



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL - AGUA

GENERACIÓN DE BIOMASA MICROALGAL CRECIDA EN AGUA
RESIDUAL DOMÉSTICA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL
EMPLEANDO LEVADURAS SILVESTRES

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

PRESENTA:
I.B.A. ENRIQUE ROMERO FRASCA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR
M. B. JOSÉ RAUNEL TINOCO VALENCIA, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DRA. IDANIA VALDEZ VAZQUEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., AGOSTO 2019



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. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Secretario: Dra. Idania Valdez Vázquez

Vocal: Dr. Víctor Luna Pabello

1^{er} Suplente: M. B. José Raunel Tinoco Valencia

2^{do} Suplente: Dra. María Teresa Orta Ledesma

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Ingeniería Ambiental, Instituto de Ingeniería, UNAM

Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias, UNAM

Unidad de Escalamiento y Planta Piloto, Instituto de Biotecnología, UNAM

School of Engineering, Newcastle University

TUTOR DE TESIS:

Dra. María Teresa Orta Ledesma

.....
FIRMA

(Segunda hoja)

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

No. de Certificado CMX C SGC 155 2017, válido en el período del 09 de noviembre de 2017 al 09 de noviembre de 2020



Resumen

Las levaduras silvestres han sido empleadas por siglos para obtener alimentos para el consumo humano. Sin embargo, su uso como organismo fermentador en la industria de bioetanol aún debe determinarse. El propósito de este estudio fue identificar potenciales levaduras silvestres etanológicas presentes en un efluente secundario para producir bioetanol a partir de biomasa microalgal pretratada. En primera instancia, se aislaron e identificaron levaduras presentes en el agua residual de estudio mediante el método de identificación molecular basado en la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S. Simultáneamente, un consorcio de microalgas secas del género *Scenedesmus* fue sacarificado empleando ácido sulfúrico diluido y neutralizado con hidróxido de sodio. La fermentación del licor hidrolizado ácido microalgal se llevó a cabo a una concentración celular inicial de 3×10^6 células mL^{-1} o una densidad óptica de 0.1 a 600 nm a una relación inicial sustrato/microorganismo de 1×10^{-3} . La producción de etanol y el consumo de glucosa de las levaduras, así como el contenido residual de nitrógeno amoniacal, ortofosfatos y nitratos, fueron determinados durante la fermentación. *Candida* sp. fue identificada como principal especie de levadura etanológica en el agua residual de estudio, misma que fue utilizada para la fermentación del hidrolizado ácido microalgal y comparada con *Saccharomyces cerevisiae*. Si bien ambas especies consumieron más del 85 % de la glucosa disponible, no fueron encontradas diferencias significativas entre especies en cuanto a la tasa de consumo de glucosa. Por su parte, la tasa de conversión de glucosa a etanol en *Candida* sp. fue superior a *S. cerevisiae*, alcanzado un 90 % y 88 % del valor teórico, respectivamente. Finalmente, solo se determinaron diferencias significativas en la remoción de ortofosfatos y nitratos entre ambas especies, donde *Candida* sp. mostró una tasa de remoción del 10 % y 96 %, respectivamente, mientras que *S. cerevisiae* tan solo alcanzó una remoción del 5 % y 68 %, respectivamente. De los resultados obtenidos se concluye que *Candida* sp. presenta una tasa de producción de etanol y de remoción de nutrientes que pueden competir con *S. cerevisiae* cuando se emplean bajas concentraciones de azúcares como sustrato inicial.

Abstract

Wildtype yeast have been employed for centuries to obtain food products for human consumption. Nonetheless, its potential use as fermenting microorganism for bioethanol production has yet to be determined. In this study, prospective ethanologenic wildtype yeast from a secondary effluent were identified in order to produce bioethanol using pretreated microalgae biomass. Yeast species in wastewater were isolated and identified using the molecular identification technique based on the 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S region. Concurrently, dried microalgae biomass, consisting mostly of *Scenedesmus* sp., was saccharified through diluted acid hydrolysis and neutralized using sodium hydroxide. Hydrolyzed-microalgae liquor fermentation was carried out at an initial cell concentration of 3×10^6 cells mL⁻¹ or an optical density of 0.1 at 600 nm at an initial substrate to microorganism ratio of 1×10^{-3} . Yeasts' ethanol production and glucose consumption, as well as residual contents of ammonia nitrogen, orthophosphates and nitrates, were determined during the fermentation. The predominant ethanologenic yeast species in wastewater was identified as a *Candida* sp. Hence, said species was used to carry out the hydrolyzed-microalgae liquor fermentation and compared to *Saccharomyces cerevisiae*. Even though both species consumed more than 85 % of the available glucose, no significant differences in the glucose consumption rate were observed between *Candida* sp. and *S. cerevisiae*. On the other hand, glucose-to-ethanol conversion rate in *Candida* sp. was superior to *S. cerevisiae*, achieving 90 and 88 % of the maximum theoretical value, respectively. Finally, significant differences were only observed between species on orthophosphates and nitrates removal rate, where *Candida* sp. exhibited a net removal rate of 10 % and 96 %, respectively, whereas *S. cerevisiae* showed only 5 % and 68 %, respectively. On the basis of the aforementioned results, it is concluded that *Candida* sp. exhibits competitive ethanol production and nutrient removal rates in comparison to *S. cerevisiae* when low concentrations of sugars are used as initial substrate.

Índice general

Resumen	IV
Abstract	V
Índice General	VII
Índice de Figuras	IX
Índice de Tablas	XI
1 Introducción	1
2 Antecedentes	3
3 Objetivos	7
3.1 Objetivo general	7
3.2 Objetivos específicos	7
4 Hipótesis	9
5 Alcance	9
6 Marco Teórico	11
6.1 Levaduras. Generalidades	11
6.2 Microalgas. Generalidades	13
6.3 Biocombustibles	16
6.3.1 Biocombustibles líquidos	17
6.4 Bioetanol. Generalidades	19
6.4.1 Pretratamiento	19
6.4.2 Hidrólisis	20
6.4.3 Fermentación	20
6.4.4 Separación y purificación del etanol	21
6.4.5 Tratamiento del efluente	21
7 Materiales y Métodos	23
7.1 Muestreo y caracterización del agua residual doméstica de estudio	24
7.2 Crecimiento de microalgas en agua residual	25

7.2.1	Cosechado, secado y pretratamiento	26
7.3	Aislamiento e identificación molecular de levaduras silvestres	28
7.4	Capacidad fermentativa de levaduras silvestres	30
7.5	Fermentación alcohólica de biomasa pretratada de microalgas	31
7.6	Análisis cromatográfico	33
7.6.1	Cromatografía Líquida de Alta Resolución	33
7.6.2	Cromatografía de Gases	34
7.7	Diseño experimental para el análisis de la información	35
8	Resultados y discusión	37
8.1	Características del agua residual de estudio	37
8.2	Identificación y composición del consorcio de microalgas	38
8.3	Pretratamiento de la biomasa microalgal	40
8.4	Especies de levaduras silvestres preponderantes en agua residual	43
8.4.1	Curvas de crecimiento y capacidad fermentativa	44
8.5	Obtención de bioetanol a partir de biomasa pretratada y consumo de nutrientes .	50
8.5.1	Tasa de consumo de glucosa en el hidrolizado ácido microalgal y consumo de nutrientes	50
8.5.2	Producción de etanol a partir del hidrolizado ácido microalgal	55
9	Conclusiones	61
	Referencias	73
A	Identificación molecular de levaduras	75
B	Curvas de calibración	87
C	Balance estequiométrico de la fermentación alcohólica	91
	Productos resultantes del proyecto de investigación	93
	Agradecimientos	95

Índice de figuras

Figura 6.1.	Crecimiento levaduriforme de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en agua residual (100x)	11
Figura 6.2.	Cultivo de microalgas en agua residual observadas al microscopio (100x) .	14
Figura 7.1.	Diagrama general de la metodología experimental	23
Figura 7.2.	Planta de Tratamiento de Agua Residual Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la UNAM (a) y Tanque de almacenamiento del efluente secundario (b)	24
Figura 7.3.	Cultivos de microalgas en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental	26
Figura 7.4.	Preparación de equipo de secado por aspersión Bowen Engineering BE-1449	27
Figura 7.5.	Biomasa de microalgas seca resultante (a) y parrilla de calentamiento con agitación empleada para hidrólisis ácida con sistema de reflujo por enfriamiento: reactor (b) y vista general (c)	28
Figura 7.6.	Biomasa seca de microorganismos proveniente de agua residual (a) y colonias uniformes aisladas de levaduras silvestres en placas con YPD (b,c)	29
Figura 7.7.	Cultivo de levaduras silvestres en incubadora con agitación orbital	31
Figura 7.8.	Vista general del equipo de cromatografía líquida de alta resolución utilizado en la Universidad de Newcastle	33
Figura 7.9.	Equipo de cromatografía líquida de alta resolución compuesto por columna de exclusión de iones (a), detector de índice de refracción(b) y de UV/Vis (c)	34
Figura 7.10.	Equipo de cromatografía de gases utilizado en la Universidad de Newcastle	35
Figura 8.1.	Géneros de microalgas identificadas como <i>Scenedesmus</i> (a), <i>Monoraphidium</i> (b), <i>Phacus</i> (c) y <i>Tribonema</i> (d) observadas al microscopio (100X)	38
Figura 8.2.	Especies identificadas como <i>Candida</i> sp. (a) y <i>Pichia</i> sp. (b) observadas al microscopio (100x)	43
Figura 8.3.	Curva de crecimiento (◆), consumo de glucosa (●) y producción de etanol (■) para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa control) a 25 g L ⁻¹ (a) y 40 g L ⁻¹ (d), <i>Candida</i> sp. a 25 g L ⁻¹ (b) y 40 g L ⁻¹ (e) y <i>Pichia</i> sp. a 25 g L ⁻¹ (c) y 40 g L ⁻¹ (f) de glucosa inicial	46
Figura 8.4.	Ácido cítrico (●), ácido acético (■) y glicerol (◆) generados en agua residual esterilizada y enriquecida con 25 g L ⁻¹ de glucosa empleando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (a) y <i>Candida</i> sp. (b)	49
Figura 8.5.	Ácido cítrico (●), ácido acético (■) y glicerol (◆) generados en agua residual esterilizada y enriquecida con 40 g L ⁻¹ de glucosa empleando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (a) y <i>Candida</i> sp. (b)	50

Figura 8.6.	Diagrama de Pareto (a,c) y gráfica de interacción (b,d) para <i>S. cerevisiae</i> y <i>Candida</i> sp., respectivamente, para la glucosa residual bajo las condiciones de estudio	52
Figura 8.7.	Diagrama de Pareto (a, c) y gráfica de interacción (b, d) para <i>S. cerevisiae</i> y <i>Candida</i> sp., respectivamente, para la remoción de nitrógeno amoniacal bajo las condiciones de estudio	53
Figura 8.8.	Diagrama de Pareto (a, c) y gráfica de interacción (b, d) para <i>S. cerevisiae</i> y <i>Candida</i> sp., respectivamente, para la remoción de nitratos bajo las condiciones de estudio	54
Figura 8.9.	Diagrama de Pareto (a, c) y gráfica de interacción (b, d) para <i>S. cerevisiae</i> y <i>Candida</i> sp., respectivamente, para la remoción de ortofosfatos bajo las condiciones de estudio	55
Figura 8.10.	Diagrama de Pareto (a, c) y gráfica de interacción (b, d) para <i>S. cerevisiae</i> y <i>Candida</i> sp., respectivamente, para la producción de etanol bajo todas las condiciones de estudio. Barras representan la concentración de glucosa consumida.	57
Figura 8.11.	Diagrama de Pareto (a, c) y gráfica de interacción (b, d) para <i>S. cerevisiae</i> y <i>Candida</i> sp., respectivamente, para la producción de ácido acético bajo todas las condiciones de estudio. Barras representan la concentración de etanol consumida.	58
Figura B.1.	Curvas de calibración para Glucosa (a), Xilosa (b) y Maltosa (c) empleadas en HPLC Perkin Elmer Flexar™	88
Figura B.2.	Curvas de calibración para Glucosa (a), Etanol (b), Ácido acético (c) y Glicerol (d) empleadas en HPLC WATERS U6K™	89
Figura B.3.	Curvas de calibración para Ácido acético (a) y Etanol (b) empleadas en GC Zebron ZB-WAXplus™	90

Índice de tablas

Tabla 6.1.	Composición bioquímica de algunas especies de microalgas	16
Tabla 7.1.	Parámetros físicos y químicos evaluados en el efluente secundario de la Planta de Agua Residual de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la UNAM	25
Tabla 7.2.	Métodos analíticos para la caracterización del caldo fermentativo	32
Tabla 7.3.	Matriz de experimentos para el tratamiento de agua residual y la producción de etanol simultánea con levaduras no convencionales	36
Tabla 8.1.	Resultados de las propiedades fisicoquímicas del agua residual de estudio .	37
Tabla 8.2.	Comparación de estudios con respecto al contenido bioquímico de consorcios de biomasa microalgal	39
Tabla 8.3.	Comparación de estudios para la extracción y sacarificación de biomasa microalgal pretratada para hidrólisis ácida	41
Tabla 8.4.	Características morfológicas de las levaduras silvestres aisladas y de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
Tabla 8.5.	Concentración y tasa de consumo de glucosa en el hidrolizado de microalgas empleando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo fermentador	51
Tabla 8.6.	Concentración y tasa de consumo de glucosa en el hidrolizado de microalgas empleando <i>Candida</i> sp. como organismo fermentador	51
Tabla 8.7.	Producción y rendimiento de etanol en la solución de hidrolizado de microalgas empleando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo fermentador	56
Tabla 8.8.	Producción y rendimiento de etanol en la solución de hidrolizado de microalgas empleando <i>Candida</i> sp. como organismo fermentador	56
Tabla 8.9.	Comparación de estudios para el rendimiento de etanol y producción de ácido acético mediante hidrolizado ácido microalgal	59

Capítulo 1

Introducción

La demanda energética mundial se ha incrementado por el rápido crecimiento socioeconómico, abasteciéndose principalmente de petróleo crudo, gas natural y carbón. Por su gran poder calorífico, disponibilidad y calidad de combustión, más del 81 % del suministro energético global proviene de estos combustibles fósiles (Du et al., 2016; IEA, 2017a). A pesar de lo anterior, su uso como fuente de energía primaria ha disminuido gradualmente en los últimos años por su lenta tasa de regeneración y alta emisión de gases de efecto invernadero (GEI) como dióxido de carbono, óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, etc. (EIA, 2018; Ho, Ngo, y Guo, 2014).

Por ende, el uso de fuentes de energías renovables ha sido ampliamente promovido con el objetivo de reducir el uso de combustibles fósiles y los problemas ambientales asociados a estos (Du et al., 2016; IEA, 2011; Naik, Goud, Rout, y Dalai, 2010). Actualmente, las fuentes de energías renovables representan 14 % del suministro energético mundial. De esta cantidad, más de 75 % proviene de materiales orgánicos de origen biológico o bioenergía (EIA, 2017; Ho et al., 2014; IEA, 2016, 2017a). Mediante el procesamiento de la bioenergía, se obtienen productos energéticos como biocombustibles o biocarburantes.

El bioetanol es uno de los biocarburantes más comunes y fáciles de adaptar en motores de combustión interna, sea puro o en mezcla con gasolina. Por su biodegradabilidad, nula toxicidad y baja emisión de contaminantes, hasta 96 % menos en comparación a la gasolina, representa una de las mejores alternativas para los vehículos de transporte (Parmar, Singh, Pandey, Gnansounou, y Madamwar, 2011; Posten y Schaub, 2009; Sirajunnisa y Surendhiran, 2016; Venkata Mohan, Rohit, Chiranjeevi, Chandra, y Navaneeth, 2015).

Los cultivos de maíz o caña de azúcar se emplean actualmente como materia prima para la producción de bioetanol de primera generación dado su gran contenido de almidón o sacarosa que pueden ser fácilmente fermentables por microorganismos. Sin embargo, una transición a

corto plazo hacia este tipo de biocombustible es limitada por las consecuencias socioeconómicas y ambientales que tendría a nivel mundial (Dutta, Daverey, y Lin, 2014; Morone y Cottoni, 2016).

El uso de biomasa lignocelulósica residual también se ha estudiado como un proceso alternativo para la producción de bioetanol. Esta biomasa presenta un alto contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, que necesita de un condicionamiento bioquímico o termoquímico para su fermentación. Si bien se ha reportado una amplia disponibilidad de materia prima, las tecnologías actualmente disponibles no se encuentran lo suficientemente desarrolladas para sustentar este proceso. Asimismo, esta segunda generación de bioetanol también depende de cultivos agrícolas para su producción, por lo que su implementación tendría impactos en el acceso a alimentos en algunos países en vías de desarrollo (Aditya, Mahlia, Chong, Nur, y Sebayang, 2016; Du et al., 2016; Magro, Decesaro, Berticelli, y Colla, 2016).

En consecuencia, el desarrollo de biocombustibles a partir de biomásas microbianas adaptadas o modificadas ha adquirido gran interés ya que prescinde del uso de suelo fértil o agua potable (Magro et al., 2016; Suali y Sarbatly, 2012). Estos biocombustibles de tercera generación se obtienen principalmente a partir de algas microscópicas o microalgas. Por su rápida tasa de crecimiento, alto contenido de carbohidratos y capacidad de crecimiento en diferentes tipos de agua, han sido propuestos como una gran oportunidad para la industria de biocombustibles (Behera et al., 2015; Dragone, Fernandes, Abreu, Vicente, y Teixeira, 2011; Dutta et al., 2014; Kumar Singh y Dhar, 2011).

La integración secuencial de tratamiento de agua residual con la producción masiva de biocombustibles se ha propuesto como una manera de mejorar la sustentabilidad y factibilidad económica en sistemas de crecimiento de microalgas. Actualmente se ha planteado el uso de levaduras como una alternativa para el tratamiento y producción de bioetanol de manera simultánea. Entre otros motivos, estos hongos presentan una tasa de crecimiento superior a las microalgas, una mayor facilidad de cultivo e incluso, bajo las condiciones adecuadas, una alta tasa de fermentación para la producción de etanol (Cai, Park, y Li, 2013; Cuellar-Bermudez et al., 2017; Mohd Azhar et al., 2017; Sankaran et al., 2010).

Capítulo 2

Antecedentes

Para el tratamiento secundario o biológico de aguas residuales, el uso de microorganismos como microalgas y/o levaduras representa una opción estratégica. Si bien es muy conocida la capacidad de remoción de nutrientes y acumulación de macromoléculas de interés comercial de las microalgas en agua residual, el uso simultáneo de levaduras permitiría una obtención de etanol con alto valor para la industria en un menor tiempo por su rápida tasa de crecimiento (incluso a pH menor a 5.0). Además, se lograría la obtención de cantidades considerables de biomasa útiles para sectores agroalimentarios.

Con la finalidad de determinar la factibilidad de integrar un sistema de tratamiento de aguas residuales domésticas con un sistema de producción de etanol para mejorar la sustentabilidad, Walls (2018) utilizaron un novedoso reactor no esterilizado con co-cultivos de consorcios de microalgas (predominantemente *Scenedesmus* sp.) y levaduras previamente aisladas de agua residual doméstica. En este estudio se confirmó la gran capacidad de remoción de nutrientes (96.0 % nitratos, 99.0 % nitrógeno amoniacal y 93.0 % ortofosfatos) y la alta productividad de biomasa de levaduras ($4.2 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$). Adicionalmente, la rápida proliferación de levaduras generó una reacción de fermentación aeróbica en el medio de cultivo, lo que confirmó entonces la factibilidad de este estudio para integrar los sistemas de tratamiento de agua residual y producción de bioetanol.

Guldhe, Ansari, Singh, y Bux (2017) estudiaron el potencial uso de agua residual de granjas acuícolas para el cultivo heterotrófico de microalgas *Chlorella sorokiniana* y como se modifica su tasa de crecimiento, eficiencia de remoción de nutrientes y composición de la biomasa con respecto a medios sintéticos de cultivo. Se encontró que los cultivos heterotróficos de *C. sorokiniana* producen hasta 2.47 g L^{-1} de biomasa en agua residual acuícola y 4.02 g L^{-1} en medio sintético BG11 con una eficiencia de remoción de 84.51 % para nitratos, 96.83 % para nitritos, 75.56 % para nitrógeno amoniacal y 73.35 % para fósforo. Para la biomasa generada se

obtuvo una productividad de $150.19 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $172.93 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $141.57 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de lípidos, carbohidratos y proteínas, respectivamente.

Ramsundar, Guldhe, Singh, y Bux (2017) valoraron el uso de diferentes efluentes procedentes de una planta de tratamiento de agua residual doméstica en diversos tipos de cultivo de *Chlorella sorokiniana*. Para este estudio se seleccionaron efluentes luego del tratamiento primario, secundario y terciario; además del licor de retorno de lodos activados. En el estudio se encontró que la presencia de bacterias y zooplancton puede competir por nutrientes y materia orgánica e incluso inhibir el crecimiento de microalgas. Por ende, fue necesaria una desinfección mecánica (filtración) para disminuir la carga bacteriana sin comprometer la disponibilidad original de nutrientes. El efluente del tratamiento secundario se observó como el mejor sustrato. Para cultivos heterotróficos, se obtuvo una productividad de biomasa de $76.25 \pm 3.54 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ con una tasa de remoción de 25.0 % para nitratos, 23.53 % para nitrógeno amoniacal, 25 % para nitritos y 83.81 % para ortofosfatos. Se obtuvo además $11.52 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $10.20 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $12.88 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para lípidos, carbohidratos y proteínas, respectivamente.

Paralelamente se evaluó la bioprospección de un consorcio de microalgas autóctonas de agua dulce para la acumulación de carbohidratos bajo condiciones de inanición y su uso como fuente de azúcares alternativos para obtener bioetanol en el estudio de Sanchez Rizza, Sanz Smachetti, Do Nascimento, Salerno, y Curatti (2017). Se lograron identificar 17 especies de las cuales una subespecie de *Desmodesmus* sp. y otra especie desconocida (SP-2), lograron una acumulación de carbohidratos en peso seco de hasta 70.4 % y 53.5 %m/m, respectivamente, luego de 10 días de cultivo. Se obtuvo además una productividad de hasta 0.24 g de etanol por g de biomasa con una concentración de 24 g de etanol por L de medio de cultivo al utilizar biomasa hidrolizada y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Dávila (2016) evaluó la generación de bioetanol utilizando biomasa de microalgas cultivada en agua residual y cosechada mediante ozonoflotación. Para este trabajo se llevó a cabo un monitoreo de la cantidad de nutrientes en agua residual, así como en el contenido de carbohidratos totales en la biomasa durante las fases de crecimiento, para determinar las condiciones de mayor productividad de biomasa y carbohidratos totales. Se alcanzaron remociones del 97.9, 80.0 y 93.1 % de nitrógeno amoniacal, nitratos y ortofosfatos, respectivamente. Para el caso de carbohidratos totales, se tuvo un aumento de 14.4 a 31.1 % debido a la fase de estrés a la que se expuso la cepa de microalga. Para lograr la fermentación alcohólica, se realizó una hidrólisis ácida con H_2SO_4 4 %v/v, en la cual se obtuvo una concentración de glucosa de 5.4 g L^{-1} en la solución de hidrolizado. Finalmente, se obtuvieron 1.8 g de etanol por L de medio de cultivo al utilizar la biomasa hidrolizada con un rendimiento de

3.6 % (g etanol g biomasa⁻¹).

Para optimizar la producción de etanol en reactores en continuo a altas temperaturas, [Tofghi, Mazaheri Assadi, Asadirad, y Zare Karizi \(2014\)](#) propusieron aislar y caracterizar levaduras nativas etanologénicas, osmotolerantes y termotolerantes preexistentes en agua residual industrial de una planta procesadora de almidón. Se encontraron un total de tres especies de levaduras (dos subespecies de *Candida tropicalis* y una de *S. cerevisiae*) de rápido metabolismo y alta tasa de producción de etanol hasta a 45. De estas especies, *S. cerevisiae* demostró no solo resistencia a altas concentraciones de sustrato (180 g L⁻¹ de glucosa) sino la mejor capacidad de producción de etanol (6.9 % m/v) con una tasa de conversión glucosa-etanol de 75 % y una producción de biomasa de 25.0g L⁻¹ .

[Wongkarnka \(2005\)](#) realizó una serie de experimentos a escala laboratorio de manera continua y en lote para determinar la capacidad de tratamiento de levaduras aerobias en agua residual industrial. Se estudió la capacidad de remoción de demanda química de oxígeno (DQO) y las mejores condiciones de operación (pH y temperatura) para el crecimiento de *Candida guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. utilis*. Se obtuvo que bajo las siguientes condiciones de operación: Temperatura 30 , pH de 4.0 a 4.5, tiempo de retención celular de 36 horas, se logró una tasa de remoción del DQO de hasta 90 % en todas las especies de levaduras, con producción de 3.4 a 4.3 g L⁻¹ de biomasa cultivada.

[Arnold, Knapp, y Johnson \(2000\)](#) evidenciaron la capacidad de hongos filamentosos y levaduriformes para reducir el potencial de contaminación de efluentes ensilados. En este estudio se aislaron diferentes especies de levaduras (*C. utilis*, *Galactomyces geotrichum*, entre otras) preexistentes en el efluente de agua y se determinó su tasa de remoción de DQO, concentración de carbono orgánico total (COT), nitrógeno amoniacal y fosfatos. Ambas especies de levaduras lograron una reducción de 74-79 % de DQO, 60-78 % de COT, 60 % de nitrógeno amoniacal y 98 % de fosfatos en diluciones 1:1 de agua residual con agua corriente. Se obtuvo hasta 7.0 y 8.6 g L⁻¹ de biomasa en seco para *C. utilis* y *G. geotrichum*, respectivamente.

[Thanh y Simard \(1973\)](#) documentaron las prometedoras ventajas del uso de levaduras (género *Rhodotorula*, basidiomicetos) para el tratamiento secundario de aguas residuales industriales. En este estudio, se evaluó la capacidad de 27 especies de levaduras para reducir fosfatos, nitrógeno amoniacal y materia orgánica presente en agua residual doméstica para producir biomasa de alto contenido proteico. La remoción de DQO, nitrógeno total, amoniacal y fosfatos fue de 0 a 72 %, 22 a 93 %, 27 a 90 % y 12 a 100 %, respectivamente. Se obtuvo adicionalmente hasta 10.0 g L⁻¹ de biomasa en seco para *Rhodotorula* spp. Asimismo, la fuente de carbono seleccionada

(glucosa) fue definida como un factor limitante en el desarrollo poblacional de las levaduras y en la factibilidad del proceso unitario.

