

## Fábrica de células para la obtención de bioenergía

René Steven Pilay Dávila, Karen Fernanda Loor Moreira, Alexandra Córdova, Maria Antonieta Riera\*

Departamento de Procesos Químicos, Alimentos y Biotecnología  
Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas. Carrera de Ingeniería Química  
Universidad Técnica de Manabí, Ecuador

(\*) [maria.riera@utm.edu.ec](mailto:maria.riera@utm.edu.ec)

Recibido: 25/07/2024

Revisado: 12/08/2024

Aceptado: 31/08/2024

### Resumen

La producción de bioenergía a partir de biomasa representa una solución prometedora para mitigar los problemas de contaminación. Esta revisión narrativa explora el estado del arte de las "fábricas de células", estrategia biotecnológica que emplea microorganismos, como levaduras, bacterias y microalgas, para la bioconversión en bioenergía. Para ello, se analizaron los principales hallazgos recientes en ingeniería genética y metabólica que han permitido mejorar significativamente el rendimiento de estos microorganismos. Además, se destaca el enfoque en biorrefinerías y economía circular para aprovechar desechos orgánicos y residuos agroindustriales como materia prima sostenible. Se pudo evidenciar novedosas técnicas biotecnológicas, que han revolucionado la capacidad de diseñar microorganismos optimizados para la producción industrial de bioenergía. Estos avances promueven el cumplimiento de Objetivos de Desarrollo Sostenible relacionados con seguridad energética, mitigación del cambio climático, producción y consumo responsables, e innovación. Sin embargo, actualmente, persisten desafíos en cuanto a la producción de bioenergía. Entre estos se destacó la escalabilidad, costos, y evaluación de impactos ambientales y socioeconómicos. Sobre esta base, se recomienda que futuras investigaciones se centren en la integración de técnicas vanguardistas dentro de la industria, así como nuevas estrategias de ingeniería metabólica que optimicen las fábricas celulares, a gran escala.

**Palabras clave:** bioenergía; fábrica de células; microorganismos; ingeniería genética

### Abstract

**Cell factory to obtain energy.** Bioenergy production from biomass represents a promising solution to mitigate pollution problems. This narrative review explores the state of the art of cell factories, a biotechnological strategy that employs microorganisms, such as yeasts, bacteria, and microalgae, for bioconversion into bioenergy. The main recent findings in genetic and metabolic engineering that have significantly improved the performance of these microorganisms were analyzed. Moreover, the focus on biorefineries and circular economy to take advantage of organic waste and agro-industrial residues as a sustainable feedstock was highlighted. Novel biotechnological techniques were evidenced, which have revolutionized the ability to design optimized microorganisms for industrial bioenergy production. These advances promote the fulfillment of Sustainable Development Goals related to energy security, climate change mitigation, responsible production and consumption, and innovation. However, challenges currently persist regarding bioenergy production, including scalability, costs, and assessment of environmental and socio-economic impacts. Based on this, it is recommended that future research should focus on integrating cutting-edge techniques within the industry, as well as new metabolic engineering strategies that optimize cell factories on a large scale.

**Keywords:** Bioenergy; Cell factory; Microorganisms; Genetic engineering

### Introducción

Durante décadas, el ser humano ha enfrentado graves problemas de contaminación, cambio climático, y escasez de alimento y energía, los cuales se han ido agudizando<sup>1</sup>. Asimismo, la mayor cantidad de recursos que se utilizan en la actualidad para la generación de energía son de origen fósil, los cuales son responsables de generar grandes daños ambientales, como por ejemplo el incremento del calentamiento global<sup>2</sup>. En consecuencia, se han planteado posibles soluciones que permitan mitigar estas problemáticas<sup>1</sup>. Una de estas posibles soluciones es la producción de bioenergía a partir de biomasa<sup>2,3</sup>.

La bioenergía está definida como aquella energía derivada de biomasa o por productos metabólicos. Esta incluye una

amplia gama de materias primas, procesos de conversión y productos<sup>4</sup>. Actualmente, existen varios métodos en donde se utilizan materias primas de origen residual o desechos, con el fin de revalorizarlas<sup>5</sup>. Uno de estos es la bio-producción, en la que se mejora el uso de materias primas no alimentarias (biomasa, residuos agroindustriales y alimentarios, aguas residuales) y se contribuye con el desarrollo más eficaz de bioenergía (biohidrógeno, biogás, biodiesel, bio-etanol, etc.), brindando beneficios tanto económicos como ambientales<sup>6</sup>.

Una estrategia para tal fin es el uso de procesos biotecnológicos, entre los cuales se destacan el empleo de las llamadas "fábricas de células". Las fábricas de células son sistemas diseña-

dos para el cultivo de células, como los microorganismos, empleados para la bioconversión de sustratos en varios productos<sup>7</sup>. Un ejemplo de estas herramientas en las que se emplean fábricas celulares es la digestión anaeróbica (DA). La DA es una tecnología consolidada que resulta atractiva para el tratamiento de residuos sólidos urbanos y otros desechos orgánicos. Su aplicación ha ido en aumento en los últimos años. La DA implica la descomposición de materia orgánica por agentes microbianos en ausencia de oxígeno, lo que lleva a la producción de biogás. Este biogás, compuesto principalmente de metano y dióxido de carbono, se puede utilizar como una fuente de energía renovable<sup>8</sup>.

La producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica es otro proceso notable, en el que se emplean fábricas celulares. Los aspectos más favorables de esta bio-producción es que la materia prima empleada es abundante, renovable y no comestible. Este proceso consta de cuatro etapas. La primera etapa es el pretratamiento, que tiene como objetivo descomponer la estructura resistente de la biomasa lignocelulósica y aumentar la superficie de la celulosa. Las dos siguientes etapas son la hidrólisis enzimática y la fermentación con levadura. Estos pasos tienen como finalidad convertir la lignocelulosa pretratada, en azúcares fermentables, y posteriormente en bioetanol a través de la fermentación. Finalmente, se lleva a cabo la destilación, que se encarga de separar y purificar el bioetanol, del caldo de fermentación, obteniéndose un producto de alta pureza<sup>9</sup>.

