



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA**  
**INGENIERIA AMBIENTAL – AGUA**

Obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual empleando  
ozoflotación como método de cosecha

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
Ing. Amb. Bernardo Dávila Cardona

TUTORES PRINCIPALES  
Dr. Ignacio Monje Ramírez, Instituto de Ingeniería  
Dra. María Teresa Orta Ledesma, Instituto de Ingeniería

COMITÉ TUTOR  
Mtro. José Raunel Tinoco Valencia, Instituto de Biotecnología  
Mtra. Gloria Moreno Rodríguez, Instituto de Ingeniería  
Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez, U. Politécnica del Edo. De Morelos

MEXICO, D.F. ENERO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dra. Moeller Chávez Gabriela Eleonora

Secretario: M. en C. Moreno Rodríguez Gloria

Vocal: M. B. Tinoco Valencia José Raunel

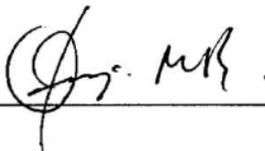
1 er. Suplente: Dr. Monje Ramírez Ignacio

2 do. Suplente: Dra. Orta Ledesma María Teresa

Lugar donde se realizó la tesis: Instituto de Ingeniería de la UNAM

**TUTOR DE TESIS:**

Dr. Ignacio Monje Ramírez

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ignacio Monje Ramírez', is written over a horizontal line.

**FIRMA**

(Segunda hoja)

# *Agradecimientos*

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de desarrollarme como profesional en la maestría en ingeniería ambiental.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo para el desarrollo del proyecto.

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM por permitirme hacer uso de sus instalaciones para terminar mi proyecto de investigación de maestría.

Al Dr. Monje por sus consejos y ayuda pero sobre todo por su comprensión y enseñanza brindada a lo largo de este proyecto de tesis.

A mis compañeros del Instituto de Ingeniería Fournier, Nava, Valeriano, Hernández y Rodríguez por su gran compañía, buenos momentos y apoyo brindado en mi proyecto de maestría.

A mis hermanos Felipe y Alejandro por creer en mí, agradezco al universo por habernos juntado en esta gran aventura que es la vida.

A mis padres Felipe y Leticia por su apoyo incondicional, por su educación y por darme la fortaleza para afrontar cualquier reto que se me presente, los amo con todo mi ser.

# Índice

Índice de Figuras .....	i
Índice de Tablas .....	iii
Resumen .....	1
1. Introducción .....	3
2. Objetivos .....	6
2.1. Objetivo general .....	6
2.2. Objetivos específicos .....	6
3. Marco teórico .....	8
3.1. Bioetanol como combustible alternativo .....	8
3.2. Microalgas como alternativa para la generación de biocombustibles.....	11
3.3. Sistemas de producción de microalgas .....	13
Sistemas abiertos.....	13
Sistemas cerrados (Fotobiorreactores) .....	15
3.4. Cultivo de microalgas en agua residual .....	17
3.5. Estrategias para la producción de metabolitos de interés .....	19
3.5.1. Deficiencia de nutrientes.....	20
3.6. Cosecha de microalgas mediante ozoflotación .....	22
3.7. Obtención de bioetanol a partir de las microalgas .....	25
3.7.1. Pre-tratamiento de la biomasa.....	26

3.7.2.	Hidrólisis .....	26
3.7.3.	Fermentación .....	28
4.	Metodología.....	32
4.1.	Etapa 1.....	32
4.1.1.	Caracterización del agua residual .....	32
4.1.2.	Adaptación de <i>Scenedesmus obliquus</i> en agua residual doméstica.....	33
4.1.3.	Cultivo de <i>Scenedesmus obliquus</i> en agua residual.....	33
4.2.	Etapa 2.....	34
4.3.	Métodos analíticos.....	35
4.3.1.	Propiedades fisicoquímicas del agua .....	35
4.3.2.	Determinación del crecimiento microalgal.....	36
4.3.3.	Determinación de carbohidratos totales por el método fenol –ácido sulfúrico. ....	36
4.3.4.	Cosecha de la biomasa .....	38
4.3.5.	Hidrólisis ácida de la biomasa microalgal.....	40
4.3.6.	Identificación y cuantificación de azúcares y etanol por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	40
4.3.7.	Fermentación alcohólica .....	40
5.	Resultados y discusión.....	43
5.1.	Adaptación de <i>Scenedesmus obliquus</i> en agua residual .....	43
5.2.	Cultivo de <i>Scenedesmus obliquus</i> en agua residual.....	44

5.2.1. Remoción de nutrientes durante el crecimiento de <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	44
5.2.2. Acumulación de carbohidratos bajo deficiencia de nitrógeno....	49
5.3 Potencial de generación de bioetanol a partir de biomasa cosechada mediante ozoflotación.....	51
5.3.1. Cosecha de microalgas mediante ozoflotación y recuperación de carbohidratos totales.....	51
5.3.2. Balance de masa de carbohidratos totales en la etapa de cosecha mediante ozoflotación. ....	54
5.3.3. Efecto de la ozoflotación en la obtención de azúcares fermentables. ....	58
5.3.4. Producción teórica de bioetanol a partir del hidrolizado microalgal cosechada mediante ozoflotación y centrifugación. ....	63
5.3 Obtención de bioetanol por fermentación de azúcares de biomasa microalgal .....	64
6 Conclusiones .....	68
Bibliografía .....	70

## Índice de Figuras

Figura 1. Mayores productores de etanol en el mundo .....	9
Figura 2. Pre-tratamiento del material lignocelulósico.....	10
Figura 3. Proceso conceptual para la producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal.....	12
Figura 4. Producción de microalgas mediante sistemas abiertos tipo circuito..	14
Figura 5. Fotobiorreactores.....	15
Figura 6. Concentración de nitratos, contenido de proteína, lípidos y carbohidratos durante el crecimiento de <i>S. obliquus</i> .....	21
Figura 7. Etapa 1 de la experimentación .....	32
Figura 8. Etapa 2 de la experimentación.....	34
Figura 9. Curva de calibración para carbohidratos totales.....	37
Figura 10. Arreglo experimental para el sistema de ozoflotación .....	39
Figura 11. Experimento de la cosecha de biomasa por ozoflotación.....	39
Figura 12. Crecimiento de <i>Scenedesmus obliquus</i> en agua residual y medio F/2. ....	43
Figura 13. Cultivos a 4 litros de <i>Scenedesmus obliquus</i> a temperatura ambiente y con un periodo de iluminación de 12 h de luz y 12 h oscuridad. ....	44
Figura 14. Crecimiento de <i>Scenedesmus obliquus</i> y remoción de nutrientes....	46
Figura 15. Variación de oxígeno y pH durante el cultivo de <i>Scenedesmus obliquus</i> . ....	47
Figura 16. Productividad de biomasa microalgal.....	48

Figura 17. Observación al microscopio al final de la experimentación .....	48
Figura 18. Contenido de carbohidratos totales y de nutrientes durante las fases de crecimiento del cultivo de <i>Scenedesmus obliquus</i> . .....	50
Figura 19. Productividad de carbohidratos .....	51
Figura 20. Desarrollo de una prueba de ozoflotación de microalgas .....	52
Figura 21. Contenido de carbohidratos en el sobrenadante de ozoflotación en función de la concentración de ozono. ....	53
Figura 22. Puntos considerados en el balance de masa de los carbohidratos totales. ....	55
Figura 23. Balance de masa de carbohidratos a una concentración de ozono de 11.20 mg/L; mejor rendimiento (6.5 mg SST/mgO <sub>3</sub> ). ....	56
Figura 24. Balance de masa de carbohidratos a una concentración de ozono de 31.20 mg/L; mejor porcentaje de recuperación de biomasa (75.4%).....	57
Figura 25. Cromatograma de los azúcares fermentables obtenidos mediante de hidrólisis ácida de la biomasa microalgal, analizados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). ....	59
Figura 26. Graficas de medias de mínimos cuadrados para los factores con diferencia significativa. ....	61
Figura 27. Gráfica de superficie mediante la cosecha de centrifugación. ....	62
Figura 28. Gráfica de superficie mediante la cosecha de ozoflotación. ....	62

## Índice de Tablas

Tabla 1. Carbohidratos o almidón contenido en especies de microalgas verdes. .....	13
Tabla 2. Ventajas y limitaciones de los sistemas de producción de microalgas. .....	16
Tabla 3. Resumen de remoción de nutrientes y productividad de biomasa a partir de cultivos de microalgas. ....	18
Tabla 4. Factores que influyen en el cultivo de microalgas .....	20
Tabla 5. Comparación de los métodos de cosecha para las microalgas .....	22
Tabla 6. Estudios realizados para la cosecha de microalgas mediante ozoflotación .....	24
Tabla 7. Comparación de las condiciones óptimas en la hidrólisis ácida .....	28
Tabla 8. Productividad de etanol de diferentes materias primas .....	29
Tabla 9. Comparación de la concentración de biomasa y el rendimiento del bioetanol, mediante diferentes tipos de hidrólisis.....	30
Tabla 10. Métodos para la determinación de las propiedades fisicoquímicas del agua .....	35
Tabla 11. Caracterización agua residual del influente PTAR Cerro del Agua ....	36
Tabla 12. Remoción de nutrientes (cultivos 4 litros). ....	45
Tabla 13. Resultados de cosecha de biomasa microalgal mediante ozoflotación .....	52
Tabla 14. Análisis de varianza en la liberación de carbohidratos en el sobrenadante.....	54

Tabla 15. Resultados de cosecha de biomasa microalgal mediante ozoflotación para balance de masa de los carbohidratos totales .....	55
Tabla 16. Promedios de los resultados obtenidos en el diseño de experimentos. ....	60
Tabla 17. Análisis de varianza de las experimentaciones de hidrólisis.....	60
Tabla 18. Prueba de Tukey para la concentración de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	62
Tabla 19. Producción teórica de etanol a partir del hidrolizado de biomasa microalgal cosechada por centrifugación y ozoflotación .....	63
Tabla 20. Resultados finales para la fermentación del hidrolizado a partir de <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	65
Tabla 21. Producción máxima de etanol en las fermentaciones con <i>S. cerevisiae</i> .....	66
Tabla 22. Comparación de estudios para la producción de etanol mediante biomasa microalgal.....	67

## Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la generación de bioetanol utilizando biomasa microalgal cultivada en agua residual y cosechada por ozoflotación.

Para lograr el objetivo de este trabajo se adaptó la microalga *Scenedesmus obliquus* para su crecimiento en agua residual, se escalaron los cultivos hasta un volumen de 4 L, los cuales se estuvo monitoreando el contenido de nutrientes ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_3$ , ortofosfatos) en el agua residual y carbohidratos totales en la biomasa durante las fases de crecimiento de las microalgas. Se alcanzaron remociones del 97.91%, 80.00% y 93.10% de nitrógeno amoniacal, nitratos y ortofosfatos, respectivamente. Para el caso de los carbohidratos totales se tuvo un aumento de 14.41% a 31.07% debido a que la microalga entro en una fase de estrés al estar bajo deficiencia de nitrógeno amoniacal y bajo contenido de nitratos. Se obtuvo una productividad de biomasa y carbohidratos de  $21.39 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  y  $6.65 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  respectivamente.

Se cuantificó el contenido de glucosa en la biomasa cosechada por ozoflotación y centrifugación por medio de una hidrólisis acida y mediante un diseño experimental factorial de 3 factores. Los mejores resultados obtenidos fueron mediante la biomasa cosechada por centrifugación con un tiempo de 25 min. y una concentración de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 4% (v/v), en el cual se obtuvo un contenido de glucosa del 10.80 % en la biomasa seca y una concentración de glucosa en el hidrolizado de 5.40 g/L. Para el caso de la biomasa cosechada por ozoflotación se obtuvo un contenido de glucosa de 10.54% en la biomasa seca y una concentración de en el hidrolizado del 5.27 g/L, a un tiempo de 25 min. y una concentración de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 6% (v/v) (ver Tabla 16).

Se obtuvo bioetanol mediante la fermentación de los azúcares obtenidos a partir de la biomasa hidrolizada, obteniendo una concentración de etanol 1.8 g/L, con un rendimiento de 3.6% (g etanol/ g biomasa)

# Introducción

## 1. Introducción

Existe una problemática mundial debido a la creciente demanda energética, lo que conlleva al agotamiento de las fuentes de combustible fósiles, el incremento del precio del petróleo y la contaminación local del aire y global como efecto invernadero por la quema de combustibles fósiles. Esta situación demanda la búsqueda de fuentes alternativas de energía basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente y en algunos casos con la posibilidad de capturar el CO<sub>2</sub>.

Los biocombustibles producidos a partir de biomasa han despertado gran interés debido a que representan una reducida o nula emisión de gases con efecto invernadero, ya que el carbono que se libera durante su combustión, es capturado en su generación. Para su producción, algunas alternativas han planteado el uso de materias primas de cultivos como el raps (*Brassica napus*), maíz, soya y aceite de palma, que requieren de grandes extensiones de terreno fértil, situación que podría conllevar a crisis alimentarias ante la escasez de suelos cultivables.

En los últimos años se investiga el aprovechamiento de materias primas que no compitan con la producción de alimentos, como es el caso de las microalgas las cuales tienen un rendimiento de producción de aceite por unidad de área mayor que los cultivos de semillas oleaginosas (Wang, et al., 2009).

Los cultivos de microalgas a menudo implican el uso de agua dulce, fertilizantes (como nutrientes) y la inyección de CO<sub>2</sub> para el crecimiento, estos factores aumentan el costo de producción y reducen su atractivo como alternativa a los combustibles fósiles. Con el fin de hacer frente a estos problemas, el uso de agua residual puede ser utilizada como portadora de nutrientes, los cuales, al ser consumidos por las microalgas pueden mejorar la calidad del agua y producir biomasa para la generación de biocombustibles (Sacristán, et al., 2013; Demirbas, 2010).

El proceso de conversión de la biomasa a biocombustibles cae dentro de tres grandes categorías: química, biológica y termoquímica. El proceso más eficiente

puede ser la combinación de dos o más procesos y usar toda la composición de la biomasa para la producción de biocombustibles (Demirbas, 2010), por ejemplo, mediante los lípidos, producir biodiesel vía transesterificación y bioetanol a partir de los carbohidratos, vía hidrólisis y fermentación alcohólica, como una biorefinería (Singh & Gu, 2010).

La producción de biodiesel a partir de la biomasa microalgal atrae la mayor atención para la obtención de biocombustibles. Algunas especies de microalgas pueden tener gran contenido carbohidratos e incrementarse bajo condiciones específicas de cultivo (Dragone, et al., 2011). El uso de la biomasa microalgal rica en carbohidratos para la producción de bioetanol, tiene ciertas ventajas en comparación con los materiales lignocelulósicos ya que los carbohidratos de las microalgas se encuentran principalmente en forma de almidón y de celulosa (con la ausencia de lignina), por lo tanto son más fáciles de convertir a monosacáridos (Ho, et al., 2013 a).

En el presente estudio se evaluó la obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal (*Scenedesmus obliquus*) cultivada en agua residual y separada mediante ozoflotación. Durante el cultivo se llevó a cabo un monitoreo de la cantidad de nutrientes en el agua residual así como el contenido de carbohidratos totales en la biomasa, durante las fases de crecimiento, incluyendo la deficiencia de nitrógeno amoniacal, para determinar las condiciones de mayor productividad de biomasa y carbohidratos totales. La biomasa producida fue cosechada mediante el método de ozoflotación y procesada para la obtención de bioetanol mediante fermentación alcohólica.

# Objetivos

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Evaluar la generación de bioetanol utilizando biomasa microalgal cultivada en agua residual y cosechada mediante ozoflotación.

### 2.2. Objetivos específicos

- Adaptar la microalga *Scenedesmus obliquus* para su crecimiento en agua residual.
- Llevar a cabo el cultivo de *Scenedesmus obliquus* en agua residual a escala laboratorio determinando el contenido de nutrientes ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ , ortofosfatos) y de carbohidratos totales durante las fases de crecimiento.
- Determinar el potencial de generación de bioetanol cuantificando el contenido de azúcares fermentables en la biomasa cosechada por ozoflotación y centrifugación, respectivamente.
- Llevar a cabo la obtención de bioetanol mediante la fermentación de azúcares fermentables obtenidos a partir de la biomasa hidrolizada.

# **Marco Teórico**

### 3. Marco teórico

#### 3.1. Bioetanol como combustible alternativo

El rápido crecimiento de la población y el ascenso de los países en desarrollo, han dado lugar a un acelerado aumento de la demanda energética (Harun, et al., 2010). Alrededor del 80% de las necesidades energéticas provienen de combustibles fósiles. Con las tendencias actuales de consumo, las reservas de petróleo se están agotando (Nigam & Singh, 2011).

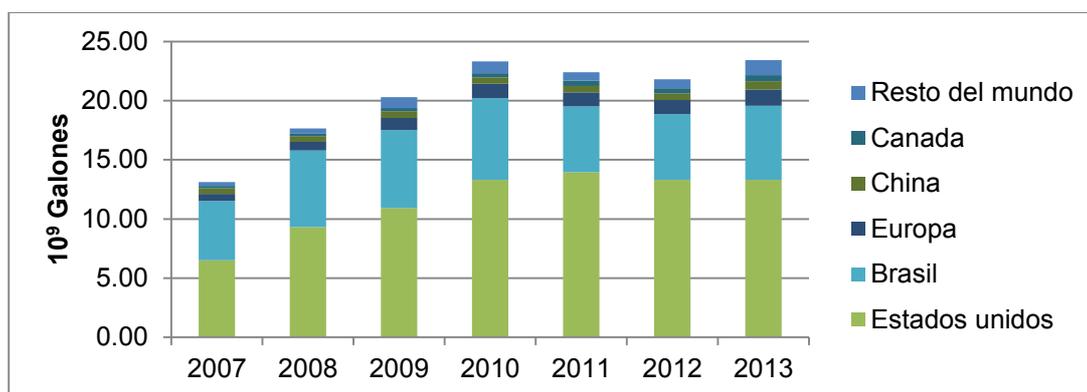
Los problemas ambientales ocasionados por la quema de combustibles fósiles, tales como el calentamiento global provocado por el aumento de las concentraciones de CO<sub>2</sub> en la atmósfera ha ocasionado la búsqueda y desarrollo de energías sostenibles (Chen, et al., 2013; Balat, et al., 2008).

Actualmente se está prestando atención a los biocombustibles, por ejemplo el bioetanol, el cual es uno de los principales candidatos para reemplazar una fracción de los combustibles producidos a partir del petróleo. Brasil lo utiliza en forma de mezcla con gasolina en distintas proporciones o en forma directa en motores especialmente diseñados para bioetanol (Macedo, et al., 2008).

El etanol presenta varias ventajas comparado con la gasolina: posee un mayor índice de octanos, un calor latente de vaporización superior, que se traduce en una mayor eficiencia energética en el motor. Como desventajas se tienen menor densidad de energía que la gasolina (34% menor que la energía de la gasolina), baja presión de vapor (dificultando el arranque en frío) y miscibilidad con el agua (Balat, et al., 2008).