Capítulo 3

Objetivos

3.1. Objetivo general

- Determinar las especies de levaduras silvestres idóneas para producir etanol y reducir la contaminación por nutrientes en agua residual empleando biomasa de cultivos de microalgas predominantemente *Scenedesmus* sp. como fuente de carbono

3.2. Objetivos específicos

- Aislar e identificar los géneros de levaduras silvestres encontradas en el agua residual de estudio
- Verificar la capacidad fermentativa de las levaduras aisladas por medio de cultivos axénicos en agua residual doméstica enriquecida con glucosa
- Generar biomasa de microalgas a partir de agua residual de estudio y caracterizar el contenido de monosacáridos presentes en el hidrolizado ácido microalgal obtenido a partir de hidrólisis ácida
- Comparar la producción neta de etanol y la tasa de remoción de nitrógeno amoniacal, nitratos y ortofosfatos entre la especie de levadura silvestre con mayor rendimiento etanológico y *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación del hidrolizado ácido de microalgas

Capítulo 4

Hipótesis

Emplear levaduras silvestres etanológicas procedentes de agua residual doméstica tratada permitirá obtener un rendimiento de etanol y de remoción de contaminantes (principalmente nitrógeno y fósforo) similar a *Saccharomyces cerevisiae* durante los procesos de fermentación de biomasa microalgal pretratada.

Capítulo 5

Alcance

Generar simultáneamente productos de mayor valor agregado y reducir la contaminación por nutrientes de aguas residuales domésticas en un proceso en el cual se genera biomasa a partir de un cultivo de microalgas predominantemente *Scenedesmus* sp., la cual es posteriormente cosechada e hidrolizada para finalmente obtener azúcares fermentables con la finalidad de producir etanol empleando levaduras silvestres no convencionales.

Capítulo 6

Marco Teórico

6.1. Levaduras. Generalidades

Las levaduras son hongos unicelulares eucariontes microscópicos capaces de reproducirse asexual o sexualmente por la formación de esporas fuera del esporocarpo Figura 6.1. Estos hongos también son dimórficos, ya que pueden proliferar de manera levaduriforme o formar largas cadenas de células en gemación llamadas hifas o pseudohifas. Una primera distinción de estos hongos microscópicos es la forma en que producen esporas para su reproducción con basidios (*Basidiomycota*) o con micelio (*Ascomycota*). En caso que carezca de una fase de reproducción sexual en su ciclo de vida, se consideran como deuteromicetos o (*Fungi imperfecti*) (Kurtzman, Fell, y Boekhout, 2011a; Mohd Azhar et al., 2017).



Figura 6.1. Crecimiento levaduriforme de *Saccharomyces cerevisiae* en agua residual (100x)

Los ascomicetos son levaduras donde las esporas sexuales o ascosporas se producen dentro de una célula sexual en forma de saco llamada asca, la cual generalmente contiene hasta ocho ascosporas. Por otra parte, los basidiomicetos producen células sexuales o basidiosporas en estructuras extracelulares elongadas llamadas basidios, los cuales presentan hasta cuatro esterigmas o filamentos que unen al basidio con las basidiosporas. Dependiendo de factores como especie, nutrición y edad, el tamaño de las levaduras es de 1-10 μm de ancho y 2-20 μm de longitud (Boekhout y Kurtzman, 1996).

Por otra parte, en levaduras *Fungi imperfecti* la gemación y la fisión binaria representan los métodos de reproducción asexual más comunes. La gemación es un proceso de división asimétrico donde se forma una prominencia nucleada de menor tamaño que se desprende paulatinamente, mientras que la fisión binaria es un proceso de división donde se generan dos células hijas del mismo tamaño (Mohd Azhar et al., 2017; Yeong, 2005). Se ha observado que las células diploides levaduriformes modifican su forma de reproducción en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, siendo sexual bajo condiciones de nutrición pobres y asexual durante periodos de gran abundancia de nutrientes (Neiman, 2005).

De manera general, las levaduras pertenecientes a la familia *Saccharomycetaceae* presentan un metabolismo quimiorganotrófico, es decir, utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía y no requieren de luz solar para su crecimiento. Su principal fuente de carbono son monosacáridos (glucosa, fructosa), disacáridos (sacarosa, maltosa) y ribosa, alcoholes y ácidos orgánicos en algunas especies. Adicionalmente, pueden llevar a cabo la respiración celular (aerobias estrictas) o bien pueden tener un metabolismo fermentativo (anaerobia facultativa) (Carrillo et al., 2007).

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en todas las áreas bióticas del planeta, desde los niveles más altos de la atmósfera (por encima de las nubes estratosféricas) hasta en las partes más profundas de los océanos, en acuíferos debajo del mar, glaciales, en la piel humana y la filósfera (Starmer y Lachance, 2011). Su ubicuidad y capacidad fermentativa han hecho a estos microorganismos muy populares en la producción, enriquecimiento y preservación de alimentos. Durante siglos, se ha utilizado para la producción de etanol, proteínas, hormonas esteroideas, colorantes (astaxantina, carotenos) y forraje. El género *Saccharomyces* representa una de las categorías taxonómicas de levaduras dominantes sobre cualquier proceso fermentativo natural o espontáneo. La capacidad de una especie en particular, *S. cerevisiae*, de acumular altas concentraciones de etanol (18 % v/v) y proliferar bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis le han conferido su condición de cultivo iniciador universal de fermentaciones o levaduras convencionales (Lin y Tanaka, 2006).

En la actualidad, nuevas aplicaciones industriales, como la producción de bioetanol, requiere de organismos etanogénicos más eficientes, termotolerantes, osmotolerantes y resistentes a factores de estrés como acidez, temperatura, compuestos inhibitorios o citotóxicos. Por tal motivo, se han explorado nuevas alternativas microbianas (especialmente levaduras) para mejorar la viabilidad económica de los procesos fermentativos industriales. La bioprospección de estas nuevas especies de levaduras ha recibido el nombre de levaduras silvestres, no convencionales o no-*Saccharomyces*. Esto se debe principalmente a que la evolución de estas especies ocurrió de manera independiente a las levaduras convencionales y poseen mecanismos de crecimiento únicos y novedosos aún por estudiarse (Deparis, Claes, Foulquié-Moreno, y Thevelein, 2017; Radecka et al., 2015).

Históricamente las levaduras no convencionales se han asociado a microorganismos descomponedores de alimentos por su rápido crecimiento, en comparación a *Saccharomyces*, durante la fermentación espontánea. Si bien influyen en gran medida en este proceso natural, las condiciones desfavorables (cambios de temperatura, pH, oxígeno, concentración de alcohol) que se generan como consecuencia de su crecimiento producen la autólisis celular. Estos nutrientes liberados al medio son después aprovechados por levaduras convencionales como sustratos de crecimiento celular. A pesar de lo anterior, algunas especies exhiben capacidades de gran interés industrial como crecimiento en sustratos complejos, tolerancia a condiciones de estrés y compuestos inhibidores de la fermentación. Diferentes estudios han reportado condiciones etanogénicas exitosas en especies dentro de los géneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Dekkera/Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, entre otras. Sin embargo, su implementación en fermentaciones industriales se limita por el escaso conocimiento técnico y la baja capacidad fermentativa real de algunas especies (Brexó y Sant'Ana, 2017; Radecka et al., 2015).

6.2. Microalgas. Generalidades

Consideradas como un grupo de microorganismos acuáticos presentes en diferentes formas y tamaños, las microalgas son esencialmente especies talofitas (Fig. 6.2) y poseen un pigmento fotosintético primario conocido como clorofila *a* (Dragone et al., 2011; Lee, 2007). Aunque se encuentran muy comúnmente en ambientes acuáticos, las microalgas sobreviven en hábitats terrestres como en suelos, desiertos, pantanos, rocas e incluso en simbiosis con líquenes. Estos microorganismos funcionan no solo como productores primarios en la cadena trófica sino como fuentes de oxígeno para el metabolismo de los organismos consumidores.

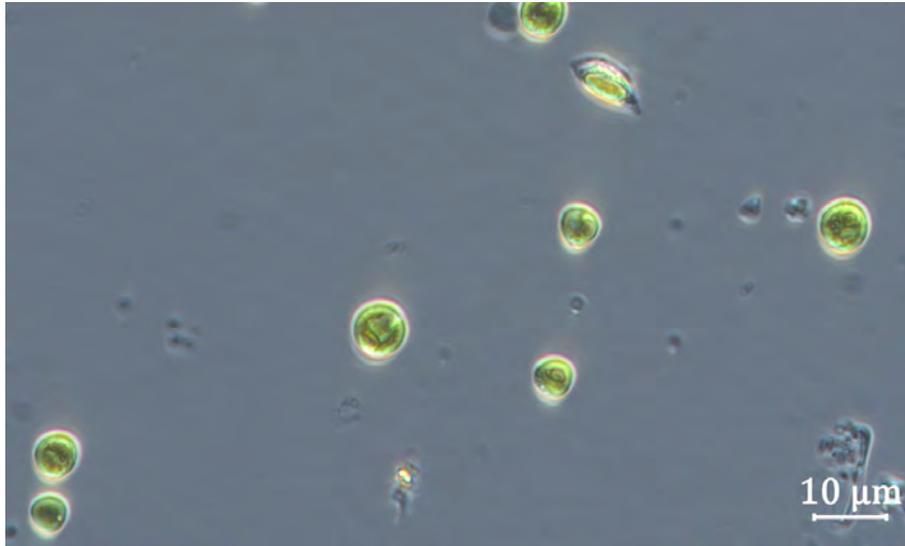


Figura 6.2. Cultivo de microalgas en agua residual observadas al microscopio (100x)

Dragone et al. (2011) y Tomaselli (2007) mencionan que las microalgas se han clasificado tradicionalmente de acuerdo a su color. Sin embargo, los sistemas de clasificación taxonómica más actuales consideran otros criterios como el tipo de pigmentos, la composición química, la estructura flagelar, esquema y ruta de la división celular, etc. Bajo estos criterios, se han logrado identificar una gran cantidad de especies, siendo la más común el fitoplancton. Adicionalmente, dentro de las microalgas se encuentran especies procariotas y eucariotas.

Las microalgas tienen la capacidad de sintetizar sus nutrientes tanto autotrófica como heterotróficamente de acuerdo con Brennan y Owende (2010); Lee (2007) y Perez-Garcia, Escalante, De-Bashan, y Bashan (2011). La autotrofia o fototrofia consiste en la obtención de los requerimientos nutricionales y energéticos a partir de compuestos inorgánicos como CO_2 y de luz, respectivamente. La heterotrofia, a su vez, consiste en la capacidad de ciertas especies de microalgas de mantener un crecimiento estable y sostenido en ausencia de luz a partir de hexosas, ácidos orgánicos, alcoholes u otros compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Un caso en particular es la glucosa, una de las fuentes de carbono más comunes para el cultivo heterotrófico de microalgas.

La glucosa es una molécula que no es capaz de difundirse de manera pasiva a través de la membrana plasmática de las células de microalgas por la distribución espacial de sus átomos. En consecuencia, ciertos géneros de microalgas (*Chlorella*, *Tetraselmis*, *Nitzschia*, etc.) se han adaptado para crecer en heterotrofia usando un sistema de cotransporte activo hexosa-protones. Este sistema, sintetizado por una proteína simporte llamada *Hexose Uptake Protein* (*hup1* por sus

siglas en inglés), disminuye el potencial de membrana de la célula a causa del transporte de protones y, en consecuencia, incrementa la permeabilidad de la membrana celular que permite la entrada de glucosa al medio intracelular (Perez-Garcia et al., 2011).

Se ha determinado además que ciertos tipos de microalgas son mixotróficas, es decir, combinan ambas capacidades de síntesis de nutrientes para alimentarse (Perez-Garcia et al., 2011). Hay que destacar que el crecimiento de las microalgas dependerá en gran medida de las condiciones ambientales y cada uno de estas capacidades de alimentación (autótrofo, heterótrofo, mixotrófico) definirá tanto la composición química como los productos metabólicos celulares (Perez-Garcia et al., 2011; Sharma, Sahoo, Singhal, y Patel, 2016).

De acuerdo con Carvalho, Monteiro, y Malcata (2009); Geider y La Roche (2002) y Paes et al. (2016), el contenido bioquímico de las microalgas puede variar por factores como condiciones ambientales, temperatura, intensidad de la luz y estado fisiológico. Una recopilación sobre la composición media de varias especies de microalgas realizada por Becker (2007) (Tabla 6.1) pudo determinar que lípidos, carbohidratos y proteínas representan hasta el 99 % de la biomasa total seca. El resto, se distribuye en otras moléculas como vitaminas, pigmentos, glicerol y aminos.

Dentro de estas tres principales clases de macromoléculas, los carbohidratos representan un grupo importante al ser no solo el punto de inicio para la síntesis de lípidos y proteínas, sino también un compuesto fácilmente procesado por hidrólisis y fermentación para la producción de biocarburantes (Juneja, Ceballos, y Murthy, 2013; Williams y Laurens, 2010). Adicionalmente, esta macromolécula cumple funciones metabólicas y estructurales básicas en las células. Si bien la composición de los carbohidratos puede variar entre especies, la glucosa, galactosa, manosa y ribosa son los monosacáridos más comunes (Hernández, 2017; Williams y Laurens, 2010). Se han reportado algunas especies de microalgas que pueden acumular hasta 60 % de carbohidratos en forma de almidón, el cual puede ser transformado en bioetanol (Juneja et al., 2013; Suali y Sarbatly, 2012).

Al igual que los carbohidratos, las proteínas también tienen funciones metabólicas y estructurales importantes dentro de las células de las microalgas. Aunque estas macromoléculas estén compuestas por diferentes tipos de aminoácidos, el contenido, proporción y disponibilidad de los nutrientes (en especial nitrógeno) así como otros factores ambientales, determinarán su porcentaje relativo en las microalgas (Becker, 2007; Suali y Sarbatly, 2012; Williams y Laurens, 2010). Las proteínas también funcionan como catalizadores enzimáticos del metabolismo celular y la formación del soporte para las moléculas de clorofila (Hernández, 2017).

Tabla 6.1. Composición bioquímica de algunas especies de microalgas

Microalga	Proteínas (% ¹)	Carbohidratos (% ¹)	Lípidos (% ¹)
<i>Anabaena cylindrica</i>	43 - 56	25 - 30	4 - 7
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 - 58	12 - 17	14 - 22
<i>Euglena gracilis</i>	39 - 61	14 - 18	14 - 20
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 - 56	10 - 17	12 - 14
<i>Spirogyra</i> sp.	6 - 20	33 - 64	11 - 21
<i>Spirulina platensis</i>	46 - 63	8 - 14	4 - 9

Porcentaje base seca

Los lípidos presentes en las microalgas también funcionan como reservas de energía y soporte estructural dentro de las células. Compuestos como los fosfolípidos y los glucolípidos son los principales componentes de la pared celular y determinan la facilidad de extracción de los metabolitos intracelulares (Rawat, Ranjith Kumar, Mutanda, y Bux, 2013; Williams y Laurens, 2010). Si bien la proporción de lípidos en microalgas varía de acuerdo a su género, especie e incluso a las condiciones de cultivo, es común encontrar lípidos neutros, polares, ésteres cerosos, esteroides e hidrocarburos (Hernández, 2017; Juneja et al., 2013). Los ácidos grasos constituyen hasta el 80 % del contenido total de lípidos en las microalgas y estos pueden ser saturados, insaturados o poliinsaturados (Rawat et al., 2013; Williams y Laurens, 2010). Para la producción de biocombustibles aquellos con mayores niveles de insaturación (poliinsaturados) son los que determinan su viabilidad como materia prima, así como su productividad y calidad (Hernández, 2017; Juneja et al., 2013; Rawat et al., 2013; Williams y Laurens, 2010).

6.3. Biocombustibles

Los biocombustibles o biocarburantes representan una de las fuentes de energía más sustentables para el futuro cercano de acuerdo con Aguillón, Islas, Martínez, Riegelhaupt, y Alternasindd (2010); Nigam y Singh (2011); Parmar et al. (2011) y Posten y Schaub (2009). Estos son combustibles obtenidos a partir de alcoholes, ésteres, éteres y otras biomoléculas provenientes de material biológico residual (biomasa), productos agrícolas y desechos industriales. Cuando se hace referencia a este tipo de carburantes se engloban en todos sus estados de agregación: líquidos, gaseosos o sólidos. Aunque a nivel mundial se han adoptado diferentes medidas para promover y desarrollar el uso eficiente de este tipo de combustible, factores como materia prima

disponible, ubicación, agendas políticas y desarrollo científico-tecnológico hacen de la incorporación de los biocombustibles al mercado económico mundial un enorme reto multidisciplinario (Aguillón et al., 2010; IEA, 2017a; Nigam y Singh, 2011). Actualmente los biocombustibles líquidos son los más estudiados y de mayor interés tecnológico y comercial.

6.3.1. Biocombustibles líquidos

Son aquellos obtenidos a partir de materia biológica procesada y/o producida en forma líquida para emplearse en motores Otto y Diésel (solos o en mezcla con gasolina/diésel convencional), para producir electricidad y calor en generadores e incluso para trabajos mecánicos en motores industriales (Aguillón et al., 2010; Chakraborty et al., 2012; Day, Tseng, Puyol, y Nissan, 2015; IEA, 2017b; Nigam y Singh, 2011). En la actualidad, la principal forma de uso de estos combustibles es mediante aceites vegetales esterificados (biodiésel) y alcohol etílico carburante (bioetanol). Estos, a su vez, se clasifican sucesivamente de acuerdo con el tipo de material biológico utilizado y a la tecnología empleada para su producción, en primera, segunda, tercera y cuarta generación.

Clasificación de los biocombustibles líquidos

Los biocombustibles de primera generación son aquellos producidos comúnmente a partir de cultivos agrícolas para consumo humano con alto contenido de azúcares, granos o semillas que requieren de un proceso bastante simple para obtener el aceite o combustible final (Chakraborty et al., 2012; Nigam y Singh, 2011). La caña de azúcar, el aceite de girasol, aceite de cacahuete, las semillas de algodón, entre otros son algunos ejemplos de materia prima utilizada. Algunos de los procesos para obtener este tipo de combustible son bastante tradicionales y/o convencionales. Como ejemplo encontramos la transesterificación con catalizadores homogéneos o heterogéneos para la producción de biodiésel y la fermentación alcohólica para la producción de bioetanol de acuerdo con Medina, Ospino, y Tejeda (2015); Naik et al. (2010) y Vázquez y Dacosta (2007).

A pesar de que actualmente son producidos en cantidades comercialmente significativas alrededor del mundo por su fácil procesamiento y relativamente baja emisión de GEI, su sustentabilidad es cuestionable (Chakraborty et al., 2012; Fargione, Hill, Tilman, Polasky, y Hawthorne, 2008; Mohr y Raman, 2013). A grandes rasgos, esta generación de combustibles: compete activamente por el uso de agua y suelo para la producción de cultivos alimenticios, es de gran costo y procesamiento por lo que requiere de grandes subsidios gubernamentales para competir con las fuentes fósiles, posee una tasa de reducción de GEI bastante variable luego de

considerar el cambio de uso de suelo y pone en riesgo la conservación de la biodiversidad y la conservación del agua por el uso intensivo de monocultivos.

Los de segunda generación son aquellos producidos comúnmente a partir de materia prima no comestible como los residuos de cultivos agrícolas, forestales o de biomasa lignocelulósica de plantas no comestibles (p. ej. paja de trigo, aserrín, hojarasca, rastrojos de maíz, etc.) según [Chakraborty et al. \(2012\)](#) y [Nigam y Singh \(2011\)](#). Los procesos de conversión termoquímica (gasificación/pirólisis de la materia prima para producir biocombustibles de cadenas de carbono largas) y bioquímica (catálisis enzimática de la materia prima para producir azúcares fermentables) son las principales rutas de obtención de biocarburantes de esta generación ([Naik et al., 2010](#); [Nigam y Singh, 2011](#)). Si bien la materia prima lignocelulósica crece en suelos pobres en nutrientes, no pone en peligro la disponibilidad de cultivos alimenticios para consumo y mejora la calidad del agua y del suelo por sus mínimos requerimientos de pesticidas y fertilizantes; su principal desventaja es el bajo costo-efectividad, la alta tecnología requerida y el gran tamaño de las instalaciones necesarias para obtener este biocombustible ([Chakraborty et al., 2012](#); [Nigam y Singh, 2011](#)).

Los de tercera generación son aquellos producidos a partir de biomasa acuática, es decir, biomasa microbiana (cianobacterias) o de microalgas con una alta densidad energética almacenada en su composición molecular ([Arthur Lee y Lavoie, 2013](#); [Saladini, Patrizi, Pulselli, Marchettini, y Bastianoni, 2016](#); [Singh, Olsen, y Nigam, 2011](#)). Los sistemas que producen este tipo de biocombustibles pueden dividirse en dos partes principales: fase de crecimiento natural o cultivo de biomasa acuática y fase de cosecha de la materia prima para biocombustibles. Incluso, al igual que los biocombustibles de segunda generación, la fase productiva puede ser termoquímica o bioquímica. Esta generación de biocombustibles tiene como principales ventajas eliminar la competencia por el suelo para su crecimiento y un balance positivo en la emisión de GEI (por la fijación de dióxido de carbono para la producción de insumos). Sin embargo, al depender de la producción de las macromoléculas de microorganismos, su implementación se ve limitada a ciertas especies de microalgas, por las tecnologías de cultivo y cosecha disponibles de acuerdo con [Arthur Lee y Lavoie \(2013\)](#) y [Saladini et al. \(2016\)](#).

6.4. Bioetanol. Generalidades

El etanol carburante es un líquido claro e incoloro considerado como uno de los combustibles alternos más comunes e importantes en el mundo. Cuando se produce a partir de materia orgánica o biomasa rica en carbohidratos recibe el nombre de bioetanol. Es uno de los tipos de alcoholes más simples de producir por la fermentación de azúcares disponibles en materia prima como caña de azúcar, cereales, maíz, entre otros (Lee, 2007). En comparación con la gasolina, el etanol es considerado una alternativa mucho más limpia y renovable debido a su número alto de octanaje, alta entalpía de evaporización y baja presión de vapor. Por estos motivos puede ser empleado directamente como combustible en vehículos o como agente oxigenante en la gasolina, logrando mejorar la oxidación de los hidrocarburos y reducir la generación de compuestos aromáticos y monóxido de carbono por combustión. Para su uso como combustible en motores de combustión interna, el bioetanol debe contar con un contenido de humedad menor al 0.7 % y una pureza mayor al 99.3 % del volumen total (Cardona, Sánchez, y Gutiérrez, 2010; Thangavelu, Ahmed, y Ani, 2016).

El proceso para producir etanol depende en gran medida del tipo de materia prima que se desea emplear. De acuerdo con Thangavelu et al. (2016), existen tres pasos importantes para su producción a partir de microalgas: obtención de una solución con azúcares fermentables (hidrólisis), conversión de azúcares en etanol (fermentación), purificación del etanol y, en ocasiones, tratamiento del efluente o vinazas. Previo a estos pasos, se realiza frecuentemente un pretratamiento a la materia prima para facilitar los procesos sucesivos. A continuación, se describen las etapas más importantes.

6.4.1. Pretratamiento

El pretratamiento tiene un efecto significativo sobre el proceso en general, que facilita la hidrólisis y producen grandes cantidades de azúcares fermentables. También tiene un grado de influencia en el rendimiento productivo de alcohol y en los costos de producción. De acuerdo con Mohd Azhar et al. (2017), los métodos de pretratamiento consisten en operaciones físicas, procesos químicos, biológicos y fisicoquímicos. El pretratamiento físico o mecánico consiste en la molienda en polvo o *pellets* para utilizarse como sustrato por trituradores, microondas y ultrasonidos, mientras que el pretratamiento químico se basa en la lisis de las células por ozonólisis, hidrólisis (ácida o alcalina) y órganosolventes. El pretratamiento biológico se basa en el uso de diferentes especies fúngicas para degradar los sustratos y finalmente el pretratamiento fisicoquímico incluye procesos novedosos como la explosión de fibras con solución de amoníaco y vaporización.

6.4.2. Hidrólisis

Este proceso se lleva a cabo luego del pretratamiento para degradar la materia prima en azúcares fermentables para la producción de bioetanol. Los métodos más comunes son la hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. La hidrólisis ácida es considerada una de las más antiguas y puede llevarse a cabo con ácidos diluidos o concentrados. La hidrólisis ácida diluida se realiza a altas temperaturas utilizando concentraciones muy bajas de ácidos inorgánicos mientras que la hidrólisis ácida concentrada utiliza bajas temperaturas de operación a concentraciones altas de ácidos. Aunque en este proceso se recupera una gran cantidad de azúcares (90 %) en un menor periodo de tiempo, su principal desventaja es la dificultad de recuperar y reciclar el ácido, haciendo el proceso muy poco económico (Jeffries y Jin, 2000; Joshi, Raj, Dinita, Jarina, y Rajani, 2011).

La hidrólisis enzimática por su parte requiere de enzimas para hidrolizar la materia prima en azúcares fermentables. Existen tres tipos de enzimas: las endo- β -1,4-glucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas. La concentración y la fuente de dichas enzimas determinan la intensidad de la actividad enzimática del proceso. Por ejemplo, la celulosa es degradada a azúcares reductores en condiciones de pH (4.8-5.0) y temperatura (45-50) moderadas. Adicionalmente, la hidrólisis enzimática no genera problemas de corrosión en los reactores, por lo que es posible obtener un alto rendimiento de conversión de azúcares. La eficiencia de este tipo de hidrólisis depende de condiciones óptimas como temperatura, tiempo, pH, carga enzimática y concentración del sustrato. La cantidad de azúcares fermentables que se obtienen incrementan a medida que la carga enzimática se incrementa mientras que la carga celulósica disminuye. A pesar de lo anterior, la más grande desventaja de este tipo de hidrólisis es el costo de las enzimas (Canilha et al., 2012; Joshi et al., 2011).

6.4.3. Fermentación

El proceso fermentativo consiste en la conversión de los monosacáridos obtenidos con anterioridad en alcohol por acción de bacterias o levaduras (*Saccharomyces*, *Zymomonas*, etc.). Una de las principales limitaciones de la fermentación es la generación de subproductos (compuestos degradados) que inhiben la producción de bioetanol como son ácidos débiles, furanos y/o fenoles. Canilha et al. (2012) y Chandel et al. (2007) han sugerido tanto la Hidrólisis y Fermentación Simultánea (HFS) como la Hidrólisis y Fermentación Secuencial (HFSe) para disminuir la producción de subproductos inhibitorios, siendo reportado el HFSe como el mejor proceso para la producción de bioetanol.