Los lípidos microbianos producidos por de levaduras, bacterias y microalgas constituyen otro tipo de fábricas celulares, destinadas a la producción de bioenergía. Los cultivos de estos microorganismos son independientes del clima, no requieren tierra cultivable, tienen un ciclo de vida más corto, pueden utilizar residuos orgánicos como fuente de carbono y son fácilmente escalable. Mientras que, los lípidos extraídos, en su gran mayoría, están compuestos por triglicéridos que son utilizados como materia prima para la producción de biodiésel, el cual se produce mediante la transesterificación de materias primas lipídicas presentes en aceites/grasas comestibles y no comestibles de origen vegetal y animal<sup>10</sup>. Sin embargo, algunos de estos procesos presentan dificultades para la producción a gran escala<sup>11</sup>.

En el caso de la producción de lípidos, el rendimiento se torna desafiante, principalmente debido a las propiedades fisicoquímicas (la luz, el dióxido de carbono, la temperatura, la salinidad y las condiciones de cultivo) y la variedad de especies de microorganismos. Para solventar esto, actualmente se están realizando amplios esfuerzos para mejorar la selección de cepas oleaginosas. Asimismo, se busca dilucidar enzimas clave y rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de lípidos, que podrían manipularse mediante ingeniería genética<sup>11</sup>. Por otra parte, la producción de bioetanol enfrenta algunos obstáculos, como la característica recalcitrante de la biomasa, el mayor costo de las enzimas celulolíticas, o celulasas, y la inhibición tanto de las enzimas como de los organismos fermentadores. Existe una búsqueda constante de mejores microorganismos que tengan una producción eficiente de celulosa y capacidad de

fermentación. La mayoría de las investigaciones que buscan mejorar las cepas de los microorganismos en cuanto a su capacidad fermentativa se ha centrado principalmente en ingeniería metabólica, consolidación de procesos y optimización de las condiciones para lograr el nivel de producción deseado de bioetanol<sup>12</sup>.

A pesar de todos estos descubrimientos recientes y los avances en la ingeniería genética y metabólica, en donde se refuerza la capacidad de manipular los procesos de bioconversión de manera eficiente, aún se necesita superar barreras tecnológicas y económicas que impiden la competencia con los combustibles fósiles y otras fuentes de energía<sup>13</sup>. Por ello, con el fin de conocer el estado de arte relacionado a esta temática, este estudio llevó a cabo una revisión bibliográfica narrativa, revisión que evalúa de forma crítica y no cuantitativa, el material publicado. Este tipo de revisiones tienen como finalidad analizar un tema en específico, proporcionando a los lectores información de vanguardia<sup>14</sup>.

Por lo tanto, esta revisión se fundamenta en la necesidad de proporcionar una visión general de las fábricas celulares como productoras de bioenergía, explorando sus enfoques metodológicos y teóricos, e identificando los vacíos de la literatura revisada. En este sentido, se llevó a cabo una revisión narrativa, en la que se examinó la literatura más reciente y relevante sobre este tema. Esta investigación se centró en profundizar las principales aplicaciones de las fábricas celulares en la bioconversión, vinculadas a los pilares de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Finalmente, se identificaron las áreas de investigación aun no exploradas, y se sugirieron futuros estudios que posiblemente puedan abordar estos vacíos.

## Metodología

### *Selección de fuentes de bases de datos y términos de búsqueda*

Para llevar a cabo la búsqueda de bibliografía relevante se han empleado tres buscadores, basándose en la Guía de Campbell (2017) propuesta por Kugley *et al.*<sup>15</sup>: MEDLINE (PubMed), Scopus, y ScienceDirect. Estos buscadores fueron seleccionados, de acuerdo con su facilidad de acceso por suscripción y por su especificidad para encontrar artículos de áreas vinculadas con las ciencias biológicas y biotecnológicas<sup>15</sup>. En cada una de estas herramientas de búsqueda se emplearon palabras claves específicas, detalladas en la tabla 1. Asimismo, para cada una, se utilizaron sus respectivos operadores booleanos, según Md Khudzari *et al.*<sup>16</sup> y Rother<sup>17</sup>, con el fin de especificar la investigación.

### *Criterios de selección de fuentes*

Con el fin de garantizar la selección de literatura pertinente para la presente investigación, se establecieron los criterios de selección de fuentes (inclusión y exclusión). Estos criterios fueron seleccionados rigurosamente según lo establecido por Dehkordi *et al.*<sup>18</sup>, centrándose en la literatura más reciente y relevante en cuanto al empleo de fábricas celulares y su aplicación en la bioconversión vinculada a los ODS. En términos de criterios de

**Tabla 1.** Criterios de búsqueda para cada base de datos a la que se accedió para la revisión narrativa.

Base de Datos	Términos de Búsqueda
PubMed	("Bioreactors"[Title/Abstract] OR "Microbial fuel cells"[Title/Abstract] OR "Cell factory"[Title] OR "Microbial"[Title] OR "Cells"[Title] OR "Bacterium"[Title] OR "Microorganisms"[Title] OR "Yeast" [Title/Abstract] OR "Algae" [Title/Abstract] OR "Bacteria" [Title/Abstract]) AND ("Bioenergy" [Title/Abstract] OR "Cellular energy generation"[Title/Abstract] OR "Bioenergy production"[Title] OR "Metabolic engineering"[Title] OR "Biogas"[Title] OR "Biofuel"[Title] OR "Bioethanol"[Title])
Scopus	TITLE ("Bioreactors" OR "Cell factory" OR "Microbial" OR "Microbial fuel cells" OR "Bacterium" OR "Microorganisms" OR "Cells" OR "Yeast" OR "Algae" OR "Bacteria") AND (TITLE-ABS ("Bioenergy" OR "Bioenergy production") OR TITLE ("Metabolic engineering" OR "Biogas" OR "Biofuel" OR "Bioethanol")) AND PUBYEAR > 2018 AND PUBYEAR < 2025 AND (LIMIT-TO (DOCTYPE, "ar") OR LIMIT-TO (DOCTYPE, "re")) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE, "English") OR LIMIT-TO (LANGUAGE, "Spanish")) AND (LIMIT-TO (OA, "all")) AND (LIMIT-TO (PUBSTAGE, "final")) AND (EXCLUDE (EXACTKEYWORD, "Nonhuman") OR EXCLUDE (EXACTKEYWORD, "Controlled Study") OR EXCLUDE (EXACTKEYWORD, "Glucose") OR EXCLUDE (EXACTKEYWORD, "Electrodes") OR EXCLUDE (EXACTKEYWORD, "Electrode") OR EXCLUDE (EXACTKEYWORD, "Genetic Procedures") OR EXCLUDE (EXACTKEYWORD, "Methane") OR EXCLUDE (EXACTKEYWORD, "Genetics"))
ScienceDirect	("Bioreactors" OR "Cell factory" OR "Microbial" OR "Bacterium" OR "Microorganisms") AND ("Bioenergy" OR "Cellular energy generation" OR "Bioenergy production")

