de acuerdo con su tiempo de retención.

**Estandarización.** Definición y documentación de características específicas para adaptar un proceso a un modelo o patrón.

**Fermentación alcohólica.** Degradación anaerobia de glucosa a etanol y CO<sub>2</sub> como subproducto llevada a cabo por microorganismos.

**Hidrólisis ácida.** Alteración de la estructura molecular de los polisacáridos para su degradación en azúcares simples empleando ácidos diluidos.

**Repetibilidad.** Dispersión característica de resultados obtenidos bajo las mismas condiciones de medición.