Actualmente, la producción de bioetanol se ha mantenido en los últimos años (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Los dos mayores productores de bioetanol son Estados Unidos y Brasil, con el 57 y el 27% de la producción mundial de bioetanol, respectivamente, según datos de la Asociación de Combustibles Renovables (RFA, por sus siglas en Inglés). Estados Unidos y Brasil

producen el bioetanol, a partir del maíz y la caña de azúcar, mientras que Europa y China, utilizan cereales como materia prima (Morales, et al., 2015).



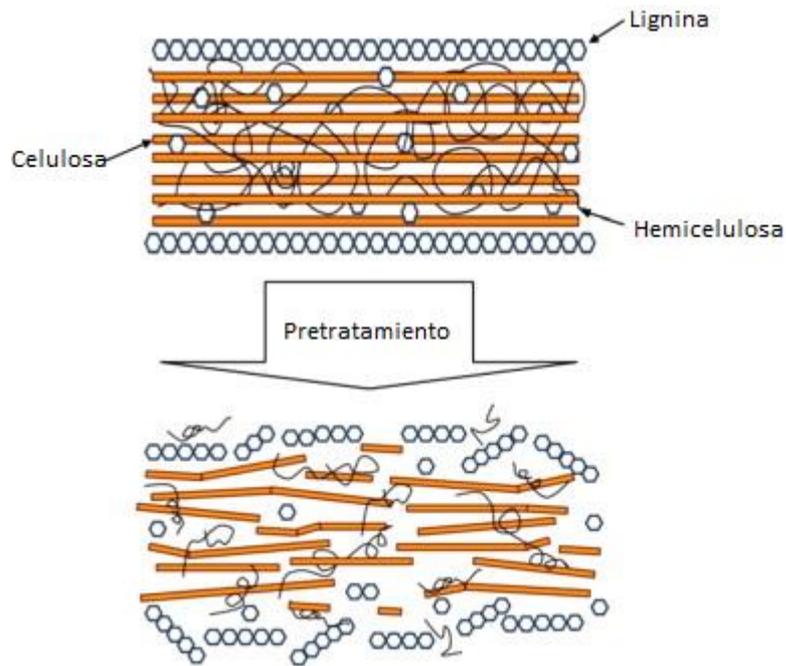
**Figura 1. Mayores productores de etanol en el mundo**

Los biocombustibles pueden ser clasificados de acuerdo a la materia prima utilizada y su tecnología de producción en biocombustibles de primera, segunda y tercera generación.

Los biocombustibles de **primera generación** se producen a partir de productos alimenticios (por ejemplo, el bioetanol producido a partir del maíz y caña de azúcar) los cuales son ricos en sacarosa y almidón, estos requieren de pocos tratamientos debido a que los carbohidratos (CHO's) que presentan no tienen una elevada complejidad y pueden ser fácilmente hidrolizables y por lo tanto fermentables. Sin embargo utilizar como materia prima productos ricos en sacarosa y almidón no es un proceso sustentable para la producción de combustibles ya que esta materia prima puede ser utilizada para la alimentación (humana y animal) y consume grandes cantidades de terreno y agua (Maity, et al., 2014; Sánchez & Cardona, 2008).

Los de **segunda generación** son producidos a partir de biomasa lignocelulósica, los cuales no son productos alimenticios, por ejemplo, el bioetanol producido a partir de la paja, la madera y la hierba, siendo materias primas de bajo costo. La biomasa lignocelulósica está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales son una fuente compleja de carbohidratos por lo que requiere de pre-tratamientos drásticos (hidrólisis ácida o alcalina) para la extracción de los

azúcares, antes de ser fermentada (Figura 2) (Demirbas, 2010; Mood, et al., 2013). La viabilidad de esta materia prima es a menudo limitada por el bajo rendimiento y el alto costo del proceso de hidrólisis con las tecnologías actuales (John, et al., 2011).



**Figura 2. Pre-tratamiento del material lignocelulósico**

Los de **tercera generación** no provienen de productos alimenticios y tienen un rápido crecimiento y alto contenido energético, por ejemplo, los pastos perennes, plantas de rápido crecimiento, algas verdes y cianobacterias (Demirbas, 2010; Maity, et al., 2014). Las microalgas forman parte las materias primas a partir de las cuales se pueden obtener biocombustibles de tercera generación.

Los principales inconvenientes de los biocombustibles de primera y segunda generación son en mayor medida vencidos por los biocombustibles de tercera generación, la ausencia de lignina en la biomasa microalgal simplifica el proceso de sacarificación (Harun, et al., 2010; John, et al., 2011).

### **3.2. Microalgas como alternativa para la generación de biocombustibles**

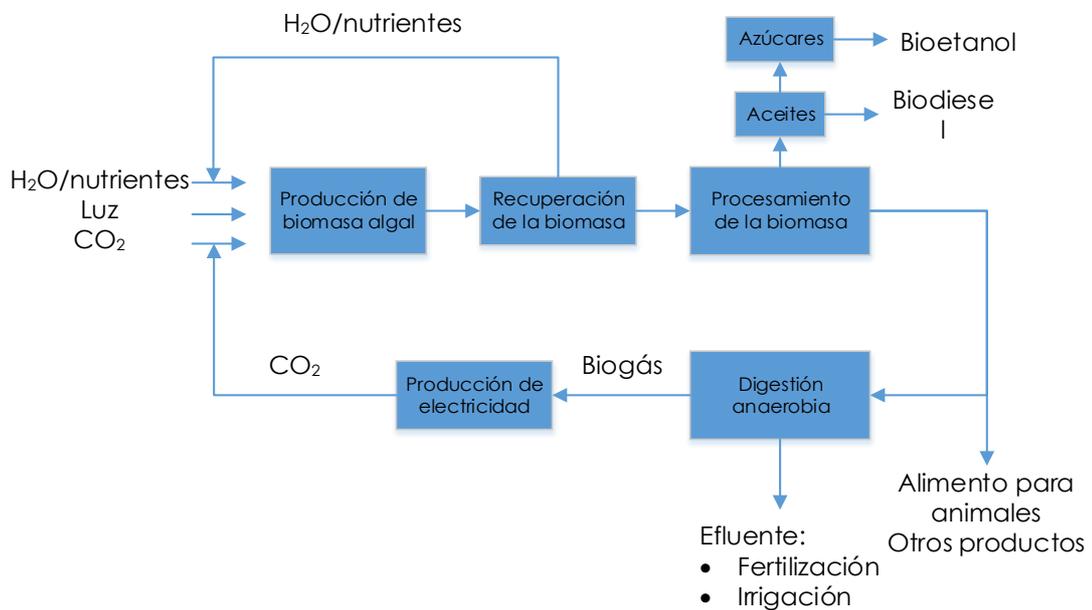
Las microalgas son un conjunto heterogéneo de organismos fotosintéticos unicelulares procariontes (cianobacterias) y eucariontes, que se localizan en diversos hábitats (aguas marinas, dulces, salobres y residuales), bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes. Se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta (Garibay, et al., 2009). Los principales componentes de las microalgas son los lípidos, carbohidratos y proteínas, cada uno de estos compuestos tiene una función dentro del metabolismo de la microalgas y pueden variar según las condiciones ambientales y nutrientes que hayan sido aplicadas en su cultivo (Band & Christine, 1999; Dragone, et al., 2011).

El uso de microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles tiene varias ventajas sobre los biocombustibles de primera y segunda generación. Las cuales se mencionan a continuación (Chen, et al., 2013; Demirbas, 2010; Chisti, 2007):

- Tienen una rápida tasa de crecimiento ya que pueden duplicar su biomasa en períodos tan cortos como 3.5 h.
- Las microalgas se pueden reproducir durante todo el año y tienen gran contenido de lípidos, los cuales superan en rendimiento a cultivos de semillas oleaginosas.
- La ausencia de lignina y bajo contenido de hemicelulosa, requiere de un menor pretratamiento para la producción de bioetanol.
- Captura eficientemente el CO<sub>2</sub> mitigando las emisiones de gases de efecto invernadero.
- No requieren de un suelo fértil para su cultivo.
- Pueden ser cultivadas en agua residual contribuyendo a la remoción de nutrientes (nitrógeno y fósforo).
- Tienen ciclos de cosecha muy cortos (1-10 días) en comparación de otras materias primas.
- No compiten con la producción de alimentos.

- Pueden obtenerse diversos biocombustibles (biodiesel y bioetanol) y subproductos de valor agregado (proteínas, pigmentos y biopolímeros).

El biodiesel producido a partir de microalgas atrae la mayor parte de la atención, debido al alto contenido de lípidos. Una estrategia para la producción de biocombustibles se centra en el concepto de biorefinería donde se pretende usar toda la composición de la microalga para mejorar la viabilidad económica generando subproductos de valor agregado (Singh & Gu, 2010). Por ejemplo, generar biodiesel a partir de los lípidos y bioetanol a partir de la biomasa resultante de la extracción de lípidos, la cual es rica en carbohidratos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** 3) (John, et al., 2011).



**Figura 3. Proceso conceptual para la producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal (modificado de Chisti, 2008).**

Algunos géneros de microalgas como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* y *Spirulina* are, son conocidos por su contenido particularmente alto de carbohidratos de más del 50% del peso seco en condiciones específicas del cultivo (Dragone, et al., 2011; Chen, et al., 2013), siendo éstas las mejores candidatas para la producción de bioetanol.

<b>Microalga</b>	<b>Contenido de carbohidratos o almidón (% peso seco)</b>
<i>Chlorella vulgaris</i>	37 (almidón)
<i>C. vulgaris</i> CCAP 211/11B	55
<i>C. vulgaris</i> P12	41 (almidón)
<i>C. vulgaris</i>	55 (almidón)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	60
<i>C. reinhardtii</i> IAM C-238	55 (almidón)
<i>Chlorococum</i> sp.	32.5
<i>Chlorococcum</i> sp. TISTR8583	26 (almidón)
<i>Scenedesmus acutiformis</i> TISTR 8495	16.4 (almidón)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	23.4 - 51.8
<i>Tetraselmis</i> sp.CS-362	26

Tabla 1.

<b>Microalga</b>	<b>Contenido de carbohidratos o almidón (% peso seco)</b>
<i>Chlorella vulgaris</i>	37 (almidón)
<i>C. vulgaris</i> CCAP 211/11B	55
<i>C. vulgaris</i> P12	41 (almidón)
<i>C. vulgaris</i>	55 (almidón)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	60
<i>C. reinhardtii</i> IAM C-238	55 (almidón)
<i>Chlorococum</i> sp.	32.5
<i>Chlorococcum</i> sp. TISTR8583	26 (almidón)
<i>Scenedesmus acutiformis</i> TISTR 8495	16.4 (almidón)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	23.4 - 51.8
<i>Tetraselmis</i> sp.CS-362	26

**Tabla 1. Carbohidratos o almidón contenido en especies de microalgas verdes (Chen, et al., 2013).**

### **3.3. Sistemas de producción de microalgas**

Las microalgas se pueden cultivar de manera fotoautótrofa, fotoheterótrofa, heterótrofa o en condiciones mixotróficas. La producción fotoautótrofa es el único método que resulta técnica y económicamente viable para la producción de microalgas a gran escala sin la producción de energía de por medio (Brennan & Owende, 2010). Los sistemas que existen son los basados en estanques abiertos y los fotobiorreactores cerrados, los cuales se describen a continuación.

#### **Sistemas abiertos**

Los sistemas empleados con mayor frecuencia en la producción comercial de biomasa microalgal son los de tipo abierto, que a pesar de sus formas y tamaños diversos, asemejan el entorno natural de las microalgas. Se pueden clasificar en aguas superficiales naturales (estanques, lagunas y lagos) y estanque artificiales o contenedores (Brennan & Owende, 2010). Los sistemas abiertos tipo circuito ("raceway ponds") son los más comúnmente utilizados en sistemas artificiales (Chisti, 2007) los cuales son circuitos cerrados, poco profundos (0.2 – 0.5m) donde el cultivo es recirculado y mezclado mediante un rodete con palas evitando la sedimentación (Figura 4).



**Figura 4. Producción de microalgas mediante sistemas abiertos tipo circuito (Creative Commons Texas A&M Agrilife)**

Las ventajas inherentes a los cultivos abiertos radican en su sencillez y su bajo costo de inversión en contraste con sistemas cerrados, la facilidad que ofrecen para su operación y mantenimiento. Las desventajas son debidas a las pérdidas de agua por evaporación, transferencia limitada de  $\text{CO}_2$  debido a su baja concentración en el aire, control limitado de condiciones de cultivo, penetración limitada de la luz y altos periodos de producción (Garibay, et al., 2009).

En contraste con los sistemas abiertos, tenemos a los cerrados que ofrecen varias ventajas, como perdidas mínimas de  $\text{CO}_2$  (si es que se aporta al sistema), control y reproducibilidad de las condiciones de cultivo, ahorro de agua y nutrientes, flexibilidad de diseño, periodos cortos de producción, y productividades considerablemente superiores (Garibay, et al., 2009).

### **Sistemas cerrados (Fotobiorreactores)**

La producción de microalgas mediante fotobiorreactores, son sistemas donde se busca solucionar los problemas asociados a los sistemas abiertos para la obtención del mayor crecimiento microalgal ya que reducen los riesgos de contaminación por otros microorganismos, aumentan la eficiencia en la utilización de luz, permiten controlar las condiciones del cultivo, con una mayor productividad de biomasa. Al

contrario de los sistemas abiertos estos tienen un elevado costo de construcción y operación (Brennan & Owende, 2010).

Existen varios tipos de fotobiorreactores, siendo los más comunes los tubulares, los de columna y los de tipo *flat-plate* (Figura 5).



**Figura 5. Fotobiorreactores: Flat-plate (A), Tubulares (B), Tipo columna (C)**

En la Tabla 2 se muestran las ventajas y limitaciones de los sistemas de producción de microalgas.

<b>Sistema de producción</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Limitaciones</b>
<i>Raceway ponds</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relativamente baratos</li> <li>• Fácil de limpiar</li> <li>• Uso de terreno no agrícola</li> <li>• Requieren poca energía</li> <li>• Fácil manutención</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja productividad de biomasa</li> <li>• Requiere de grandes áreas</li> <li>• Limitado a algunas especies de microalgas</li> <li>• reducida homogeneidad</li> <li>• Fácil contaminación de los cultivos</li> </ul>
<i>Fotobiorreactores tubular</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grande superficie de iluminación</li> <li>• Fácil control de las condiciones de crecimiento</li> <li>• Construcción relativamente barata</li> <li>• Buena productividad de biomasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento de algas en las paredes del reactor</li> <li>• Requiere grandes áreas</li> <li>• Formación de gradientes de pH, oxígeno disuelto y CO<sub>2</sub> a lo largo del tubo</li> </ul>
<i>Fotobiorreactores flat-plate</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altas productividades de biomasa fácil de esterilizar</li> <li>• Reducida acumulación de oxígeno</li> <li>• Fácil control de las condiciones de crecimiento</li> <li>• Buenas condiciones de iluminación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Difícil escalamiento</li> <li>• Difícil control de temperatura</li> <li>• Bajo nivel de stress hidrodinámico</li> </ul>
<i>Fotobiorreactores en columna</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compacto Elevada transferencia de masa</li> <li>• Bajos niveles de consumo de energía</li> <li>• Turbulencia elevada</li> <li>• Reducido estrés mecánico</li> <li>• Bajos niveles de foto-inhibición y foto-oxidación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducida área de iluminación</li> <li>• Construcción sofisticada y cara</li> </ul>

**Tabla 2. Ventajas y limitaciones de los sistemas de producción de microalgas.**

### 3.4. Cultivo de microalgas en agua residual

Los cultivos de microalgas a menudo implican el uso de agua dulce, fertilizantes (como nutrientes) y la inyección de CO<sub>2</sub> para el crecimiento, estos factores aumentan el costo de producción y reducen su atractivo como alternativa a los combustibles fósiles. Con el fin de hacer frente a estos problemas, el uso de las aguas residuales puede ser utilizado como una estrategia para minimizar los costos para el cultivo de microalgas y la generación de biocombustibles (Sacristán, et al., 2013; Ji, et al., 2015).

Las microalgas, mediante su metabolismo fotosintético, capturan la luz solar, captan dióxido de carbono y fijan nutrientes del medio para generar biomasa. Por lo tanto, pueden ser utilizadas para la remoción de fósforo y nitrógeno de las aguas residuales, que de otro modo, producirían la eutrofización en cuerpos de agua receptores, permitiendo el aprovechamiento de nutrientes remanentes como materia prima para la generación de biomasa y por lo tanto de combustibles (Christenson & Sims, 2011).

Dentro de los requerimientos químicos necesarios para un buen crecimiento de las microalgas se encuentra el balance entre los macronutrientes específicos y los micronutrientes. Los macronutrientes de mayor importancia se consideran el carbono, nitrógeno y fósforo. Con respecto a los micronutrientes son aquellos que se suministran en poca cantidad (trazas) en comparación con los anteriores. Entre estos se encuentran el sílice, calcio, magnesio, potasio, hierro, manganeso, azufre, zinc, cobre, y el cobalto; el suministro de estos micronutrientes rara vez limita el crecimiento de las algas cuando se utiliza agua residual (Romo, 2002; Christenson & Sims, 2011).

Existen varios estudios sobre la remoción de nutrientes en agua residual por medio de microalgas, se hizo una recopilación de algunos artículos los cuales se muestran en **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Agua residual	Agua residual	PT (%)	NT (%)	Productividad de biomasa (g/L/día)	Referencia
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Efluente secundario, doméstica	-	-	0.15	(Ruiz, et al., 2014)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Efluente secundario, doméstica	85	88	0.07	(Ji, et al., 2015)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Doméstica	>99	>99	0.04	(Zhang, et al., 2014)
<i>Scenedesmus acutus</i>	Doméstica	66.2	-	0.073	(Sacristán, et al., 2013)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Efluente secundario, doméstica	98	98.5	-	(Xin, et al., 2010)
Cultivos mixtos (Cianobacterias)	Doméstica	30.1	55.4	0.017	(Komolafe, et al., 2014)
<i>Desmodesmus</i>	Doméstica	38.7	80	0.013	(Komolafe, et al., 2014)
Cultivo mixto ( <i>Desmodesmus</i> )	Doméstica	60	83.9	0.017	

**Tabla 3. Resumen de remoción de nutrientes y productividad de biomasa a partir de cultivos de microalgas.**

El género *Scenedesmus*, se ha estudiado en el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales, destacando las provenientes de plantas de tratamiento convencionales, de origen industrial, urbano y las derivadas de excretas animales obteniendo gran eficiencia de remoción de nutrientes (nitrógeno y fósforo) por lo que se puede decir que *Scenedesmus* sp, tiene la capacidad y facilidad de adaptarse en diferentes composiciones de agua para su cultivo (Ruiz, et al., 2014; Ji, et al., 2013; Woertz, et al., 2009; Sacristán, et al., 2013).

### 3.5. Estrategias para la producción de metabolitos de interés

Existen diversas variables que influyen en el crecimiento y la acumulación de metabolitos en las microalgas. La Tabla 4 presenta los distintos factores que afectan mayormente los cultivos de microalgas y sus efectos e interacciones de estos microorganismos en general.