inclusión, se priorizaron aquellos documentos que han sido publicados en revistas revisadas por pares, con el fin de asegurar la calidad y la fiabilidad de la información revisada. Asimismo, la búsqueda fue limitada a aquellos artículos escritos en inglés, ya que este es el idioma más común en la literatura científica, y permiten establecer una revisión más exhaustiva. Por otro lado, se favoreció la selección de investigaciones de *open access*, para asegurar la accesibilidad a un público amplio, y promover la transparencia de la información presentada en este estudio. Por último, se restringió el período de publicación a documentos en un rango de años, desde 2019 hasta 2024, enfocándose en la obtención de literatura actualizada, referente a áreas de la ciencia medioambientales, y bio-recursos, que aborde los avances más recientes en el campo de estudio.

En contraparte, se definieron criterios de exclusión para filtrar la literatura obtenida. Se decidió no seleccionar la literatura gris (publicaciones no revisadas por pares ni publicadas en revistas académicas) y no académica (publicación que no sigue el formato académico tradicional), con el propósito de mantener el enfoque en la investigación científica, manteniendo la calidad y fiabilidad de los documentos incluidos en el análisis. También se omitieron aquellas publicaciones con más de 5 años de antigüedad, priorizando la información relevante y actual. Finalmente, se excluyeron todos los estudios que contenían ciertas palabras claves, consideradas poco relevantes o redundantes, como: "Non human", "Controlled Study", "Glucose", "Electrodes", "Methane" y "Genetics". Esto, con la finalidad de orientar la presente investigación en los aspectos más relevantes de las fábricas celulares, los cuales son: la bioconversión, producción de bioenergía y biocombustible, avances recientes en su aplicabilidad y su contribución a los ODS.

#### Proceso de selección de literatura

Una vez realizada la búsqueda de los artículos científicos, se obtuvo un gran número de publicaciones, por cada una de las bases de datos: (122) PubMed, (486) Scopus y (873) ScienceDirect. Para seleccionar la literatura que cumpla con los criterios

de selección, se llevó a cabo un proceso de *screening* (filtrar la literatura relevante y excluir aquellas fuentes que no cumplen con estándares predefinidos), según la metodología de Kabusi & Khoddam<sup>19</sup>, Kugley *et al.*<sup>15</sup> y Wang *et al.*<sup>20</sup>. Todos los artículos seleccionados fueron organizados en una lista de referencias, e introducidos al software EndNote X20, con el objetivo de gestionar de manera sistemática los datos, y eliminar las posibles redundancias. Posteriormente se realizó una revisión manual por parte de los autores del presente estudio, la cual constó de 2 etapas. Primero, se revisaron independientemente los títulos y resúmenes de cada uno de los documentos obtenidos. En la segunda etapa, se obtuvo el texto completo de los artículos seleccionados, y se analizaron para obtención de los datos y literatura relevante.

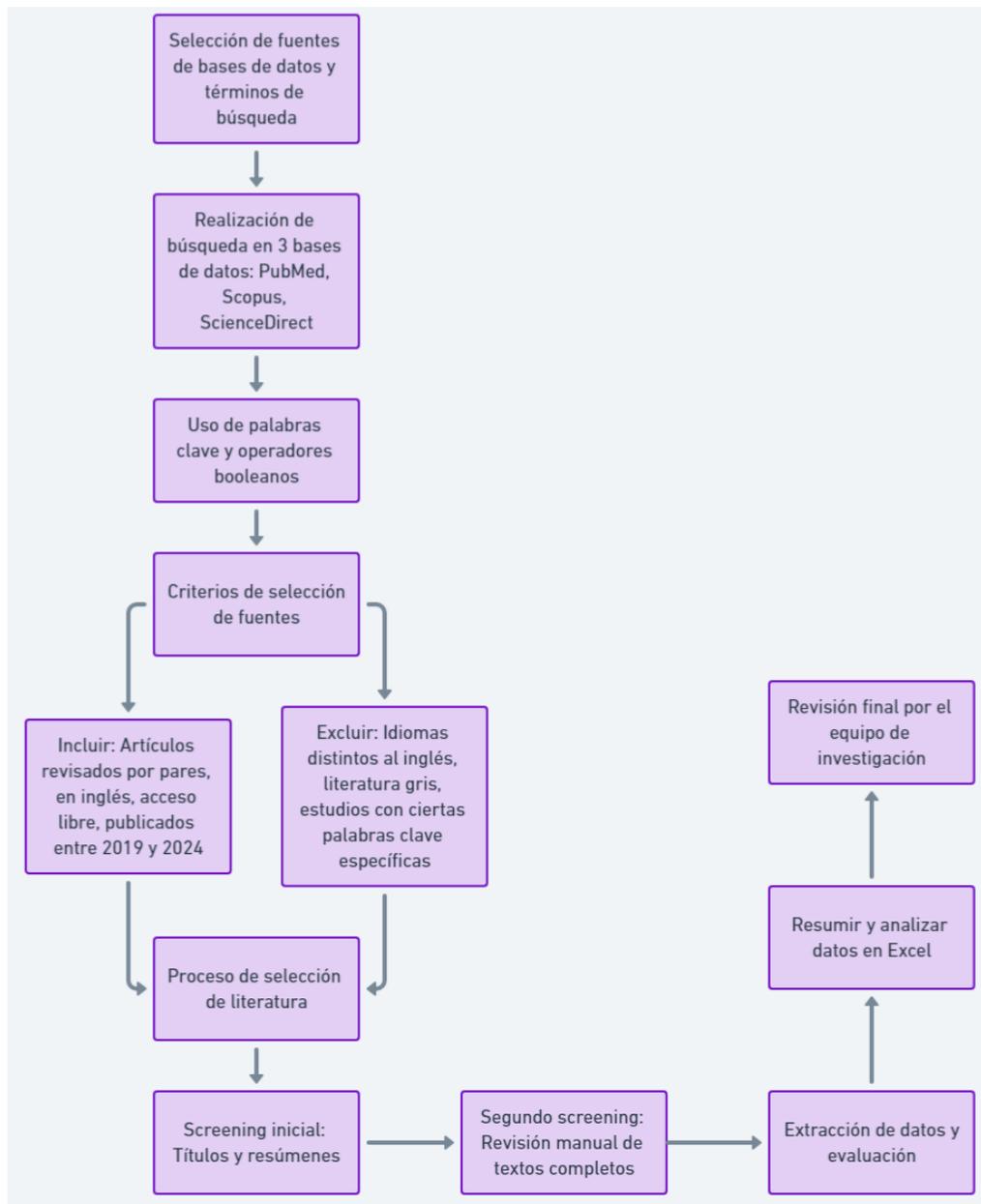
#### Extracción de datos y evaluación de calidad