Empleado usualmente para estudiar y optimizar las condiciones de operación (pH, temperatura, tiempo de reacción) la HFSe se realiza en reactores por separado de manera tal que se produzcan más sustratos de manera eficiente para su fermentación. Sin embargo, este proceso es mucho más laborioso y poco económico al requerirse altas cargas de reactivos para el hidrolizado y poco sustrato para obtener una eficiente productividad de etanol, de acuerdo con [Mohd Azhar et al. \(2017\)](#). Adicionalmente, se requiere un tiempo de reacción mayor para eliminar la contaminación y algunos subproductos del sustrato hidrolizado. Caso contrario, la HFS resulta un proceso estratégico para eliminar la contaminación y los subproductos del sustrato hidrolizado en un mismo reactor, donde estos últimos son progresivamente asimilados por el organismo fermentador, produciendo una mayor concentración de bioetanol en comparación al HFSe. Aunque el costo y tiempo de reacción del HFS sea mucho menor al llevarse a cabo en un solo reactor, este procesamiento simultáneo requiere de condiciones de operación y recuperación de metabolitos cuya optimización y escalamiento resulta un gran reto para la producción masiva del combustible ([Danquah, Liu, y Haru, 2011](#); [Sirajunnisa y Surendhiran, 2016](#)).

6.4.4. Separación y purificación del etanol

La recuperación del etanol representa uno de los pasos de mayor importancia para determinar la factibilidad técnica y económica de la producción de bioetanol. De acuerdo con [Balat, Balat, y Öz \(2008\)](#), las tecnologías más comunes para esto son la destilación y la centrifugación. Para los casos en donde los subproductos de la fermentación son más volátiles que el agua, se utiliza con mayor frecuencia la destilación. Los sistemas de destilación permiten la separación del bioetanol en mezclas con agua (o azeotrópicas) debido a la diferencia entre los puntos de ebullición de estos dos líquidos. Este proceso genera un gas de etanol, el cual es condensado por una corriente de agua fría y concentrado en una columna de rectificación hasta un 95 %. Procesos más avanzados como la desorción de gases o stripping permiten obtener una concentración arriba del 99 % ([Balat et al., 2008](#); [Kwiatkowski, McAloon, Taylor, y Johnston, 2006](#)). Por otra parte, la centrifugación es otro proceso simple que permite separar principalmente las fracciones sólidas y líquidas más densas que el etanol. Sin embargo, en este proceso se logra obtener un etanol purificado de entre 15 y 20 % ([Mcaloon, Taylor, Yee, Ibsen, y Wooley, 2000](#)).

6.4.5. Tratamiento del efluente

Durante el proceso de refinación del etanol se acumulan una importante cantidad de residuos conocidos como vinazas, melazas o bagazos. Estos residuos, considerados como altamente corrosivos y contaminantes para el ambiente, son ricos en compuestos no volátiles presentes en

los tanques de fermentación, proteínas de levaduras, fragmentos de células, compuestos fenólicos y materia orgánica. Usualmente el tratamiento de las vinazas consiste en emplearlos como agentes de fertirrigación (irrigación de campos con agua rica en nutrientes como fertilizante) en tierras empleadas para fines agrícolas. Sin embargo, estas prácticas se han asociado a problemas de eutrofización y al incremento en la demanda de oxígeno en fuentes de agua superficiales o subterráneas en zonas rurales. A causa del incremento de la producción de etanol en los últimos años, alternativas sostenibles para el aprovechamiento de las vinazas han sido estudiadas exhaustivamente como fermentación anaerobia (metano), fermentación aerobia (proteínas unicelulares) y combustión (fertilizantes) que permitan mejorar, además, la factibilidad técnico-económica de la industria del bioetanol (España-Gamboa et al., 2011; Reis, Bento, Alves, Carvalho, y Castro, 2019).

Capítulo 7

Materiales y Métodos

La fase experimental se resume en la figura 7.1. La caracterización fisicoquímica del agua residual de estudio y cultivo de microalgas fue realizada en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM. El aislamiento y caracterización de los géneros de levaduras no convencionales presentes en el agua residual se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Por su parte, la identificación molecular fue realizada por la Colección Nacional de Cepas Microbianas Celulares del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

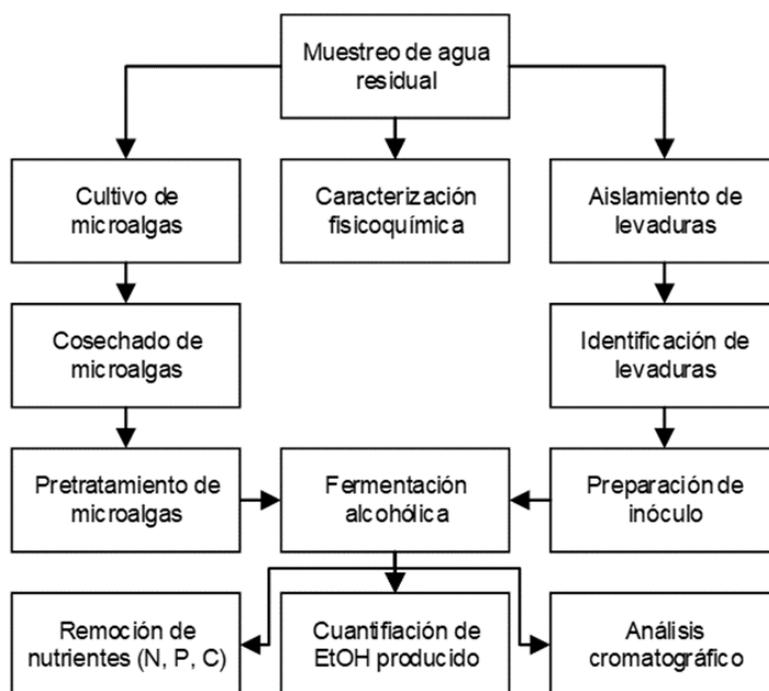


Figura 7.1. Diagrama general de la metodología experimental

El secado de la biomasa microalgal y el análisis de glucosa residual, etanol y ácido acético procedentes de la caracterización fermentativa fue realizada en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Finalmente, el pretratamiento de la biomasa microalgal y la fermentación alcohólica de la biomasa microalgal pretratada se llevó a cabo en el Laboratorio de Fabricación de Electroquímicos de la Universidad de Newcastle, Newcastle-upon-Tyne, Reino Unido. En las secciones sucesivas se describen los aspectos y procedimientos analíticos más importantes que se utilizaron en el estudio.

7.1. Muestreo y caracterización del agua residual doméstica de estudio

Se empleó agua residual doméstica para el crecimiento de un cultivo microalgal, así como para el aislamiento de levaduras silvestres. El agua residual doméstica provino del colector del efluente secundario de la Planta de Tratamiento de Agua Residual de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales (PTAR FCPyS, figura 7.2) ubicada en Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México. Se tomaron seis muestras puntuales y representativas de esta agua residual en intervalos de dos semanas durante los meses de febrero a abril de 2018, en conformidad con lo sugerido por la norma NMX-AA-003-1980. Dichas muestras fueron tomadas de puntos con flujo turbulento empleando recipientes previamente enjuagados con el agua por muestrear. Estas muestras fueron colectadas en bidones de polietileno de alta densidad (HDPE por sus siglas en inglés) de 20.0 L. Las muestras se conservaron a 4.0 hasta su uso.



Figura 7.2. Planta de Tratamiento de Agua Residual Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la UNAM (a) y Tanque de almacenamiento del efluente secundario (b)

En la tabla 7.1 se resumen los métodos analíticos que se utilizaron para determinar las características fisicoquímicas de cada una de las seis muestras de agua residual antes de iniciar la fase experimental. Para evitar alteraciones en las pruebas, el agua residual fue previamente filtrada al vacío usando papel Whatman™ 40 con un tamaño de poro de 8.0 μm . Para la determinación de carbohidratos totales por el método fenol-sulfúrico, se realizó una curva de calibración con soluciones de glucosa de 0 a 100 g L^{-1} . En caso de ser necesario, se realizaron diluciones con agua destilada para asegurarse que las concentraciones obtenidas se encontraran dentro del intervalo de medición en los equipos utilizados.

Tabla 7.1. Parámetros físicos y químicos evaluados en el efluente secundario de la Planta de Agua Residual de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la UNAM

Parámetro	Método	Instrumento/Equipo	Referencia
Temperatura	2550B	Termómetro Brannan LO-tox	
Sólidos suspendidos totales (SST)	2540D	Estufa Thermo Scientific Precision Econotherm	
pH	4500-H ⁺ B	Medidor de pH Thermo Scientific Orion Star A211	APHA-AWWA-WPCF (2005)
Amoniac-Nitrógeno (NH ₃ -N)	4500-NH ₃ C	Destilador BÜCHI B-324	
Carbohidratos totales (CHO)	Fenol-Sulfúrico		DuBois et al. (1956)
Turbidez	2130B	HACH DR3900	APHA-AWWA-WPCF (2005)
Nitratos-Nitrógeno (NO ₃ ⁻ -N)	8039		
Ortofosfatos (PO ₄ ³⁻ -P)	8178		HACH Co. (2000)
Demanda química de oxígeno (DQO)	8000	Digestor DQO HACH 45600-00	

7.2. Crecimiento de microalgas en agua residual

Se utilizó un consorcio de microalgas obtenido del Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM (figura 7.3). El cultivo de las microalgas se realizó en contenedores de polietileno (PET por sus siglas en inglés) de 42.5 cm de longitud por 22.1 cm ancho con una capacidad máxima de 10.1 L a temperatura ambiente (mínima 20, máxima 25) y con agitación manual dos veces por día. El proceso de adaptación consistió en inocular sistemáticamente (cada 14 días) el agua residual de estudio con 0.30 g L^{-1} de biomasa de microalgas previamente sedimentada por cada lote de trabajo (tres en total). La identificación de los géneros de microalgas predominantes en el cultivo se realizó mediante observación directa de

una muestra en un microscopio óptico Carl Zeiss modelo Axio Lab.A1, utilizando los objetivos de 63X y 100X, y posterior comparación con claves taxonómicas reportadas en la literatura (Wehr, Sheath, y Kociolek, 2015). La densidad celular de las microalgas en el agua de estudio fue determinada por hematocitómetro o cámara de Neubauer. Paralelamente, el contenido de carbohidratos y lípidos de los cultivos fue determinado mediante la técnica fenol-sulfúrico (DuBois et al., 1956) y sulfofosfovainillina (Knight, Anderson, y Rawle, 1972), respectivamente.



Figura 7.3. Cultivos de microalgas en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental

7.2.1. Cosechado, secado y pretratamiento

El proceso de recuperación final de la biomasa de microalgas se realizó en dos etapas, sedimentación natural y centrifugación. En primera instancia, los cultivos fueron sedimentados por un periodo de 72 h y se procedió a la decantación del sobrenadante. A continuación, la biomasa concentrada fue separada por centrifugación en una centrífuga refrigerada Beckman Coulter Avanti J-26S XPI a una temperatura de 5.0 por 15 min a $17,670 \times g$ RCF de acuerdo a lo sugerido por Hernandez, Riaño, Coca, y García-González (2015) y Miranda, Passarinho, y Gouveia (2012). La humedad de las muestras fue entonces eliminada mediante un equipo de secado por aspersión Bowen Engineering BE-1449 (Fig. 7.4) a una temperatura de entrada y salida de aire de 130 y 70, respectivamente.



Figura 7.4. Preparación de equipo de secado por aspersion Bowen Engineering BE-1449

Con base en los estudios realizados por [Castro, Ellis, Miller, y Sims \(2015\)](#) y [Ellis, Hengge, Sims, y Miller \(2012\)](#), se determinó necesario realizar una hidrólisis ácida. Estos estudios han destacado que la fermentación alcohólica de biomasa microalgal cultivada en agua residual solo es posible cuando se degradan los polisacáridos en unidades monoméricas y diméricas como maltosa, glucosa y xilosa, los que son fácilmente fermentables por levaduras en comparación con los polisacáridos. Para este estudio, se utilizaron las condiciones óptimas reportadas por dichos autores.

El proceso consistió en preparar una suspensión 1:10 de biomasa microalgal seca en 1.0 M H_2SO_4 . A continuación, se elevó la temperatura hasta 90 y se mantuvo en agitación magnética a 1,200 RPM durante 120 min (Fig. 7.5). El hidrolizado fue entonces centrifugado a $1,500 \times g$ RCF por 20 min, antes y después de la neutralización, para eliminar residuos sólidos y sales del medio. Como neutralizante, se agregó suficiente NaOH (5.0 M) hasta alcanzar un pH de 6.5. Finalmente, se determinó el contenido de monosacáridos en el hidrolizado mediante una técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) descrita posteriormente en la sección 7.6.1. Por su parte, el contenido de monosacáridos remanente en el lodo residual fue cuantificado por el método Anthrone descrito por [de Farias Silva, Meneghello, de Souza Abud, y Bertucco \(2018\)](#).

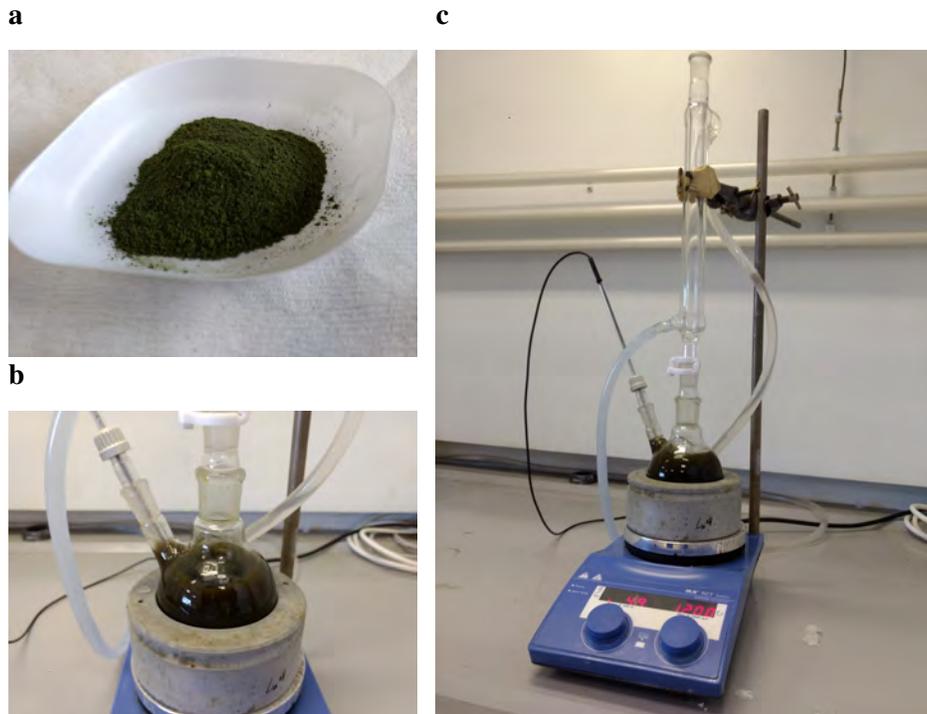


Figura 7.5. Biomasa de microalgas seca resultante (a) y parrilla de calentamiento con agitación empleada para hidrólisis ácida con sistema de reflujo por enfriamiento: reactor (b) y vista general (c)

7.3. Aislamiento e identificación molecular de levaduras silvestres

Análisis preliminares realizados en el agua residual de estudio demostraron la existencia de levaduras silvestres potencialmente etanológicas al añadir una fuente de carbono orgánica externa (Walls, 2018). En el presente proyecto de investigación se aislaron e identificaron las especies de levaduras preponderantes en el agua residual. Para ello, se utilizó biomasa seca recuperada del agua residual doméstica, compuesta principalmente por bacterias, protozoarios y levaduras (Fig. 7.6a).

El aislamiento de levaduras se realizó partiendo de una solución 1:10 de biomasa seca en agua estéril. De esta suspensión, 20.0 μL fueron inoculados en placas Petri con medio rico Yeast Extract Peptone Dextrose o YPD (1.0 % extracto de levadura, 2.0 % peptona, 2.0 % glucosa, 2.0 % agar y 0.015 % cloranfenicol) semisólido previamente estéril. Inmediatamente después, el cultivo en cuestión fue transferido a una incubadora Amerex's GYROMAX 703 a una temperatura de 28.0 durante 48 h. Este proceso se repitió en placas con YPD hasta obtener finalmente colonias morfológicamente uniformes (figuras 7.6b y 7.6c).

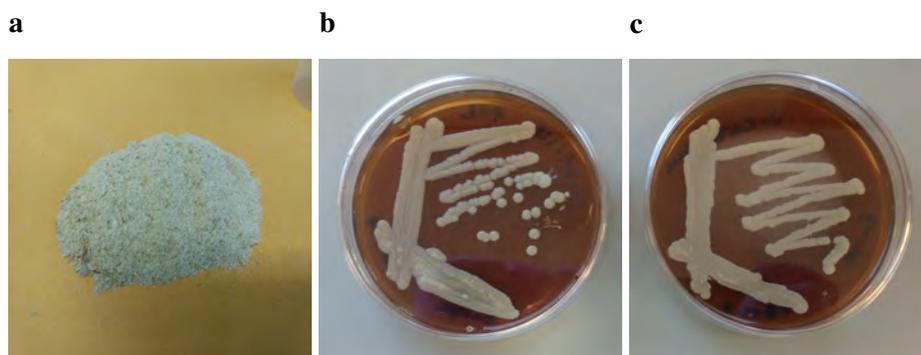


Figura 7.6. Biomasa seca de microorganismos proveniente de agua residual (a) y colonias uniformes aisladas de levaduras silvestres en placas con YPD (b,c)

Para la determinación de las especies de levaduras existentes en el agua residual de estudio, se seleccionó el método molecular de identificación de los fragmentos de las regiones espaciadoras internas, ITS por sus siglas en inglés. Esta técnica consiste en la extracción, amplificación y secuenciación del fragmento 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de los microorganismos. En primera instancia, se extrajo el ácido desoxirribonucleico o ADN a aproximadamente 500 mg de biomasa húmeda de las colonias uniformes previamente mencionadas por medio del ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ kit (ZymoResearch, Irvine, CA, EE.UU.). A continuación, el fragmento de interés (18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S) fue amplificado mediante una reacción de polimerasa en cadena (PCR por sus siglas en inglés) usando los oligonucleótidos ITS5 e ITS4 a las condiciones previamente descritas por [White, Bruns, Lee, y Taylor \(1990\)](#). Para comprobar el tamaño del fragmento (al menos 500 pb), se realizó una electroforesis en gel agarosa al 1.0 % por 15 minutos a 100 V.

La secuenciación de los fragmentos previamente mencionados, así como su edición, fue realizada utilizando el programa Chromas 2.4, con la finalidad de conformar una secuencia consenso para cada aislamiento. Estas secuencias fueron entonces comparadas con secuencias biológicas disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) mediante una búsqueda BLAST. Con los datos obtenidos se realizó finalmente un dendrograma utilizando el programa MEGA 6.0 con el método Neighbor-Joining para observar las relaciones filogenéticas entre cepas del mismo género con distintas secuencias de holotipos de especies definidas. Esta técnica de identificación se explica con mayor detalle en el Apéndice [A](#).

7.4. Capacidad fermentativa de levaduras silvestres

Como paso previo a la determinación de la capacidad fermentativa, se prepararon inóculos de las cepas de levaduras aisladas en la sección anterior. En primera instancia, las colonias de levaduras aisladas en cajas Petri con medio YPD semisólido fueron resuspendidas en medio líquido YPD (1.0 % extracto de levadura, 2.0 % peptona, 2.0 % glucosa) e incubadas a 28.0 con una agitación mecánica de 120 RPM durante 48 h. La suspensión fue entonces centrifugada a $2,163 \times g$ RCF durante 20 min y se retiró el sobrenadante. Este paso se repitió nuevamente añadiendo agua destilada esterilizada para eliminar cualquier residuo del medio de cultivo.

A continuación, se recuperó el precipitado de biomasa lavada y se realizaron una serie de diluciones hasta 1:1,000 con agua destilada con la finalidad de medir la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) por espectrofotometría. Con estos datos, se realizaron los cálculos pertinentes para inocular el medio de cultivo a 0.1 (DO_{600}).

Para evaluar las capacidades fermentativas de cada cepa de levadura se realizaron fermentaciones axénicas en agua residual doméstica filtrada al vacío utilizando membranas estériles S-Pack™ Millipore Co. de 0.20 μm y enriquecida con glucosa (dextrosa) anhidra en polvo ultrapura (J.T.Baker, Hampton, NH, EE.UU.). Se utilizaron concentraciones de glucosa de 2.5 y 5.0 % m/v en agua residual filtrada como medio de cultivo. La caracterización se realizó en matraces Erlemeyer con una capacidad máxima de 250 mL utilizando un agitador orbital con control de temperatura Heidolph™ UNIMAX 1010 a 180 RPM y una temperatura de 28.0, como se observa en la figura 7.7.

Finalmente, la producción de etanol y ácido acético, así como el consumo de glucosa se midieron utilizando la técnica de HPLC especificada en la sección 7.6.1. Adicionalmente, el crecimiento de las levaduras fue determinada empleando los valores de (DO_{600}) registrados cada tres horas durante un periodo de tres días.



Figura 7.7. Cultivo de levaduras silvestres en incubadora con agitación orbital

7.5. Fermentación alcohólica de biomasa pretratada de microalgas

La obtención del etanol a partir de la biomasa microalgal se realizó en dos etapas que incluyen la obtención del hidrolizado rico en azúcares fermentables y la fermentación utilizando la levadura silvestre con mayor productividad de etanol presente en el agua residual. Primero, el hidrolizado de biomasa de microalgas generado en la sección 7.2.1 fue enriquecido con nutrientes esenciales para el crecimiento de levaduras, principalmente nitrógeno y fósforo. Conforme con los trabajos desarrollados por Aslan y Kapdan (2006), Eze, Velasquez-Orta, Hernández-García, Monje-Ramírez, y Orta-Ledesma (2018) y Villaseñor, Capilla, Rodrigo, Cañizares, y Fernández (2013), se agregaron $120.0 \pm 5.2 \text{ mg L}^{-1}$ de cloruro de amonio, $20.0 \pm 7.61 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato de sodio y $61.9 \pm 2.51 \text{ mg L}^{-1}$ de fosfato monopotásico como fuentes de nitrógeno amoniacal, nitratos y ortofosfatos, respectivamente, para simular la concentración promedio de estos nutrientes en el licor hidrolizado de microalgas.

Paralelamente, se prepararon los inóculos de levaduras de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 7.4. También se preparó un inóculo de la subespecie S288C de *S. cerevisiae* con la finalidad de obtener una referencia biológica para este estudio. Una vez obtenido los inóculos para cada especie de levadura, se inoculó el caldo fermentativo a 0.1 DO₆₀₀ equivalente a una

densidad celular de 3×10^6 células mL^{-1} manteniendo una relación inicial sustrato/microorganismo de 1×10^{-3} . Finalmente, se realizó la fermentación alcohólica del hidrolizado de microalgas en tubos de polipropileno esterilizados con tapón de una capacidad de 50 mL. Se incluyeron blancos experimentales por cada condición de estudio, conteniendo solamente solución hidrolizada. Las condiciones de este proceso fueron microaerobias, a una temperatura constante de 28.0 con agitación mecánica a 120 RPM en una incubadora con agitación orbital.

Durante este proceso se evaluó el consumo de glucosa, producción de etanol y ácido acético, así como la tasa de remoción de nitrógeno amoniacal, nitratos y ortofosfatos. En la tabla 7.2 se describen los métodos analíticos utilizados. Se tomaron muestras del caldo fermentativo bajo condiciones de esterilidad para evitar la contaminación del cultivo en una cabina de flujo laminar con lámpara UV de 254 nm. Una vez tomada las muestras, se procedió a centrifugar por 5 min a $13,300 \times g$ RCF para separar la biomasa de levaduras del caldo fermentativo y realizar las respectivas determinaciones.

Tabla 7.2. Métodos analíticos para la caracterización del caldo fermentativo

Parámetro	Método	Instrumento Equipo	Referencia
Amoniaco-Nitrógeno ($\text{NH}_3 - \text{N}$)	8038		
Nitratos-Nitrógeno ($\text{NO}_3^- - \text{N}$)	8039	HACH DR6000	HACH Co. (2000)
Ortofosfatos ($\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$)	8178		
Monosacáridos (Glucosa)	HPLC	Perkin Elmer Flexar™ LC	Takle, Vohra y Patil (2010)
Etanol	GC	Shimadzu GC	Shimadzu (2016)
Ácido Acético		2010plus™	

7.6. Análisis cromatográfico

7.6.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución

La identificación y cuantificación de carbohidratos presentes en el hidrolizado de biomasa microalgal se realizó en un equipo de HPLC Perkin Elmer Flexar™ LC con una columna Restek™ Ultra Amino de 150 mm × 4.6 mm a 35 y un inyector de bucle de HPLC marca Rheodyne modelo 7725 (Fig. 7.8). Se utilizó una solución 70 % acetonitrilo:30 % agua a un flujo de 0.8 mL min⁻¹ como fase móvil. Para la identificación de monosacáridos, se utilizó un detector de índice de refracción marca WATERS 2410 (16X, 35). El volumen de inyección utilizado fue de 20 µL por muestra. Se realizaron curvas patrones de calibración de soluciones de sacáridos, como glucosa, xilosa y maltosa, de 0 a 10,000 ppm (Apéndice B).



Figura 7.8. Vista general del equipo de cromatografía líquida de alta resolución utilizado en la Universidad de Newcastle

Por otra parte, se evaluó la capacidad fermentativa con base en la producción de etanol, ácido acético y ácido cítrico, los cuales se analizaron en un equipo de HPLC compuesto por una columna de exclusión de iones Bio-Rad™ AMINEX HPX-87H (300 mm × 7.8 mm) a 50 acoplada a un inyector de bucle WATERS U6K (Fig. 7.9). Se empleó una solución de H₂SO₄ 5.0 mM a un flujo de 0.6 mL min⁻¹ como fase móvil. Para la identificación de monosacáridos, se utilizó un detector de índice de refracción marca WATERS 2410 (16X, 40) mientras que para analizar la composición del ácido acético se utilizó un detector UV/Vis marca WATERS 2487 a una longitud

de onda de 210 nm. Para la cuantificación de los azúcares se realizaron curvas de calibración de glucosa, etanol y ácido acético de 0 a 20,000 ppm (Apéndice C). El volumen de inyección utilizado fue de 20 μL por muestra.