<b>Factor</b>	<b>Efecto e interacciones</b>
<i>Luz</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja intensidad de luz promueve el aumento de unidades fotosintéticas y por lo tanto el aumento de los pigmentos.</li> <li>• Una alta iluminación, los pigmentos disminuyen y bajo se produce gran cantidad de O<sub>2</sub> debido a la fotosíntesis puede producir un daño fotooxidativo en las células de las microalgas.</li> <li>• Exceso en la intensidad de luz puede llegar a un nivel de saturación que se manifiesta con una disminución en la fotosíntesis y se ve reflejado en una disminución de la tasa de crecimiento en la biomasa.</li> </ul>
<i>Nutrientes</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El CO<sub>2</sub> es la fuente de carbono más utilizada en cultivos de microalgas, estas pueden vivir bajo concentraciones altas de CO<sub>2</sub>.</li> <li>• La falta de nutrientes se manifiesta como un descenso en el crecimiento o hasta la detención del mismo.</li> <li>• La manipulación en la concentración de nitrógeno puede incrementar metabolitos de interés (lípidos y carbohidratos)</li> </ul>
<i>Temperatura</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor importante que afecta el crecimiento y desarrollo de los cultivos ya que disocian las moléculas de carbono haciéndola disponible para la fotosíntesis.</li> <li>• La temperatura óptima para el cultivo de microalgas ronda entre los 20 y 24 °C sin embargo puede variar dependiendo de</li> </ul>

	la especie de la microalga. Los cambios de temperatura pueden causar alteraciones en las rutas metabólicas.
<i>pH</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un alta o baja excesiva en el pH disminuye el crecimiento de la microalga por el rompimiento de muchos procesos celulares.</li> <li>• El rango de pH para la mayoría de los cultivos puede estar entre 7 y 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7.</li> <li>• El pH puede ser controlado mediante la adición de CO<sub>2</sub>.</li> <li>• El pH se incrementa con la edad del cultivo</li> </ul>
<i>Mezclado</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El mezclado asegura la distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo eliminando gradientes de luz, nutrimentos y temperatura.</li> <li>• Un mezclado vigoroso puede dañar la estructura celular de la microalga.</li> <li>• Un mezclado insuficiente puede provocará un mal suministro de los factores que influyen en el cultivo.</li> </ul>

**Tabla 4. Factores que influyen en el cultivo de microalgas (Malgas, 2013)**

### 3.5.1. Deficiencia de nutrientes

Al realizar un cultivo de microalgas, la manipulación de los nutrientes puede crear un ambiente de estrés en la microalga, induciendo la biosíntesis de productos de interés, como lípidos y carbohidratos. Varios estudios han demostrado que la composición celular de las microalgas puede verse afectada por la deficiencia de nutrientes (nitrógeno y fósforo) en el cultivo.

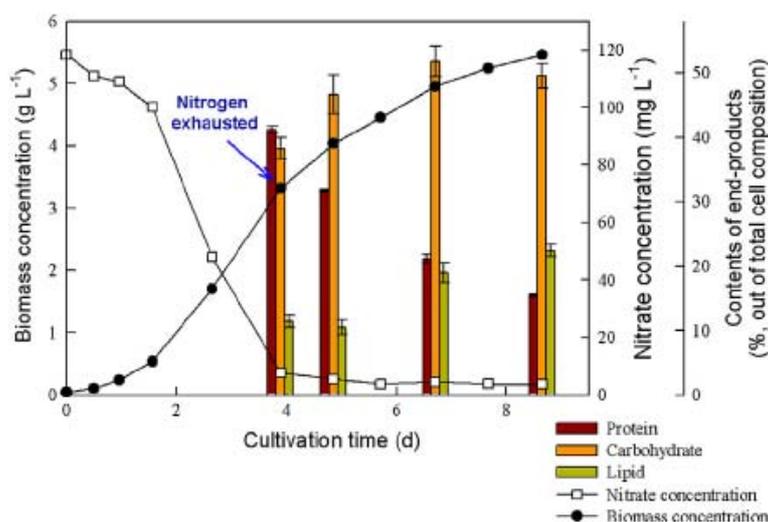
Una de las técnicas más importantes es la deficiencia de nitrógeno, la cual incrementa en gran medida el contenido de lípidos y carbohidratos, ya que bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno las proteínas y péptidos acumulados dentro de las células de las microalgas se pueden transformar en lípidos y carbohidratos (Pancha, et al., 2014; Ho, et al., 2012; Dragone, et al., 2011).

Existen diferentes estrategias de limitación de nitrógeno, como es la limitación total, concentraciones intermedias de nitrógeno, cultivo en dos etapas, donde primeramente se cultiva en condiciones ricas en nitrógeno y posteriormente se transfieren a un medio libre de nitrógeno (Chen, et al., 2011) y por último incrementar el tiempo de cultivo ya que las microalgas al consumir los nutrientes

del medio, provocan una inanición de nitrógeno en las microalgas (Ho, et al., 2013 a).

Ho (2012) observó en cultivos de *Scenedesmus obliquus* que durante el periodo de inanición de nitrógeno el contenido de proteínas disminuía de 41.2% a 15.43% mientras que el contenido de lípidos y carbohidratos incrementaba de 11.48% a 22.40% y 38.25% a 51.8% respectivamente (Figura 6) (Ho, et al., 2012).

Ho et al. (2013) investigaron el efecto de la deficiencia de nitrógeno en la acumulación de carbohidratos en *Chlorella vulgaris* FSP-E, realizando el cultivo y monitoreo del contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas. Alrededor del 5º día, el cultivo mostró baja concentración de nitrógeno. Durante este periodo de deficiencia de nitrógeno el contenido de proteína disminuye de 58.8% a 20.1% mientras que el contenido de carbohidratos incrementaba de 13.3% a 54.4% teniendo el máximo contenido de carbohidratos después de 3 días de que se presentó la deficiencia de nitrógeno, por lo que, desde el aspecto de la ingeniería es necesario explorar el tiempo óptimo del cultivo de microalgas bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno para lograr la mayor productividad de carbohidratos (Ho, et al., 2013 a).



**Figura 6. Concentración de nitratos, contenido de proteína, lípidos y carbohidratos durante el crecimiento de *S. obliquus* (Ho, et al., 2012).**

En el presente estudio se siguió la estrategia de prolongar el tiempo de cultivo después de alcanzar la remoción de nitrógeno y se cuantificó el contenido de carbohidratos presentes en la biomasa microalgal con respecto al tiempo del cultivo, con el fin de obtener la mayor productividad de carbohidratos.

### 3.6. Cosecha de microalgas mediante ozoflotación

La producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal se ha visto obstaculizada por la imposibilidad de encontrar un método eficaz y económicamente viable de cosechar grandes cantidades de microalgas. Se estima esta etapa representa entre el 20 y 30% del costo total de producción de la biomasa (Christenson & Sims, 2011).

Existen diferentes métodos para la separación de las microalgas entre los cuales destacan la floculación, la sedimentación, centrifugación, flotación y la ultrafiltración. En la Tabla 5. Comparación de los métodos de cosecha para las microalgas (Christenson & Sims, 2011)

<b>Método de cosecha</b>	<b>Conc. de sólidos después de la cosecha</b>	<b>Recuperación</b>	<b>Escala</b>	<b>Principales beneficios</b>	<b>Principales limitaciones</b>
<i>Centrifugación</i>	12-22%	>90%	Semi-piloto	Alta concentración de sólidos	Alto costo, alto consumo de energía
<i>Filtración tangencial</i>	5-27%	70-90%	Semi-piloto	Alta concentración de sólidos	ensuciamiento de la membrana, alto costo
<i>Sedimentación</i>	0.5-3%	10-90%	Piloto	Bajo costo	Lento
<i>Flotación</i>	3-6%	50-90%	Piloto	Probado a gran escala	Usualmente se requiere de floculantes

**Tabla 5. Comparación de los métodos de cosecha para las microalgas (Christenson & Sims, 2011)**

La ozonación es usada en el tratamiento del agua potable para lograr diferentes objetivos de tratamiento (Langlais, et al., 1991):

- Desinfección y control de algas
- Oxidación de contaminantes inorgánicos (hierro y magnesio)
- Oxidación de microcontaminantes inorgánicos (sabor, olor, pesticidas)
- Oxidación de macrocontaminantes orgánicos (color)
- Mejoramiento de la coagulación.

El proceso de ozoflotación combina fenómenos físicos como la flotación con las propiedades oxidativas del ozono para remover partículas suspendidas en el agua. La separación de las microalgas mediante ozoflotación ha sido poco explorada. Betzer et al. (1980) fue el primero en observar la separación de microalgas por ozoflotación a partir de un efluente de lagunas de oxidación, obteniendo como resultado una remoción del 98% de los sólidos suspendidos o algas, obtuvo un líquido incoloro y gran remoción de bacterias.

El ozono en su forma molecular ( $O_3$ ) oxida preferentemente dobles enlaces y anillos aromáticos. En las células de las microalgas provoca una lisis en la membrana liberando biopolímeros que tiene un efecto coagulante y reducen la tensión superficial, favoreciendo así la separación (Langlais, et al., 1991; Cheng, et al., 2011). Por otro lado, la ozoflotación puede funcionar como pre-tratamiento de la biomasa microalgal, mejorando la extracción lípidos para la producción de biodiesel (Velasquez-Orta, et al., 2014).

La flotación con ozono tiene la ventaja de no requerir de la adición de compuestos químicos como en el caso de la coagulación-floculación que puede ocasionar la contaminación de los productos precursores de biocombustibles (Velasquez-Orta, et al., 2014; Cheng, et al., 2011).

En la presente investigación se evalúa si el ozono puede mejorar el rendimiento de azúcares fermentables que se obtienen por hidrólisis ácida.

En la Tabla 6 se muestran estudios reportados sobre la cosecha de microalgas mediante ozoflotación.

<b>Tipo de agua</b>	<b>Microalga</b>	<b>SST (mg/L)</b>	<b>Turbiedad</b>	<b>Condiciones de ozoflotación</b>	<b>Dosis de ozono (mg/L)</b>	<b>Remoción</b>	<b>Referencias</b>
Efluente de un estanque	Cultivo mixto	300-480	-	Cge: 1.1 mgO <sub>3</sub> /L; Flujo de ozono: 2 L/min; Tiempo: 35 min	0.05 - 0.16	98% SST	(Betzer, et al., 1980)
Medio específico	<i>Chorella vulgaris</i>	-	1000	-	0.024 - 0.05	94% Turbiedad	(Cheng, et al., 2010)
Medio específico	<i>Scenedesmus obliquus</i> FSP-3	-	1000	Cge: 63-135 mgO <sub>3</sub> /L; Flujo de ozono: 0.6 L/min; Tiempo: 4min	0.2 - 0.52	95% Turbiedad	(Cheng, et al., 2011)
Agua residual de un lago artificial	Cultivo mixto	419	712.5	Cge: 45 mgO <sub>3</sub> /L; Flujo de ozono: 0.6 L/min; Tiempo: 5 min	0.23	79.6% SST; 97.8% turbiedad	(Velasquez-Orta, et al., 2014)
Agua residual	<i>Scenedesmus</i> sp.	758	-	Cge: 9.44 mgO <sub>3</sub> /L; Flujo de ozono: 0.6 L/min; Tiempo: 5 min	28.32	69.33% SST	(Rodríguez Muñiz, 2015)

**Tabla 6. Estudios realizados para la cosecha de microalgas mediante ozoflotación (Cge: concentración de gas a la entrada).**

### **3.7. Obtención de bioetanol a partir de las microalgas**

El bioetanol es un combustible líquido renovable y amigable con el ambiente. Se puede producir a partir de diversas materias primas, como el azúcar de caña o almidón (biocombustibles de primera generación) y de biomasa lignocelulósica (biocombustibles de segunda generación). Actualmente el etanol se produce principalmente a partir del azúcar y materias primas a base de almidón que son fácilmente fermentables y por lo tanto tienen una gran eficiencia de conversión a biocombustibles, como el azúcar de caña en Brasil, el maíz y la remolacha en Estados Unidos y la Unión Europea (Chen, et al., 2013; Sánchez & Cardona, 2008; Mood, et al., 2013). Sin embargo, como ya se me mencionó anteriormente, la producción de biocombustibles a partir de alimentos no es sostenible. En la actualidad existe un aumento en la población mundial, por lo que al utilizar alimentos y terrenos cultivables para la producción de biocombustibles, puede resultar en el aumento de los precios en los alimentos y provocar una escasez de los mismos (John, et al., 2011).

La producción a partir de biomasa microalgal requiere de varios pasos, incluyendo el pre-tratamiento, la sacarificación, la fermentación y la recuperación del producto (Harun & Danquah, 2011). El principal reto es liberar de manera eficiente los azúcares fermentables de las células de las microalgas.

Los carbohidratos de las microalgas se encuentran principalmente en la pared interna de la célula y en los polisacáridos atrapados dentro de la célula (Kim Hyoun, et al., 2014).

La obtención de bioetanol a partir de la fermentación de los carbohidratos, puede realizarse en una sola etapa o en etapas separadas. En una sola etapa, la hidrólisis y la fermentación ocurren en un solo paso, los azúcares fermentables obtenidos por hidrólisis enzimática se metabolizan inmediatamente por el microorganismo fermentador obteniendo como producto final el bioetanol. En etapas separadas, primero se realiza la hidrólisis y posteriormente el producto de dicha hidrólisis es fermentado en otra operación, la ventaja de este método es que se puede realizar tanto la hidrólisis como la fermentación en sus condiciones óptimas de operación pero en la hidrólisis química (ácida o alcalina), pueden producirse sustancias

tóxicas para el microorganismo fermentador (Briones & Gonzalo, 2012; John, et al., 2011).

### **3.7.1. Pre-tratamiento de la biomasa**

El pre-tratamiento es un paso crucial para liberar los azúcares fermentables de modo que la hidrólisis de los carbohidratos se pueda alcanzar más rápidamente y con mayor rendimiento. El pre-tratamiento puede ser físico (molienda) o termo-químico. El objetivo es exponer la mayor cantidad de los constituyentes de la célula para facilitar la hidrólisis de los carbohidratos (Harun, et al., 2011).

En el presente estudio se evaluará si la ozoflotación como método de cosecha, también puede funcionar como pre-tratamiento de la biomasa debido a que es un oxidante fuerte que actúa sobre la membrana de las microalgas provocándoles la lisis celular, haciendo disponibles los metabolitos para posteriores procesos, la cual podría facilitar la liberación de azúcares fermentables de la biomasa mejorando su rendimiento.

### **3.7.2. Hidrólisis**

El almidón en los cloroplastos, la celulosa en la pared de las células, no son fácilmente fermentables, por lo que estos polisacáridos presentes en la biomasa de las microalgas deben ser hidrolizados para obtener azúcares fermentables. La hidrólisis química (ácida y alcalina) o enzimática son métodos comúnmente usados para este propósito. La hidrólisis ácida es rápida, fácil de aplicar y más barata que otros tipos de hidrólisis, aunque las condiciones ácidas pueden conducir a la descomposición de los azúcares en compuestos no deseados que pueden inhibir el proceso de fermentación (Miranda, et al., 2012). En contraste, la hidrólisis enzimática es un proceso más lento y más costoso, pero amigable con el ambiente y que permite obtener altos rendimientos de glucosa sin producir productos inhibitorios (Ho, et al., 2013 a).

La hidrólisis ácida proporciona una mayor eficiencia en la conversión de materiales celulósicos en azúcares fermentables (Harun & Danquah, 2011; Ho, et al., 2013 a). La mayoría de los estudios se centran en optimizar este proceso debido a que es

un paso fundamental para la producción de bioetanol. Se necesitan contrarlar diversos factores para evitar la formación de sustancias inhibitorias como los furfurales y compuestos fenólicos (Miranda, et al., 2012). Los factores que influyen en la liberación de azúcares fermentables mediante la hidrólisis ácida son: el tiempo del proceso, la temperatura, la cantidad de biomasa y la concentración del ácido (Harun & Danquah, 2011) (Ho, et al., 2013 a).

El aumento de temperatura mejora la extracción de los azúcares debido a que produce celulosa altamente digerible pero si se incrementa demasiado puede disminuir significativamente la cantidad de azúcares reductores liberados. Por otra parte, concentraciones demasiado altas de ácido pueden producir menor cantidad de azúcares en el hidrolizado, debido a que los azúcares pueden degradarse y a su vez formar sustancias tóxicas como los ácidos acético y fórmico, hidroximetilfurfural y furfural los cuales tienen efectos perjudiciales sobre el proceso de fermentación. Grandes cargas de biomasa reducen el desempeño de la hidrólisis ya que pueden conducir a una menor exposición o contacto de la biomasa con los reactivos utilizados en la hidrólisis (Harun & Danquah, 2011; Miranda, et al., 2012).

En estudios realizados por Miranda et al. (2012), comparan diferentes métodos de ruptura celular y extracción de azúcares de la especie *Scenedesmus obliquus*, tanto físicos (homogeneización, sonicación, temperatura a 120 °C) como fisicoquímicos (hidrólisis ácida y alcalina), concluyendo que el mejor método fue la hidrólisis ácida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y que *Scenedesmus obliquus* es una buena fuente de carbohidratos para la producción de bioetanol.

Por otro lado, Ho et al. (2013) compararon la hidrólisis enzimática y ácida, determinando que la hidrólisis ácida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es la más eficaz para la sacarificación de la biomasa de *Chlorella vulgaris*, logrando un rendimiento de glucosa de 93.6% a partir de los carbohidratos de la microalga.

La Tabla 7 muestra condiciones óptimas reportadas en diversos estudios para la obtención de azúcares reductores mediante la hidrólisis ácida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Microalga	Conc. de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% v/v)	Carga de biomasa (g/L)	Temp. (°C)	Tiempo (min)	Azúcares extraídos (% base seca)	Referencia
<i>Chlorococcum humicola</i>	3	10	160	15	N. D.	(Harun & Danquah, 2011)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	5.36	50	120	30	28.6	(Miranda, et al., 2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	1	50	121	20	46.1	(Ho, et al., 2013 a)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	2	60	121	20	51.8	(Ho, et al., 2013 b)

**Tabla 7. Comparación de las condiciones óptimas en la hidrólisis ácida**

En el presente tesis se emplea la hidrólisis ácida y se evaluó la concentración de ácido, el tiempo de hidrólisis y el tipo de cosecha (centrifugación y ozoflotación), para obtener el mayor rendimiento de azúcares fermentables.