La búsqueda inicial arrojó 1481 artículos de investigación en idioma inglés. Cada uno de ellos entró al proceso de selección, descrito previamente. Por tanto, de estos estudios, se excluyeron artículos no relevantes, conservándose un total de 281 investigaciones, cuyo contenido se analizó según la metodología propuesta por Brandt *et al.*<sup>21</sup>, con algunas modificaciones. Los autores del presente estudio resumieron sistemáticamente la información, con el objetivo de extraer los datos estándares de cada estudio y aquellos relacionados con las preguntas de investigación planteadas, de forma que se obtuvo: tipo de artículo, objetivo, principales hallazgos, impacto en la sostenibilidad y seguridad energética, y cumplimiento de ODS. Todos los datos resumidos fueron compilados en una matriz y revisados por los miembros del equipo de investigación<sup>22,23</sup>. Un resumen del proceso que se llevó a cabo para la selección y extracción de información utilizada en este artículo se presenta en la figura 1.

## Resultados y discusión

### Análisis de tendencias actuales de investigación

Mediante el proceso de revisión narrativa se analizaron los de-



**Fig. 1:** Descripción de pasos para la selección de literatura y extracción de datos.

talles de un total de 1481 artículos y mediante la evaluación de títulos y resúmenes, se escogieron 281 artículos (37 PubMed; 86 Scopus; 158 ScienceDirect), de las cuales se evaluó su texto completo, obteniendo finalmente 91 documentos, los cuales fueron sintetizados contemplando las preguntas de investigación propuestas en el presente estudio (tabla 2). En total se encontraron: 48 artículos de revisión, 42 artículos originales y 1 artículo de procedimientos.

En estos artículos se evidenció que los microorganismos, como levaduras, algas y bacterias, han demostrado ser fuentes prometedoras para la producción de bioenergía y biocombustibles. Su versatilidad para aprovechar una amplia gama de sustratos, incluidos desechos orgánicos y residuos agroindustriales, los convierte en opciones atractivas y sostenibles. En este sentido, los avances recientes en la ingeniería genética y la modificación

de estos microorganismos han permitido mejorar significativamente su rendimiento. Igualmente, numerosos estudios han logrado aumentos notables en la acumulación de lípidos, producción de biomasa, eficiencia de fermentación y tolerancia a condiciones adversas mediante la modificación genética de microalgas, levaduras y bacterias. Algunas investigaciones muestran incrementos sustanciales en la producción de bioetanol, biodiesel o biogás al modificar genéticamente cepas específicas. Estos avances resaltan el potencial de la ingeniería metabólica para optimizar los procesos de bioconversión, como la fermentación, la digestión anaerobia y la transesterificación, con el fin de lograr una producción eficiente y económicamente viable de biocombustibles a gran escala. Los artículos encontrados demostraron un claro enfoque en las biorrefinerías y en la economía circular. Por ello, se puede decir que ambos temas han ga-

nado relevancia, al aprovechar los desechos orgánicos y residuos agroindustriales como materia prima para la producción de bioenergía y otros bio-productos valiosos.

#### *Análisis de cumplimiento de ODS*

La mayoría de los artículos investigados se alinearon con varios de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas<sup>24</sup>, incluyendo los ODS 1 (Fin de la pobreza), 7 (Energía asequible y no contaminante), 9 (Industria, innovación e infraestructura), 12 (Producción y consumo responsables), 13 (Acción por el clima) y 14 (Vida submarina) (tabla 2). No obstante, el objetivo principal de estos estudios fue el cumplimiento del ODS 7, enfocado en promover el acceso a fuentes de energía asequibles, confiables, sostenibles y modernas para todos. En consecuencia, gran parte de las investigaciones se centraron en explorar nuevas fuentes de energía alternativa y renovable. Gracias a los hallazgos encontrados, se evidenció que el uso de fábricas celulares, para la generación de bioelectricidad y biocombustibles, representa una alternativa sostenible y prometedora, particularmente para países en vías de desarrollo. Diversos estudios destacan el potencial de las células de combustible microbiana (MFC), para producir energía a partir de una amplia gama de sustratos renovables y residuos orgánicos, como biomasa de algas<sup>25</sup>, aguas residuales<sup>26</sup> y desechos alimentarios<sup>27</sup>. Además, estas tecnologías pueden integrarse en sistemas de biorrefinerías circulares, donde se maximiza el aprovechamiento de los recursos y se reduce el impacto ambiental<sup>28</sup>. Las MFC son procesos de bajo costo, energéticamente eficientes, y contribuyen a mitigar los efectos del cambio climático, ya que disminuyen la dependencia de combustibles fósiles<sup>29</sup>. Por lo tanto, la implementación de estas tecnologías en países en vías de desarrollo podría impulsar el acceso a fuentes de energía renovables y sostenibles, promoviendo así el cumplimiento del ODS 7<sup>29,30</sup>, y la acción por el clima (ODS 13)<sup>31,32</sup>.