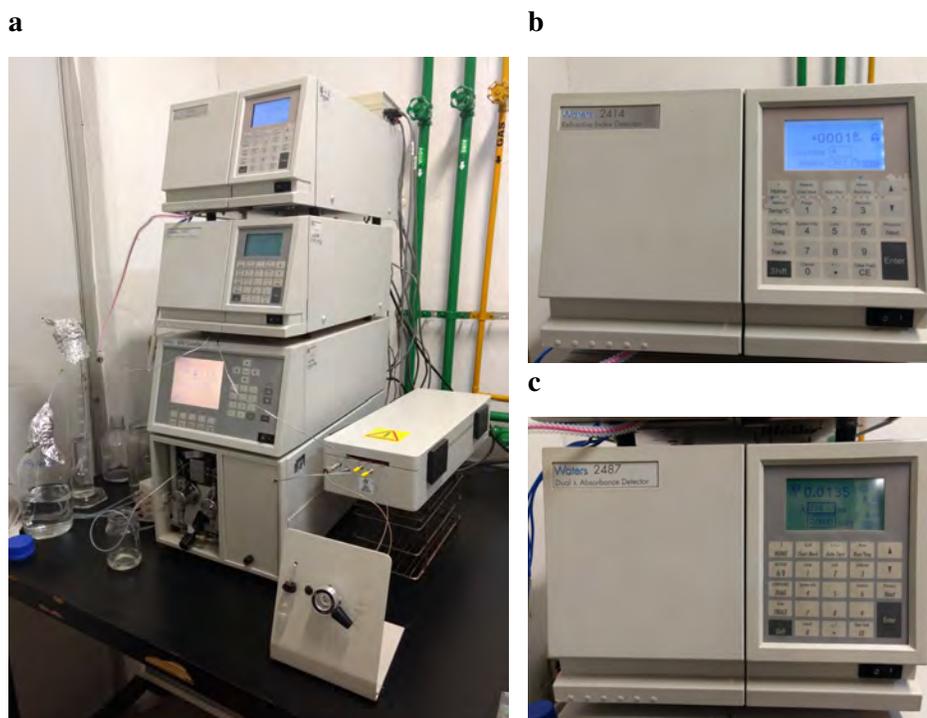


Figura 7.9. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución compuesto por columna de exclusión de iones (a), detector de índice de refracción(b) y de UV/Vis (c)

7.6.2. Cromatografía de Gases

Se determinó la producción de etanol y ácido acético en el caldo fermentativo de biomasa de microalgas utilizando un equipo de cromatografía de gases Shimadzu GC 2010plus™ compuesto por una columna GC Zebron ZB-WAXplus™ (30 m \times 0.26 mm \times 0.25 μm) a una temperatura de 250 ± 10 (Fig. 7.10). Se utilizó una rampa de temperatura de 50 por minuto. Como gas acarreador se empleó helio ultrapuro (99.9 %) a una presión de 21.2 psi con un flujo de 2.0 mL min^{-1} . Se utilizó un detector de ionización de descarga de barrera integrado BID 2010plus para detectar los analitos de interés. El volumen de inyección por muestra fue de 1.0 μL y se utilizó un equipo de muestreo automático Shimadzu AOC 20i. Se realizaron curvas patrones de calibración de soluciones de etanol y ácido acético, de 0 a 20,000 ppm (Apéndice B).



Figura 7.10. Equipo de cromatografía de gases utilizado en la Universidad de Newcastle

7.7. Diseño experimental para el análisis de la información

Para realizar las pruebas de laboratorio se planteó un diseño de experimentos con un modelo de tipo factorial 3^k . Como variables independientes para este proyecto se seleccionaron la concentración de glucosa proveniente de microalgas y el tiempo de fermentación. Por otra parte, las variables de respuesta fueron la producción volumétrica de etanol generado y el consumo de glucosa por cultivo. La matriz de estos experimentos contó con tres niveles reales, que a su vez fueron codificados como -1, 0 y 1 (tabla 7.3). Un diseño experimental factorial 3^2 fue finalmente generado, el cual mostró un total de 9 experimentos con dos réplicas por condición. El cálculo de las combinaciones de los niveles para maximizar la cantidad de etanol, el consumo de glucosa y la remoción de nutrientes se realizó empleando el programa estadístico MINITAB® 18.

Tabla 7.3. Matriz de experimentos para el tratamiento de agua residual y la producción de etanol simultánea con levaduras no convencionales

Corridas	Valores codificados		Valores reales	
	A	B	A: Concentración [g L ⁻¹]	B: Tiempo [h]
1	-1	-1	1.0	8
2	0	-1	2.5	8
3	+1	-1	5.0	8
4	-1	0	1.0	30
5	0	0	2.5	30
6	+1	0	5.0	30
7	-1	+1	1.0	53
8	0	+1	2.5	53
9	+1	+1	5.0	53

Capítulo 8

Resultados y discusión

8.1. Características del agua residual de estudio

Se determinó la concentración de nutrientes y otros parámetros fisicoquímicos del agua residual doméstica utilizada para el desarrollo de la presente investigación. En la tabla 8.1 se presenta el promedio y la desviación estándar para cada parámetro de estudio. En comparación con trabajos similares desarrollados por Walls (2018), Ramsundar et al. (2017) y Guldhe et al. (2017), se observó un mayor contenido de carbohidratos, nutrientes ($\text{NH}_3\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) y pH. De acuerdo con Ge et al. (2015) y Collivignarelli, Bertanza, Abbà, Sordi, y Pedrazzani (2017), una gran concentración de nitrógeno amoniacal y valores de pH superiores a siete son resultado de procesos de oxidación (nitrificación) deficiente en el agua residual. Asimismo, el elevado contenido de carbohidratos se ha relacionado con descargas puntuales de dichas biomoléculas al agua o por un proceso de remoción deficiente de los lodos del tratamiento primario (Lim, Lau, y Poh, 2016; Makisha y Semenova, 2018).

Tabla 8.1. Resultados de las propiedades fisicoquímicas del agua residual de estudio

Parámetro	Unidad	Agua de estudio	Walls (2018)	Ramsundar et al. (2017)	Guldhe et al. (2017)
Temperatura		26.6 ± 5.60	SD	21.9 ± 3.24	27.3
pH	-	8.2 ± 0.45	7.5	7.5 ± 0.23	7.3
Turbidez	NTU	6.7 ± 0.09	SD	23.3 ± 0.07	SD
SST	mg L^{-1}	26.67 ± 0.02	47.9 ± 35.80	60.0 ± 0.02	70
CHO	mg L^{-1}	25.97 ± 1.67	5.7 ± 3.90	SD	SD
$\text{NH}_3\text{-N}$	mg L^{-1}	147.5 ± 1.32	133.1 ± 13.90	50.5 ± 0.21	5.3
$\text{NO}_3^- \text{-N}$	mg L^{-1}	33.2 ± 8.72	15.0 ± 4.90	26.0 ± 0.01	40.7
$\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$	mg L^{-1}	68.7 ± 2.68	67.5 ± 19.50	19.7 ± 0.42	8.8
DQO	mg L^{-1}	121 ± 3.05	95 ± 24.70	110	96

SD Sin determinar

8.2. Identificación y composición del consorcio de microalgas

Como se observa en la figura 8.1, se lograron identificar cuatro géneros predominantes de microalgas: *Scenedesmus* (50.0×10^4 células mL^{-1}), *Tribonema* (2.0×10^4 células mL^{-1}), *Monoraphidium* (1.7×10^4 células mL^{-1}) y *Phacus* (0.4×10^4 células mL^{-1}). Asimismo, se observaron otros géneros como *Chlorophyceae* y, en menor medida, *Diatomeae*, morfológicamente no identificables por su similitud con otros géneros de microalgas. Si bien para la producción de biocombustibles se ha reportado ampliamente el uso de cultivos axénicos de *Scenedesmus* o *Chlorella*, la bioprospección de especies nativas representa un método innovador con el que se podría mejorar tanto el modelo técnico-económico de cultivos masivos como la producción neta de biomasa microalgal.

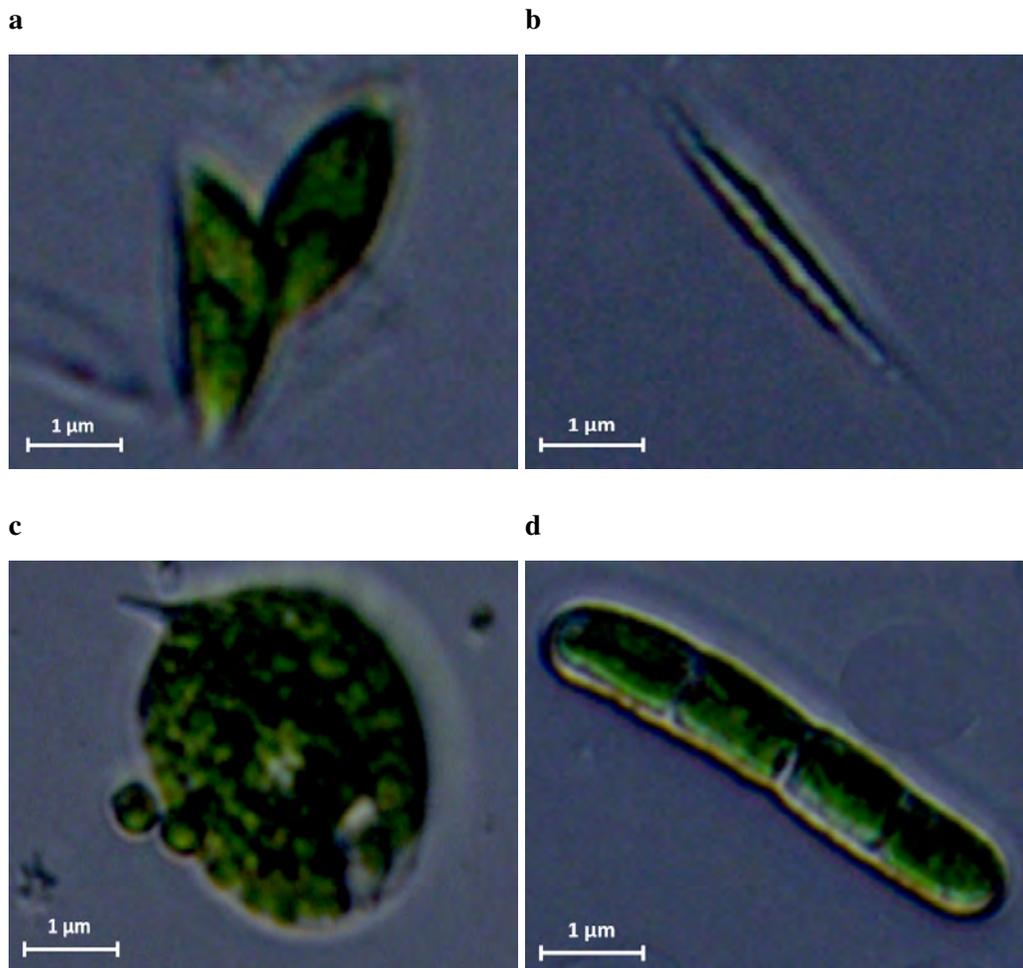


Figura 8.1. Géneros de microalgas identificadas como *Scenedesmus* (a), *Monoraphidium* (b), *Phacus* (c) y *Tribonema* (d) observadas al microscopio (100X)

El contenido de carbohidratos y lípidos presentes en el consorcio de microalgas empleado en este estudio se detalla en la tabla 8.2. Los resultados obtenidos para estos parámetros fueron comparados con estudios similares. Es importante resaltar que aquellos estudios donde se obtienen una mayor composición bioquímica emplean medios de cultivos comerciales con una concentración de nutrientes (p. ej. BG11) superior a la encontrada comúnmente en agua residual. Aunque se logra mejorar las tasas de crecimiento y acumulación de compuestos bioquímicos, el uso de medios de cultivo comerciales incrementa los costos de producción y mantenimiento disminuyendo consecuentemente su viabilidad económica a mediana y gran escala (Laurens et al., 2015; Simas-Rodrigues et al., 2015).

Tabla 8.2. Comparación de estudios con respecto al contenido bioquímico de consorcios de biomasa microalgal

Microalga	Medio de cultivo	Lípidos (g kg ⁻¹)	CHO (g kg ⁻¹)	Referencia
Consortio <i>Scenedesmus</i> sp.	Agua residual	123.3 ± 0.5	68.9 ± 0.2	Este estudio de Farias Silva, Meneghello y Bertucco (2018)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	BG11 modificado	100 ± 22.8	484.0 ± 44.9	
Consortio <i>Scenedesmus</i> sp.	Agua residual	SD	55.3	Sanchez Rizza et al. (2017)
Consortio <i>Desmodesmus</i> sp.	Agua residual	35.4 ± 2.9	25.8 ± 1.3	Fournier (2015)

SD Sin determinar; CHO Carbohidratos

Adicionalmente, en estos mismos estudios se favorece aún más la acumulación de lípidos y carbohidratos a causa de estimulantes físicos o químicos, siendo este último el más utilizado. La limitación de nutrientes o estrés nutricional es uno de los estimulantes químicos más utilizados, el cual consiste en mantener cultivos bajo inanición por periodos prolongados de tiempo una vez agotada la fuente de nutrientes. En consecuencia, las rutas metabólicas de las microalgas se ajustan a las nuevas condiciones de cultivo donde se promueve inicialmente la acumulación de carbohidratos (macromoléculas de reserva altamente energética) y posteriormente de lípidos (Hernández-García et al., 2019).

Por otra parte, también se puede asociar la diferencia observada en el contenido de azúcares entre cultivos axénicos y mixtos a la pureza de las especies empleadas. Se observa que los cultivos

mixtos poseen una productividad bioquímica relativamente inferior a aquella encontrada en los cultivos con cepas seleccionadas probablemente debido a la competencia interespecífica. En otras palabras, la acumulación de lípidos y carbohidratos en cultivos mixtos se ve afectada debido a las diferentes tasas de asimilación de nutrientes y producción de metabolitos entre todas las especies de microalgas que cohabitan en un mismo cultivo.

Sin embargo, algunos cultivos con cepas seleccionadas presentan una plasticidad bioquímica impredecible ante cualquier variación física (temperaturas, pH, turbidez) y/o química (relación C:H:O:N) que podrían disminuir del mismo modo la productividad de lípidos y carbohidratos. A pesar de lo anterior, se ha considerado como una mejor opción utilizar cultivos mixtos de especies autóctonas para cultivos masivos dada la aclimatación previa de las microalgas y el menor riesgo ecológico asociado a la introducción de especies foráneas que estas representan ([Sanchez Rizza et al., 2017](#)).

8.3. Pretratamiento de la biomasa microalgal

En primera instancia, es importante destacar que se obtuvo un total de 40.0 g de biomasa seca de microalgas predominantemente *Scenedesmus* sp. La cuantificación de xilosa, glucosa y maltosa, así como de azúcares totales se realizó en el hidrolizado y en el lodo residual del pretratamiento, respectivamente.

En este estudio, el hidrolizado obtenido tuvo la siguiente composición: 3.9 g L⁻¹ de glucosa; 0.5 g L⁻¹ de maltosa y 0.35 g L⁻¹ de xilosa. En el caso del lodo residual, el contenido de xilosa, glucosa y maltosa no pudo ser determinado mediante cromatografía líquida por su viscosidad. En consecuencia, el contenido total de azúcares se determinó por el método colorimétrico fenol sulfúrico. Una cantidad inferior a 0.01 g L⁻¹ de azúcares totales fueron cuantificados. En este estudio se logró comprobar una diferencia significativa entre el contenido de sacáridos en la biomasa microalgal no tratada y pretratada ($p \leq 0.05$). Esto demuestra la importancia del tratamiento químico en sustratos complejos para producir azúcares fácilmente fermentables. Los rendimientos de extracción de azúcares y de sacarificación obtenidos, así como una comparación entre estudios, se sintetizan en la tabla [8.3](#).

Tabla 8.3. Comparación de estudios para la extracción y sacarificación de biomasa microalgal pretratada para hidrólisis ácida

Microalga	Ácido sulfúrico (%v/V)	Biomasa inicial (g L ⁻¹)	CHO (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Azúcares totales en hidrolizado (g L ⁻¹)	Azúcares extraídos (% ^a)	Sacarificación (% ^b)	Referencia
Consorcio <i>Scenedesmus</i> sp.	5.0	100	6.9	90	120	4.75	69.9	81.1	Este estudio de Farias Silva, Meneghello y Bertucco (2018)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3.0	50	23.0	120	30	20.7	90.0	64.4	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	4.0	50	12.3	120	25	3.05	49.8	58.7	Dávila (2016)
Consorcio <i>Scenedesmus</i> sp.	5.0	100	SD	80-90	120	16.1	SD	49.0	Castro et al. (2015)
Consorcio <i>Scenedesmus</i> sp.	5.0	100	SD	90	60	8.9	SD	26.0	Ellis et al. (2012)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	5.0	50	SD	120	30	3.2	72.3	46.2	Miranda et al. (2012)

SD Sin determinar; CHO Carbohidratos; Temp Temperatura

^a gramos de azúcares totales extraídos por gramo de biomasa^b gramos de glucosa en gramos de azúcares totales extraídos

En primera instancia, se observa una recuperación de azúcares y un porcentaje de sacarificación superior al reportado por el resto de los estudios. Estas diferencias han sido asociadas a factores previamente estudiados como carga de biomasa inicial, tipo-concentración del ácido empleado para el pretratamiento y temperatura-tiempo de reacción en el reactor (Castro et al., 2015; de Farias Silva, Meneghello, y Bertuccio, 2018; Miranda et al., 2012).

En cuanto a la concentración inicial de biomasa, Miranda et al. (2012) determinó que tanto el rendimiento de extracción de azúcares como el rendimiento de sacarificación se ven negativamente afectados conforme se incrementa la proporción de biomasa en la solución ácida. Esto sucede a causa del incremento en la viscosidad de la fracción líquida o hidrolizado. A pesar de que el autor concluye que la carga óptima de biomasa es de 50 g L^{-1} , dicho parámetro fue calculado para una temperatura de reacción mayor (120) y un tiempo menor (30 min) a la utilizada en este estudio.

de Farias Silva, Meneghello, y Bertuccio (2018) y Miranda et al. (2012) emplearon reactores especializados (autoclave) para alcanzar la condiciones previamente mencionadas. Aunque el uso de equipos autoclave es ampliamente utilizado para el pretratamiento químico, este posee efectos desfavorables cuando no se opera correctamente. Cuando los polisacáridos son hidrolizados en monosacáridos, son susceptibles a una degradación térmica progresiva si no se controla con precisión la temperatura o el tiempo de reacción. La exposición prolongada de estos azúcares a 120 favorece la disminución del rendimiento de sacarificación y la acumulación de hidroximetilfuranos (HMF) y furfurales, los cuales poseen efectos inhibitorios durante la fermentación alcohólica (Valdez-Guzmán et al., 2019; Velazquez-Lucio et al., 2018).

Por su parte, el tipo de ácido también ha sido asociado al rendimiento de extracción de azúcares y sacarificación. De acuerdo con Velazquez-Lucio et al. (2018), el uso de ácidos fuertes como H_2SO_4 facilita la degradación de la pared celular y despolimerización de la hemicelulosa en las microalgas para así lograr la hidrólisis del almidón en moléculas simples (monosacáridos). Por su parte, la concentración a la que se emplean los ácidos también es determinante en el rendimiento final del pretratamiento químico. Emplear concentraciones superiores a 2 N (5.0% v/v) promueve, al igual que temperaturas a 120, la degradación de azúcares en la fracción líquida en compuestos inhibitorios o no deseados (Miranda et al., 2012).

Finalmente, si bien en este estudio se empleó un sistema de condensación Liebig que disminuyó las pérdidas de volumen durante el pretratamiento, la concentración de azúcares final en el hidrolizado fue baja en comparación con el resto de los estudios. Esto sucede por la baja concentración de carbohidratos iniciales que poseía la biomasa microalgal previo al pretratamiento (ver secc. 8.2).

8.4. Especies de levaduras silvestres preponderantes en agua residual

De acuerdo con el proceso de identificación molecular, las levaduras aisladas pertenecían a la familia *Saccharomycetaceae*. Esta familia de levaduras se caracteriza por una amplia distribución mundial y estar presentes en una gran variedad de hábitats, en especial aquellos con un suministro abundante de sacáridos (Cannon y Kirk, 2007). Fueron identificadas dos especies taxonómicas, *Lindnera* sp. (anamorfo de *Candida* sp., Fig. 8.2a) y *Pichia* sp. (Fig. 8.2b) con $\geq 99.0\%$ de similitud con la secuencia tipo. Las características Es importante resaltar que, para fines comerciales, ambas especies son usualmente reportadas por su nombre anamórfico.

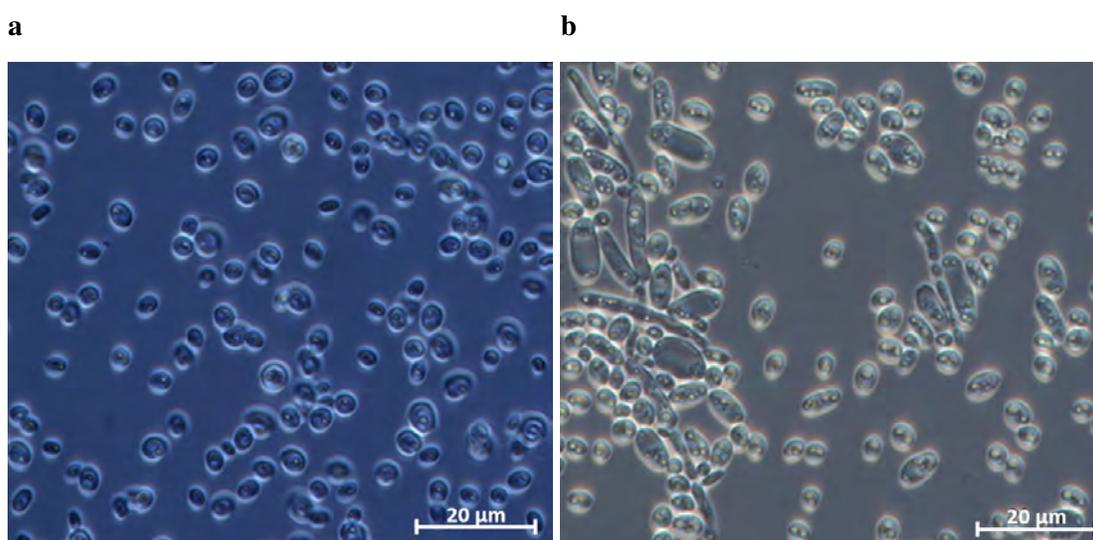


Figura 8.2. Especies identificadas como *Candida* sp. (a) y *Pichia* sp. (b) observadas al microscopio (100x)

De acuerdo con Cooper (2011); Johnson y Echavarri-Erasun (2011) y Kieliszek, Kot, et al. (2017), las levaduras del género *Candida* son un grupo de especies unicelulares extremadamente heterogéneo. Las especies pertenecientes a este género se reproducen por gemación y tanto su forma como tamaño dependen en gran parte de la especie, fase de crecimiento, condiciones fisiológicas y de las condiciones ambientales de los cultivos. Adicionalmente, este tipo de levaduras crecen bajo un régimen aerobio y poseen una pared celular delgada. Si bien una gran cantidad de especies de *Candida* son consideradas altamente patógenas e infecciosas, Cooper (2011) ha destacado que solo aquellas que proliferan y habitan en el aparato gastrointestinal humano ocasionan graves daños a la salud. Por su parte, aquellas especies de *Candida* encontradas en hábitats naturales son mucho menos nocivas y presentan un gran potencial biotecnológico y comercial.

Sobre *Candida* sp., Kurtzman, Fell, y Boekhout (2011b) han reportado que, si bien su hábitat natural es incierto, su origen se ha asociado tanto a residuos de fermentación industrial como a material vegetal en descomposición, su capacidad de metabolizar pentosas y tolerar subproductos de lignina. Es importante resaltar que el aislamiento de esta especie en agua residual doméstica no ha sido reportado hasta este momento en la literatura. Esta levadura tiene una amplia historia en el sector alimenticio y biotecnológico. En la industria de alimentos y bebidas, su uso como forraje o alimento para ganado es bien conocido; sin embargo, últimamente se ha reportado su gran capacidad de producir proteínas unicelulares, SCP por sus siglas en inglés, para combatir el déficit proteico global (Kieliszek, Błażej, y Kurek, 2017; Kurcz, Błażej, Kot, Bzducha-Wróbel, y Kieliszek, 2018).

Tabla 8.4. Características morfológicas de las levaduras silvestres aisladas y de *Saccharomyces cerevisiae*

Características	Levaduras		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida</i> sp.	<i>Pichia</i> sp.
Longitud (μm)	5.5 - 7.5	3.0 - 4.0	6.5 - 8.5
Ancho (μm)	5.1 - 6.2	4.5 - 6.0	4.0 - 6.0
Forma de colonias	Puntiforme	Granular	Circular
Densidad celular (células mL^{-1})*	3×10^6	3×10^6	3×10^6
Otras	Colonias húmedas, de color blanco o cremoso	Colonias húmedas, de color amarillento o sepia	Colonias secas, de color amarillo oscuro

* Densidad celular estimada a 0.1 DO_{600} a partir de Broach, Pringle, y Jones (1997) y Reyna-Beltrán et al. (2018)

8.4.1. Curvas de crecimiento y capacidad fermentativa

En vista de la diversidad etanológica de especies del género *Candida* y *Pichia*, se decidió verificar la producción de etanol y consumo de glucosa (capacidad fermentativa) de las cepas identificadas mediante un proceso de fermentación alcohólica de manera simultánea empleando agua residual esterilizada y concentraciones en exceso de glucosa, uno de los azúcares más

fácilmente fermentables. Del mismo modo, estas cepas identificadas fueron comparadas bajo las mismas condiciones de cultivo con una especie fermentadora conocida *Saccharomyce cerevisie*. El rendimiento teórico máximo para la producción de etanol en este estudio se muestra en el Apéndice C. La cinética de crecimiento y la producción de etanol resultante para las especies evaluadas (*S. cerevisiae*, *Candida* sp. y *Pichia* sp.) se muestra en la figura 8.3.

Una característica común en todas las condiciones de estudio fue la ausencia de una fase de adaptación (*lag*) y una rápida fase de crecimiento exponencial. Si bien este fenómeno se ha asociado a un estado fisiológico particular de las células parentales y, en menor medida, a la cantidad de inóculo inicial en *S. cerevisiae*, el motivo específico de este comportamiento celular aún es desconocido en especies como *Candida* sp. y *Pichia* sp. (Pamment y Hall, 1978). En vista de los resultados obtenidos en este estudio se infiere que la razón de la ausencia de la fase *lag* en *S. cerevisiae* sea la misma para las especies aisladas en el agua residual.

En cuanto al crecimiento celular de las levaduras, se observa que *Candida* sp. (Figs. 8.3b y 8.3e) muestra una cinética de crecimiento significativamente diferente en comparación con aquellas calculadas para *S. cerevisiae* y *Pichia* sp. ($p \leq 0.05$). A 25 g L^{-1} de glucosa inicial, para *Candida* sp. se calculó una densidad óptica de 6.6 OD_{600} (equivalente a 198×10^6 células ml^{-1}) en 72 h, mientras que para *S. cerevisiae* y *Pichia* sp. se determinó una DO de 3.2 (96×10^7 células ml^{-1}) y 2.3 (69×10^6 células ml^{-1}) OD_{600} al mismo tiempo, respectivamente. Por su parte, cuando la cantidad de glucosa inicial fue incrementada a 40 g L^{-1} *Candida* sp., *S. cerevisiae* y *Pichia* sp. exhibieron una densidad óptica de 12.5 (375×10^6 células ml^{-1}), 4.9 (147×10^6 células ml^{-1}) y 6.8 (204×10^6 células ml^{-1}) OD_{600} a 72 h de cultivo, respectivamente.