### 3.7.3. Fermentación

La alta productividad de las microalgas y la capacidad de algunas especies de acumular altos niveles de azúcares, hace que este tipo de biomasa sea atractiva como materia prima para la producción de bioetanol ya que pueden alcanzar un rendimiento de etanol de 140,290L/ha (Tabla 8) (Mussatto, et al., 2010)

<b>Materia prima</b>	<b>Rendimiento de etanol (L/ha)</b>
Rastrojo de maíz	1 050 - 1 400
Trigo	2 590
Yuca	3 310
Sorgo dulce	3 050 - 4 070
Maíz	3 460 - 4 020
Remolacha azucarera	5 010 - 6 680
Caña de azúcar	6 190 - 7 500
Microalgas	46 760 - 140 290

**Tabla 8. Productividad de etanol de diferentes materias primas (los valores de las microalgas se calculan a partir del contenido de azúcares) (Mussatto, et al., 2010)**

Una vez obtenido el hidrolizado este debe ser fermentado para obtener el bioetanol. La fermentación produce CO<sub>2</sub> el cual puede ser recuperado e incorporado al sistema de cultivo de microalgas como fuente de carbono (Chen, et al., 2013)

La mayoría de las fermentaciones alcohólicas que se llevan a cabo a escala comercial se realiza mediante la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Ho et al. (2013) obtuvieron bioetanol a partir del hidrolizado ácido de *Scenedesmus obliquus* utilizando *Zymomonas mobilis* como microorganismo fermentador. Después de 4 horas de fermentación encontraron una concentración de etanol de 8.55 g/L con un rendimiento de 0.213 g etanol/g de biomasa. La hidrólisis ácida no mostro inhibición significativa en la fermentación alcohólica debido a compuestos tóxicos, por lo que recomienda como un método viable para la producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal (Ho, et al., 2013 b).

La tabla 9 muestra un resumen comparativo de estudios recientes para la producción de etanol a partir de biomasa microalgal. Cabe señalar que a la fecha no se ha reportado la obtención de bioetanol a partir de microalgas cosechadas mediante ozoflotación.

<b>Hidrólisis</b>	<b>Fuente de la hidrólisis</b>	<b>Tipo de hidrólisis y fermentación</b>	<b>Biomasa Microalgal</b>	<b>Biomasa microalgal (g/L)</b>	<b>Contenido de Glucosa (g/L)</b>	<b>Contenido de Etanol (g/L)</b>	<b>Rendimiento (g etanol/g alga)</b>	<b>Referencia</b>
Termo-química	Ácido sulfúrico	Separadas	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	50	28.5	14.6	0.292	(Nguyen, et al., 2009)
Enzimática	Celulosa + Amilasa	Simultaneas	<i>Chlorella vulgaris</i>	20	N.D.	4.27	0.214	(Ho, et al., 2013 a)
Química	Ácido sulfúrico	Separadas	<i>Chlorella vulgaris</i>	50	23.6	11.66	0.233	(Ho, et al., 2013 a)
Química	Ácido sulfúrico	Separada	<i>Scenedesmus obliquus</i>	N.D.		8.55	0.213	(Ho, et al., 2013 b)
Enzimática	Amilasa	Separadas	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	N.D.	N.D.	N.D.	0.235	(Choi, et al., 2010)

**Tabla 9. Comparación de la concentración de biomasa y el rendimiento del bioetanol, mediante diferentes tipos de hidrólisis (N.D. no disponible)**

# Metodología

## 4. Metodología

El desarrollo del proyecto se llevó a cabo en los laboratorios de Ingeniería Ambiental (LIA) del Instituto de Ingeniería de la UNAM y se desarrolló en dos etapas principales las cuales se describen a continuación.

### 4.1. Etapa 1.

La Figura 7 muestra el esquema con los pasos que se siguieron.

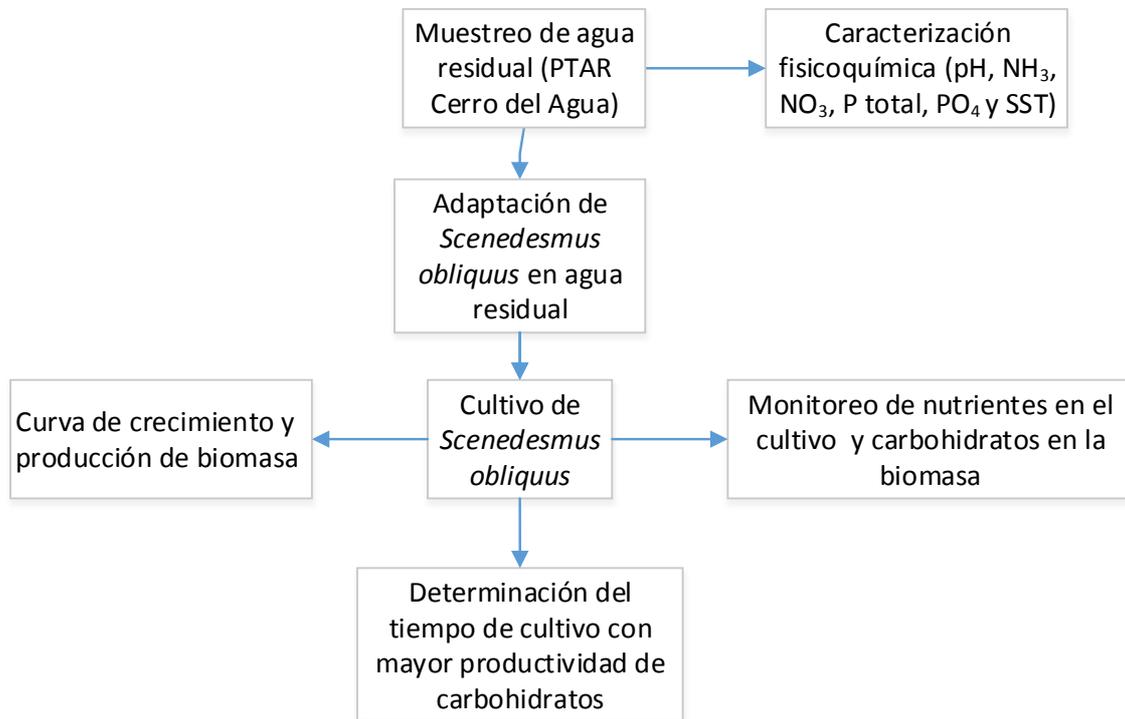


Figura 7. Etapa 1 de la experimentación

#### 4.1.1. Caracterización del agua residual

Para el cultivo de microalgas se utilizó agua residual doméstica (influyente) proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) Cerro del Agua, ubicada en Ciudad Universitaria (UNAM). Antes de su uso fue filtrada utilizando un filtro Wathman 40 de 8  $\mu\text{m}$  de fibra de vidrio para realizar los cultivos.

Se realizó la caracterización del agua residual doméstica evaluando el contenido de nitrógeno total, nitrógeno amoniacal, nitratos y ortofosfatos durante el periodo de cultivo de la microalga.

#### **4.1.2. Adaptación de *Scenedesmus obliquus* en agua residual doméstica**

La microalga *Scenedesmus obliquus* utilizada en este estudio fue donada por la Escuela de Ciencias Biológicas del IPN. El cultivo puro fue adaptado para su crecimiento en agua residual realizando diversos cultivos en tubos de ensayo empleando el influente de la planta de tratamiento de aguas residuales Cerro del Agua de Ciudad Universitaria (CU). La adaptación consistió en ir agregando semanalmente agua residual en una proporción de 3:1 de inóculo/agua residual respectivamente, con iluminación natural y agitación manual esporádica en tubos de ensayo.

Una vez adaptada la microalga al agua residual, los cultivos fueron escalados progresivamente hasta alcanzar un volumen de 4 L. El escalamiento consistió en ir aumentando el volumen de los cultivos una vez que alcanzaban la fase estacionaria con una proporción de 1:1 de inóculo/agua residual respectivamente. Los cultivos eran mantenidos con agitación magnética e iluminación artificial mediante 2 lámparas LED de 18 watts y una luminosidad de 1850 lúmenes con un periodo de iluminación de 12 h de luz y 12 h oscuridad.

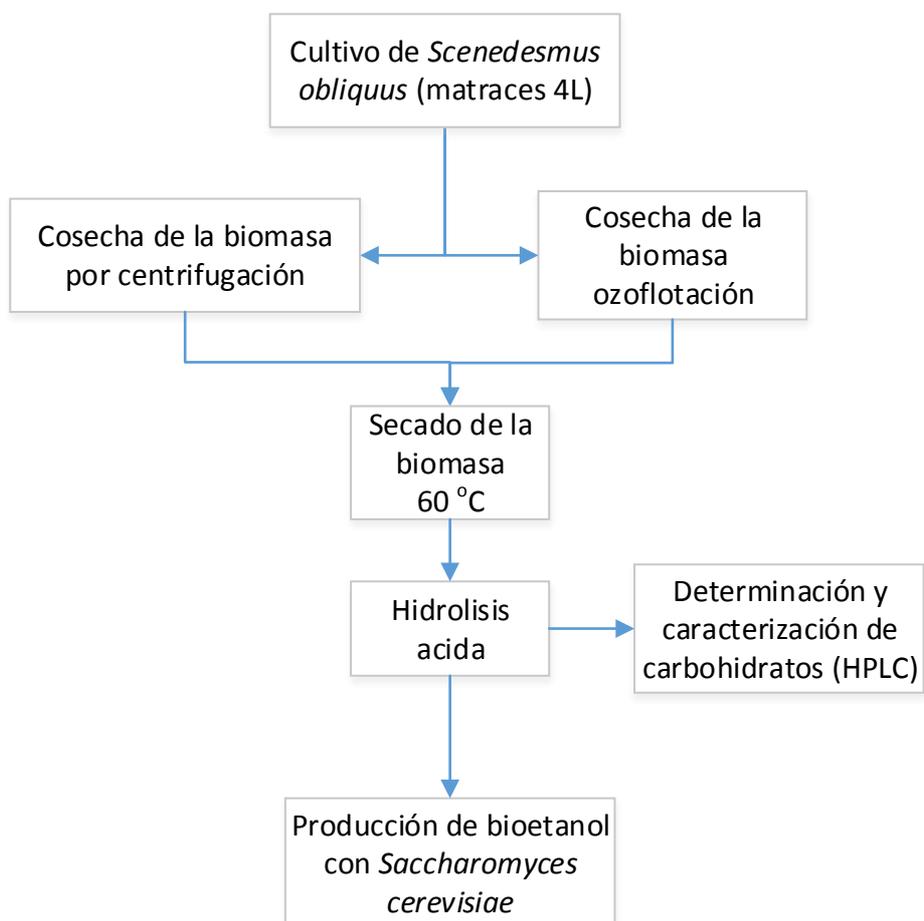
#### **4.1.3. Cultivo de *Scenedesmus obliquus* en agua residual**

Se realizó el cultivo de *Scenedesmus obliquus* en volúmenes de 4 L con una proporción de 1:1 de inóculo/agua residual respectivamente y eran mantenidos como se describe en la sección 4.1.2.

Se realizaban muestreos con la finalidad de evaluar la remoción de nutrientes ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$ ) y la cantidad de carbohidratos totales en la biomasa durante las diferentes etapas de crecimiento de las microalgas para determinar la mayor productividad de biomasa así como de carbohidratos totales. También se llevó a cabo el monitoreo de SST, pH y oxígeno disuelto para evaluar el crecimiento de la microalga. La experimentación se realizó por duplicado.

## 4.2. Etapa 2

La Figura 8 muestra el esquema de los pasos que se siguieron en esta etapa.



**Figura 8. Etapa 2 de la experimentación**

Se realizó el cultivo de *Scenedesmus obliquus* en volúmenes de 4 L en agua residual y se procedió a cosechar la biomasa mediante centrifugación y ozoflotación, respectivamente. La biomasa así obtenida fue sometida a una hidrólisis ácida evaluando las condiciones de tratamiento mediante un diseño experimental factorial con el propósito de mejorar el rendimiento en la obtención de azúcares fermentables, los cuales fueron medidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Una vez obtenidos los resultados del diseño experimental, se realizaron ensayos de fermentación por medio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de bioetanol.

### 4.3. Métodos analíticos

#### 4.3.1. Propiedades fisicoquímicas del agua

Los parámetros y métodos analíticos utilizados para la determinación de las propiedades fisicoquímicas del agua se enlistan en la Tabla 10.

<b>Parámetro fisicoquímico</b>	<b>Método</b>
<i>Nitrógeno total</i>	Kjeldahl (APHA-AWWA-WPCF, 2005) 4500-N
<i>Nitrógeno amoniacal</i>	Titulométrico (APHA-AWWA-WPCF, 2005) 4500-NH <sub>3</sub>
<i>Nitratos</i>	Reducción de cadmio (HACH) 8039
<i>Ortofosfatos</i>	Ácido ascórbico (HACH) 8048
<i>Sólidos suspendidos totales</i>	Sólidos totales en suspensión secados a 103-105 °C (APHA-AWWA-WPCF, 2005) 2540D
<i>Oxígeno disuelto</i>	Electrodo de membrana 4500-O
<i>pH</i>	Electrodo 4500-H B

**Tabla 10. Métodos para la determinación de las propiedades fisicoquímicas del agua**

Se estuvo monitoreando el contenido de nutrientes (nitrógeno total, nitrógeno amoniacal, nitritos, nitratos y ortofosfatos), durante la primera etapa del estudio en el periodo de muestreo que comprendió del 1 agosto del 2014 al 10 noviembre del 2014. En la Tabla 11; **Error! No se encuentra el origen de la**

**referencia.** se encuentra el resumen de esta caracterización. Lo anterior se realizó con el fin de llevar un control de las características del agua residual utilizada como medio de cultivo de las microalgas.

<b>Influente PTAR Cerro del Agua CU-UNAM</b>		
<b>Parámetro</b>	<b>Max.</b>	<b>Min.</b>
NTK (mg/L)	123.50	39.50
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	105.06	32.32
Nitratos (mg/L)	40.00	21.00
Ortofosfatos (mg/L)	10.41	9.00
pH	8.70	7.56

**Tabla 11. Caracterización agua residual del influente PTAR Cerro del Agua**

El contenido de nutrientes en el influente de la PTAR Cerro del agua presentó gran variabilidad durante el intervalo de las fechas del muestreo. El alto contenido de nitratos presentes en el agua residual es indicativo que puede haber algún tipo de estancamiento del agua, debido a que la planta no se encontraba en funcionamiento durante los meses de octubre y noviembre.

#### **4.3.2. Determinación del crecimiento microalgal**

El crecimiento de microalgas se realizó mediante la medición de densidad óptica (absorbancia) a 680 nm con ayuda de un espectrofotómetro (HACH 3900) y mediante gravimetría por el contenido de sólidos suspendidos totales (SST).

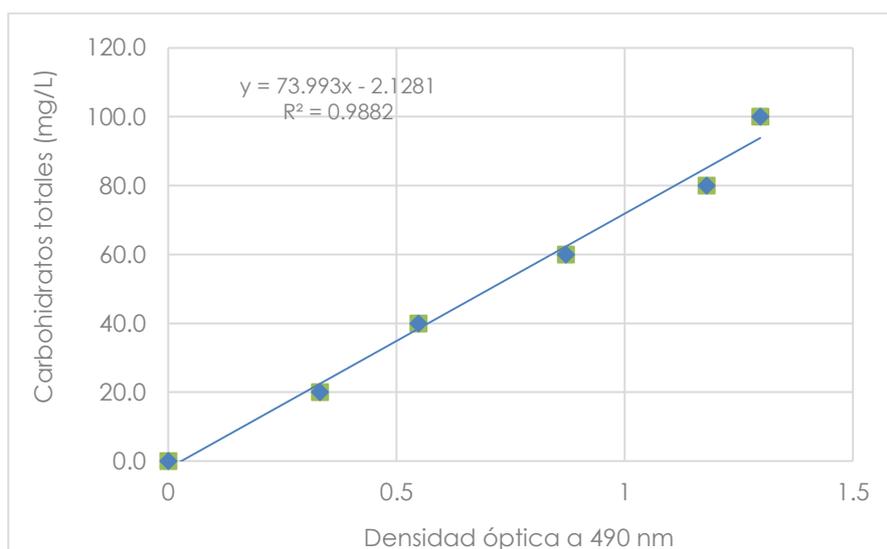
#### **4.3.3. Determinación de carbohidratos totales por el método fenol – ácido sulfúrico**

La determinación de azúcares totales se realizó por el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico (Dubois, et al., 1956). Un método rápido y simple para determinar el contenido total de carbohidratos, el cual detecta prácticamente

todas las clases de carbohidratos. El ácido sulfúrico concentrado hidroliza los polisacárido, oligosacárido y disacárido, para transformarlos en monosacáridos. Las pentosas son deshidratadas a furfurales y las hexosas a hidroximetil furfural. Estos compuestos reaccionan con el fenol para producir un color amarillo-oro (Nielsen, 2015).

Para el análisis se utilizó una solución de fenol al 5% y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado al 98%. En tubos de ensayos con tapa roscada se adicionaron respectivamente y en el orden siguiente: 1 mL de muestra problema, 1 mL de fenol al 5%, y 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, aplicando un mezclado suave para homogenizar la mezcla. Se dejaron los tubos en reposo durante 10 minutos y luego se colocaron en un baño con agua fría durante 15 minutos. Finalmente, se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro HACH (DR 3900) a una longitud de onda de 490 nm.

Para obtener la concentración de carbohidratos totales fue necesario la construcción de una curva de calibración. A partir de una solución de glucosa de concentración conocida (100 mg/L) se prepararon las respectivas diluciones para definir los puntos de la curva (20, 40, 60, 80 y 100 mg/L) y se trataron de acuerdo al procedimiento previamente descrito.



**Figura 9. Curva de calibración para carbohidratos totales**

La curva de calibración resultante para la cuantificación de glucosa se muestra en la Figura 9; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Se puede observar que los puntos se aproximan a una recta con un coeficiente de correlación de 0.9882, con la siguiente ecuación  $y=73.993x-2.1281$  ( $y$ =carbohidratos totales,  $x$ =absorbancia).

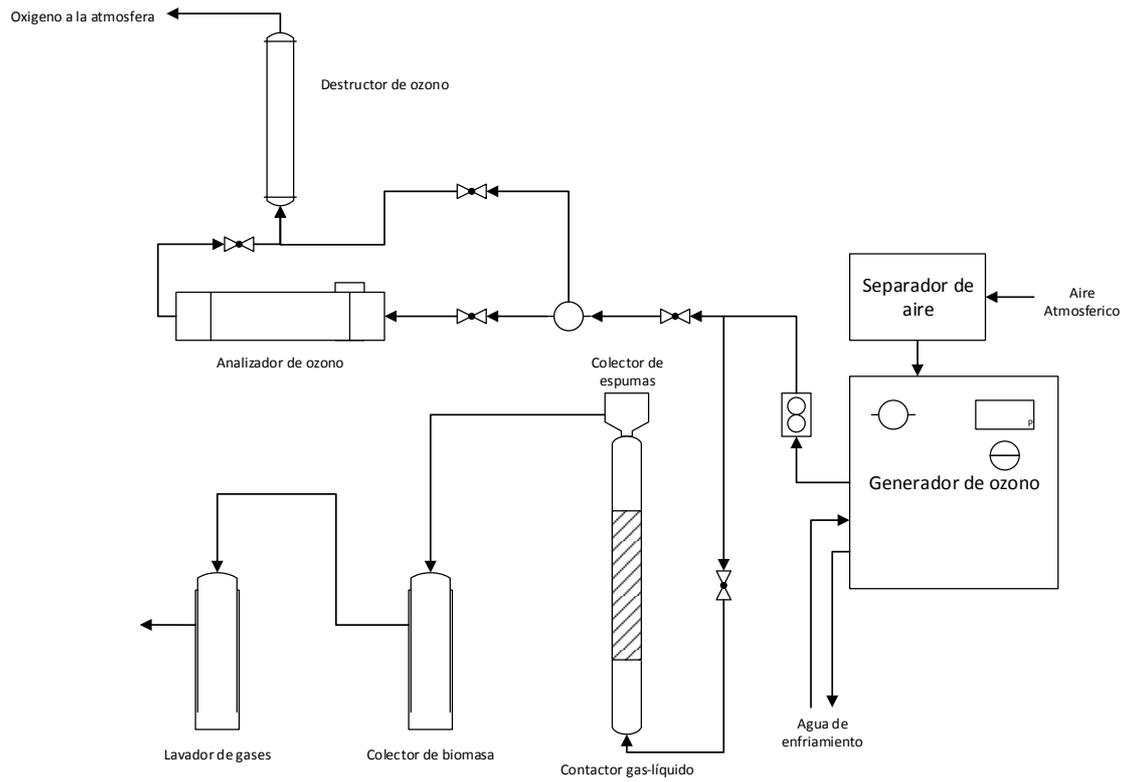
#### **4.3.4. Cosecha de la biomasa**

La cosecha mediante centrifugación se realizó a 7,000 rpm por 8 minutos (Miranda, et al., 2012). La biomasa recuperada fue secada a 60°C hasta obtener peso constante para posteriores análisis.