El enfoque de fábrica de células y la biología sintética son pilares fundamentales en el diseño y construcción de microorganismos altamente eficientes para la producción de bioenergía. Estas disciplinas permiten la ingeniería de microorganismos a medida, optimizando vías metabólicas y características específicas para maximizar la producción de biocombustibles. Al diseñar microorganismos más eficientes se abre la puerta a una producción sostenible y adaptable, reduciendo la dependencia de los combustibles fósiles y promoviendo un enfoque más limpio y renovable en la industria energética. Estos avances en la producción de bioenergía a partir de microorganismos contribuyen directamente a varios de los ODS ya mencionados. Al diversificar la matriz energética con fuentes renovables y sostenibles, se reduce la dependencia de los combustibles fósiles y se promueve un futuro más limpio.

#### *Análisis de los enfoques metodológicos actuales*

Se han destacado ciertos avances en metodologías que permiten la optimización de las fábricas de células, para la bio-

conversión. Los avances en técnicas como CRISPR-Cas9, recombinación homóloga, evolución dirigida, síntesis genómica, transformación por electroporación, conjugación bacteriana y RNA interferente han revolucionado la capacidad de diseñar microorganismos para la producción de bioenergía a nivel industrial y comercial. Estas herramientas permiten la optimización de vías metabólicas para la producción de biocombustibles avanzados como: etanol celulósico, butanol, biodiesel, entre otros. La posibilidad de escalar estos procesos implican una reducción significativa de costos y una mejora sustancial en la sostenibilidad de la producción de bioenergía, al utilizar materias primas renovables y reducir la dependencia de combustibles fósiles<sup>42-44</sup>.

La bioenergía ha sido caracterizada por la Agencia Internacional de Energía (AIE) como una potencia en el campo de las energías renovables que a menudo se pasa por alto. La bioenergía moderna ya constituye más del 50% del consumo global de energía renovable y se anticipa que su expansión en los próximos años supere la de otras fuentes de energía renovable<sup>45</sup>. Reemplazar una parte de los combustibles fósiles por biocombustibles renovables tiene el potencial de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y mejorar la calidad ambiental. Los responsables de obtener estos bio-productos son en su gran mayoría microorganismos entre los que destacan las microalgas, levaduras, bacterias, arqueas, etc. Por lo cual, es relevante el estudio de sus parámetros de crecimiento para el oportuno aprovechamiento de sus productos<sup>46</sup>.

La producción sostenible de bioenergía es posible mediante el empleo de cultivo de microalgas y su uso como fuente para la generación de biocombustible. Esta es una de las vías de sostenibilidad de tercera generación, ampliamente aplicada debido a su mayor capacidad de fijación de dióxido de carbono, gran productividad de biomasa y fácil extracción<sup>47</sup>. Por otro lado, las levaduras son un recurso barato y se considera una fuente de energía fácilmente disponible a partir de biomasa. Entre los microorganismos más utilizados para la fermentación de etanol, *Saccharomyces cerevisiae* posee gran capacidad para hidrolizar la sacarosa de caña en azúcares fermentables, tiene la capacidad de crecer en condiciones anaeróbicas y requiere cierta cantidad de oxígeno para sintetizar sustancias esenciales<sup>48</sup>. La tecnología de digestión anaeróbica se puede utilizar para reducir significativamente el impacto ambiental y obtener productos valiosos, biogás y biofertilizantes. Los únicos organismos que pueden hacer esto son los procariontes, *Archaea* o *archaea* de los géneros *Methanobacterium*, *Methano saeta* (*Methanothrix*), *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanocorpusculum*, *Methanobrevibacteria* y *Methanopyrus*. De hecho, la producción del metano es un factor importante como fuente de energía<sup>49</sup>. A continuación, se detallan algunas aplicaciones de estos microorganismos para la producción de bioenergía.

#### *Empleo de microorganismos en la producción de bioenergía*

Las algas son consideradas un grupo amplio de organismos acuáticos que se dividen en micro y macroalgas según su tama-