Se ha reportado con anterioridad que los parámetros cinéticos (p. ej. crecimiento celular) dependen en gran medida del medio de cultivo, las condiciones microbianas y experimentales. Al igual que en el presente estudio, Alloue-Boraud et al. (2015) reportó un mayor crecimiento celular en una especie de *Candida* (*C. tropicalis*) en comparación con *S. cerevisiae*. El autor atribuyó esta diferencia a la presencia de pequeñas concentraciones de oxígeno en el reactor durante las primeras etapas de la fermentación alcohólica.

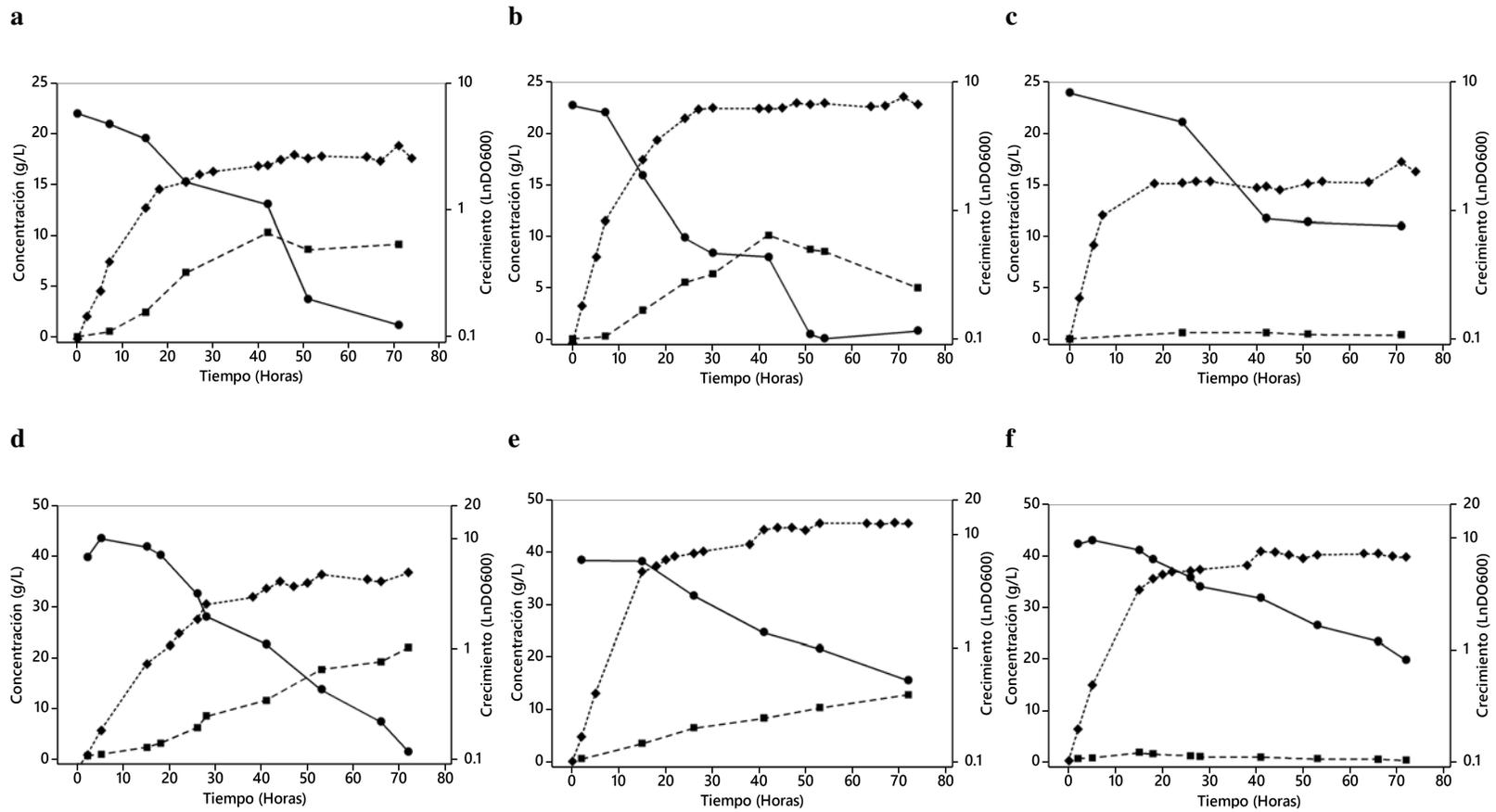


Figura 8.3. Curva de crecimiento (◆), consumo de glucosa (●) y producción de etanol (■) para *Saccharomyces cerevisiae* (cepa control) a 25 g L⁻¹ (a) y 40 g L⁻¹ (d), *Candida* sp. a 25 g L⁻¹ (b) y 40 g L⁻¹ (e) y *Pichia* sp. a 25 g L⁻¹ (c) y 40 g L⁻¹ (f) de glucosa inicial

Lo anterior también fue observado por [Salari y Salari \(2017\)](#) quien añadió además que si bien *S. cerevisiae* puede crecer aeróbica o anaeróbicamente, su crecimiento puede verse ralentizado si el medio de cultivo no cuenta con los azúcares necesarios. Para el crecimiento aeróbico, el autor reportó que la galactosa y fructosa son preferidas. Si bien en el presente trabajo no fue confirmada la presencia de estos azúcares, el rápido crecimiento en *Candida* sp. puede asociarse tanto a una adaptación previa (dada su naturaleza silvestre) a la fermentación alcohólica aerobia de glucosa como a la ausencia de otros monosacáridos fácilmente asimilables por *S. cerevisiae*.

Se observó una diferencia significativa en el consumo de glucosa entre *Pichia* sp. y el resto de las especies ($p \leq 0.05$). *Pichia* sp. exhibió el menor porcentaje de consumo de glucosa tanto a una concentración inicial de 25 g L^{-1} (56 %) como a 40 g L^{-1} (53 %) de glucosa. Por su parte, *Candida* sp. y *S. cerevisiae* mostraron una tasa de consumo de glucosa similar. En primera instancia, es importante recordar que la asimilación de glucosa es una de las rutas metabólicas con mayor regulación en levaduras. Esta actividad está principalmente influenciada tanto por la concentración de glucosa en el medio como por la fase de crecimiento en que se encuentran las levaduras y la disponibilidad de nutrientes en el medio.

En vista de lo anterior, [Does y Bisson \(1989\)](#) realizó una comparación entre las cinéticas del consumo de glucosa en diferentes especies de levaduras silvestres y comerciales cultivadas en medio YPD con 2 % o 0.05 % v/V de glucosa. Al igual que en este estudio, solo una especie de *Pichia* evaluada (*P. heedi*) exhibió una tasa de asimilación de glucosa muy inferior a la determinada para *S. cerevisiae*. El autor añade a su vez que esta diferencia puede ser asociada a la capacidad fermentativa de las levaduras. En otras palabras, las levaduras con capacidad fermentativa poseen un mecanismo de transporte activo de glucosa que les permite asimilarle con mayor rapidez en comparación con las especies de levadura que solo consumen glucosa por respiración o mecanismos de transporte pasivo.

Aunque *Candida* sp. y *S. cerevisiae* consumen glucosa de una manera similar cuando se emplean 25 g L^{-1} de glucosa, se observó que *Candida* sp. consume mucho más rápido esta fuente de carbono en comparación con *S. cerevisiae*, donde esta primera especie logra consumir 98 % de la glucosa a 51 h (Fig. 8.3b) mientras que la segunda consume 95 % del contenido total de glucosa luego de 72 h (Fig. 8.3a). Sin embargo, se observó una diferencia significativa entre ambas especies cuando se incrementó la concentración a 40 g L^{-1} , en donde *S. cerevisiae* obtuvo un porcentaje de remoción de glucosa igual a 95 % en 72 h (Fig. 8.3d) mientras *Candida* sp. exhibió un porcentaje mucho menor en el mismo tiempo (60 %, Fig. 8.3e).

De acuerdo con van van Dijken, Weusthuis, y Pronk (1993) y Van Urk, Postma, Scheffers, y Van Dijken (2009), algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces* emplean mecanismos de transporte de alta afinidad, también llamado simporte de protones o activo, para asimilar el sustrato (glucosa). En este tipo de transporte, el sustrato es asimilado de manera unilateral a mayor velocidad por una proteína aún por identificar. Sin embargo, cuando estas levaduras se cultivan en medios con altas concentraciones de glucosa se favorece la acumulación de un subproducto análogo no metabolizable, el 6-deoxiglucosa (6-DG).

A su vez, esta acumulación de 6-DG se ha asociado con la desaceleración o ralentización del mecanismo de transporte simporte de protones en estas levaduras no-*Saccharomyces*. Por su parte, *S. cerevisiae* posee un mecanismo pasivo o por difusión facilitada, de baja afinidad al sustrato, relativamente más lento y cuyo sistema no permite la acumulación del 6-DG. En consecuencia, la velocidad de asimilación de sustrato en estas levaduras no varía de manera significativa hasta encontrar sustancias que inhiban por completo el proceso fermentativo (HMF, ácidos orgánicos, etc.) o concentraciones de sustrato por encima de sus niveles de tolerancia (180 g L⁻¹).

En cuanto a la producción neta de etanol, se observó que *Pichia* sp. no posee capacidades fermentativas, por lo que la producción de etanol fue nula durante toda la fase experimental para esta especie. En el caso de *S. cerevisiae* y *Candida* sp., solo se observaron diferencias significativas entre las especies cuando se incrementó la concentración inicial de glucosa a 40 g L⁻¹ ($p \leq 0.05$). Bajo esta condición de estudio, *S. cerevisiae* produjo un máximo de 0.506 g EtOH g glucosa⁻¹ mientras que *Candida* sp. logró tan solo 0.330 g EtOH g glucosa⁻¹.

A pesar de lo anterior, el consumo de glucosa en esta última especie no superó el 60 % en 72 h, por lo que puede plantearse que un mayor rendimiento de etanol en esta especie puede ser obtenido si se extiende el tiempo de fermentación. Asimismo, el bajo rendimiento en *Candida* sp. puede asociarse a otros múltiples factores como baja tolerancia a concentraciones de glucosa superiores a 40 g L⁻¹, a concentraciones de etanol superiores de etanol a 10 g L⁻¹ o a una desaceleración en su sistema de asimilación de glucosa a causa de estas condiciones de estrés. Se requieren estudios adicionales para verificar las condiciones máximas tolerables para dicha especie.

Finalmente, algunos subproductos comúnmente encontrados en la fermentación alcohólica también fueron detectados en este trabajo. Fueron identificados principalmente ácidos orgánicos (acético y cítrico) y algunos alcoholes distintos al etanol (glicerol) descritos en las figuras 8.4 y 8.5 para las condiciones de estudio planteadas. Es bien conocido que uno de los subproductos

más comunes es el ácido acético. Se ha reportado que al alcanzar concentraciones superiores a 3 % v/v, combinado con otros metabolitos tóxicos producidos en este proceso, se detiene o inhibe la producción de etanol en los fermentadores (Klinke, Thomsen, y Ahring, 2004; Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996; Vasserot, Mornet, y Jeandet, 2010). Por su parte, el ácido cítrico es otro subproducto importante cuya presencia permite determinar el nivel de contaminación en los sistemas de fermentación. Cabe destacar que para *Pichia* sp. no fue identificado ninguno de los subproductos previamente mencionados al no poseer capacidad de fermentación alcohólica. Para esta especie solo se observó un crecimiento celular bajo las condiciones de estudio.

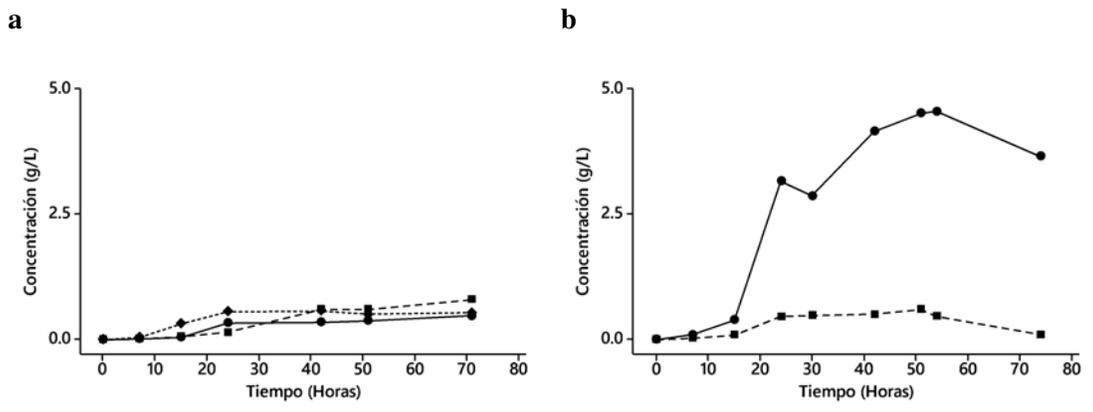


Figura 8.4. Ácido cítrico (●), ácido acético (■) y glicerol (◆) generados en agua residual esterilizada y enriquecida con 25 g L⁻¹ de glucosa empleando *Saccharomyces cerevisiae* (a) y *Candida* sp. (b)

Considerado como un producto de alto valor en la industria alimenticia, su presencia en el caldo fermentativo se ha relacionado con la inhibición o remoción de microorganismos descomponedores (Arias-Moliz, Ferrer-Luque, Espigares-Rodríguez, Liébana-Ureña, y Espigares-García, 2008; In, Kim, Kim, y Oh, 2013; Nikolaus, Wayman, y Encinas, 1988). En el caso de *S. cerevisiae*, se ha reportado que la presencia de este subproducto en los fermentadores se asocia con una desaceleración en la capacidad de crecimiento y un incremento en la producción de glicerol (Guadalupe Medina, Almering, van Maris, y Pronk, 2010; Nielsen y Arneborg, 2007).

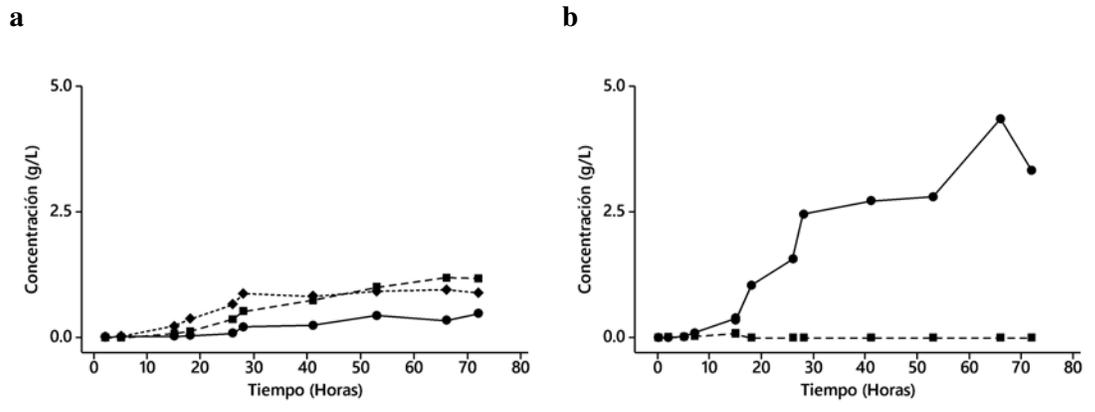


Figura 8.5. Ácido cítrico (●), ácido acético (■) y glicerol (◆) generados en agua residual esterilizada y enriquecida con 40 g L^{-1} de glucosa empleando *Saccharomyces cerevisiae* (a) y *Candida* sp. (b)

8.5. Obtención de bioetanol a partir de biomasa pretratada y consumo de nutrientes

En vista de la capacidad fermentativa determinada para las especies *S. cerevisiae* y *Candida* sp., se decidió comparar ambas especies como organismos fermentadores empleando hidrolizado de biomasa de microalgas pretratada como fuente de carbono. Para ello, se compararon las tasas de remoción de nutrientes, de consumo de glucosa y de producción de etanol de cada especie. La especie identificada como *Pichia* sp. fue descartada en esta fase experimental por su incapacidad de producir etanol.

8.5.1. Tasa de consumo de glucosa en el hidrolizado ácido microalgal y consumo de nutrientes

Al igual que en la experimentación de la sección 8.4.1, se observó un rápido consumo de glucosa para ambas especies. En esta fase experimental, sucedió después de las 8 h de fermentación. A partir de este primer punto de muestreo, se determinó una tasa de consumo de glucosa de al menos 53 % en todas las concentraciones de estudio (tablas 8.5 y 8.6).

Como se ha descrito anteriormente, este importante consumo sucede por mecanismos de transporte de alta afinidad a la glucosa. Se observa en la figs. 8.6a y 8.6c diferencias significativas en la tasa de consumo solo si se incrementa la cantidad inicial de glucosa. En otras palabras, el agotamiento de la glucosa en el hidrolizado microalgal incrementa de manera proporcional a la concentración inicial de sustrato. Si bien la lenta tasa de consumo a mayores concentraciones de

glucosa inicial es una de las desventajas más conocidas en *S. cerevisiae*, esta no pudo ser comprobada en este estudio por limitaciones en la cantidad de biomasa microalgal disponible.

Tabla 8.5. Concentración y tasa de consumo de glucosa en el hidrolizado de microalgas empleando *Saccharomyces cerevisiae* como organismo fermentador

Tiempo (h)	Concentración de azúcar 5.0 g L ⁻¹		Concentración de azúcar 2.5 g L ⁻¹		Concentración de azúcar 1.0 g L ⁻¹	
	Consumo glucosa (g L ⁻¹)	Tasa de consumo (%)	Consumo glucosa (g L ⁻¹)	Tasa de consumo (%)	Consumo glucosa (g L ⁻¹)	Tasa de consumo (%)
8	3.5 ± 0.2	73.3	1.7 ± 0.5	70.3	0.9 ± 0.2	97.6
30	4.2 ± 0.4	87.2	1.9 ± 0.6	76.5	0.9 ± 0.1	99.8
53	4.1 ± 0.2	86.1	2.0 ± 0.6	79.7	1.0 ± 0.1	100.0

Consumo: $S_i - S_t$; Tasa de consumo: $(S_t/S_0) \times 100$

Por otra parte, en la figura 8.6b se observa que la máxima tasa de consumo en *S. cerevisiae* se presenta a las 53 h de fermentación mientras que para *Candida* sp. se encuentra a las 30 h (Fig. 8.6d). Esta observación confirma que *Candida* sp. es una especie que no solo produce una mayor cantidad de biomasa en comparación con *S. cerevisiae*, sino que también agota mucho más rápida dicho sustrato de crecimiento.

Tabla 8.6. Concentración y tasa de consumo de glucosa en el hidrolizado de microalgas empleando *Candida* sp. como organismo fermentador

Tiempo (h)	Concentración de azúcar 5.0 g L ⁻¹		Concentración de azúcar 2.5 g L ⁻¹		Concentración de azúcar 1.0 g L ⁻¹	
	Consumo glucosa (g L ⁻¹)	Tasa de consumo (%)	Consumo glucosa (g L ⁻¹)	Tasa de consumo (%)	Consumo glucosa (g L ⁻¹)	Tasa de consumo (%)
8	2.5 ± 0.5	53.4	1.8 ± 0.6	75.0	0.7 ± 0.3	78.3
30	3.6 ± 0.2	75.2	1.9 ± 0.5	78.0	1.0 ± 0.2	99.7
53	3.6 ± 0.1	74.9	2.2 ± 0.8	87.8	1.0 ± 0.3	100.0

Consumo: $S_i - S_t$; Tasa de consumo: $(S_t/S_0) \times 100$

Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos se observó que entre ambas especies no existe una diferencia significativa en cuanto al consumo de glucosa ($p \leq 0.05$). Para ambas especies, la tasa de consumo óptima de acuerdo al diseño factorial propuesto se presenta a las 30 h a una concentración inicial de 5.0 g L⁻¹.

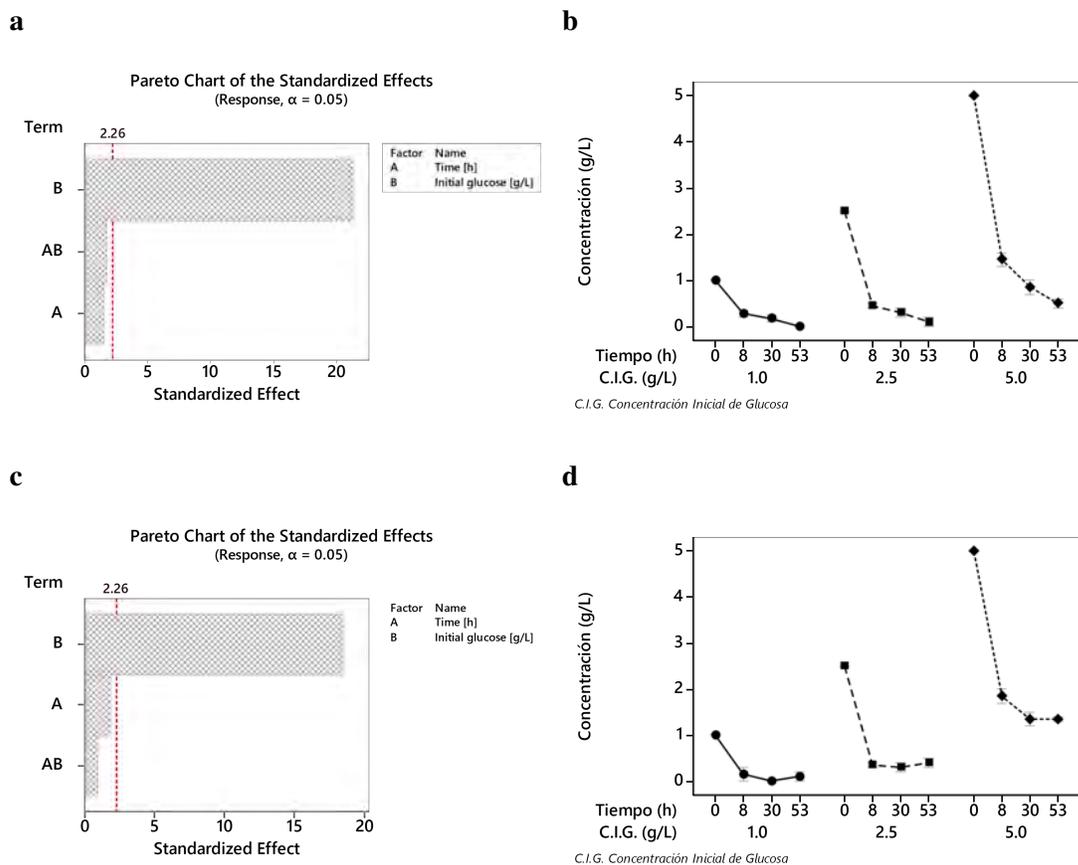


Figura 8.6. Diagrama de Pareto (a,c) y gráfica de interacción (b,d) para *S. cerevisiae* y *Candida sp.*, respectivamente, para la glucosa residual bajo las condiciones de estudio

En cuanto a la reducción de nutrientes, se observó de manera general un incremento en la tasa de remoción conforme se aumentaba la concentración de sustrato inicial en la fermentación. En el caso del nitrógeno amoniacal (Fig. 8.7), una de las fuentes de nitrógeno más fácilmente asimilables por muchos microorganismos, se encontraron diferencias significativas entre la concentración inicial de glucosa aplicada y el tiempo de fermentación ($p \leq 0.05$). En otras palabras, la concentración de nitrógeno amoniacal presentó una tasa de remoción mayor conforme se incrementa el tiempo de fermentación y la concentración de glucosa inicial. Para ambas especies de estudio, se encontró que la máxima tasa de remoción ocurrió a las 53 h cuando se disponía de 5.0 g L^{-1} de glucosa como sustrato.

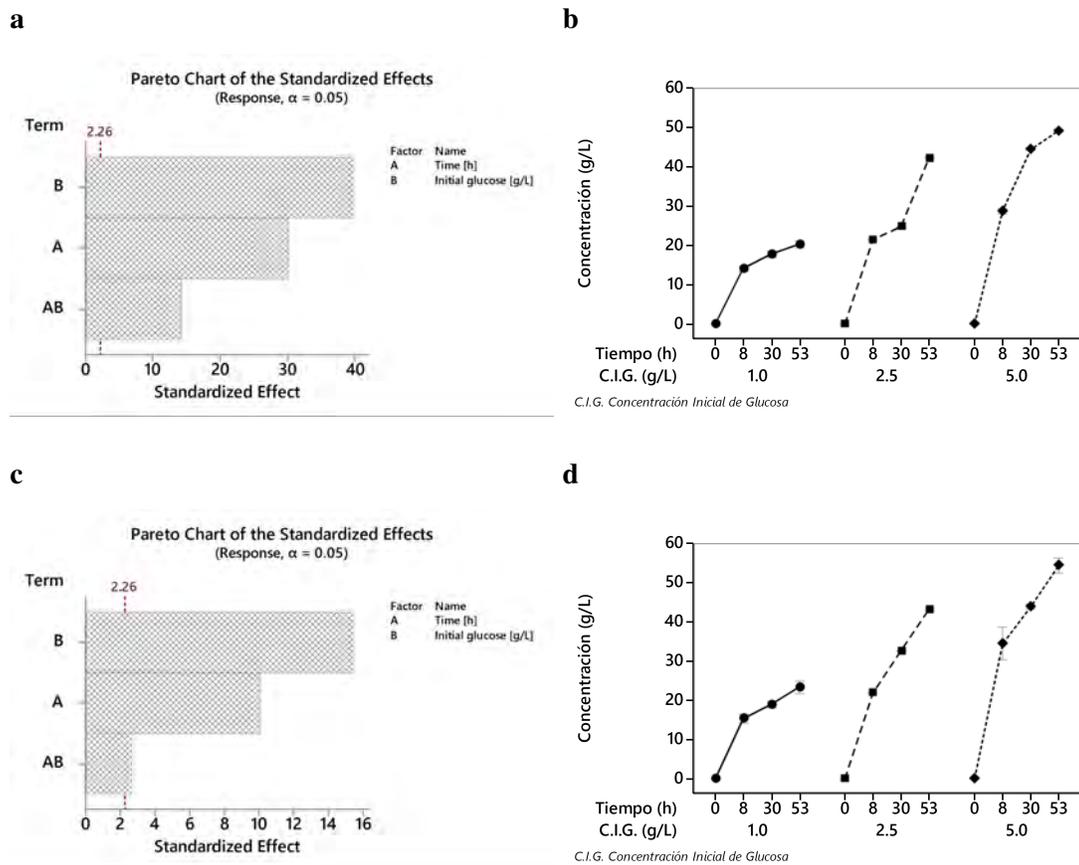


Figura 8.7. Diagrama de Pareto (a, c) y gráfica de interacción (b, d) para *S. cerevisiae* y *Candida* sp., respectivamente, para la remoción de nitrógeno amoniacal bajo las condiciones de estudio

En el caso de nitratos, se observó una diferencia significativa no solo entre las condiciones de estudio sino también entre las especies de estudio. Si bien se encontró que la asimilación de este nutriente se incrementa con respecto a la cantidad de glucosa inicial, *Candida* sp. es en definitiva la especie que mejor remueve nitratos. Una tasa de consumo de nitratos de hasta el 96 % luego de 53 h de fermentación empleando 5.0 g L⁻¹ de glucosa como sustrato inicial fue encontrada para *Candida* sp. (Fig. 8.8). Por su parte, *S. cerevisiae* obtuvo una tasa de remoción de apenas el 68 % en las mismas condiciones de estudio. Esto sucede por la capacidad de algunas especies de levaduras de asimilar un amplio rango de fuentes de nitrógeno, incluyendo nitratos (Siverio, 2002; Walls, 2018).