Las condiciones de cosecha mediante ozoflotación fueron establecidas tomando en cuenta lo reportado por Rodríguez (2015). Las pruebas fueron realizadas en un reactor espumador por lote utilizando un volumen de trabajo de 1L, un flujo de gas ozono de 0.6 L/min y concentraciones de 10, 20, 30 mgO<sub>3</sub>/L, respectivamente. Las pruebas fueron realizadas por triplicado, determinando las mejores condiciones de cosecha de biomasa microalgal.

El arreglo experimental utilizado para llevar a cabo la ozoflotación se muestra en la Figura 10 el cual está conformado por un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA) con capacidad de producción de 1.9 gO<sub>3</sub>/h, utiliza aire enriquecido con oxígeno como gas de alimentación abastecido por un separador de aire (Airsep modelo AS-12, USA), un reactor tipo espumador, un analizador de ozono gas (Teledyne Instruments, USA) y una unidad de destrucción catalítica de ozono (Ozone & Control Systems INC, USA).

El reactor tipo espumador cuenta con un colector de espuma y biomasa microalgal en la parte superior el cual se conecta a un sistema de lavadores de gases para coleccionar el excedente de biomasa y capturar el ozono contenido en la corriente de gas agotado. El segundo lavador de gases contiene una solución de KI (2%) para capturar y cuantificar por el método yodométrico (Birsall, et al., 1952) el ozono que sale del sistema sin reaccionar.



**Figura 10. Arreglo experimental para el sistema de ozoflotación**



**Figura 11. Experimento de la cosecha de biomasa por ozoflotación**

#### **4.3.5. Hidrólisis ácida de la biomasa microalgal**

La hidrólisis ácida se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Miranda et al. (2012). Se utilizó un diseño experimental factorial de tres factores completamente al azar, el primer factor fue la concentración  $H_2SO_4$  con tres niveles (2, 4 y 6% v/v), el segundo factor fue el tipo de cosecha con dos niveles (centrifugación y ozoflotación) y el tercer factor fue el tiempo de hidrólisis con dos factores (15 y 25 min), la concentración de biomasa y la temperatura no se varió y fue de 50 g/L y 120 °C por medio de una autoclave, la variable de respuesta fue el contenido de glucosa en el hidrolizado, cuantificada por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Ver 4.3.6).

#### **4.3.6. Identificación y cuantificación de azúcares y etanol por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

La identificación y cuantificación de azúcares presentes en el hidrolizado de la biomasa microalgal fueron realizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), equipado con un detector de índice de refracción WATERS 2414 (16X, 40 °C) y absorbancia WATERS 2487, con un horno WATERS para la columna, se utilizó una columna Bio Rad Aminex HPX-87H, 300 x 7.8 mm, y como fase móvil una solución de ácido sulfúrico 5 mM con un flujo 0.60 ml/min y una Temperatura de 50 °C, con un volumen de inyección de 20  $\mu$ L.

Se realizaron curvas de calibración para los compuestos a analizar (glucosa, etanol y ácido acético), usadas como patrones en concentraciones que van de 0 a 10 g/L.

#### **4.3.7. Fermentación alcohólica**

Se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial, esta fue mantenida en placas de agar preparadas con 200 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de levadura, 5g/L de peptona, 1 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ , 2 g/L de  $KH_2PO_4$ , 0.5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y 0.5 g/L de  $FeSO_4$ . El medio de cultivo fue esterilizado a 121 °C por 15 min (Cazetta, et al., 2007), se hacían resiembras cada 20 días.

La fermentación para la obtención de etanol a partir de biomasa microalgal se realizó en dos etapas. Primero se realizó la hidrólisis ácida y una vez extraídos los azúcares fermentables se realizó la fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica se llevó a cabo en matraces de 100 ml con un volumen de 20 ml del hidrolizado microalgal (Ver 4.3.5), en condiciones microaerobias a una temperatura constante de 30°C, con agitación de 100 rpm y un pH inicial de 6. La levadura fue inoculada con una concentración inicial aproximada de 0.7 g/L de hidrolizado. Se realizó un experimento control, con el fin de comparar la producción de etanol utilizando glucosa como sustrato. Al final de la fermentación se determinó la concentración de etanol por HPLC (ver 4.3.6.)

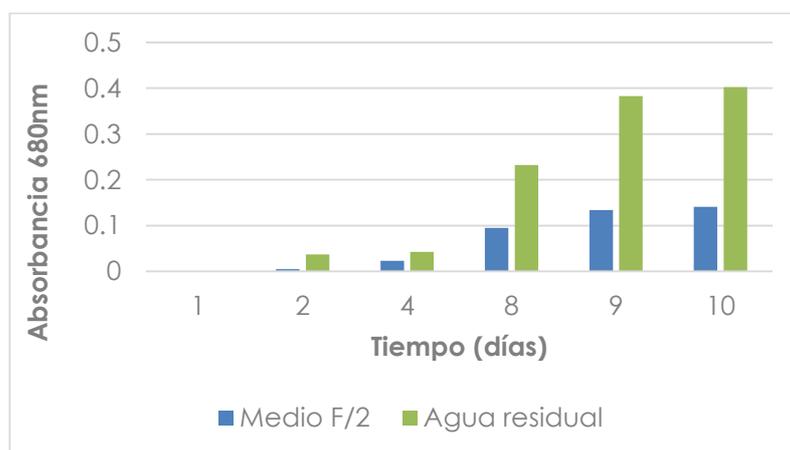
# **Resultados y discusión**

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Adaptación de *Scenedesmus obliquus* en agua residual

Después de cuatro semanas de adaptación se realizó un experimento comparando el crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* en agua residual y en medio de cultivo f/2 de Guillard, con una relación inóculo/medio de cultivo o agua residual 1:1 en tubos de ensayo.

Para dar seguimiento al crecimiento y adaptación de dicha microalga se monitoreo el contenido de biomasa por medio de la densidad óptica a 680 nm, en la Figura 12 se muestra los resultados obtenidos.



**Figura 12. Crecimiento de *Scenedesmus obliquus* en agua residual y medio F/2.**

En la Figura 12 se puede observar que *Scenedesmus obliquus* mostró una mayor densidad celular cuando se cultivó en agua residual doméstica comparado con la obtenida en el medio de cultivo F/2. Estos resultados indican que dicha microalga presenta gran adaptabilidad al agua residual, lo cual es consistente con lo reportado por varios autores en la bibliografía, quienes destacan la facilidad de esta especie para adaptarse y crecer en diferentes tipos de aguas residuales (Ruiz, et al., 2014; Ji, et al., 2013; Woertz, et al., 2009; Sacristán, et al., 2013). Por lo que el agua residual utilizada como medio de cultivo resultó ser la adecuada para este estudio.

## 5.2. Cultivo de *Scenedesmus obliquus* en agua residual

El cultivo de *Scenedesmus obliquus* se llevó a cabo utilizando una relación 1:1 de inóculo/agua residual. Se mantuvo con iluminación natural y artificial, con agitación magnética y se determinó la densidad celular a través de la densidad óptica a 680 nm. Se inició con volúmenes de cultivo de 250 ml y se fue incrementando hasta llegar a volúmenes de cultivos de 4L (Figura 13); se incrementaba el volumen cuando el cultivo alcanzaba su fase estacionaria.



**Figura 13. Cultivos a 4 litros de *Scenedesmus obliquus* a temperatura ambiente y con un periodo de iluminación de 12 h de luz y 12 h oscuridad.**

### 5.2.1. Remoción de nutrientes durante el crecimiento de *Scenedesmus obliquus*.

Una vez alcanzado el volumen necesario, se realizó el cultivo de *Scenedesmus obliquus* durante los meses de junio a agosto en volúmenes de 4 L con una proporción de 1:1 de inóculo/agua residual respectivamente.

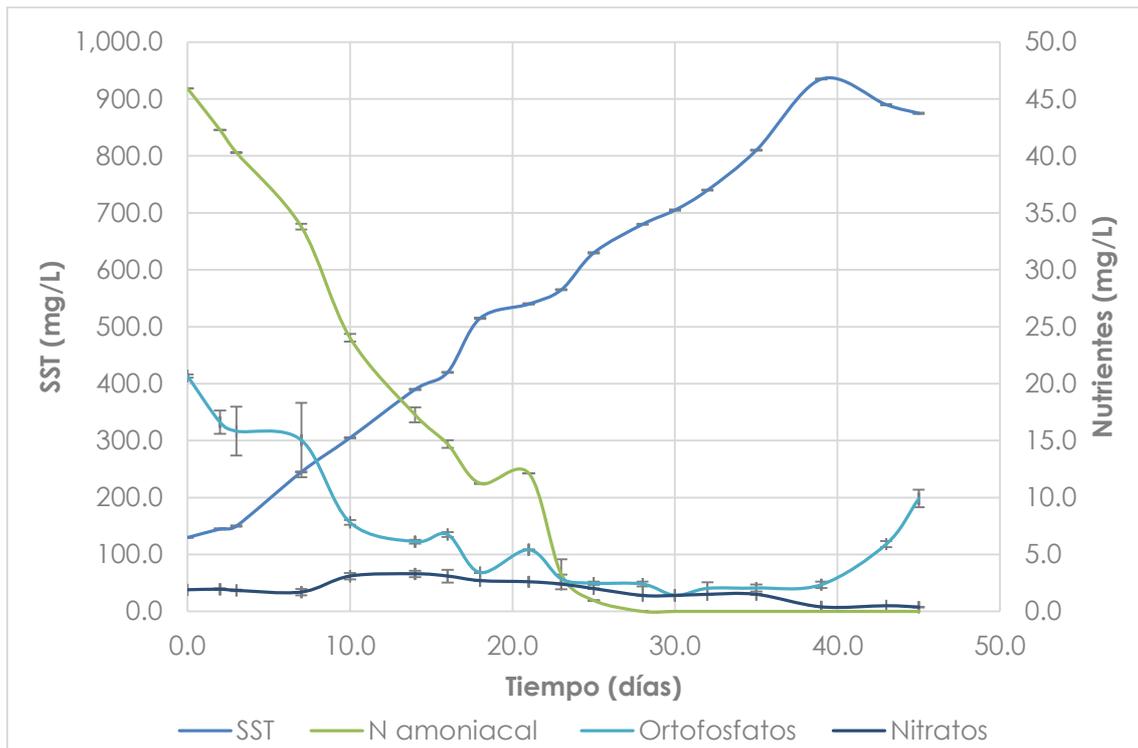
Se realizaron muestreos con la finalidad de evaluar por una parte la remoción de nutrientes ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$ ) y por otra, la cantidad de carbohidratos totales en la biomasa durante las diferentes etapas de crecimiento de las microalgas, para determinar la mayor productividad de biomasa así como de carbohidratos totales, la experimentación se realizó por duplicado.

El contenido de nutrientes obtenidos al inicio y al final del cultivo de *Scenedesmus obliquus* se muestran en el Tabla 12. Se alcanzaron remociones del 97.91%, 80.00% y 93.10% de nitrógeno amoniacal, nitratos y ortofosfatos, respectivamente.

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Inicial</b>	<b>Final</b>	<b>Remoción (%)</b>
<b>Nitrógeno amoniacal</b>	mg/L N	45.92 ± 0.00	<0.96 ± 0.03	97.91
<b>Nitratos</b>	mg/L $\text{NO}_3^-$	1.90 ± 0.00	0.38 ± 0.02	80.0
<b>Ortofosfatos</b>	mg/L $\text{PO}_4^{3-}$	20.68 ± 0.13	1.42 ± 0.06	93.1

**Tabla 12. Remoción de nutrientes (cultivos 4 litros).**

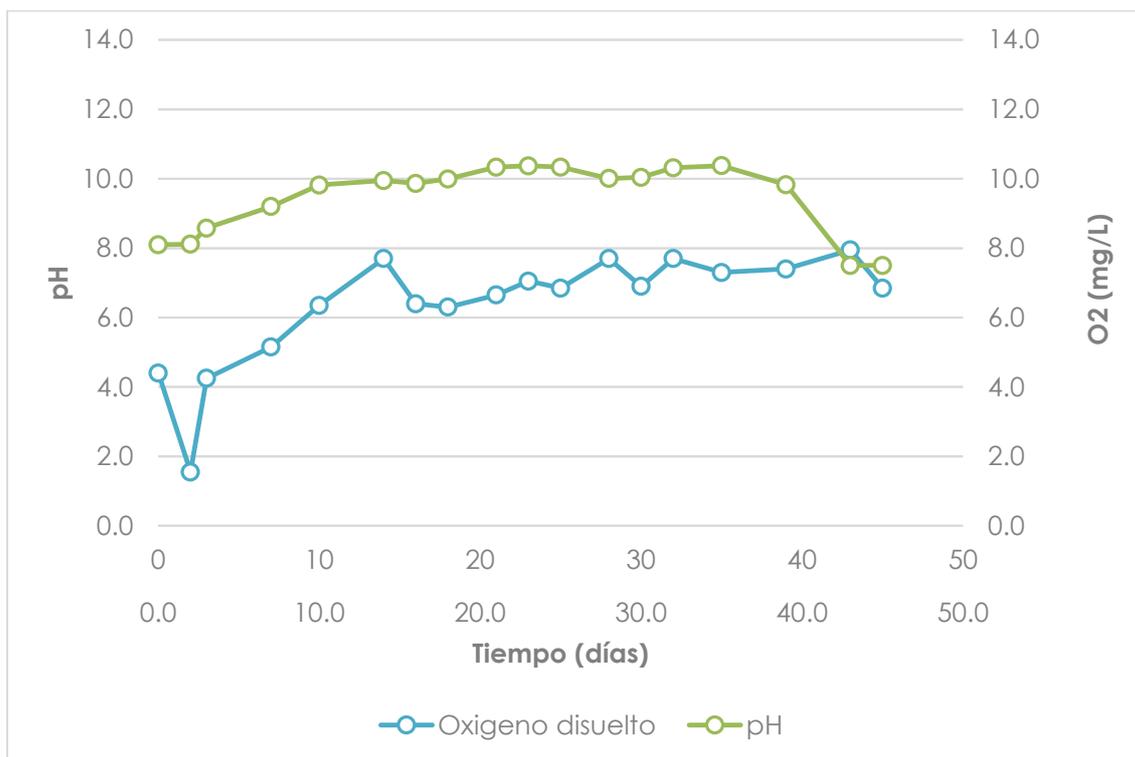
En la Figura 14 se observa que a los 25 días de cultivo se logró la remoción total de nitrógeno amoniacal en el agua de cultivo, siendo esta la principal fuente de nitrógeno utilizada por *Scenedesmus obliquus*, mientras que los niveles más bajos de ortofosfatos se obtuvieron al día 30 (1.42 mg/L). Los nitratos tienden a disminuir hacia la parte final del periodo de cultivo. Por otra parte, la máxima concentración de microalgas se alcanzó a los 39 días de cultivo (935 mg/L como SST).



**Figura 14. Crecimiento de *Scenedesmus obliquus* y remoción de nutrientes.**

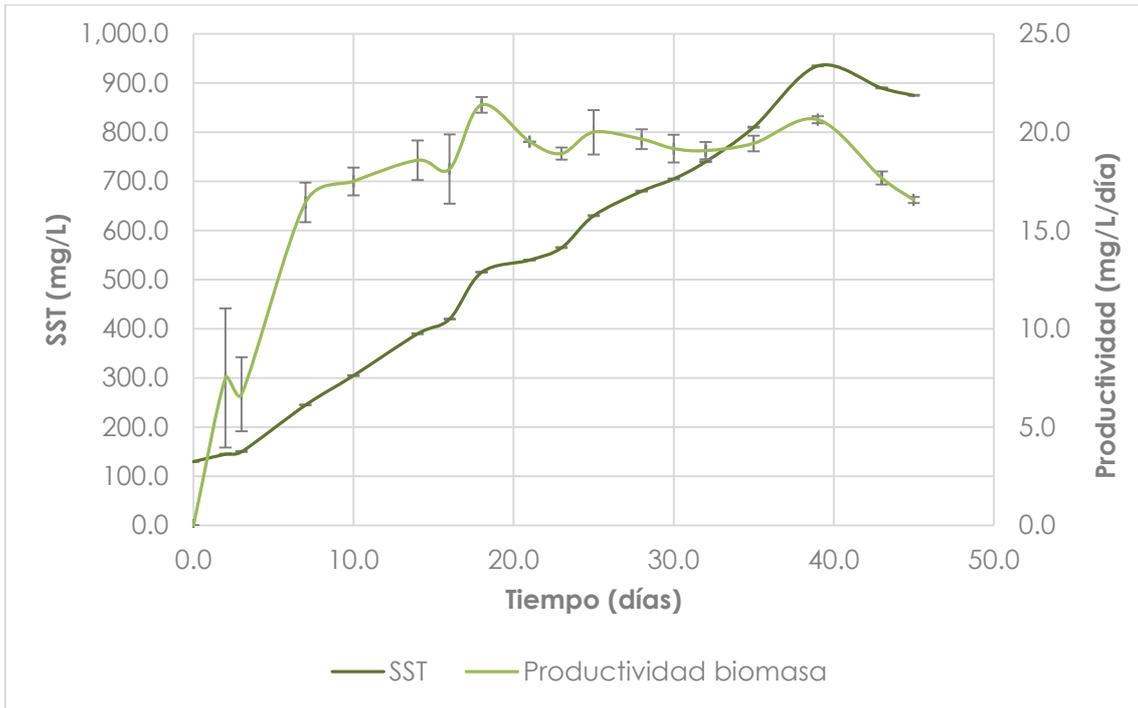
Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con lo reportado por otros autores, respecto a la capacidad de *Scenedesmus obliquus* para adaptarse y remover los nutrientes de aguas residuales. Recientemente, Zahng et al. (2014) investigaron la remoción total de nitrógeno y de fósforo a partir de agua residual doméstica. Ji en el 2015 reportó remociones del 85 y 88% de fósforo y nitrógeno totales, respectivamente a partir de un efluente secundario.