**Tabla 2.** Resumen de la matriz de investigaciones encontradas.

ODS*	Objetivo	Principales hallazgos	Impacto en la seguridad energética
7	Presentar las ventajas y desventajas de la producción de biocombustibles a partir de levaduras, destacando los avances tecnológicos y su contraste con los métodos convencionales <sup>33</sup> .	En la actualidad se emplean cepas de levadura oleaginosas y no oleaginosas para la generación de diversos biocombustibles (bioetanol, biogás, biodiesel y biocombustibles), como biomasa/catalizador. Las levaduras oleaginosas posiblemente son superiores a las microalgas para la producción de lípidos destinados a biodiesel. Esto se debe principalmente a dos factores: su mayor capacidad de acumulación de lípidos y la facilidad de su proceso de extracción de lípidos en comparación con las microalgas. En cuanto a la acumulación de lípidos, las levaduras tienen la ventaja de poder ser producidas a granel de manera más sencilla, lo que permite obtener mayores rendimientos. Además, el proceso de extracción de lípidos de las levaduras es más fácil y eficiente que en las microalgas. Esto se debe a que las microalgas contienen varios pigmentos y otros metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, que dificultan e interfieren en el proceso de extracción de los lípidos. Por el contrario, las levaduras carecen de estos compuestos interferentes, facilitando así la purificación y obtención de los lípidos deseados, presentan ventajas técnicas que las posicionan como candidatos superiores a las microalgas.	El artículo promueve el empleo de biocombustibles a partir de levadura y desechos orgánicos. Además, incentiva la búsqueda de nuevos protocolos para la obtención de otros bioproductos, en especial bioenergía. Estas fuentes de energía renovable y sostenible ayudan a reducir la dependencia de los combustibles fósiles.
7	Describir los factores de estrés en la fermentación de levaduras y los mecanismos que confieren su tolerancia, cuya elucidación y perfeccionamiento tienen el potencial de mejorar la eficacia de la fermentación <sup>34</sup> .	La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , se resalta como un microorganismo importante para la producción de bioetanol, por lo que es necesario comprender su respuesta ante fenómenos estresantes. Las respuestas a diferentes formas de estrés afectan a la expresión de diferentes genes en esta especie, sin embargo, aún no se ha discernido con exactitud cuales son los genes claves, involucrados en las respuestas al estrés, por lo que es crucial llevar a cabo investigaciones bioquímicas que permitan detectarlos. El artículo destaca que el comprender este vacío de la información podrá permitir a un futuro generar estrategias de ingeniería genética para generar cepas de levaduras adaptadas a ciertas condiciones estresantes, lo que puede tener implicaciones importantes en la viabilidad económica y ambiental de la producción de bioetanol.	Al describir los factores de estrés en la fermentación de levaduras y los mecanismos de tolerancia al estrés, proporciona información relevante para mejorar la eficiencia de la producción de bioetanol, un biocombustible que puede contribuir a reducir la dependencia de combustibles fósiles y mitigar el cambio climático.
7	Detallar las fuentes de residuos para la producción de biocombustible y bioelectricidad, así como la tecnología de pilas de combustible microbianas, sus perspectivas económicas y medioambientales <sup>35</sup> .	En los últimos años ha aumentado el interés en el sistema integrado de biorrefinería, por su potencial para asegurar la viabilidad económica y ambiental. Este sistema, diseñado para producir múltiples bioproductos a partir de una única fuente, se muestra altamente adaptable a diversas fuentes de recursos. La combinación de fermentación y celdas de combustible microbianas emerge como una alternativa prometedora para generar bioenergía en múltiples formas. Sin embargo, se identifica una falta de diseño sostenible en este sistema, en donde, no se ha considerado la viabilidad técnica, económica y ambiental. Igualmente, se requiere una mayor investigación para optimizar su eficiencia. La modelización integral de la sostenibilidad y la implementación de diseños inteligentes son pasos cruciales para mejorar la efectividad y escalabilidad de este sistema estos sistemas, a futuro.	Al desarrollar un sistema integrado de biorrefinería que aprovecha los desechos orgánicos para generar múltiples formas de bioenergía, como la electricidad y los biocombustibles, se promueve el acceso a fuentes de energía sostenible y se reduce la dependencia de los combustibles fósiles.
7, 12	Investigar cómo los desechos de alimentos generados en masa pueden ser utilizados para producir bioproductos valiosos a través de técnicas de bioconversión como el metabolismo oleaginoso, la fermentación anaeróbica y la solventogénesis <sup>36</sup> .	Este estudio revisa los diferentes procesos de bioconversión de residuos alimentarios, abarcando desde la fermentación anaeróbica, hasta el metabolismo oleaginoso, junto con los bioproductos potenciales como biocombustibles y productos bioquímicos. La integración de estos procesos de biorrefinería en la economía circular, promueven la creación de una economía sostenible y respetuosa con el medio ambiente. Se destaca la importancia de implementar adecuadamente rutas, escalas económicas y métodos apropiados, junto con una evaluación de la ubicación, cantidad y recolección de los desechos alimentarios, para lograr un impacto positivo en la sostenibilidad y la rentabilidad. Se evidencia que el efecto ambiental negativo de la biorrefinería de desechos alimentarios es considerablemente menor que los métodos convencionales. Se enfatiza la necesidad de priorizar el medio ambiente en el desarrollo tecnológico, tanto en la producción de bioproductos como en las técnicas de gestión de desechos eficientes. Aunque no se encontraron estudios satisfactorios de evaluación del ciclo de vida en términos socioeconómicos, abordar los desafíos actuales, implementar una gestión ecológica adecuada y utilizar los desechos de manera eficiente puede hacer que una bioeconomía circular sea rentable y respetuosa con el clima. La estrategia para las biorrefinerías de desechos alimentarios requiere optimizar la cascada de diversos bioprocesos para transformar una economía lineal en circular.	Al aprovechar los desechos orgánicos para la producción de energía renovable, se promueve una mayor diversificación de las fuentes de energía, lo que contribuye a reducir la dependencia de los combustibles fósiles. Además, al reducir el desperdicio de alimentos y aprovecharlos de manera eficiente, se reducen las emisiones de gases de efecto invernadero asociadas con su descomposición, ayudando a mitigar el cambio climático y promueve la sostenibilidad.
7, 9	Evaluar el potencial de los desechos de zanahoria como materia prima para la fermentación de acetona-butanol-etanol (ABE) y la posterior producción de biobutanol <sup>37</sup> .	La fermentación ABE de los hidrolizados enzimáticos de varios residuos agroindustriales, incluida la pulpa de zanahoria, puede lograr rendimientos globales de hasta 79 g de butanol y 123 g de ABE por kg de pulpa de zanahoria, más eficiente que el obtenido en otros estudios. Esto sugiere que no es necesario realizar un pretratamiento en algunos de estos residuos para obtener altos rendimientos de butanol, lo cual representa una ventaja significativa en comparación con los residuos lignocelulósicos convencionales. Igualmente, el uso exitoso de <i>Clostridium beijerinckii</i> en estos procesos, resalta su capacidad para llevar a cabo la fermentación ABE de manera eficiente a partir de una variedad de sustratos agroindustriales.	Estos hallazgos proporcionan una vía prometedora para la bioconversión de desechos de zanahoria en biobutanol, lo que reduce la dependencia a combustibles fósiles y mitiga las emisiones de gases de efecto invernadero.
7, 9	Utilizar material orgánico de turba como sustrato en una celda de combustible microbiana de doble cámara, aprovechando la presencia natural de bacterias	La celda de MFC basada en turba alcanzó una alta densidad máxima de potencia de 438,116 mW/m <sup>2</sup> , superando significativamente a las MFCs que utilizan otros materiales orgánicos como sustratos. Inicialmente, el voltaje de circuito abierto (OCV) disminuyó, pero se estabilizó y aumentó después de 7 horas, indicando la activación de la microflora de bacterias del género <i>Clostridium</i> presentes en la turba, las cuales actuaron como biocatalizadores liberando la energía bioelectroquímica almacenada en forma de electrones y protones para generar electricidad. Sin embargo, después de 9 horas, la membrana de intercambio de protones (PEM) se perforó, permitiendo que la solución de	Al lograr una alta densidad de potencia de 438,116 mW/m <sup>2</sup> aprovechando las bacterias presentes naturalmente en la turba, sienta las bases para desarrollar esta tecnología como una fuente de energía. Si se escala y optimiza adecuadamente, podrían contri-