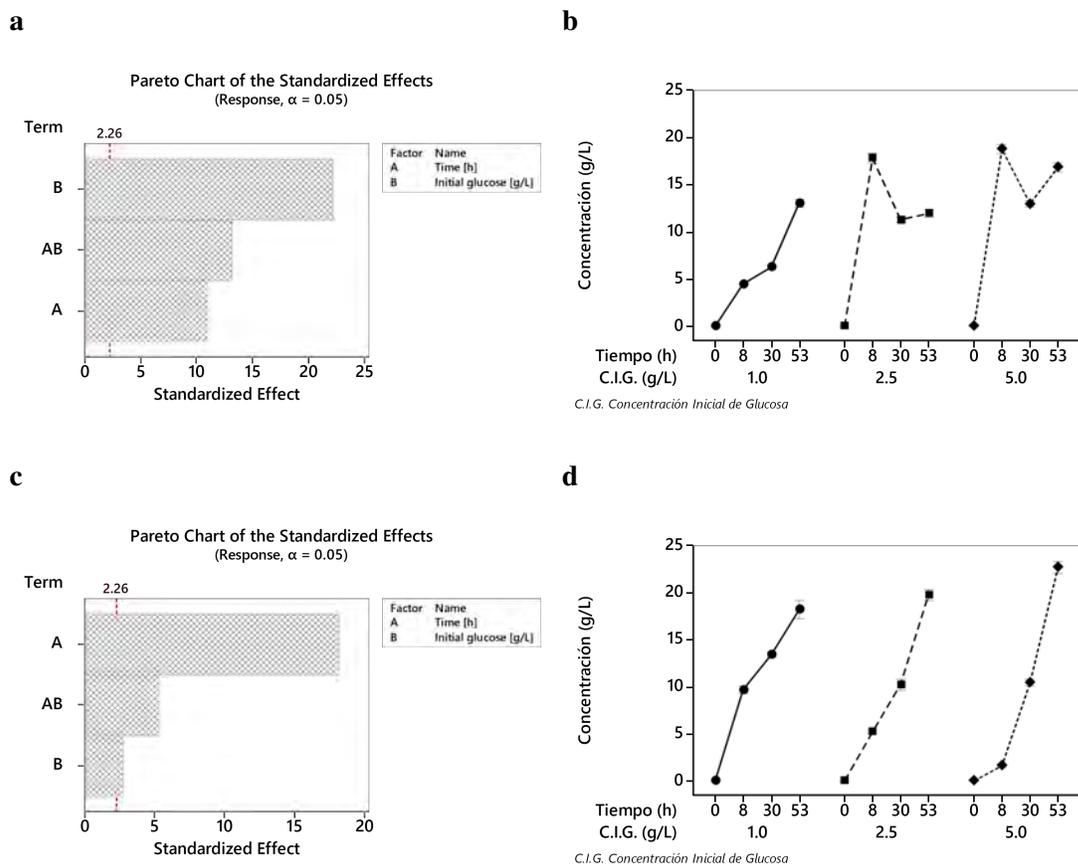


Figura 8.8. Diagrama de Pareto (a, c) y gráfica de interacción (b, d) para *S. cerevisiae* y *Candida sp.*, respectivamente, para la remoción de nitratos bajo las condiciones de estudio

Finalmente, en la figura 8.9 se presenta la tasa de consumo de ortofosfatos para ambas especies. Cabe destacar que, si bien se encontraron diferencias significativas para las condiciones de estudio, el consumo de ortofosfatos no presentó una reducción significativa con respecto a la cantidad inicial. De acuerdo con Dick, Dos-Santos, y Meyer-Fernandes (2011) y Freitas-Mesquita y Meyer-Fernandes (2014), esta nula o poca reducción de las levaduras para ortofosfatos se debe a la sobreexpresión de una enzima fosfatasa bajo altas concentraciones de fosfato. Cuando las células de levaduras detectan altas concentraciones de este nutriente en el medio, se estimula la producción de la ectofosfatasa, enzima encargada de hidrolizar al fosfato orgánico en moléculas libres de fosfato, que por su actividad aumenta temporalmente la concentración de este nutriente.

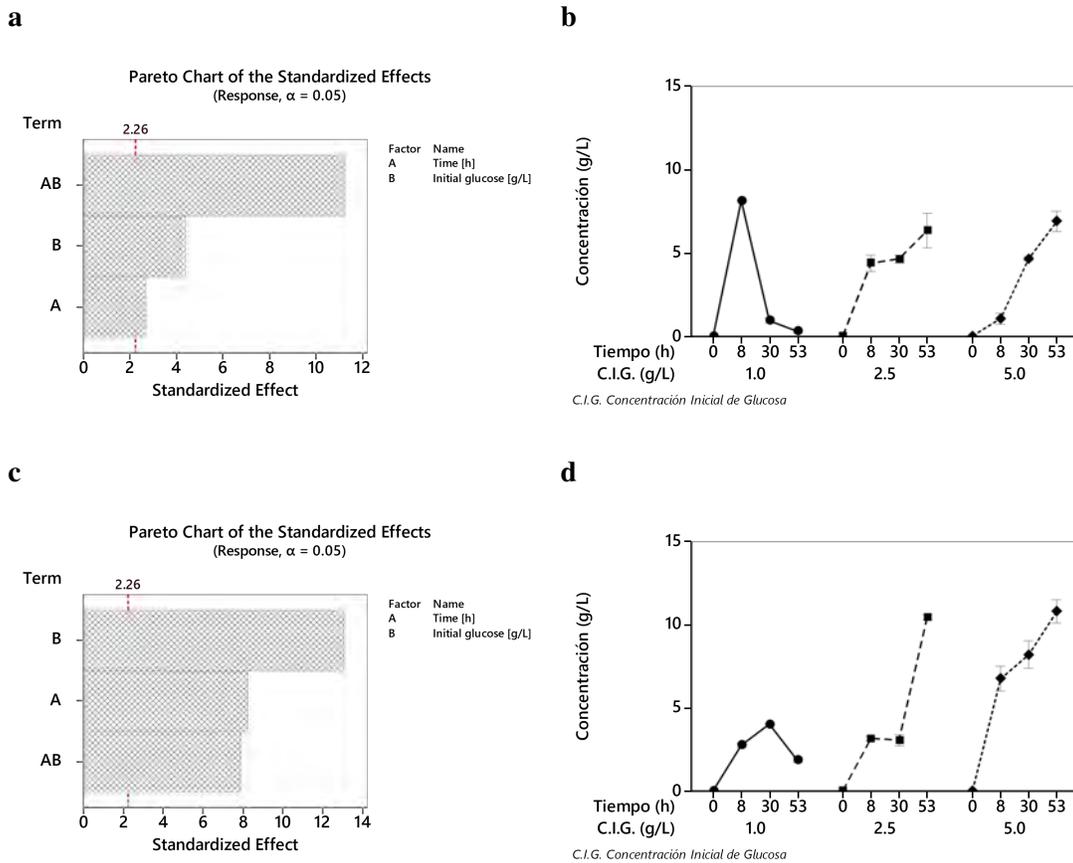


Figura 8.9. Diagrama de Pareto (a, c) y gráfica de interacción (b, d) para *S. cerevisiae* y *Candida sp.*, respectivamente, para la remoción de ortofosfatos bajo las condiciones de estudio

8.5.2. Producción de etanol a partir del hidrolizado ácido microalgal

La producción neta y el rendimiento total de etanol obtenido para *S. cerevisiae* y *Candida sp.* en este estudio se detallan en las tablas 8.7 y 8.8, respectivamente. Asimismo, en la figura 8.10 solo se observan diferencias significativas para la producción de etanol conforme se incrementa la concentración de glucosa inicial y tiempo de fermentación ($p \leq 0.05$). Ambas especies mostraron el mismo rendimiento y producción de etanol bajo todas las condiciones de estudio. Si bien este trabajo confirma una relación directamente proporcional entre la concentración inicial de sustrato (glucosa) y la concentración final de etanol producido, también se verificó el efecto del tiempo de fermentación en la producción neta de etanol.

Tabla 8.7. Producción y rendimiento de etanol en la solución de hidrolizado de microalgas empleando *Saccharomyces cerevisiae* como organismo fermentador

Tiempo (h)	Concentración de azúcar 5.0 g L ⁻¹		Concentración de azúcar 2.5 g L ⁻¹		Concentración de azúcar 1.0 g L ⁻¹	
	Producción etanol (g L ⁻¹)	Rendimiento ($\frac{\text{gEtOH}}{\text{gGlucosa}}$)	Producción etanol (g L ⁻¹)	Rendimiento ($\frac{\text{gEtOH}}{\text{gGlucosa}}$)	Producción etanol (g L ⁻¹)	Rendimiento ($\frac{\text{gEtOH}}{\text{gGlucosa}}$)
8	1.0 ± 0.01	0.22 ± 0.02	1.0 ± 0.1	0.40 ± 0.09	0.5 ± 0.01	0.50 ± 0.04
30	2.1 ± 0.1	0.45 ± 0.05	0.7 ± 0.01	0.29 ± 0.03	0.2 ± 0.01	0.21 ± 0.002
53	1.3 ± 0.1	0.28 ± 0.14	0.0 ± 0.0	0.01	0.1 ± 0.01	0.06 ± 0.01

En primera instancia, se observa que en todas las condiciones de estudio en ambas especies existe al menos un punto de muestreo donde la concentración de etanol disminuye. Esto se ha asociado con anterioridad a la disponibilidad inicial de glucosa. Estudios han determinado bajo condiciones de estrés (o limitación de carbono), las levaduras (*i.e.* *S. cerevisiae*) activan un mecanismo de respiración celular que les permite degradar el etanol en CO₂ y agua e incorporarlos en la propia biomasa (Otterstedt et al., 2004). Aunque este mecanismo no ha sido confirmado para *Candida* sp., los resultados obtenidos en este estudio permiten deducir un comportamiento similar de esta especie con *S. cerevisiae*.

Tabla 8.8. Producción y rendimiento de etanol en la solución de hidrolizado de microalgas empleando *Candida* sp. como organismo fermentador

Tiempo (h)	Concentración de azúcar 5.0 g L ⁻¹		Concentración de azúcar 2.5 g L ⁻¹		Concentración de azúcar 1.0 g L ⁻¹	
	Producción etanol (g L ⁻¹)	Rendimiento ($\frac{\text{gEtOH}}{\text{gGlucosa}}$)	Producción etanol (g L ⁻¹)	Rendimiento ($\frac{\text{gEtOH}}{\text{gGlucosa}}$)	Producción etanol (g L ⁻¹)	Rendimiento ($\frac{\text{gEtOH}}{\text{gGlucosa}}$)
8	1.2 ± 0.01	0.25 ± 0.04	0.9 ± 0.1	0.35 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.35 ± 0.01
30	2.2 ± 0.1	0.46 ± 0.05	0.5 ± 0.01	0.22 ± 0.03	0.1 ± 0.1	0.10 ± 0.01
53	0.9 ± 0.01	0.19 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.02 ± 0.001	0.05 ± 0.05	0.05 ± 0.01

Por otra parte, se observó que el punto óptimo para obtener la mayor productividad de etanol en este estudio se encuentra a las 30 h empleando una concentración inicial de 5.0 g L⁻¹ (Fig. 8.10). Esta condición óptima se encuentra en concordancia con la determinada en la sección anterior, por lo que puede deducirse que la glucosa funciona como reactivo limitante en las reacciones de fermentación. Finalmente, se verificó la producción de ácido acético en esta fase experimental para ambas cepas de levaduras empleadas. Como se observa en la figura 8.11, existen diferencias significativas entre la cantidad de ácido acético generado, tiempo de fermentación y cantidad de sustrato inicial empleado ($p \leq 0.05$).

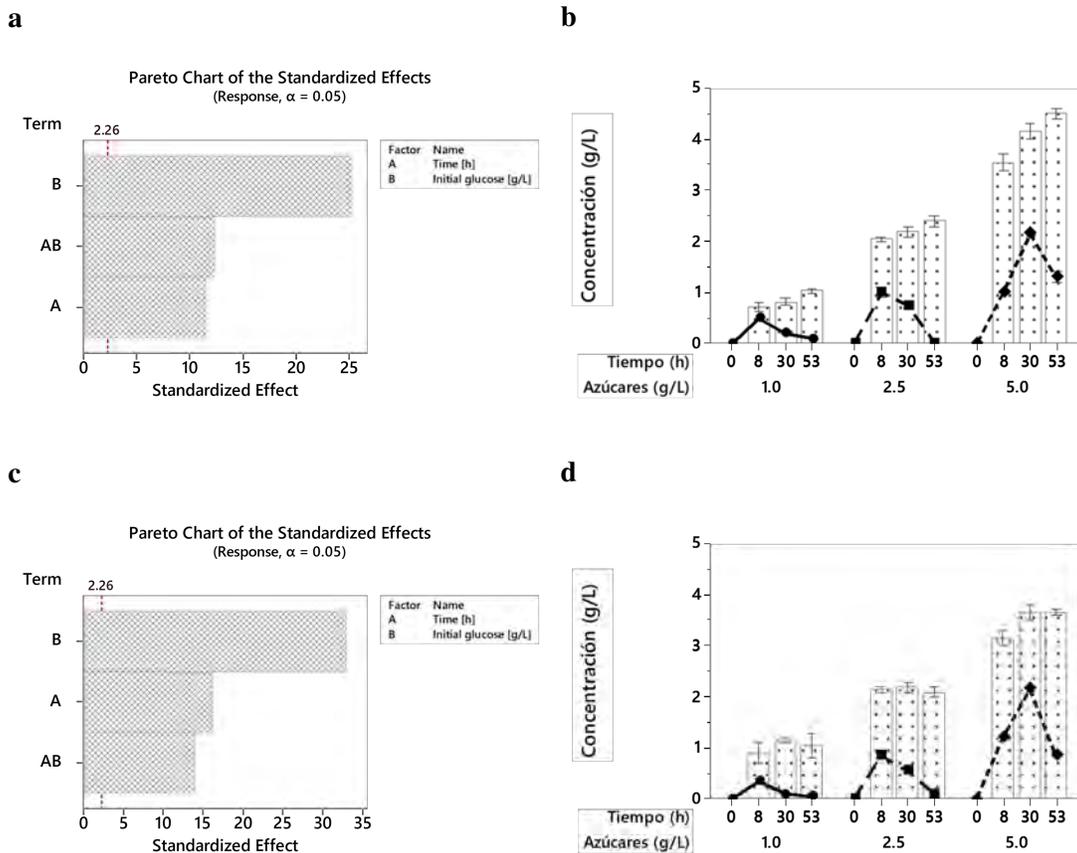


Figura 8.10. Diagrama de Pareto (a, c) y gráfica de interacción (b, d) para *S. cerevisiae* y *Candida sp.*, respectivamente, para la producción de etanol bajo todas las condiciones de estudio. Barras representan la concentración de glucosa consumida.

Aunque la producción de ácido acético se mantiene casi constante durante las primeras 30 h de fermentación, se observa para ambas especies y bajo todas las condiciones de estudio una importante disminución en el último punto de muestreo. Esta reducción del ácido acético durante la fermentación alcohólica se ha relacionado con condiciones de estrés en el caldo fermentativo. Cuando ciertas especies de levaduras como *S. cerevisiae* son sujetas a condiciones de estrés por ácido acético, las células activan proteínas tipo quinasas que aumentan la permeabilidad del ion acetato (endocitosis) a la membrana celular y permite a la célula degradar dicho sustrato en monómeros para sus actividades metabólicas (Shang, Zeng, Zhu, y Zhong, 2016; Vasserot et al., 2010). Si bien este mecanismo no se ha confirmado o estudiado para *Candida sp.*, los resultados de este estudio sugieren un comportamiento similar entre ambas especies. En la tabla 8.9 se presenta una comparación con trabajos similares de la producción y rendimiento de etanol, así como del ácido acético producido por las especies empleadas en este estudio.

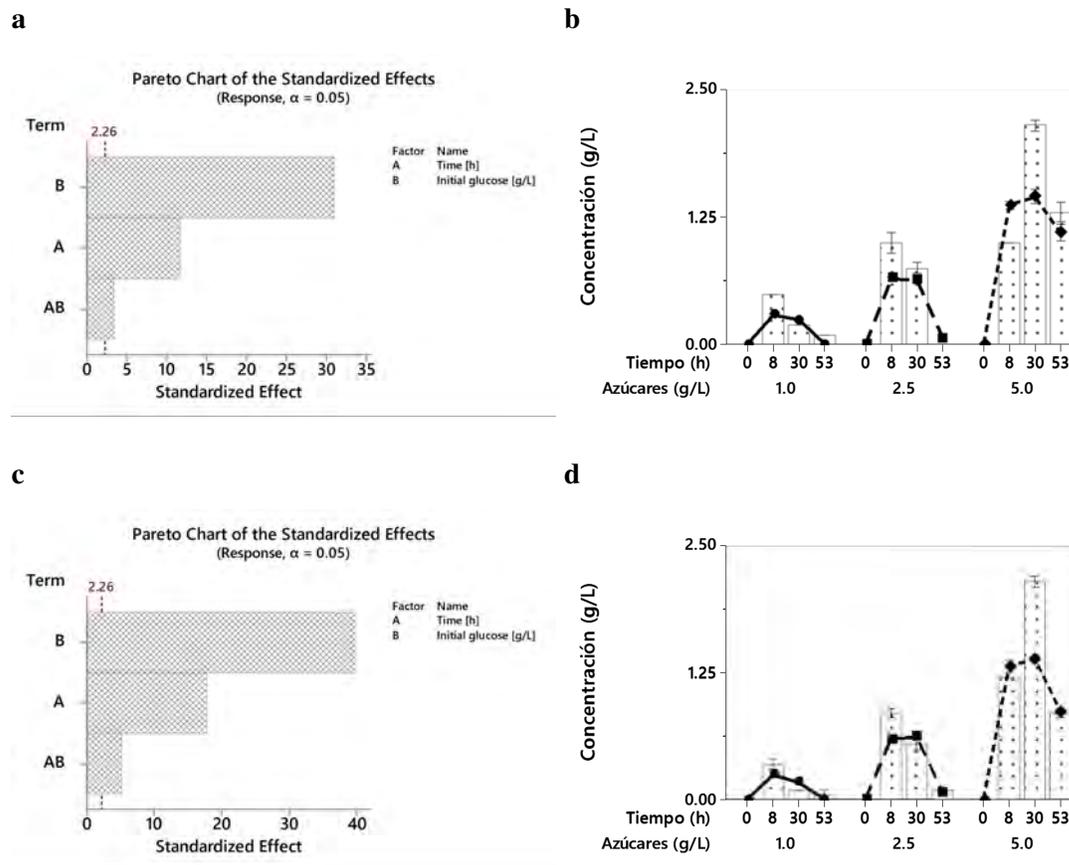


Figura 8.11. Diagrama de Pareto (a, c) y gráfica de interacción (b, d) para *S. cerevisiae* y *Candida sp.*, respectivamente, para la producción de ácido acético bajo todas las condiciones de estudio. Barras representan la concentración de etanol consumida.

En primera instancia, es importante resaltar que tanto la cantidad de glucosa asimilada, como el rendimiento de etanol y la producción de ácido acético son factores no solo intrínsecos de los microorganismos fermentadores sino de las condiciones empleadas para la fermentación alcohólica. Por ejemplo, se observó que para la levadura *S. cerevisiae* (bajo condiciones de cultivo similares) se obtiene una mayor producción de etanol conforme se eleva la cantidad de glucosa inicial. Sin embargo, el rendimiento del mismo (en comparación con el máximo valor teórico) se ve disminuido. A pesar de lo anterior, una mejor rendimiento con mayor producción neta de etanol es posible si se controlan algunos factores ambientales (temperatura, pH) o técnicos (agitación, relación sustrato-microorganismo). Aunque este comportamiento no se ha verificado para *Candida sp.*, los resultados obtenidos en este estudio sugieren un comportamiento similar al presentado por *S. cerevisiae*

Tabla 8.9. Comparación de estudios para el rendimiento de etanol y producción de ácido acético mediante hidrolizado ácido microalgal

Organismo fermentador	Glucosa inicial (g L⁻¹)	Glucosa asimilada (%)	Etanol (g L⁻¹)	Etanol ($\frac{\text{gEtOH}}{\text{gGlucosa}}$)	Etanol (%^a)	Ácido acético (g L⁻¹)	Referencia
<i>S. cerevisiae</i> S288C	5.0	87.2 ± 0.4	2.1 ± 0.1	0.45 ± 0.05	88	1.45 ± 0.10	Este estudio
<i>Candida</i> sp.	5.0	75.2 ± 0.2	2.2 ± 0.1	0.46 ± 0.05	90	1.38 ± 0.05	Este estudio
<i>S. cerevisiae</i> (Cameo S.p.A TM)	13.0	92.6 ± 4.4	4.96 ± 0.1	0.38 ± 0.10	74.6	0.69 ± 0.06	de Farias Silva, Meneghello y Bertucco (2018)
<i>S. cerevisiae</i>	18.9	61.4 ± 3.3	3.2 ± 0.4	0.17 ± 0.01	61	SD	Dávila (2016)
<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	16.6	SD	0.53	0.03	6.2	SD	Castro et al. (2015)
<i>Zymomona mobilis</i>	7.8	100	3.6	0.46	90	SD	Hsin Ho et al. (2013)

SD Sin determinar

^a Rendimiento con respecto al máximo valor teórico

Capítulo 9

Conclusiones

De manera general, se observó que la levadura silvestre *Candida* sp. aislada del agua residual de estudio reportó no solo una capacidad etanológica similar, sino una reducción de nutrientes en agua residual superior al reportado por *Saccharomyces cerevisiae* al emplear biomasa de microalgas como fuente de carbono y agua residual doméstica sintética como fuente de nutrientes bajo condiciones de cultivo controlado.

Adicionalmente, se logró exitosamente el cultivo, y posterior cosechado de biomasa de microalgas predominantemente *Scenedesmus* sp. empleando agua residual doméstica como medio de cultivo bajo condiciones de fototrofía. Del mismo modo, se logró la exitosa conversión de los polisacáridos provenientes de la biomasa de microalgas en monosacáridos, principalmente glucosa, xilosa y maltosa.

- Se confirmó la presencia de levaduras silvestres tipo no-*Saccharomyces*, pertenecientes a los géneros *Lindnera* (*Candida*) y *Pichia*, en el agua residual doméstica de estudio, las cuales se recuperaron de la matriz de estudio mediante técnicas de separación física e identificaron mediante técnicas moleculares de manera exitosa.
- En los estudios para verificar la capacidad fermentativa de las levaduras aisladas, se observó una importante capacidad de conversión de glucosa a etanol bajo condiciones axénicas en agua residual doméstica esterilizada y enriquecida con 25 y 40 g L⁻¹ de glucosa) en solo una especie de levadura silvestre en particular, identificada como *Candida* sp.
- Se concluye que fue posible el crecimiento de microalgas predominantemente *Scenedesmus* sp. en el agua residual de estudio y la hidrólisis ácida incrementa la disponibilidad de monosacáridos, principalmente glucosa, en el licor del pretratamiento. En este estudio

en particular, se logró obtener 4.75 g L^{-1} azúcares fermentables mediante hidrólisis ácida diluida de la biomasa microalgal.

- La especie *Candida* sp., aislada del agua residual de estudio posee una capacidad de conversión de glucosa a etanol similar a la de *S. cerevisiae* durante la fermentación del hidrolizado ácido de microalgas. Sin embargo, las diferencias significativas encontradas en la tasa de remoción de nutrientes como ortofosfatos y nitratos definen aplicaciones novedosas en procesos simultáneos de tratamiento biológico de agua residual con producción de bioetanol como producto de mayor valor agregado para la levadura silvestre *Candida* sp.