La Figura 15 muestra la variación de oxígeno y el pH durante el cultivo de *Scenedesmus obliquus*. En los primeros 14 días se observó un aumento en la concentración de oxígeno disuelto, debido al metabolismo y crecimiento de las microalgas; posteriormente se mantuvo entre 6 y 8 mg/L. Para el caso de del pH, este tiende a subir y después del día 10 se mantiene ligeramente en un pH de 10; a los 40 días tiende a bajar debido a que se alcanza la fase estacionaria (ver Figura 14).



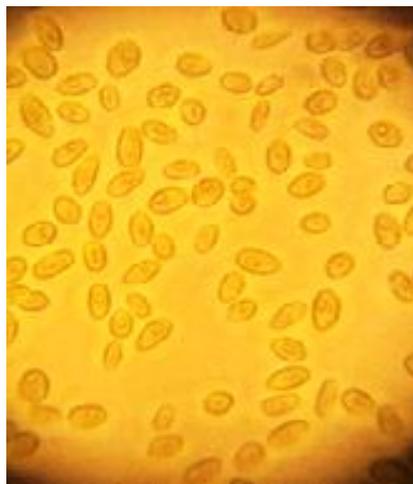
**Figura 15. Variación de oxígeno y pH durante el cultivo de *Scenedesmus obliquus*.**

En la Figura 16 se muestra el crecimiento y la productividad de la biomasa microalgal obtenida en los cultivos de *Scenedesmus obliquus*, la cual alcanzó su valor más alto en el día 18 (21.39 mg/L/día, 0.021 g/L). Estos resultados de productividad son comparables con la mayoría de trabajos reportados en la bibliografía (ver Tabla 3).



**Figura 16. Productividad de biomasa microalgal**

Regularmente se realizaron observaciones de muestras de los cultivos al microscopio para conocer la distribución de los géneros de microalga. La Figura 17 muestra una foto del cultivo al final de la experimentación en la cual se observa la predominancia de la microalga *Scenedesmus obliquus*.



**Figura 17. Observación al microscopio al final de la experimentación**

Con respecto al crecimiento y remoción de nutrientes se puede concluir que el cultivo de microalgas en agua residual es un método efectivo para el tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa microalgal como ha sido reportado previamente (Zhang, et al., 2014; Ji, et al., 2015; Shen, et al., 2015).

### **5.2.2. Acumulación de carbohidratos bajo deficiencia de nitrógeno**

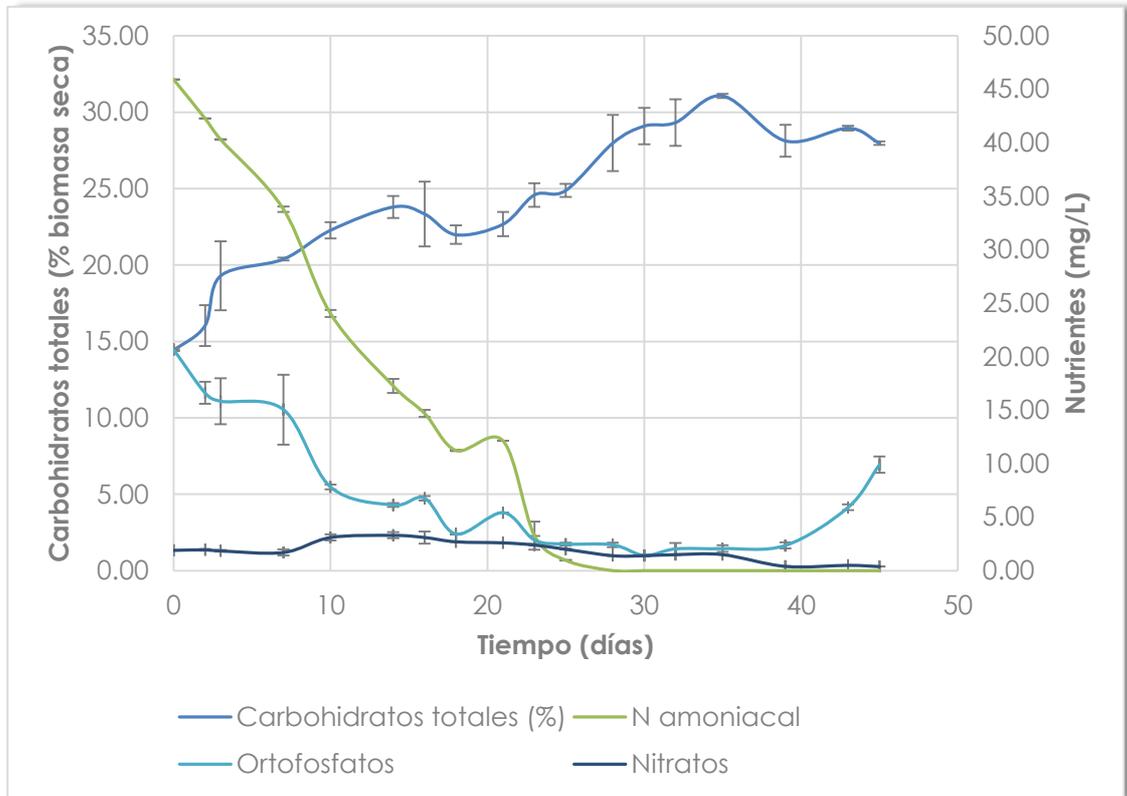
En la producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal es deseable utilizar especies de microalgas con altas tasas de crecimiento, alto contenido de carbohidratos y lípidos. La acumulación de compuestos ricos en energía, tales como carbohidratos y lípidos, puede aumentarse bajo condiciones específicas de cultivo como es la limitación de nitrógeno (ver 3.5.1).

En este trabajo se analizó la cantidad de carbohidratos totales en la biomasa así como el contenido de nutrientes en las diferentes etapas del cultivo para determinar las condiciones de mayor productividad, de remoción y de limitaciones de nutrientes, respectivamente. Con el tiempo de cultivo las microalgas consumen el nitrógeno hasta crear una deficiencia del mismo, al no tener una fuente de nitrógeno, no pueden producir proteínas por lo que acumulan lípidos y carbohidratos.

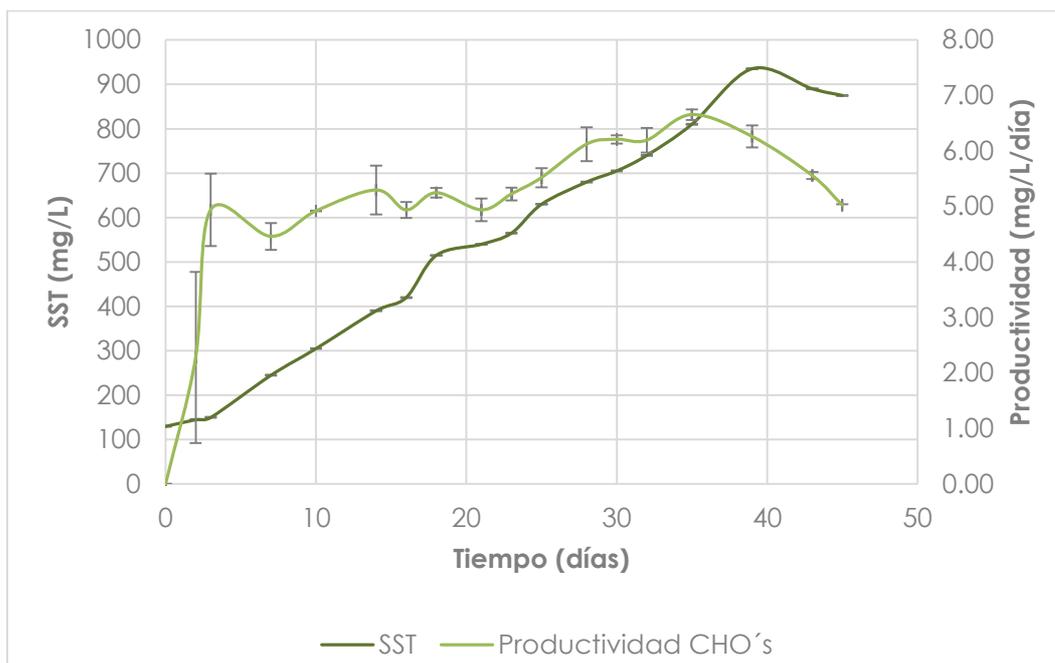
En la gráfica de la Figura 18 se puede observar que en el día 25 el nitrógeno amoniacal fue consumido totalmente y los nitratos están presentes en muy bajas concentraciones (2 mg/L). Lo que supone deficiencia de dichos nutrientes y condiciones de estrés para las microalgas, dando como resultado un incremento en el contenido de carbohidratos totales de 14.41% a 31.07%. Xin et al. (2010) reporta que *Scenedesmus* sp. utiliza principalmente nitrógeno amoniacal, seguido de urea y finalmente de nitrato.

En cuanto a la mayor productividad de carbohidratos se refiere (6.65 mg/L/día), esta se alcanzó en el día 35 (Figura 19). Ji et al. (2015) investigaron la productividad de carbohidratos en cultivos de *Scenedesmus obliquus* utilizando agua residual municipal con la adición de CO<sub>2</sub> encontrando una productividad

de carbohidratos de 5.15 mg/L/día, lo cual es consistente con lo obtenido en la presente tesis.



**Figura 18. Contenido de carbohidratos totales y de nutrientes durante las fases de crecimiento del cultivo de *Scenedesmus obliquus*.**

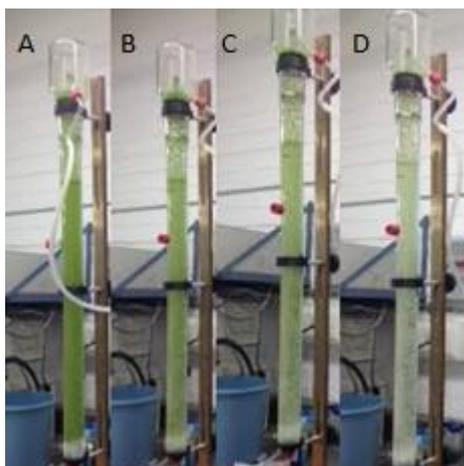


**Figura 19. Productividad de carbohidratos**

### **5.3 Potencial de generación de bioetanol a partir de biomasa cosechada mediante ozoflotación.**

#### **5.3.1. Cosecha de microalgas mediante ozoflotación y recuperación de carbohidratos totales.**

La Figura 20 muestra el desarrollo de una prueba de ozoflotación y en la Tabla 12 se resumen los resultados de la cosecha de microalgas para tres condiciones de concentración de ozono en fase gas, con flujo de gas de 0.6 L/min y tiempo de 15 min, respectivamente.



**Figura 20. Desarrollo de una prueba de ozoflotación de microalgas**  
(A=0 min, B=5 min, C=10 min, D=15min)

<i>Biomasa inicial</i> (mg/L)	<i>Biomasa final</i> (mg/L)	<i>Flujo de gas (L/min)</i>	<i>[O<sub>3</sub>] Entrada (mg/L)</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>DOA (mg O<sub>3</sub>/L)</i>	<i>DOT (mg O<sub>3</sub>/L)</i>	<i>Rendimiento (mg biomasa/mg O<sub>3</sub>)</i>	<i>Remoción de SST Columna (%)</i>
325± 7.07	115± 7.07	0.6	10.24	15	92.16	61.92± 2.04	3.53± 0.08	64.62± 1.41
325± 7.07	115± 7.07	0.6	18.6	15	167.40	109.80 ±1.40	1.94± 0.04	64.62± 2.95
325± 7.07	80± 0.00	0.6	32	15	288.00	159.62 ±1.72	1.13± 0.02	75.38± 0.54

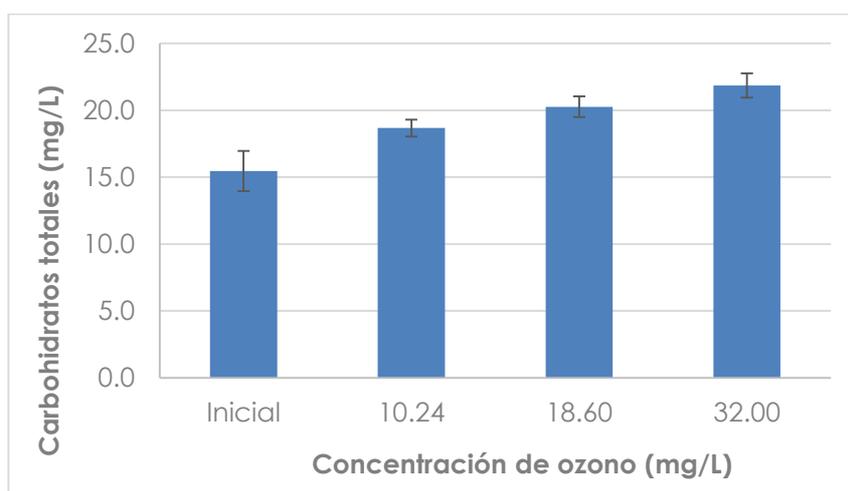
**Tabla 13. Resultados de cosecha de biomasa microalgal mediante ozoflotación**

El porcentaje más alto de recuperación de microalgas, medidas como SST, fue del 75.38% con un rendimiento de 1.13 mg SST/mg O<sub>3</sub>. Rodríguez (2015) reporta 97.91% de recuperación y un rendimiento de 1.58 mg SST/mg O<sub>3</sub> empleando condiciones similares de ozoflotación. Las diferencias en los resultados de cosecha se pueden atribuir a las características propias del cultivo empleado (concentración microalgal y distribución de especies de microalgas).

Para los fines de este trabajo, los porcentajes de recuperación de biomasa y las condiciones de ozoflotación, fueron considerados adecuados para investigar el potencial de generación de bioetanol a partir de biomasa microalgal.

Además de la cosecha de biomasa microalgal, en este trabajo se evaluó el efecto del ozono como pre-tratamiento en la hidrólisis ácida y la obtención de azúcares fermentables.

En un primer paso, se investigó si bajo las condiciones de ozoflotación ensayadas (Tabla 13), ocurre la liberación de carbohidratos durante esta etapa de cosecha. Con este fin se analizó el contenido de carbohidratos totales en el agua residual sometida a ozoflotación; para el análisis, las muestras de cultivo fueron previamente filtradas para eliminar las interferencias de la biomasa microalgal. Los resultados se muestran en la Figura 21.



**Figura 21. Contenido de carbohidratos en el sobrenadante de ozoflotación en función de la concentración de ozono.**

Se puede observar que existe un aumento de la concentración de carbohidratos totales en el sobrenadante de ozoflotación para las distintas condiciones ensayadas; a mayor concentración de ozono mayor contenido de carbohidratos en el sobrenadante. El aumento de la concentración de carbohidratos totales con respecto al valor inicial cuantificado en el cultivo, fue de 20.91, 31.20 y 41.42 %, respectivamente. Los datos obtenidos de estas pruebas

experimentales, fueron sometidos a un análisis de varianza para conocer si existe una diferencia significativa en cuanto a la liberación de los carbohidratos en el sobrenadante, los resultados se muestran en la Tabla 14.

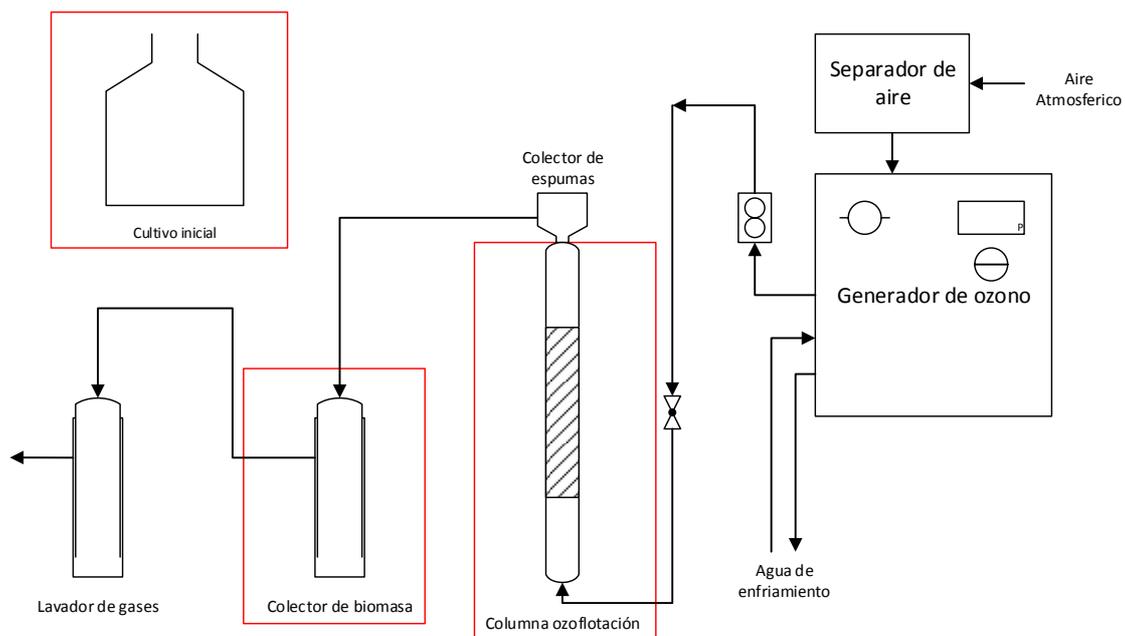
	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>F calculada</b>	<b>Prob&gt;F</b>
<b>Modelo</b>	3	43.7249	14.575	11.2886	0.0202
<b>Error</b>	4	5.1645	1.2911		
<b>Total</b>	7	48.8894			

**Tabla 14. Análisis de varianza en la liberación de carbohidratos en el sobrenadante.**

En análisis de varianza indica que existe una diferencia significativa (Prob>F) de 0.0202 con un nivel de significancia del 0.05 ( $\alpha=0.05$ ), por lo que se puede concluir que ocurre una liberación de carbohidratos durante la ozoflotación de la biomasa microalgal. Estos resultados concuerdan con lo reportado con Nguyen et al. (2013), quien encontró que los polisacáridos en el sobrenadante se incrementan con el tiempo de ozoflotación, debido a la lisis celular causado por el ozono. También Chen et al. (2010) indica que el contenido de polisacáridos aumenta, alcanza un punto máximo y disminuye a medida que la dosis de ozono aumenta; lo cual es posible y dependiente de las condiciones de ozoflotación utilizadas.

### **5.3.2. Balance de masa de carbohidratos totales en la etapa de cosecha mediante ozoflotación.**

Debido a los resultados de liberación de carbohidratos en el proceso de ozoflotación se decidió realizar un balance de masa de carbohidratos totales para la etapa de cosecha. La Figura 22 muestra los elementos de balance que fueron considerados.