	<i>Clostridium</i> como biocatalizadores, sin necesidad de agregar otras cepas bacterianas adicionales <sup>38</sup> .	NaOH del cátodo se mezclara con la turba del ánodo, dañando la morfología de las bacterias <i>Clostridium</i> y reduciendo el rendimiento. La alta resistencia interna de 1001,13 $\Omega$ también limitó la generación de energía.	buir a diversificar la matriz energética y aumentar el acceso a energía en zonas con disponibilidad limitada.
7, 9	Establecer nuevas fuentes de energía sostenible para abordar el cambio climático, la seguridad energética y la gestión de residuos <sup>39</sup> .	Combina la digestión anaerobia, la purificación de biogás y la producción de bio-H <sub>2</sub> a partir de residuos de alimentos, reduciendo emisiones y promoviendo soluciones de combustible más limpias. Los principales hallazgos incluyen la optimización de la temperatura (20-25) °C para aumentar el rendimiento del biogás, con la gestión crucial del amoníaco (<3%). Se determinaron tasas óptimas de alimentación de residuos de alimentos y agua. Se encontró que el solvente a base de imidazolio contribuye con la purificación de biogás, logrando alta pureza de metano con bajo consumo de energía. Temperaturas más altas de reformado de vapor (600-700) °C mejoraron la producción y la pureza del H <sub>2</sub> . Un análisis económico destacó que el costo de capital total para la digestión anaerobia es relativamente bajo, en relación con su rentabilidad en la fase inicial de producción. El enfoque propuesto para la producción de H <sub>2</sub> a partir de biogás tiene el potencial de generar ganancias y contribuye con un panorama energético más limpio.	Este estudio propone un enfoque integrado para la producción de bio-H <sub>2</sub> a partir de residuos de alimentos y biogás. Al aprovechar estos recursos renovables para generar hidrógeno, se reduce la dependencia de los combustibles fósiles y se promueve una fuente de energía más limpia y sostenible.
7, 9, 13	Informar sobre las posibilidades de una biorrefinería integrada de bajo coste basada en microalgas para la recuperación de recursos y mitigar la eutrofización y la emisión de gases de efecto invernadero <sup>28</sup> .	Los consorcios de algas en cuerpos de agua son extremadamente variables, por lo que se dificulta su empleo para la generación de bioenergía. Sin embargo, la optimización de su cultivo es crucial para su viabilidad, así como para mantener las condiciones de vida del cuerpo de agua. La literatura disponible destaca que las algas están emergiendo como una fuente prometedora de energía verde y un componente clave de la economía circular. Estos microorganismos son capaces de producir biocombustibles, productos farmacéuticos y suplementos alimenticios. Para añadir, las algas pueden cultivarse en lugares con recursos limitados, como desiertos o estanques de agua salada, lo que las convierte en una opción ideal para países que carecen de acceso a fuentes tradicionales de energía. Finalmente, se destaca que las algas tienen un papel importante en la mitigación de gases de efecto invernadero, ya que pueden absorber dióxido de carbono y convertirlo en oxígeno.	El empleo de algas es una alternativa prometedora para la generación de biocombustibles, y otros productos. Promueve el consumo y producción de combustibles y fuentes energéticas alternativas. La fácil producción y mantenimiento, así como su capacidad para reducir la emisión de gases de efecto invernadero, promueve la conservación ambiental.
7, 13	Ofrecer una visión actualizada de los métodos de conversión de la biomasa de algas en diversos productos biocarburantes, como biodiésel, gas de síntesis, biogás y bioetanol <sup>40</sup> .	La biomasa microalgal tiene el potencial de convertirse en materia prima para la producción de productos químicos y biocombustibles importantes. Se destaca el papel clave de las microalgas en la producción de biocombustibles como alternativa a los combustibles fósiles, siendo el biodiésel uno de los productos más prometedores debido a su carácter renovable y su impacto ambiental reducido. Se mencionan tres enfoques para la producción de biocombustibles a partir de microalgas: termoquímico, químico y bioquímico, y se señala la técnica de transesterificación como promisoría para la generación de biodiésel, aunque aún se requiere mejorar el procedimiento de extracción de lípidos. Además, se resalta la importancia del análisis de los lípidos extraídos de la biomasa microalgal para optimizar las condiciones de cultivo y los procesos posteriores.	El desarrollo y optimización de técnicas de bioconversión, mediadas por microalgas, diversifica la matriz energética, y proporciona una fuente de combustible alternativa la cual garantiza un suministro estable y sostenible a largo plazo.
7, 9, 12, 13	Evaluar la economía y eficiencia energética de diferentes configuraciones de biorrefinerías que incluyen la valorización de vinazas para la síntesis de bioproductos <sup>41</sup> .	El estudio reveló que la optimización de la asignación de vinazas hacia la producción de bioproductos es crucial para alcanzar una biorrefinería energéticamente autosuficiente. Mediante la valorización de las vinazas para la síntesis de otros bioproductos valiosos, se logra un uso más eficiente de los recursos y se reduce el impacto ambiental. Se demostró que la síntesis de procesos a través de la optimización de superestructuras es una herramienta efectiva para evaluar el impacto de varios parámetros relacionados con la valorización de vinazas en el costo total y el balance energético de la biorrefinería. Estos hallazgos proporcionan información valiosa para el desarrollo de estrategias de valorización de vinazas más eficientes y sostenibles en la producción de biocombustibles.	El impacto en la seguridad energética de esta investigación es significativo, ya que proporciona herramientas y resultados para evaluar la viabilidad económica y la eficiencia energética de estrategias de biomasa a biocombustibles que emplean la valorización de vinazas.
7, 9, 13	Identificar los principales retos a los que se enfrentan los biocombustibles de algas a gran escala desde el punto de vista económico <sup>29</sup> .	Las algas tienen gran potencial como materia prima en la producción de biocombustibles, como biodiésel y bioetanol, así como biogás. Su capacidad para crecer en una variedad de sistemas, tanto abiertos como cerrados, y su versatilidad para adaptarse a diferentes condiciones de cultivo los convierte en una opción atractiva. Es vital la correcta selección de la especie de algas para el propósito deseado, así como mejorar los métodos de cultivo y las propias especies de algas a través de tecnologías como la nanotecnología y la ingeniería genética. Sin embargo, los desafíos actuales incluyen la baja eficiencia debida al acceso limitado a la luz y los altos costos de cosecha del material crudo. Superar estos desafíos podría conducir a la producción económica de biocombustibles de algas, lo que tendría un impacto positivo en la industria de los combustibles al reducir las emisiones de carbono.	Las algas son microorganismos prometedores para la producción de biocombustibles. La mejora de este proceso de bioconversión podría disminuir la demanda de combustibles de origen fósil, y a su vez reducir la emisión de carbono, por lo que se mitigaría los efectos del calentamiento global.
7, 9, 13	Determinar la influencia de los regímenes de tratamiento en la desintegración de lodos activos y la subsiguiente producción de metano a escala de laboratorio <sup>30</sup> .	El uso de métodos físicos, basados en un dispositivo de cavitación rotacional, para el pretratamiento de lodos de aguas residuales (LAR). Los diferentes regímenes de tratamiento (cavitantes y no cavitantes), tuvieron un impacto significativo en las propiedades físicas y químicas de los LAR, estimulando la producción de metano en comparación con los LAR no tratados. La cavitación tuvo efectos tanto a microescala, relacionados con la formación y colapso de burbujas, como a macroescala, afectando la viscosidad de los LAR. Estos hallazgos destacan la importancia de optimizar el balance energético en el proceso de bioconversión de LAR en digestores anaerobios, donde se produce biogás, reduciendo el volumen de lodos finales a ser desechados y generando así una fuente de energía renovable, el metano.	Subraya la relevancia de desarrollar tecnologías que mejoren la producción de energía a partir de una fuente que nunca se agota y cuya cantidad continúa aumentando, lo que tiene implicaciones significativas para la seguridad energética y la gestión sostenible de los residuos.