Referencias

- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M., Chong, W. T., Nur, H., y Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631–653. doi: 10.1016/j.rser.2016.07.015
- Aguillón, J. E., Islas, J. M., Martínez, A., Riegelhaupt, E., y Alternasindd, E. (2010). Bioenergía. En C. A. Estrada y J. Islas (Eds.), *Energías alternativas: propuesta de investigación y desarrollo tecnológico para México* (1ra Ed. ed., pp. 41–50). Ciudad de México: AMC-AI-UNAM.
- Alloue-Boraud, W. A. M., N'Guessan, K. F., Djéni, N. T., Hiligsmann, S., Djè, K. M., y Delvigne, F. (2015). Fermentation profile of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* as starter cultures on barley malt medium. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 5236–5242. doi: 10.1007/s13197-014-1526-0
- APHA-AWWA-WPCF. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (21st ed.; L. Clesceri, A. Greenberg, y A. Eaton, Eds.). Washington D.C.: American Public Health Association.
- Arias-Moliz, M. T., Ferrer-Luque, C. M., Espigares-Rodríguez, E., Liébana-Ureña, J., y Espigares-García, M. (2008). Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 106(2), e84 – e89. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.04.002>
- Arnold, J. L., Knapp, J. S., y Johnson, C. L. (2000). The use of yeasts to reduce the polluting potential of silage effluent. *Water Research*, 34(15), 3699–3708. doi: 10.1016/S0043-1354(00)00129-9
- Arthur Lee, R., y Lavoie, J.-M. (2013). From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*, 3(2), 6–11. doi: 10.2527/af.2013-0010
- Aslan, S., y Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1), 64–70. doi: 10.1016/j.ecoleng.2006.04.003
- Balat, M., Balat, H., y Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551–573. doi: 10.1016/j.pecs.2007.11.001

- Becker, E. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207–210. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002
- Behera, S., Singh, R., Arora, R., Sharma, N. K., Shukla, M., y Kumar, S. (2015). Scope of Algae as Third Generation Biofuels. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2(February), 1–13. doi: 10.3389/fbioe.2014.00090
- Boekhout, T., y Kurtzman, C. P. (1996). Principles and Methods Used in Yeast Classification, and an Overview of Currently Accepted Yeast Genera. En *Nonconventional yeasts in biotechnology: A handbook* (pp. 1–81). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-79856-6_1
- Brennan, L., y 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*, 14(2), 557–577. doi: 10.1016/j.rser.2009.10.009
- Brexó, R. P., y Sant’Ana, A. S. (2017). Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73(February 2016), 423–434. doi: 10.1016/j.rser.2017.01.151
- Broach, J. R., Pringle, J., y Jones, E. (1997). *Molecular and cellular biology of the yeast saccharomyces. cell cycle and cell biology*.
- Cai, T., Park, S. Y., y Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360–369. doi: 10.1016/j.rser.2012.11.030
- Canilha, L., Chandel, A. K., Suzane dos Santos Milessi, T., Antunes, F. A. F., Luiz da Costa Freitas, W., das Graças Almeida Felipe, M., y da Silva, S. S. (2012). Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–15. doi: 10.1155/2012/989572
- Cannon, P. F., y Kirk, P. M. (2007). *Fungal Families of the World* (1st Ed ed.). Cambridge, EE.UU.: CABI Publishing Series.
- Cardona, C. A., Sánchez, Ó. J., y Gutiérrez, L. F. (2010). *Process Synthesis for Fuel Ethanol Production* (Vol. 2010) (n.º 10).
- Carrillo, L., Audisio, C., Bejarano, N., Molina, S., Ancasi, G., y Benítez, M. (2007). *Levaduras* (n.º 1).
- Carvalho, A. P., Monteiro, C. M., y Malcata, F. X. (2009). Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 543–552. doi: 10.1007/s10811-009-9415-z
- Castro, Y. A., Ellis, J. T., Miller, C. D., y Sims, R. C. (2015). Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol, and ethanol fermentation. *Applied Energy*, 140, 14–19. doi: 10.1016/j.apenergy.2014.11.045

- Chakraborty, S., Aggarwal, V., Mukherjee, D., Andras, K., Yang, H., Ye, H., ... Wang, G. (2012). Biomass to biofuel: a review on production technology. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 7(3), S254–S262. doi: 10.1002/apj.1642
- Chandel, A. K., Es, C., Rudravaram, R., Narasu, M. L., Rao, V., y Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies : an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2(February), 14–32. doi: ISSN1538-2273
- Collivignarelli, M. C., Bertanza, G., Abbà, A., Sordi, M., y Pedrazzani, R. (2017). Synergy between anaerobic digestion and a post-treatment based on Thermophilic Aerobic Membrane Reactor (TAMR). *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 36(6), 1802–1809. doi: 10.1002/ep.12677
- Cooper, C. R. (2011). Yeasts Pathogenic to Humans. En *The yeasts* (pp. 9–19). Elsevier.
- Cuellar-Bermudez, S. P., Aleman-Nava, G. S., Chandra, R., Garcia-Perez, J. S., Contreras-Angulo, J. R., Markou, G., ... Parra-Saldivar, R. (2017). Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. *Algal Research*, 24, 438–449. doi: 10.1016/j.algal.2016.08.018
- Danquah, M., Liu, B., y Haru, R. (2011). Analysis of process configurations for bioethanol production from microalgal biomass. En S. S. Shaukat (Ed.), *Progress in biomass and bioenergy production* (cap. 20). Rijeka: InTech.
- Dávila, B. (2016). *Obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual empleando ozoflotación como método de cosecha* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Day, C., Tseng, Y.-C., Puyol, R., y Nissan, J. (2015). Efficiency Comparisons of Secondary Biofuels. *PAM Review: Energy Science & Technology*, 1(1), 70.
- de Farias Silva, C. E., Meneghello, D., y Bertucco, A. (2018). A systematic study regarding hydrolysis and ethanol fermentation from microalgal biomass. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14(February), 172–182. doi: 10.1016/j.bcab.2018.02.016
- de Farias Silva, C. E., Meneghello, D., de Souza Abud, A. K., y Bertucco, A. (2018). *Pretreatment of microalgal biomass to improve the enzymatic hydrolysis of carbohydrates by ultrasonication: Yield vs energy consumption*. Elsevier. doi: 10.1016/j.jksus.2018.09.007
- Deparis, Q., Claes, A., Foulquié-Moreno, M. R., y Thevelein, J. M. (2017). Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS yeast research*, 17(4), 1–17. doi: 10.1093/femsyr/fox036
- Dick, C. F., Dos-Santos, A. L. A., y Meyer-Fernandes, J. R. (2011). Inorganic Phosphate as an Important Regulator of Phosphatases. *Enzyme Research*, 2011, 1–7. doi: 10.4061/2011/103980
- Does, A. L., y Bisson, L. F. (1989). Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts. *Journal of Bacteriology*, 171(3), 1303–1308. doi: 10.1128/jb.171.3.1303-1308.1989

- Dragone, G., Fernandes, B. D., Abreu, A. P., Vicente, A. A., y Teixeira, J. A. (2011). Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, 88(10), 3331–3335. doi: 10.1016/j.apenergy.2011.03.012
- Du, C., Zhao, X., Liu, D., Lin, C. S. K., Wilson, K., Luque, R., y Clark, J. (2016). Introduction: An overview of biofuels and production technologies. En R. Luque, C. S. K. Lin, K. Wilson, y J. Clark (Eds.), *Handbook of biofuels production (second edition)* (Second Edi ed., pp. 3–12). Woodhead Publishing.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., y Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. doi: 10.1021/ac60111a017
- Dutta, K., Daverey, A., y Lin, J.-G. (2014). Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy*, 69, 114–122. doi: 10.1016/j.renene.2014.02.044
- EIA. (2017). *Biofuels: Ethanol and Biodiesel Explained*. <https://www.eia.gov/energyexplained/index.cfm?page=biofuel{ }home>. (Consultada: 2018-01-23)
- EIA. (2018). *Petroleum Statistics*. <https://www.eia.gov/energyexplained/index.cfm?page=oil{ }home{#}tab3>. (Consultada: 2018-01-22)
- Ellis, J. T., Hengge, N. N., Sims, R. C., y Miller, C. D. (2012). Acetone, butanol, and ethanol production from wastewater algae. *Bioresource Technology*, 111, 491–495. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2012.02.002
- España-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado, J., Hernández-Zarate, G., y Alzate-Gaviria, L. (2011). Vinasses: characterization and treatments. *Waste Management & Research*, 29(12), 1235-1250. (PMID: 21242176) doi: 10.1177/0734242X10387313
- Eze, V. C., Velasquez-Orta, S. B., Hernández-García, A., Monje-Ramírez, I., y Orta-Ledesma, M. T. (2018). Kinetic modelling of microalgae cultivation for wastewater treatment and carbon dioxide sequestration. *Algal Research*, 32, 131–141. doi: 10.1016/j.algal.2018.03.015
- Fargione, J., Hill, J., Tilman, D., Polasky, S., y Hawthorne, P. (2008). Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1235–8. doi: 10.1126/science.1152747
- Fournier, P. A. (2015). *Obtención de biomasa microalgal y remoción de nutrientes de aguas residuales mediante el cultivo de microalgas (Desmodesmus sp. y Scenedesmus sp.) con potencial uso en la producción de biocombustibles* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Freitas-Mesquita, A., y Meyer-Fernandes, J. (2014). Biochemical Properties and Possible Roles of Ectophosphatase Activities in Fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2289–2304. doi: 10.3390/ijms15022289
- Ge, S., Wang, S., Yang, X., Qiu, S., Li, B., y Peng, Y. (2015). Detection of nitrifiers and

- evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, 140, 85–98. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.02.004
- Geider, R., y La Roche, J. (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37(1), 1–17. doi: 10.1017/S0967026201003456
- Guadalupe Medina, V., Almering, M. J. H., van Maris, A. J. A., y Pronk, J. T. (2010). Elimination of Glycerol Production in Anaerobic Cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain Engineered To Use Acetic Acid as an Electron Acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 190–195. doi: 10.1128/AEM.01772-09
- Guldhe, A., Ansari, F. A., Singh, P., y Bux, F. (2017). Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecological Engineering*, 99, 47–53. doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.11.013
- HACH Co. (2000). *Manual de análisis de agua* (3ra Ed ed.). Loveland, EE.UU..
- Hernández, A. (2017). *Efecto de las condiciones de cultivo en la composición bioquímica y producción de biomasa de un consorcio de microalgas cultivadas en agua residual y lixiviado* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hernandez, D., Riaño, B., Coca, M., y García-González, M. (2015). Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, 262, 939–945. doi: 10.1016/J.CEJ.2014.10.049
- Hernández-García, A., Velásquez-Orta, S. B., Novelo, E., Yáñez-Noguez, I., Monje-Ramírez, I., y Orta Ledesma, M. T. (2019). Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 435–444. doi: 10.1016/J.ECOENV.2019.02.052
- Ho, D. P., Ngo, H. H., y Guo, W. (2014). A mini review on renewable sources for biofuel. *Bioresource Technology*, 169, 742–749. doi: 10.1016/j.biortech.2014.07.022
- Hsin Ho, S., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., y Chang, J. S. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, 135, 191–198. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.015
- IEA. (2011). *Biofuels can provide up to 27 % of world transportation fuel by 2050, IEA report says - IEA 'roadmap' shows how biofuel production can be expanded in a sustainable way, and identifies needed technologies and policy actions.*
- IEA. (2016). *World Energy Outlook 2016*. IEA/OECD, Paris.
- IEA. (2017a). *Key World Energy Statistics 2017*. IEA Statistics, 80.
- IEA. (2017b). *Renewables Information 2017*. IEA Statistics, 497.
- In, Y. W., Kim, J. J., Kim, H. J., y Oh, S. W. (2013). Antimicrobial Activities of Acetic Acid, Citric Acid and Lactic Acid against *Shigella* Species. *Journal of Food Safety*, 33(1), 79–85.

- doi: 10.1111/jfs.12025
- Jeffries, T. W., y Jin, Y. S. (2000). Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Advances in applied microbiology*, 47, 221–68. doi: 10.1016/S0065-2164(00)47006-1
- Johnson, E. A., y Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast biotechnology. En *The yeasts*. doi: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3
- Joshi, B., Raj, M., Dinita, B., Jarina, S., y Rajani, J. (2011). Lignocellulosic ethanol production : Current practices and recent developments. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6(November), 172–182.
- Juneja, A., Ceballos, R. M., y Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. *Energies*, 6(9), 4607–4638. doi: 10.3390/en6094607
- Kieliszek, M., Błażejczak, S., y Kurek, E. (2017). Binding and Conversion of Selenium in *Candida utilis* ATCC 9950 Yeasts in Bioreactor Culture. *Molecules*, 22(3), 352. doi: 10.3390/molecules22030352
- Kieliszek, M., Kot, A. M., Bzducha-Wróbel, A., Błażejczak, S., Gientka, I., y Kurcz, A. (2017). Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), 185–198.
- Klinke, H. B., Thomsen, A. B., y Ahring, B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(1), 10–26. doi: 10.1007/s00253-004-1642-2
- Knight, J. A., Anderson, S., y Rawle, J. M. (1972). Chemical Basis of the Sulfo-phospho-vanillin Reaction for Estimating Total Serum Lipids. *Clinical Chemistry*, 18(3), 199 LP – 202.
- Kumar Singh, N., y Dhar, D. W. (2011). Microalgae as second generation biofuel. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(4), 605–629. doi: 10.1007/s13593-011-0018-0
- Kurcz, A., Błażejczak, S., Kot, A. M., Bzducha-Wróbel, A., y Kieliszek, M. (2018). Application of Industrial Wastes for the Production of Microbial Single-Cell Protein by Fodder Yeast *Candida utilis*. *Waste and Biomass Valorization*, 9(1), 57–64. doi: 10.1007/s12649-016-9782-z
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., y Boekhout, T. (2011a). Definition, classification and nomenclature of the yeasts. En *The yeasts*. doi: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00001-X
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., y Boekhout, T. (2011b). *The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th Edition*.
- Kwiatkowski, J. R., McAloon, A. J., Taylor, F., y Johnston, D. B. (2006). Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products*, 23(3), 288–296. doi: 10.1016/j.indcrop.2005.08.004
- Laurens, L. M., Nagle, N., Davis, R., Sweeney, N., Van Wychen, S., Lowell, A., y Pienkos, P. T.

- (2015). Acid-catalyzed algal biomass pretreatment for integrated lipid and carbohydrate-based biofuels production. *Green Chemistry*, 17(2), 1145–1158. doi: 10.1039/c4gc01612b
- Lee, S. (2007). Ethanol from Corn. En *Handbook of alternative fuel technologies* (pp. 323–341). doi: 10.1201/9781420014518.ch10
- Lim, M. W., Lau, E. V., y Poh, P. E. (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 14–45.
- Lin, Y., y Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(6), 627–642. doi: 10.1007/s00253-005-0229-x
- Magro, F. G., Decesaro, A., Berticelli, R., y Colla, L. M. (2016). Produção de Bioetanol Utilizando Microalgas: Uma Revisão. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 37(1), 159. doi: 10.5433/1679-0375.2016v37n1p159
- Makisha, N., y Semenova, D. (2018). Production of biogas at wastewater treatment plants and its further application. *MATEC Web of Conferences*, 144(04016), 1–7. doi: 10.1051/mateconf/201814404016
- Mcaloon, A., Taylor, F., Yee, W., Ibsen, K., y Wooley, R. (2000). *Determining the Cost of Producing Ethanol from Corn Starch and Lignocellulosic Feedstocks* (n.º October). doi: NREL/TP-580-28893
- Medina, M., Ospino, Y., y Tejada, L. (2015). Esterificación y transesterificación de aceites residuales para obtener biodiesel. *Luna Azul*, 40(40), 25–34. doi: 10.17151/luaz.2015.40.3
- Miranda, J., Passarinho, P., y Gouveia, L. (2012). Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 104, 342–348. doi: 10.1016/j.biortech.2011.10.059
- Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., y Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.03.003
- Mohr, A., y Raman, S. (2013). Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. *Energy Policy*, 63, 114–122.
- Morone, P., y Cottoni, L. (2016). Biofuels: Technology, economics, and policy issues. En R. Luque, C. S. K. Lin, K. Wilson, y J. Clark (Eds.), *Handbook of biofuels production (second edition)* (Second Edi ed., pp. 61–83). Woodhead Publishing.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., y Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 578–597. doi: 10.1016/j.rser.2009.10.003
- Neiman, A. M. (2005). Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 565–584. doi: 10.1128/MMBR.69.4.565-584.2005

- Nielsen, M., y Arneborg, N. (2007). The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. *Food Microbiology*, 24(1), 101–105. doi: 10.1016/j.fm.2006.03.005
- Nigam, P. S., y Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52–68.
- Nikolaus, B. E., Wayman, B. E., y Encinas, E. (1988). The bactericidal effect of citric acid and sodiumhypochlorite on anaerobic bacteria. *Journal of Endodontics*, 14(1), 31–34. doi: 10.1016/S0099-2399(88)80238-3
- Olsson, L., y Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(5), 312–331. doi: 10.1016/0141-0229(95)00157-3
- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R. M., Ståhlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., y Gustafsson, L. (2004). Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO reports*, 5(5), 532–7. doi: 10.1038/sj.embor.7400132
- Paes, C. R., Faria, G. R., Tinoco, N. A., Castro, D. J., Barbarino, E., y Lourenco, S. O. (2016). Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(2), 275–292. doi: 10.3856/vol44-issue2-fulltext-9
- Pamment, N. B., y Hall, R. J. (1978). Absence of External Causes of Lag in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 105(2), 297–304.
- Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E., y Madamwar, D. (2011). Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, 102(22), 10163–10172. doi: 10.1016/j.biortech.2011.08.030
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., De-Bashan, L. E., y Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.037
- Posten, C., y Schaub, G. (2009). Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels—A process view. *Journal of Biotechnology*, 142(1), 64–69. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.03.015
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R., y Thevelein, J. M. (2015). Looking beyond *Saccharomyces*: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, 15(6), 1–13. doi: 10.1093/femsyr/fov053
- Ramsundar, P., Guldhe, A., Singh, P., y Bux, F. (2017). Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella sorokiniana* under different modes of cultivation. *Bioresource Technology*, 227, 82–92. doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.037
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., y Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A

- critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, 103, 444–467. doi: 10.1016/j.apenergy.2012.10.004
- Reis, C. E. R., Bento, H. B. S., Alves, T. M., Carvalho, A. K. F., y Castro, H. F. D. (2019). Vinasse treatment within the sugarcane-ethanol industry using ozone combined with anaerobic and aerobic microbial processes. *Environments*, 6(1), 5. doi: 10.3390/environments6010005
- Reyna-Beltrán, E., Iranzo, M., Calderón-González, K. G., Mondragón-Flores, R., Labra-Barrios, M. L., Mormeneo, S., y Luna-Arias, J. P. (2018). The *Candida albicans* *eno1* gene encodes a transglutaminase involved in growth, cell division, morphogenesis, and osmotic protection. *Journal of Biological Chemistry*, 293(12), 4304–4323. doi: 10.1074/jbc.m117.810440
- Saladini, F., Patrizi, N., Pulselli, F. M., Marchettini, N., y Bastianoni, S. (2016). Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66(September 2015), 221–227. doi: 10.1016/j.rser.2016.07.073
- Salari, R., y Salari, R. (2017). Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic physician*, 9(1), 3592–3597. doi: 10.19082/3592
- Sanchez Rizza, L., Sanz Smachetti, M. E., Do Nascimento, M., Salerno, G. L., y Curatti, L. (2017). Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. *Algal Research*, 22, 140–147. doi: 10.1016/j.algal.2016.12.021
- Sankaran, S., Khanal, S. K., Jasti, N., Jin, B., Pometto, A. L., y Van Leeuwen, J. H. (2010). Use of Filamentous Fungi for Wastewater Treatment and Production of High Value Fungal Byproducts: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40(5), 400–449. doi: 10.1080/10643380802278943
- Shang, Y. H., Zeng, Y. J., Zhu, P., y Zhong, Q. P. (2016). Acetate metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* at different temperatures during lychee wine fermentation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(3), 512–520. doi: 10.1080/13102818.2016.1142831
- Sharma, A. K., Sahoo, P. K., Singhal, S., y Patel, A. (2016). Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp. *3 Biotech*, 6(2), 116. doi: 6
- Shimadzu. (2016). *GC Column Guidebook* (1st ed.). Tokyo: Shimadzu Corp.
- Simas-Rodrigues, C., Villela, H. D. M., Martins, A. P., Marques, L. G., Colepicolo, P., Bioquímica, D. D., ... Prestes, A. L. (2015). Microalgae for economic applications : advantages and perspectives for bioethanol. , 66(14), 4097–4108. doi: 10.1093/jxb/erv130
- Singh, A., Olsen, S. I., y Nigam, P. S. (2011). A viable technology to generate third-generation biofuel. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(11), 1349–1353. doi: 10.1002/jctb.2666
- Sirajunnisa, A. R., y Surendhiran, D. (2016). Algae – A quintessential and positive resource of bioethanol production: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66(August), 248–267. doi: 10.1016/j.rser.2016.07.024

- Siverio, J. M. (2002). Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 277–284. doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00615.x
- Starmer, W. T., y Lachance, M. A. (2011). Yeast ecology. En *The yeasts* (Vol. 1, pp. 65–83). doi: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00006-9
- Suali, E., y Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316–4342. doi: 10.1016/j.rser.2012.03.047
- Takle, S. P., Vohra, M., y Patil, S. (2010). HPLC method for quantitative estimation of polyhydric alcohols and sugars in bio-glycerol production.. doi: 10.13140/2.1.1531.9846
- Thangavelu, S. K., Ahmed, A. S., y Ani, F. N. (2016). Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 56, 820–835. doi: 10.1016/j.rser.2015.11.089
- Thanh, N. C., y Simard, R. E. (1973). Biological treatment of wastewater by yeasts. *J Water Pollut Control Fed*, 45(4), 674–680.
- Tofighi, A., Mazaheri Assadi, M., Asadirad, M., y Zare Karizi, S. (2014). Bio-ethanol production by a novel autochthonous thermo-tolerant yeast isolated from wastewater. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12(1), 107. doi: 10.1186/2052-336X-12-107
- Tomaselli, L. (2007). The Microalgal Cell. En A. Richmond (Ed.), *Handbook of microalgal culture* (pp. 1–19). Oxford: Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1002/9780470995280.ch1
- Valdez-Guzmán, B. E., Rios-Del Toro, E. E., Cardenas-López, R. L., Méndez-Acosta, H. O., González-Álvarez, V., y Arreola-Vargas, J. (2019). Enhancing biohydrogen production from Agave tequilana bagasse: Detoxified vs. Undetoxified acid hydrolysates. *Bioresource Technology*, 276, 74–80. doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.101
- Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W. A., y Van Dijken, J. P. (2009). Glucose Transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative Yeasts. *Microbiology*, 135(1989), 2399–2406. doi: 10.1099/00221287-135-9-2399
- van Dijken, J. P., Weusthuis, R. A., y Pronk, J. T. (1993). Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63(1), 343–352. doi: 10.1007/BF00871229
- Vasserot, Y., Mornet, F., y Jeandet, P. (2010). Acetic acid removal by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation in oenological conditions. Metabolic consequences. *Food Chemistry*, 119(3), 1220–1223. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.08.008
- Vázquez, H., y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 2007, 249–259.
- Velazquez-Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R. M., Colla, L. M., Sáenz-Galindo, A., Cervantes-Cisneros, D. E., Aguilar, C. N., ... Ruiz, H. A. (2018). Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review.

- Biofuel Research Journal*, 17, 780–791. doi: 10.18331/BRJ2018.5.1.5
- Venkata Mohan, S., Rohit, M., Chiranjeevi, P., Chandra, R., y Navaneeth, B. (2015). Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. *Bioresource Technology*, 184, 169–178. doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.056
- Villaseñor, J., Capilla, P., Rodrigo, M., Cañizares, P., y Fernández, F. (2013). Operation of a horizontal subsurface flow constructed wetland – Microbial fuel cell treating wastewater under different organic loading rates. *Water Research*, 47(17), 6731–6738. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.005
- Walls, L. (2018). *Novel Wastewater Treatment Systems - Wild Yeast Outperform Microalgae under Non-Sterile Heterotrophic Conditions* (Tesis de Maestría). Newcastle University.
- Wehr, J. D., Sheath, R. G., y Kociolek, J. P. (2015). *Freshwater Algae of North America*. Elsevier. doi: 10.1016/C2010-0-66664-8
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. En *Pcr protocols, a guide to methods and applications* (pp. 315–322).
- Williams, P. J. I. B., y Laurens, L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 554. doi: 10.1039/b924978h
- Wongkarnka, M. (2005). *The application of aerobic yeast for treatment of high strength food processing wastewater containing furfural* (Tesis de Doctorado). Iowa State University.
- Yeong, F. M. (2005). Severing all ties between mother and daughter: cell separation in budding yeast. *Molecular Microbiology*, 55(5), 1325–1331. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04507.x

Apéndice A

Identificación molecular de levaduras



CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas
y Cultivos Celulares



I N F O R M E :

“Estudio para la identificación molecular de dos levaduras a partir de la secuencia del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S ribosomal”

Elaborado por:

Dr. Daniel Estrada Bárcenas,
Responsable del laboratorio de Hongos filamentosos y
Biología Molecular

6 de julio de 2018



CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas
y Cultivos Celulares



Introducción

Las técnicas moleculares se basan en el estudio del genoma nuclear, ribosómico y mitocondrial. Estas en su mayoría son costosas y a veces laboriosas, pero son herramientas que presentan exactitud, rapidez y factibilidad, aplicadas en cualquier ámbito laboral, en particular a la industria (Orberá, 2004).

Los ácidos nucleicos y proteínas son macromoléculas comunes a todos los seres vivos, estas presentan cambios en el tiempo progresivo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. Un ejemplo son las regiones espaciadoras internas (ITS por sus siglas en inglés, Internal transcribed spacer) que son parte del ADN ribosómico (ARNr) y se usan ampliamente para la ecología molecular del reino fungi (Peay et al 2008) y son las secuencias universales de códigos de barras para la identificación de hongos (Schoch et al., 2012).

Los fragmentos ITS son una molécula polirribonucleótida de entre 500 y 800 nucleótidos (nt) dependiendo el género y la especie estudiada (Schoch et al., 2012), estos son muy útiles para la sistemática molecular a nivel de especie, e incluso a nivel intraespecífico (por ejemplo, para identificar distintas variedades, ya sea en hospederos o zonas geográficas distintas). Debido a su mayor grado de variación que otras regiones génicas (White, 1990) El método molecular de identificación mediante secuenciación del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S ARNr incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra; b) búsqueda BLAST de la secuencia de nucleótidos; y c) análisis de la secuencia.

Metodología

Las cepas levadura chica y levadura grande fueron sembradas en agar YM por 48 horas a una temperatura de 28 °C, posteriormente se tomaron 500 mg de biomasa para la extracción de ADN, por medio del kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep. La cantidad de ADN obtenida se calculó a partir de espectrofotómetro Epoch (BioTech). El fragmento 16S-

Av. Instituto Politécnico Nacional N° 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Deleg. GA Madero. Ciudad de México. C.P. 07360

Tél. +52 (55) 57-47-39-03

Fax: +52 (55) 57-47-70-02

<http://cdbb.cinvestav.mx/>



CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas
y Cultivos Celulares



ITS1-5.8S-ITS2-26S se amplificó en una Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) usando los oligonucleótidos ITS5 y ITS4 de acuerdo a las condiciones previamente descritas por White (1990), a partir del ADN total obtenido. Se utilizó un gel de agarosa al 1% para comprobar el tamaño del fragmento esperado (500-800 nt) por 15 minutos a 100V.

La secuenciación del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S fue realizada por el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del CINVESTAV con el cual se obtuvieron dos secuencias por cada muestra. Las secuencias fueron editadas manualmente por medio del programa Chromas 2.4 (2012) conformando una secuencia consenso, por cada aislamiento. Las secuencias consenso de cada una de las muestras se comparó con el programa nucleotide BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para encontrar similitudes entre secuencias biológicas.

La secuencia consenso se alineó junto con las resultantes de la búsqueda BLAST, con el programa Clustal W incluido dentro del programa MEGA 6.0 (Tamura, et al. 2013) para realizar un dendrograma con el método de Neighbor-Joining para observar las similitudes entre secuencias de especies tipos definidas, que resultaron relacionadas con el programa de BLAST. Finalmente se realizó un dendrograma a partir del algoritmo de Neighbor-Joining para observar las relaciones filogenéticas entre cepas del mismo género, con distintas secuencias de holotipos de especies definidas.



CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas
y Cultivos Celulares



Resultados

En el tabla 1 se muestra el ADN la concentración obtenida para las dos cepas, a partir de estas se hizo una dilución a 100 ng/μl para la amplificación de ADN del gen 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S, dando resultado positivo para ambas muestras.

Tabla 1. ADN obtenido para levadura chica y grande (ng/μl)

CEPA	CONCENTRACIÓN DE ADN (ng/μl)
LEVADURA CHICA	433
LEVADURA GRANDE	276

Análisis molecular de la levadura chica

El producto de la PCR de la levadura chica fue secuenciado y editado, obteniendo una secuencia consenso del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S con un total 547 nucleótidos (Figura 1).

```

TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGAGAACCTGGGCCTGCGCTACTTGCGCGGCTC
CAACCAATACACAGTGTATTTTGCTTCTTTTGCTTTGGCTCTGCCAAAGGTTTTAAACACAGAAAT
TTATTTTCTTTAAGAACAGTCAATTTGAAATTTAATCTTCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGG
TTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGGTTTTCGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCATATTGCGCTCTCTGGCATTCCAGAGAGCATGCCTGTTTGAGCGTCA
TTTCTCTCTCAAGATCCTCTAGGGGACTTGGTATTGAGTGATACTCTGTGTTAACTTGAAATACTC
TAGGCAGAGCTCCCCCTGGAAATCCTCTGGGCCGAAATAATGTATTAGGTTCTACCAACTCGTT
ATTTTCCAGACAGACTTCCAGGCAGAGCTCGGCTTAACAACCTTTCTAAGCTTGACCTCAAATCA
GGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA
    
```

Figura 1. Secuencia del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de la levadura chica con un total 547 nucleótidos.



CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas
y Cultivos Celulares



Las secuencias más similares con la cepa denominada “levadura chica” de acuerdo a la búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), fue la especie *Cyberlindnera* (Tabla 2).

La secuencia más similar a la levadura chica es *Cyberlindnera*, con una cobertura de la secuencia del 99% y una identidad del 99%.

Tabla 2. Secuencias similares con la secuencia consenso de la levadura chica obtenidas en la búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (fecha de la búsqueda 05-07-2018).



CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas
y Cultivos Celulares



Se realizó un dendrográma con las secuencias de las diferentes cepas de distintas especies relacionadas con el género *Cyberlindnera* para observar la relación con la cepa identificada (Figura 2).

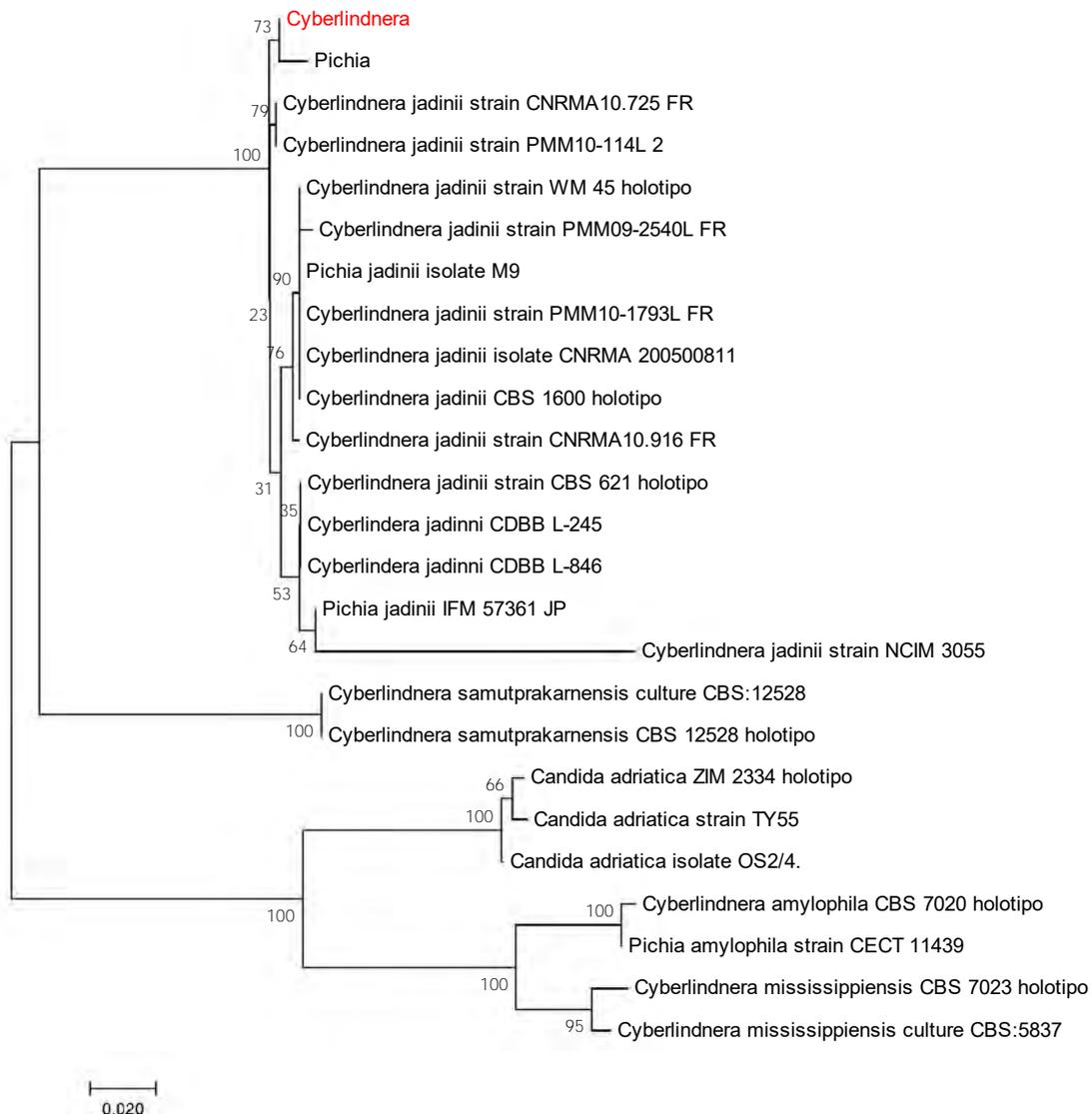


Figura 2. Dendrográma de similitud de las secuencias consenso del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de la cepa "Levadura chica" (color rojo) con un total 638 posiciones de nucleótidos por medio del algoritmo de parámetro 3 de Tamura para Neighbor-Joining.

Av. Instituto Politécnico Nacional N° 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Deleg. GA Madero. Ciudad de México. C.P. 07360

Tél. +52 (55) 57-47-39-03

Fax: +52 (55) 57-47-70-02

<http://cdbb.cinvestav.mx/>



CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas
y Cultivos Celulares



Análisis molecular de la levadura grande

El producto de la PCR de la levadura grande fue secuenciado y editado, obteniendo una secuencia consenso del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S con un total 428 nucleótidos (Figura 3).

```
TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTTATCCACCACACTGCGTGG
GCGACACGAAACACCGAAACCGAACGCACGCCGTCAAGCAAGAAATCCACAAAACCTTC
AACACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGT
GTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCCTGGTAT
TCCGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCTTCTTGGAGCGGAGCTTCAGACCTG
GCGGGCTGTCTCTCGGGACGGCGGCCCAAAGCGAGGGGCCTTCTGCGCGAACTAGA
CTGTGCGCGCGGGGCGGCCGGAAGCTTATTACCAAGCTCGACCTCAGATCAGGCAG
GAGTACCCGCTGAACTTAAG
```

Figura 3. Secuencia del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de la levadura grande con un total 428 nucleótidos.

Las secuencias más similares con la cepa denominada “levadura grande” de acuerdo a la búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), fue la especie *Pichia* (Tabla 3).

La secuencia más similar a la levadura grande es *Pichia*, con una cobertura de la secuencia del 100% y una identidad del 99%.



CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas
y Cultivos Celulares



Tabla 3. Secuencias similares con la secuencia consenso de la levadura grande obtenidas en la búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (fecha de la búsqueda 05-07-2018).



CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas
y Cultivos Celulares



Se realizó un dendrográma con las secuencias de las diferentes cepas de distintas especies relacionadas con el género *Pichia* para observar la relación con la cepa identificada (Figura 4).

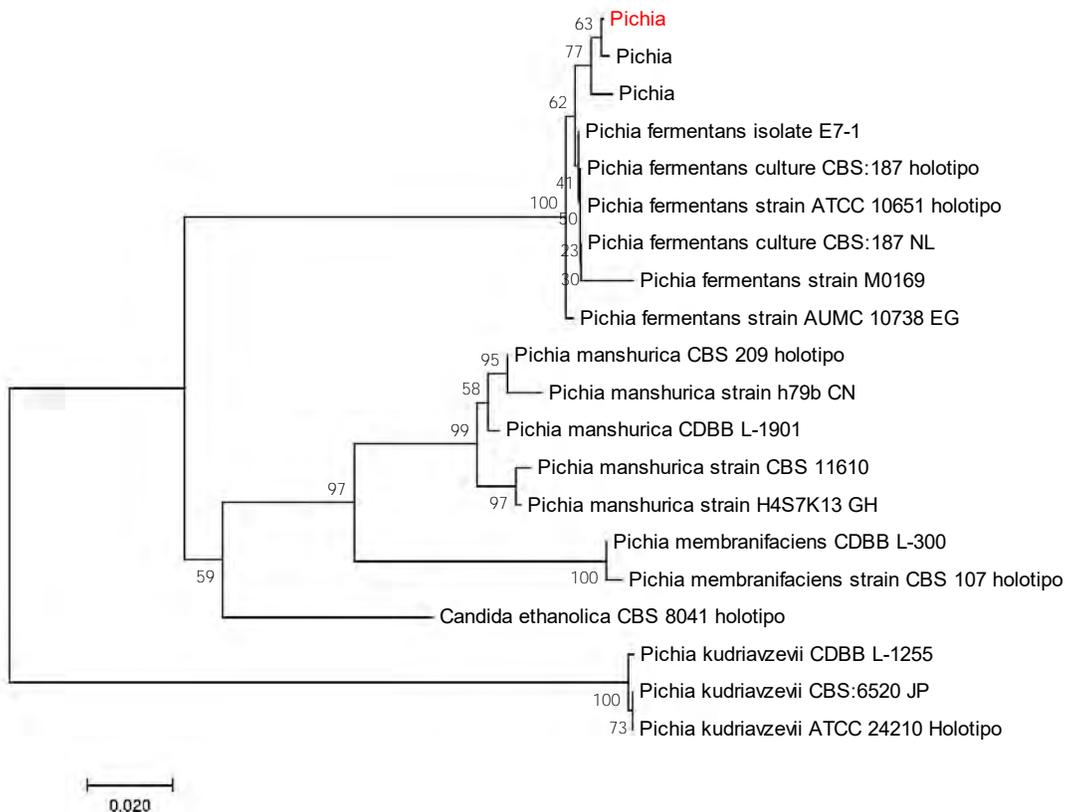


Figura 4. Dendrográma de similitud de las secuencias consenso del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de la cepa "Levadura grande" (color rojo) con un total 502 posiciones de nucleótidos por medio del algoritmo de parámetro 3 de Tamura para Neighbor-Joining.



CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas
y Cultivos Celulares



Conclusiones

El análisis molecular de la secuencia del fragmento 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S ribosomal de la levadura chica, nos determina la especie *Cyberlindnera j* con un 99% de similitud con la secuencia tipo de esa especie.

Clasificación Taxonómica:

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Saccharomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Cyberlindnera*

Especie teleomorfa: *Cyberlindnera*

Sinónimos anamorfos: *Candida* , *Candida*

El análisis molecular de la secuencia del fragmento 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S ribosomal de la levadura grande, nos determina la especie *Pichia* con un 99% de similitud con la secuencia tipo de esa especie.

Clasificación Taxonómica:

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Saccharomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Pichia*

Especie teleomorfa: *Pichia*

Sinónimos anamorfos: *Candida*



CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas
y Cultivos Celulares



REFERENCIAS

Orberá, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev. Iberoam. Micol.* 21: 15-19.

Peay K.G.; Kennedy P.G.; Bruns T.D. (2008). "Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master". *BioScience.* 58: 799–810.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P.W.; et al. (2012). "Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi". *PNAS.* 109 (16): 6241–6246.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* 18, 315–322.

Apéndice B

Curvas de calibración

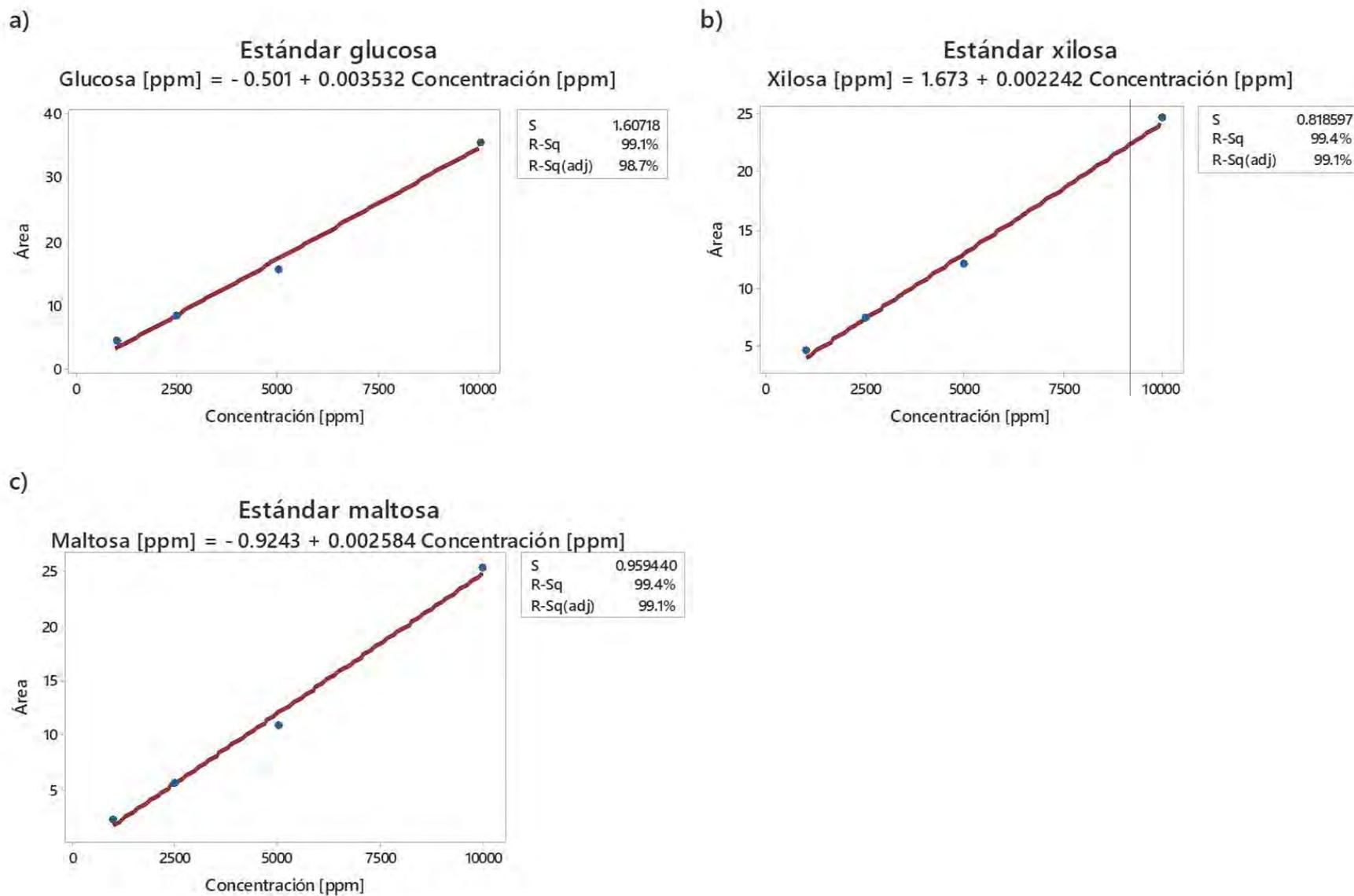


Figura B.1. Curvas de calibración para Glucosa (a), Xilosa (b) y Maltosa (c) empleadas en HPLC Perkin Elmer Flexar™

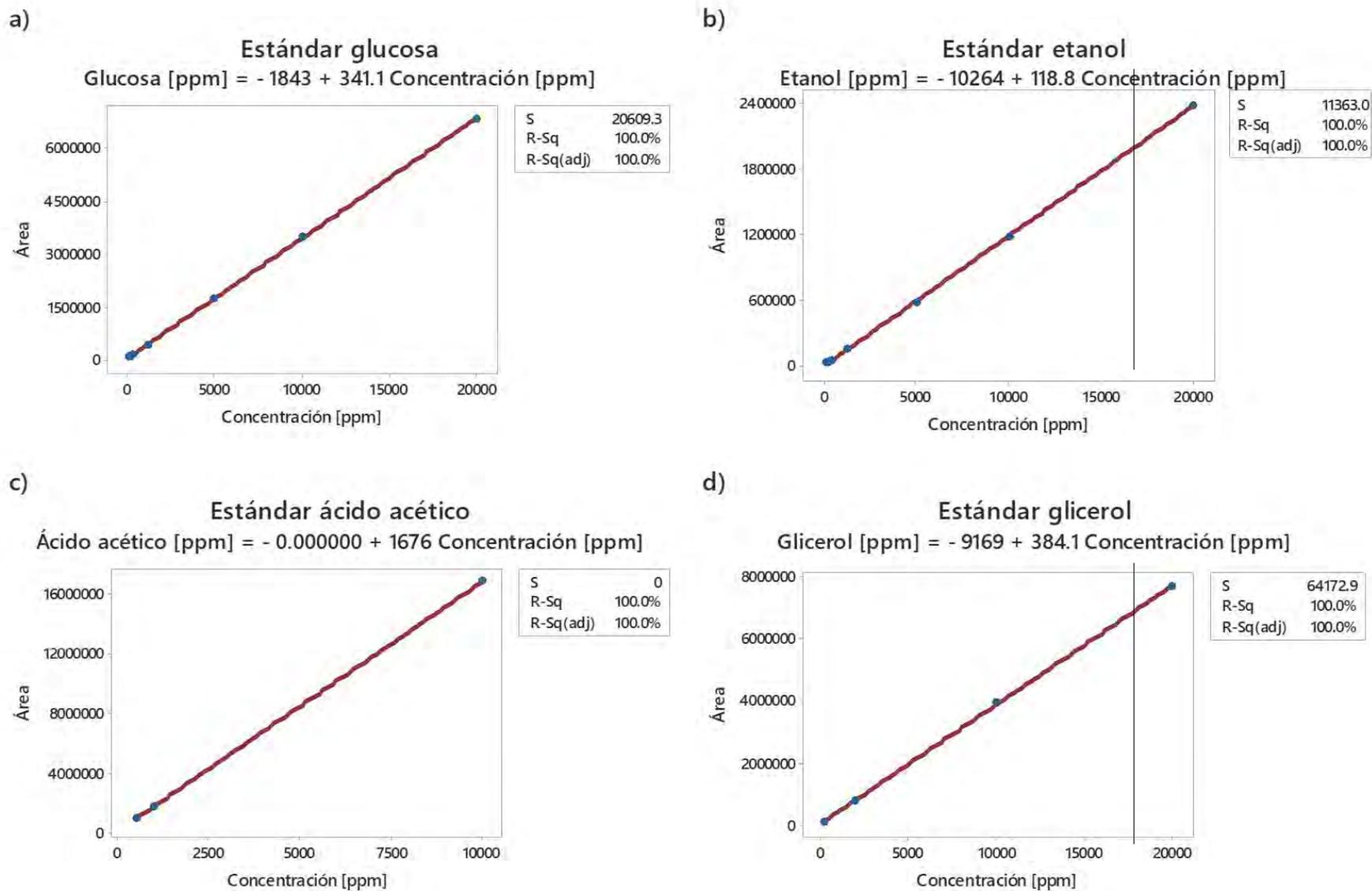


Figura B.2. Curvas de calibración para Glucosa (a), Etanol (b), Ácido acético (c) y Glicerol (d) empleadas en HPLC WATERS U6K™

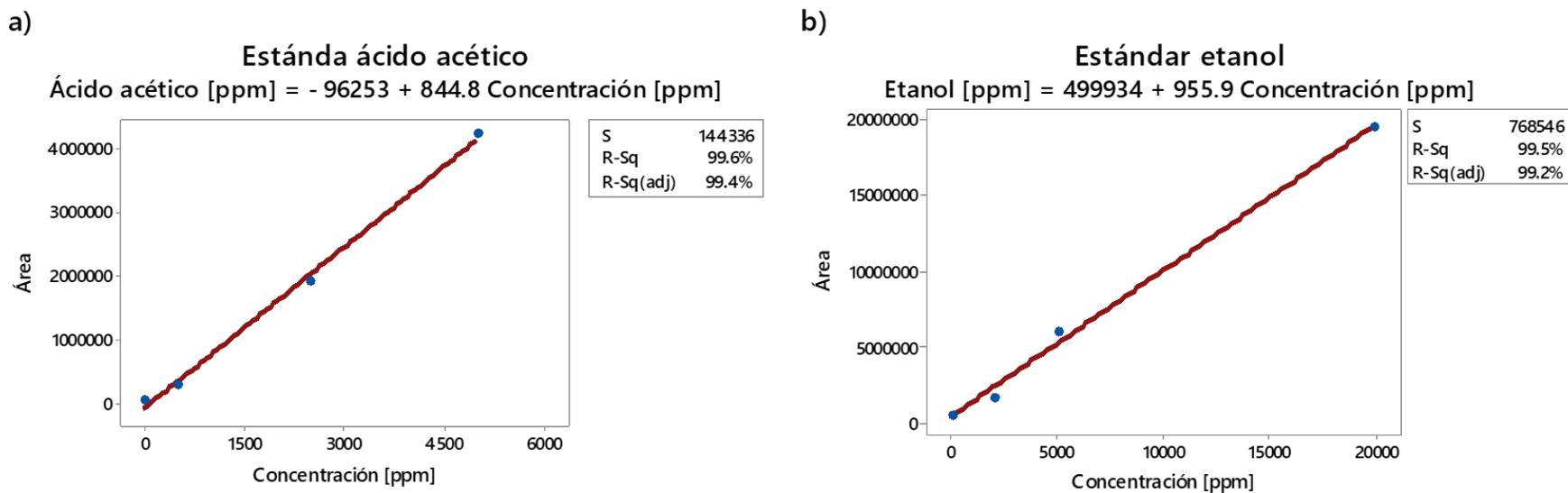


Figura B.3. Curvas de calibración para Ácido acético (a) y Etanol (b) empleadas en GC Zebron ZB-WAXplus™

Apéndice C

Balance estequiométrico de la fermentación alcohólica

Fórmula fermentación alcohólica



Masa molecular glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) = 180.156 g mol⁻¹

Masa molecular etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) = 46.071 g mol⁻¹

Densidad etanol = 0.79 g ml⁻¹

Moles de glucosa

$$1.0 \text{ g C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \frac{1 \text{ mol C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6}{180.156 \text{ g C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6} = 5.5 \times 10^{-3} \text{ mol C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$$

Moles de etanol teórico

$$5.5 \times 10^{-3} \text{ mol C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \frac{2 \text{ mol C}_2\text{H}_5\text{OH}}{1 \text{ mol C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6} = 1.1 \times 10^{-3} \text{ mol C}_2\text{H}_5\text{OH}$$

Masa de etanol teórico

$$1.1 \times 10^{-3} \text{ mol C}_2\text{H}_5\text{OH} \times \frac{46.07 \text{ g C}_2\text{H}_5\text{OH}}{1 \text{ mol C}_2\text{H}_5\text{OH}} = 0.511 \text{ g C}_2\text{H}_5\text{OH}$$

Tasa de producción de etanol por glucosa

(Rendimiento máximo teórico)

$$0.511 \text{ g C}_2\text{H}_5\text{OH} \times \frac{1}{1 \text{ g C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6} = 0.511 \frac{\text{g C}_2\text{H}_5\text{OH}}{\text{g C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6}$$

Productos resultantes del proyecto de investigación

Publicaciones en revistas indexadas

- **Romero-Frasca, E.**, Velasquez-Orta, S. B., ..., & Orta Ledesma, M. T. (2019). *Bioprospecting of wild type ethanologenic yeast for bioethanol production using wastewater-grown microalgae*. Bioresource Technology.
- Walls, L., Velasquez-Orta, S. B., **Romero-Frasca, E.**, ... & Orta Ledesma, M. T. (2019). *Non-sterile heterotrophic cultivation of native wastewater yeast and microalgae for integrated municipal wastewater treatment and bioethanol production*. Biochemical Engineering Journal. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107319>

Congresos internacionales

- **Romero-Frasca, E.**, Velasquez-Orta, S. B., ... & Orta Ledesma, M. T. Julio 2019. *Nutrient removal and ethanol production via pre-treated microalgae biomass as carbon source in domestic wastewater using wild-type yeast*. IWA Conference on Algal Technologies and Stabilisation Ponds for Wastewater Treatment and Resource Recovery. Valladolid, España.

Proyectos/Estancias en convenio internacional

- Participación en el Proyecto **ATZINTLI: Novedoso sistema para el tratamiento agua y captura de CO₂ utilizando microalgas y ozonoflotación**.
- Estancia de Investigación en la Escuela de Ingeniería (*School of Engineering*) de la Universidad de Newcastle, RU. Septiembre 2018 a noviembre 2018.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado de Ingeniería Ambiental por la formación recibida durante los estudios de Maestría y el apoyo durante mi desarrollo académico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, a través de sus convocatorias Becas Nacionales 2017 y Becas de Movilización 2018 por el financiamiento de mis estudios de posgrado en México y el extranjero.

Al Módulo de Apoyos de la Coordinación General de Estudios de Posgrado por el financiamiento para realizar mi estancia de investigación en el extranjero.

A mi tutora principal, Dra. Ma. Teresa Orta Ledesma por incondicional apoyo brindado, durante la elaboración de este proyecto.

A los miembros del comité tutor, el Mtro. Raunel Tinoco Valencia, la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky, el Dr. Victor Luna Pabello y la Dra. Idania Valdez Vázquez por su asesoramiento, comentarios y sugerencias durante la realización de esta tesis.

A la Q. Viviana Escobar Sánchez por su extraordinario apoyo durante el aislamiento y caracterización morfológica de las levaduras.

A la Dra. Sharon Belinda Velásquez Orta por recibirme y asistirme durante mi visita en la Universidad de Newcastle.

A los académicos del grupo de investigación, la Mtra. Isaura Yáñez Noguez y el Dr. Ignacio Monje Ramírez, y todos los colegas del cubículo 410 por su colaboración y ayuda brindada a lo largo de mi trabajo de investigación.