**Figura 22. Puntos considerados en el balance de masa de los carbohidratos totales.**

Para el balance de masa se realizaron dos experimentos de ozoflotación con sus respectivas réplicas, tomando en cuenta las condiciones que mejores resultados arrojaron en la etapa de cosecha. Para estos experimentos se utilizaron dos lotes de cultivo distintos, con una concentración microalgal cercana a 400 mg SST/L; los resultados se muestran la Tabla 15.

Biomasa inicial (mg SST/L)	Biomasa final (mg/L)	Flujo de gas (L/min)	[O <sub>3</sub> ] Entrada (mg/L)	Tiempo (min)	DOA (mg O <sub>3</sub> /L)	DOT (mg O <sub>3</sub> /L)	Rendimiento (mg biomasa/mg O <sub>3</sub> )	Remoción de SST Columna (%)
390 ± 0.00	101.67 ± 7.64	0.6	31.2	15	280.8	152.8 ± 9.09	1.39 ± 0.00	73.93 ± 1.96
435 ± 0.00	163.33 ± 5.77	0.6	11.2	10	67.2	48.64 ± 2.42	6.47 ± 0.00	62.45 ± 1.33

**Tabla 15. Resultados de cosecha de biomasa microalgal mediante ozoflotación para balance de masa de los carbohidratos totales (DOA: Dosis de ozono aplicada, DOT: Dosis de ozono transferida, [O<sub>3</sub>]: Concentración de ozono)**

La recuperación de carbohidratos totales fue calculada de la siguiente manera:

$$\% \text{ Recuperacion} = \frac{C_{CB}}{C_i} * 100$$

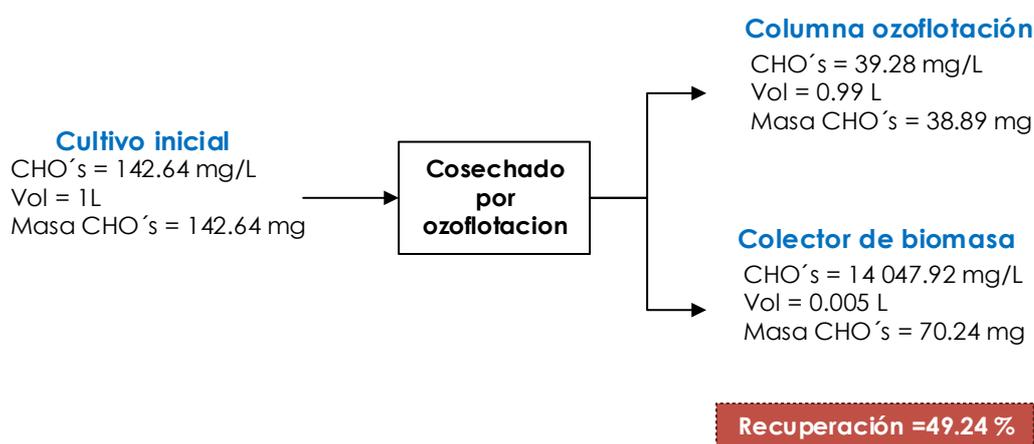
Donde,

C<sub>i</sub>: contenido inicial de carbohidratos totales en el cultivo (mg)

C<sub>CB</sub>: contenido de carbohidratos totales en el colector de biomasa (mg)

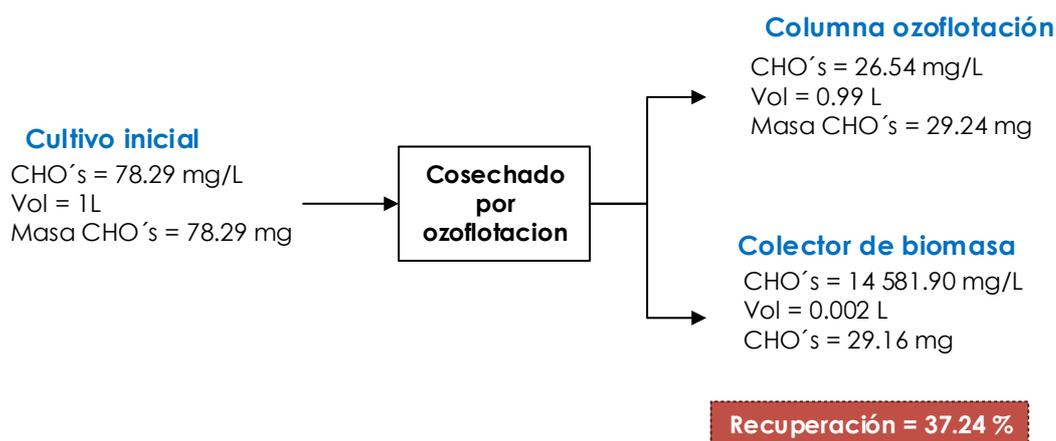
En la figura 23 se muestran los resultados del balance de masa de carbohidratos totales para la condición de ozoflotación en la que mayor rendimiento de biomasa se obtuvo en los ensayos de cosecha.

Los resultados indican que para dicha condición de ozoflotación se tiene un porcentaje de recuperación de carbohidratos totales del 49.24% en el colector de biomasa. Los carbohidratos remanentes en la columna de ozoflotación equivalen al 27.3% del valor inicial; y se observó una pérdida del 23.5%, lo cual se puede atribuir a posibles causas de oxidación. Se ha reportado que la acción del ozono en los polisacáridos conduce a la ruptura de los enlaces glicosídicos, seguido por la oxidación de los monosacáridos libres, llevando eventualmente a la formación de ácidos alifáticos y aldehídos (Langlais, et al., 1991).



**Figura 23. Balance de masa de carbohidratos a una concentración de ozono de 11.20 mg/L; mejor rendimiento (6.5 mg SST/mgO<sub>3</sub>).**

Por otra parte, en la Figura 24 se muestran los resultados del balance de masa para la condición de ozoflotación donde mayor porcentaje de recuperación de biomasa se obtuvo. Los resultados muestran que para dicha condición, se logra un menor porcentaje de recuperación de carbohidratos totales (37.25%), el porcentaje de carbohidratos remanentes (33.53%) y las pérdidas (29.20%), son mayores comparados con la condición anterior.



**Figura 24. Balance de masa de carbohidratos a una concentración de ozono de 31.20 mg/L; mejor porcentaje de recuperación de biomasa (75.4%)**

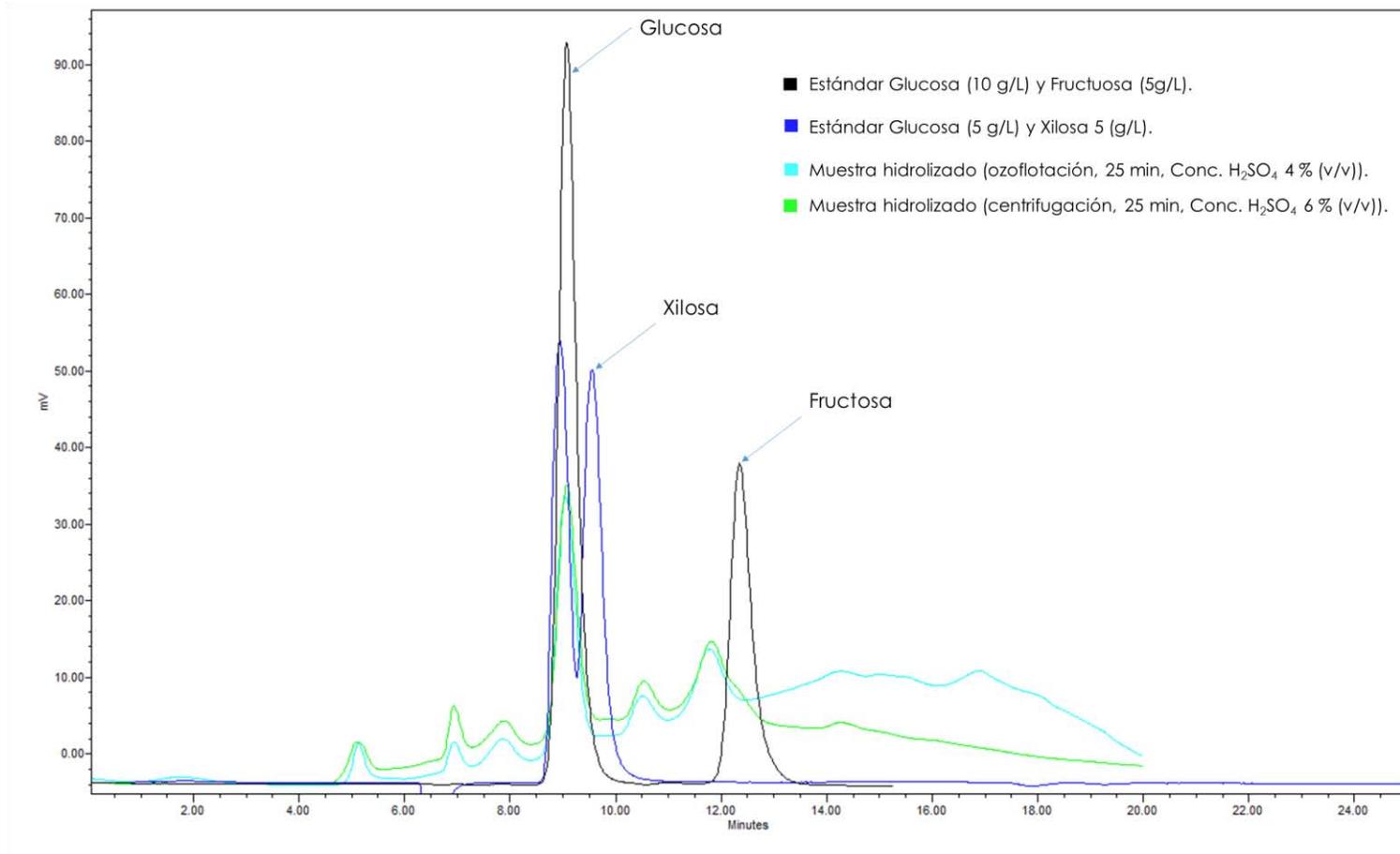
A partir de los resultados del balance de masa se puede concluir que las condiciones de ozoflotación estudiadas no favorecen la recuperación de carbohidratos totales, no obstante los resultados logrados en la recuperación de biomasa microalgal. Ello significa que en investigaciones futuras se debe de profundizar en las condiciones de operación del método de ozoflotación para mejorar la eficiencia de recuperación de carbohidratos a partir de cultivos de microalgas. Para ello es indispensable mejorar las eficiencias de recuperación de la biomasa microalgal y buscar condiciones de ozoflotación (concentración y dosis de ozono aplicada y tiempo de cosecha) que disminuyan la liberación y pérdida de carbohidratos totales durante esta etapa.

### **5.3.3. Efecto de la ozoflotación en la obtención de azúcares fermentables**

Con la finalidad de determinar si la ozoflotación puede mejorar el rendimiento de azúcares fermentables que se obtienen a partir de la biomasa microalgal cosechada, se realizó un diseño de experimentos factorial de 3 factores, en donde se compara dos métodos de cosecha (ozoflotación y centrifugación), la concentración de ácido sulfúrico y el tiempo de reacción de hidrólisis. Las condiciones de cada prueba se detallan en el apartado 4.3.5 de metodología. Como variable respuesta se determinó la concentración de azúcares fermentables los cuales fueron analizados e identificados mediante cromatografía de líquidos alta resolución (HPLC). La experimentación se realizó por triplicado, resultando en 36 experimentos aleatorios.

En el cromatograma de la Figura 25 se muestra los picos correspondientes a los estándares de glucosa, xilosa y fructosa, así como los productos de los hidrolizados de biomasa microalgal cosechada mediante ozoflotación y centrifugación, respectivamente. De acuerdo a los análisis de cromatografía de líquidos (HPLC), el principal producto de la hidrólisis ácida de la biomasa microalgal cosechada por ambos métodos fue la glucosa,. Para analizar el efecto del ozono en la producción de azúcares fermentables se tomó como producto principal a la glucosa.

En la Tabla 16 se presentan los resultados promedio de la concentración de glucosa obtenida por hidrólisis ácida de la biomasa microalgal. Las concentraciones de glucosa más altas fueron obtenidas: 1) mediante ozoflotación utilizando una concentración de ácido sulfúrico del 6% (v/v) y tiempo de hidrólisis de 25 min; y 2) mediante centrifugación con una concentración de ácido sulfúrico de 4% (v/v) y un tiempo de 25 min.



**Figura 25. Cromatograma de los azúcares fermentables obtenidos mediante de hidrólisis ácida de la biomasa microalgal, analizados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).**

Glucosa (g/L)				
Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v/v)	Ozoflotación*		Centrifugación	
	15 min	25 min	15 min	25 min
2	3.53 ± 0.12	3.80 ± 0.52	3.50 ± 0.10	4.23 ± 0.51
4	4.07 ± 0.12	4.33 ± 0.31	4.50 ± 0.35	<b>5.40 ± 0.72</b>
6	4.47 ± 0.06	<b>5.27 ± 0.06</b>	4.87 ± 0.15	5.07 ± 0.87

**Tabla 16. Promedios de los resultados obtenidos en el diseño de experimentos.**

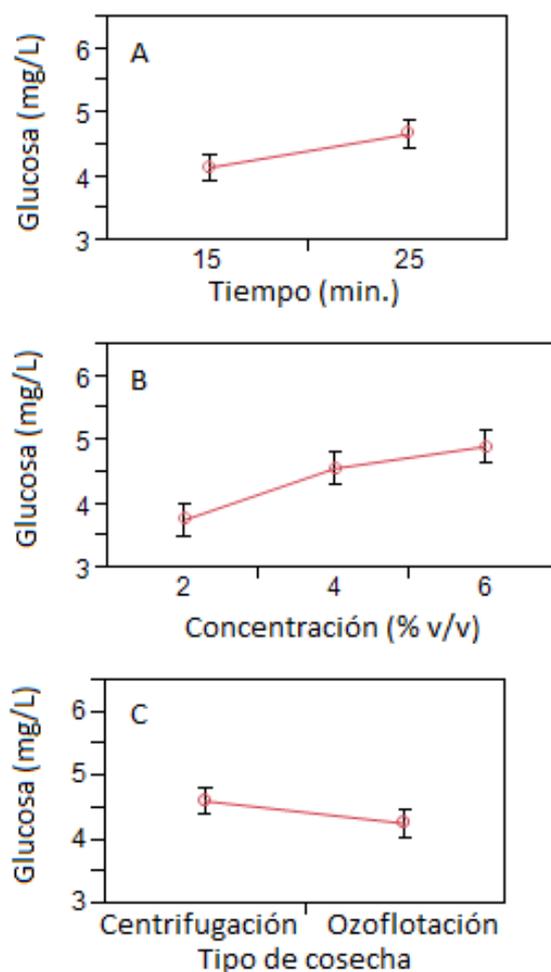
Para determinar si existe diferencia significativa entre ambos tipos de método de cosecha y condición de hidrólisis ácida, los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (Tabla 17). El análisis de varianza indica que el efecto del tiempo, concentración de ácido y método de cosecha, si tienen una diferencia significativa (Prob>F) de 0.0009, <.0001 y 0.0191, respectivamente, con un nivel de significancia del 0.05 ( $\alpha = 0.05$ ). Mientras que las interacciones entre las combinaciones de los factores (tiempo, concentración y cosecha) no son significativas.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Calculada	Prob > F
<b>Tiempo</b>	1	2.5069444	2.506944	14.3482	0.0009
<b>Concentración</b>	2	8.3705556	4.185278	23.9539	<.0001
<b>Cosecha</b>	1	1.1025	1.1025	6.31	0.0191
<b>Tiempo * Concentración</b>	2	0.0138889	0.006944	0.0397	0.9611
<b>Tiempo * Cosecha</b>	1	0.0625	0.0625	0.3577	0.5554
<b>Concentración* Cosecha</b>	2	0.735	0.3675	2.1033	0.1440
<b>Tiempo* Concentración* Cosecha</b>	2	0.6716667	0.335833	1.9221	0.1682

**Tabla 17. Análisis de varianza de las experimentaciones de hidrólisis.**

La Figura 25 muestra las gráficas de las medias de mínimos cuadrados para los factores que resultaron con diferencia significativa (tiempo, concentración y método de cosecha).

En la gráfica "A" de la Figura 26 se observa que el mejor tiempo de hidrólisis para convertir los carbohidratos de la biomasa microalgal a glucosa es el de 25 min. En la gráfica "B" se observa que la mejor concentración de  $H_2SO_4$  es de 4 % (v/v), esto debido a que se realizó la prueba de Tukey (Tabla 18) y no mostró una diferencia significativa en las concentraciones de 4 y 6 % (v/v) de  $H_2SO_4$ , por lo que al requerir menos cantidad de ácido, la concentración de 4 % (v/v) resulta ser la mejor opción (Figura 27 y 28).



**Figura 26. Graficas de medias de mínimos cuadrados para los factores con diferencia significativa. A) Tiempo, B) Concentración, C) Método de cosecha**

Nivel (% v/v)		Medias de mínimos cuadrados
6	A	4.91667
4	A	4.57500
2	B	3.76667

Niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

Tabla 18. Prueba de Tukey para la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

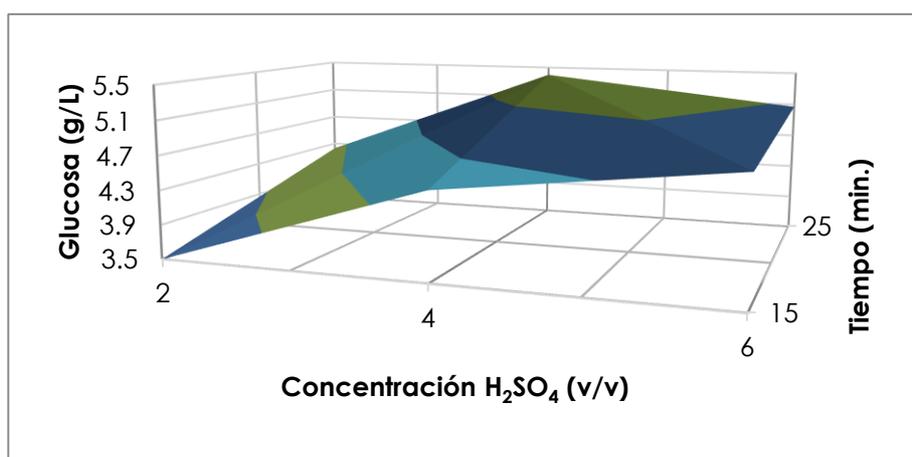


Figura 27. Gráfica de superficie mediante la cosecha de centrifugación.

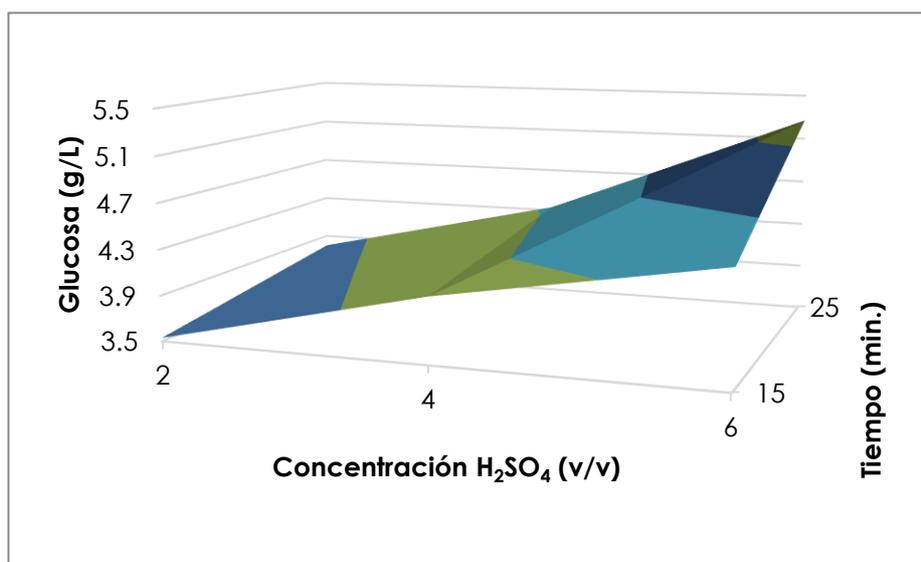


Figura 28. Gráfica de superficie mediante la cosecha de ozoflotación.

Para el caso del método de cosecha la gráfica "C" muestra que la centrifugación resulta ser la mejor opción. Por lo que se concluye que bajo las condiciones de ozoflotación ensayadas en este trabajo, el ozono no mostró una mejora en la producción de azúcares fermentables a partir de la hidrólisis ácida de la biomasa microalgal.

#### **5.3.4. Producción teórica de bioetanol a partir del hidrolizado microalgal cosechada mediante ozoflotación y centrifugación.**

Para estimar la producción teórica de bioetanol se tomó en cuenta el mayor contenido de carbohidratos obtenidos en el cultivo de microalgas (31.07%, w/w; ver 5.2.2) y el rendimiento de conversión de carbohidratos a azúcares fermentables obtenidos experimentalmente en este trabajo, de 63.23% y 58.66% (g glucosa/g carbohidratos totales) para la biomasa cosechada por ozoflotación y centrifugación respectivamente. Cabe señalar que el contenido de carbohidratos totales en la biomasa cosechada por ambos métodos son similares. El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO<sub>2</sub> por 1 g de glucosa (Vázquez & Dacosta, 2007). Los resultados se muestran en la Tabla 19.

<b>Cosecha</b>	<b>CHO's totales (%)</b>	<b>Glucosa (%)</b>	<b>CHO's totales (g/L)</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>Rendimiento etanol % (g etanol/g biomasa)</b>
Ozoflotación	31.07	19.65	15.54	9.82	5.02	10.04
Centrifugación	31.07	18.23	15.54	9.11	4.66	9.32

**Tabla 19. Producción teórica de etanol a partir del hidrolizado de biomasa microalgal cosechada por centrifugación y ozoflotación**

El rendimiento obtenido a partir de la producción teórica de etanol, para cada método de cosecha fue respectivamente de 10.04 % y 9.32 % (g etanol/g biomasa); ligeramente más alto utilizando la biomasa cosechada por ozoflotación. Estos resultados se encuentran por debajo de lo reportado por Ho,

et al. (2012), quienes reportan un rendimiento de etanol del 21.5% (g etanol/g biomasa) a partir de biomasa microalgal de *Scenedesmus obliquus*, cultivada en medio sintético y deficiencia de nutrientes y un contenido de carbohidratos totales de 51.8% (w/w); 1.6 veces más que el contenido de este trabajo (31.07%). Tomando en cuenta la diferencia en cuanto al contenido de carbohidratos total en la biomasa microalgal, podemos concluir que los resultados son consistentes en cuanto al rendimiento de etanol.

### **5.3 Obtención de bioetanol por fermentación de azúcares de biomasa microalgal**

Se realizaron pruebas de fermentación para la obtención de bioetanol, utilizando biomasa microalgal cosechada por centrifugación (16.67%) y ozoflotación (18.41%), la cual fue hidrolizada mediante las mejores condiciones encontradas en este trabajo: tiempo de hidrólisis de 25 min y concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 4% (v/v). Se realizó un experimento control con el fin de comparar el rendimiento (g etanol/g glucosa) de bioetanol en la fermentación utilizando glucosa como fuente de carbono. El hidrolizado se inoculó directamente sin ningún tipo de suplementación, ya que está en un medio de cultivo complejo (hidrolizado) que contiene proteínas, sales y otros compuestos aportados por la biomasa microalgal (Miranda, et al., 2012). La concentración inicial de glucosa en los hidrolizados de biomasa microalgal cosechada por ozoflotación y centrifugación, fue respectivamente de 5.27 g/L y 5.40 g/L. Como control se realizó una fermentación utilizando 2.5 g/L de glucosa. El contenido de glucosa residual y sub-productos de la fermentación fueron cuantificados por HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Muestra	Etanol (g/L)	Ac. Acético (g/L)	Glucosa residual (g/L)	Rendimiento % (g etanol/g glucosa)	Rendimiento % (g etanol/g biomasa)
Ozoflotación	1.83 ± 0.07	1.16 ± 0.19	ND	67.95	3.66
Centrifugación	1.74 ± 0.09	2.14 ± 0.19	0.21 ± 0.01	63.05	3.48
Control	1.17 ± 0.06	0.17 ± 0.02	0.07 ± 0.01	91.59	-

**Tabla 20. Resultados finales para la fermentación del hidrolizado a partir de *Scenedesmus obliquus* (ND: No detectado).**

A partir de los hidrolizados se obtuvo una concentración de bioetanol similar en los dos tipos de biomasa microalgal; la cosechada por ozoflotación (1.83g/L) y centrifugación (1.74g/L). El rendimiento de producción de etanol por gramo de glucosa fermentada fue del 67.95% y 63.8%, no obstante que la glucosa se consumió completamente (Tabla 20). Cabe destacar que en el caso del cultivo control se obtuvo un rendimiento del 90.80%. Esto nos sugiere que en el caso de los hidrolizados de biomasa microalgal, se pueden estar formando otros productos a partir de la glucosa y/o el etanol se puede transformar a compuestos como el ácido acético (García, 2013), un subproducto que fue detectado y cuantificado en el fermentado, junto con el etanol. El ácido acético se encontró en mayor concentración (2.14 g/L) en el fermentado correspondiente a la biomasa cosechada por centrifugación; 1.8 veces más que en el fermentado de ozoflotación. En este sentido la ozoflotación presentó ventajas. Con base en estos resultados es recomendable para futuras investigaciones, profundizar en las condiciones y en la identificación de subproductos de fermentación.

En cuanto a los rendimientos de etanol por gramo de biomasa microalgal, estos se encuentran en el orden del 3.5%; un valor bajo, pero acorde a la biomasa microalgal utilizada en el ensayo. Se realizaron estimaciones tomando en cuenta las mejores condiciones experimentales de cultivo, con una biomasa con un contenido de carbohidratos totales del 31.07%, un rendimiento en la hidrólisis del 63.23% y 58.66% (g glucosa/g Carbohidratos totales) para la biomasa cosechada por ozoflotación y centrifugación respectivamente y un rendimiento en la fermentación de 67.95% y 63.05% (g etanol/g glucosa), respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla 21.

Muestra	Etanol (g/L)	Rendimiento % (g etanol/g biomasa)	Rendimiento % (g etanol/g glucosa)
Ozoflotación	3.41	6.82	67.95
Centrifugación	2.93	5.88	63.05

**Tabla 21. Producción máxima de etanol en las fermentaciones con *S. cerevisiae*.**

El rendimiento de etanol obtenido fue de 6.82% y 5.88% (g etanol/g biomasa) para la biomasa cosechada por ozoflotación y centrifugación respectivamente. Comparado con otros estudios, este rendimiento está por debajo (2- 3 veces menos) de lo reportado con biomasa microalgal cultivada en medios sintéticos (Tabla 22).

Microalga	Método de hidrólisis	Concentración de biomasa (g/L)	CHO's (%)	Glucosa (g/L)	Microorganismo fermentador	Etanol (g/L)	Rendimiento de etanol % (g etanol / g de biomasa)	Rendimiento de glucosa % (g glucosa / g CHO's totales)	Referencia
<i>Scenedesmus obliquus</i> CNW-N	Química 2% (v/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40	51.8	20.72	<i>Z. mobilis</i>	8.60	21.5	100	(Ho, et al., 2013 b)
<i>Chlorella vulgaris</i> FSP-E	Enzimáticos celulasas + Amilasas	20	46.8	7.78	<i>Z. mobilis</i>	3.60	18.0	83.11	(Ho, et al., 2013 a)
<i>Tertiolecta Dunaliella</i> (lípidos extraídos)	Enzimática AMG 300L	50	51,9	42	<i>S. cerevisiae</i>	7.20	14.4	27.75	(Lee, et al., 2013)
<i>Scenedesmus obliquus</i> (ozoflotación)	Química 4% (v/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50	31.07	19.65	<i>S. cerevisiae</i>	3.41	6.8	63.34	Este estudio
<i>Scenedesmus obliquus</i> (centrifugación)	Química 4% (v/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50	31.07	18.23	<i>S. cerevisiae</i>	2.93	5.9	58.66	Este estudio

**Tabla 22. Comparación de estudios para la producción de etanol mediante biomasa microalgal.**

## 6 Conclusiones

Mediante el cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* en agua residual y la cosecha de biomasa microalgal por ozoflotación, fue posible obtener azúcares fermentables en forma de glucosa principalmente y generar bioetanol mediante fermentación alcohólica. Los rendimientos obtenidos (63.34 y 58.66 % (g glucosa / g CHO's totales)) se encuentran en el mismo orden de magnitud que los obtenidos a partir de biomasa microalgal cultivada en medios sintéticos.

*Scenedesmus obliquus* es una especie de microalga que mostró una alta capacidad de adaptación para crecer en agua residual doméstica. Mediante la prolongación del tiempo de cultivo se duplicó del contenido de carbohidratos totales en la biomasa, debido al estrés producido por la deficiencia de nitrógeno amoniacal principalmente. Con base en las altas eficiencias de remoción de nutrientes (80-97.7%), la concentración microalgal (0.9 g SST/L) y el contenido de carbohidratos totales (31.07%), se concluye que el cultivo de microalgas es una alternativa técnicamente viable para el tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa microalgal para la obtención de biocombustibles.

Las condiciones de ozoflotación ensayadas para la cosecha de microalgas no favorecieron la recuperación de carbohidratos totales. Esto debido a la liberación de dichos compuestos al medio acuoso y a las posibles reacciones de oxidación que experimentan durante el cosechado. A partir del balance de masa se determinó una recuperación máxima del 49.24%. Adicionalmente se concluye que el uso del ozono en la cosecha de biomasa microalgal no mostró mejoras significativas en la obtención de azúcares fermentables mediante la hidrólisis ácida de la biomasa ozoflotada, comparado con lo obtenido a partir de la biomasa centrifugada.

Se concluye que la biomasa microalgal cosechada por ozoflotación y centrifugación respectivamente, presentaron un rendimiento de producción teórica de etanol de 10.04 % y 9.32 % (g etanol/g biomasa), respectivamente; lo cual corresponde a la mitad de lo reportado para la misma especie de

microalga cultivada en medio sintético y con mayor contenido de carbohidratos totales.

La glucosa presente en el hidrolizado de biomasa microalgal, identificada como el principal azúcar fermentable, fue transformada en bioetanol mediante la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con una eficiencia >60% (g de etanol/ g glucosa). Se concluye que a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual y con un contenido de carbohidratos totales del 31.07%, es posible obtener rendimientos de bioetanol entre 8.7% y 9.4% (g etanol/g biomasa).

## Bibliografía

APHA-AWWA-WPCF, 2005. *Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewater*. 21 ed. Wahshigton, DC: APHA.

Balat, M., Balat, H. & Oz, C., 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, Volume 34, p. 551–573.

Band , S. & Christine, J., 1999. *Efecto de la composicion bioquimica de microalgas sobre el valor nutritivo de dos cepas de artemia*. La Paz: Instituto Politecnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.

Birsall, C. M., Jenkins, A. C. & Spadinger, E., 1952. Iodometric determination of ozone. *Analytical Chemistry*, 24(4), pp. 662-664.

Brennan, L. & Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 14, pp. 557-577.

Briones, P. & Gonzalo, A., 2012. *Produccion de etanol a partir de la macroalga Ulva rigida*. Santiago de Chile: Universidad de Chile, Facultad de ciencias fisicas y matematicas, Departamento de ingeniería química y biotecnología.

Cazetta, M. L., Celligio, M. A. P. C., Buzato, J. B. & Scarmino, I. S., 2007. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*, Issue 98, pp. 2824-2828.

Chen, C. Y., Zhao, X. Q., Yen, H. W. & Ho, S. H., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 78, pp. 1-10.

Cheng, Y. L., Juang, Y. C., Liao, G. Y. & Tsai, P. W., 2011. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation. *Bioresource Technology*, Volume 102, pp. 82-87.

Chen, M., Tang, H., Ma, H. & Holland, T. C., 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, Volume 102, pp. 1649-1655.

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, Volume 25, p. 94–306..

Choi, S. P., Nguyen, M. T. & Sim, S. J., 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresource Technology*, Issue 101, pp. 5330-5336.

Christenson, L. & Sims, R., 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, Issue 29, pp. 686-702.

Demirbas, F., 2010. Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*, pp. 3473-3480.

Dragone, G., Fernandez, B., Abreu, A. & Vicente, A., 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, Volume 88, pp. 3331-3335.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K. & Rebers, P. A., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), pp. 350-356.

García, M., 2013. *Biología alimentaria*. Quinta ed. Mexico: Limusa.

Garibay, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez, M. & Serrano, L., 2009. Biodiesel a Partir de Microalgas. *BioTecnología*, pp. 38-61.

Harun, R. & Danquah, M. K., 2011. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*, Volume 46, pp. 304-309.

Harun, R., Danquah, M. K. & Forde, G. M., 2010. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *J. Chem. Technol. Biootechnol.*, Volume 85, pp. 199-203.

Harun, R., Liu, B. & Danquah, M. K., 2011. Analysis of process configurations for bioethanol production from microalgal biomass. *Progress in Biomass and Bioenergy Production*, pp. 395-408.

Ho, S. H., Chen, C. Y. & Chang, J. S., 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, Volume 113, pp. 244-252.

Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y. & Hasunuma, T., 2013 a. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, Volume 135, pp. 191-198.

Ho, S. H., Li, P. J., Liu, C. C. & Chang, J. S., 2013 b. Bioprocess development on microalgae-based CO<sub>2</sub> fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, Issue 145, pp. 142-149.

Ji, M. K., Abou Shanab, R. A. I., Hwang, J. H. & Timmes, T. C., 2013. Removal of Nitrogen and Phosphorus from Piggery Wastewater Effluent Using the Green Microalga *Scenedesmus obliquus*. *J. Environ. Eng.*, Volume 139, pp. 1198-1205.

Ji, M. K., Yun, H. S., Park, S. & Lee, H., 2015. Effect of food wastewater on biomass production by a green microalga *Scenedesmus obliquus* for bioenergy generation. *Bioresource Technology*, Volume 179, pp. 624-628.

John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M. & Pandey, A., 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, Volume 102, pp. 186-193.

Kim Hyoun, K., Choi Seong, I., Kim Myeong, H. & Wi Gon, S., 2014. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by

enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresource Technology*, Volume 153, pp. 47-54.

Komolafe, O., Velasquez, S., Monje, I. & Yáñez, I., 2014. Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. *Bioresource Technology*, Issue 154, pp. 207-304.

Langlais, B., Reckhow, D. A. & Deborah, R. B., 1991. *Ozone in water treatment, application and engeneering*. USA: Lewis publishers.

Lee, O. K., Kim, A. L., Seong, D. H. & Lee, C. G., 2013. Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, Volume 132, pp. 197-201.

Macedo, I. c., Seabra, J. E. A. & Solva, J. E., 2008. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy*, 32(7), pp. 582-595.

Maity, J. P., Bundschuh, J., Chen, C.-Y. & Bhattacharya, P., 2014. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives - A mini review. *Energy*, pp. 1-10.

Malgas, 2013. *Aplicaciones de las microalgas: estado de la tecnica*. Gijon: AST Ingeniería S. L..

Miranda, J. R., Passarinho, P. C. & Gouveia, L., 2012. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource technology*, Volume 104, pp. 342-348.

Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M. & Jouzani, G. S., 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 27, pp. 77-93.

Morales, M., Quintero, J., Conejeros, R. & Aroca, G., 2015. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 42, pp. 1349-1361.

Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimarães, P. M. & Silva, J. P. A., 2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, Volume 28, pp. 817-830.

Nguyen, M. T., Choi, S. P., Lee, J. & Sim, S. J., 2009. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *J. Microbiol. Biotechnol*, Issue 19, pp. 161-166.

Nielsen, S. S., 2015. *Food analysis laboratory manual*. Second edition ed. New York: Springer.

Nigam, P. S. & Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, Volume 37, pp. 52-68.

Pancha, I., Chokshi, K., George, B. & Ghosh, T., 2014. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, Volume 156, pp. 146-154.

Rodríguez Muñoz, V., 2015. *Separación de microalgas por ozoflotación en un reactor tipo espumador para la producción de biodiesel*. Distrito Federal: Tesis Licenciatura UNAM.

Romo, A. K., 2002. *Manual para el cultivo de microalgas*. La Paz: Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Ruiz, J., Arbib, Z., Álvarez-Díaz, P. & Garrido-Pérez, C., 2014. Influence of light presence and biomass concentration on nutrient kinetic removal from urban wastewater by *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Biotechnology*, Volume 178, pp. 32-37.

Sacristán, M., Luna Pabello, V. M., Cadena, E. & Ortiz, E., 2013. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient

removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource Technology*, Issue 146, pp. 744 - 748.

Sánchez, Ó. J. & Cardona, C. A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstock. *Biosource Technology*, 99(12), pp. 5270-5295.

Shen, Q.-H., Jiang, J.-W. & Chen, L.-P., 2015. Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. *Bioresource Technology*, Volume 190, p. 257.263.

Singh, J. & Gu, S., 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 14, pp. 2596-2610.

Vázquez, H. J. & Dacosta, O., 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 8(4).

Velasquez-Orta, S. B., Garcia-Estrada, R., Monje-Ramirez, I. & Harvey, A., 2014. Microalgae harvesting using ozoflotation: Effect on lipid and FAME recoveries. *Biomass and bioenergy*, Volume 70, pp. 356-363.

Wang, L., Min, M., Li, Y. & Chen, P., 2009. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

Woertz, I., Feffer, A., Lundquist, T. & Nelson, Y., 2009. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. *Journal of Environmental Engineering*, Issue 11, pp. 1115-1122.

Xin, L., Hong-ying, H. & Jia, Y., 2010. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New Biotechnology*, pp. 59-63.

Zhang, C., Zhang, Y., Zhuang, B. & Zhou, X., 2014. Strategic enhancement of algal biomass, nutrient uptake and lipid through statistical optimization of nutrient supplementation in coupling *Scenedesmus obliquus*-like microalgae cultivation and municipal wastewater treatment. *Bioresource Technology*, Volume 171, pp. 71-79.