7, 9, 12, 13	Examinar las enzimas aprovechadas por dos bacterias para la despolimerización de las hemicelulosas xilanos y mananos, utilizables para su conversión en biocombustibles y otros productos químicos de valor <sup>42</sup> .	Se identificaron a las bacterias termófilas <i>C. polysaccharolyticus</i> y <i>C. besicii</i> como organismos capaces de degradar eficientemente hemicelulosas mediante conjuntos similares de enzimas. Mientras <i>C. polysaccharolyticus</i> ancla las enzimas en su superficie celular para facilitar el transporte inmediato de los oligosacáridos resultantes, <i>C. besicii</i> secreta las enzimas al medio ambiente, permitiendo el acceso comunitario a los oligosacáridos. Proporciona un modelo para la caracterización de enzimas similares en otros organismos eficientes en la degradación de hemicelulosas o para la formulación de cócteles enzimáticos que mejoren la depolimerización de hemicelulosas en azúcares unitarios. Además, se sugiere que los cócteles enzimáticos dirigidos a los componentes hemicelulósicos en los piensos animales podrían aumentar la energía derivada de estos alimentos, reduciendo la viscosidad y mejorando el metabolismo y la diversidad microbiana en el tracto gastrointestinal, lo que contribuiría a mitigar impactos ambientales adversos asociados con la producción animal.	Esta investigación contribuye al desarrollo y la promoción de fuentes de energía renovable y sostenible. Al investigar la producción de bioenergía a partir de biomasa, se fomenta la diversificación de la matriz energética, reduciendo así la dependencia de los combustibles fósiles y aumentando la resiliencia del sistema energético.
7, 9, 13	Desarrollar un sistema integrado de conversión de biomasa basado en la gasificación y digestión anaerobia de residuos agrarios para obtener energía e hidrógeno, en una localidad nigeriana <sup>43</sup> .	Se propuso una planta de bioconversión integrada con una planta de ciclo combinado para la generación de energía utilizando biogás. Este bioproducto se obtuvo a partir de la digestión de desechos animales y gas de síntesis de la gasificación de desechos de cultivos. Se introdujo una unidad de metanación para convertir el hidrógeno producido en un gas de síntesis mejorado, aumentando el contenido energético. El combustible de los procesos de conversión y mejora de la biomasa se convierte en energía en un ciclo superior combinado de celda de combustible de óxido sólido y turbina de gas. Los principales hallazgos incluyen una potencia neta generada de 9,05 MW, una reducción del costo nivelado de energía a \$111,8/MWh, y eficiencias energéticas y exergéticas generales del 54,81% y 44,87%, respectivamente. La integración de la mejora del gas de síntesis refuerza la utilización de plantas integradas para alcanzar objetivos energéticos sostenibles.	Propone un sistema integrado que utiliza desechos animales y cultivos agrícolas como fuentes de biomasa para la producción de biogás, lo que reduce la dependencia de combustibles fósiles importados. El estudio logró reducir el costo nivelado de energía, haciendo que la energía generada sea más asequible.

\*ODS 7: Energía asequible y no contaminante, 9: Industria, Innovación e Infraestructura, 12: Producción y consumo responsables, 13: Acción por el clima

**Tabla 3.** Aplicación de microalgas en la producción de bioenergía.

Microalgas	Aplicación	Medios de Cultivo	Rendimiento	Temperatura	pH
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	Producción de biodiesel <sup>53</sup>	1. Patra	246±1 mg lípidos/ g biomasa	22-28°C	6,7-7,3
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		2. 04	73±2 mg lípidos/ g biomasa		
<i>Scenedesmus obliquus</i>		3. Tamiya	298±2 mg lípidos/ g biomasa		
<i>Chlamydomonas</i>		4. L-min	192±1 mg lípidos/ g biomasa		
		5. Meyers			
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Producción de biodiesel <sup>54</sup>	BG 11 TRACE: HBO (0,143 g), MnCl <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (0,905 g), ZnCl * 7H <sub>2</sub> O (0,11 g), NaMoO * 2H <sub>2</sub> O (0,195 g) NaHCO <sub>3</sub> (5,0 g) 6 CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O (0,0395 g), Cn(NO) <sub>3</sub> * 6H <sub>2</sub> O (0,10 g), Agua Destilada (500 ml), y Agar (20,0 g).	6% de lípidos/ g de algas	24-29°C	6-7
<i>Monoraphidium</i> sp.	Producción de biodiesel <sup>55</sup>	BG-11 estéril: MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O (0,1), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,25), NaCl (0,5), CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O (0,02), NaHCO <sub>3</sub> (5,0), NaNO <sub>3</sub> (6,0), K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,5), C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> (0,005) y C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> MgN <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (0,001) en g/L.	3% de lípidos/ g de algas		
<i>Chlorella vulgaris</i>	Producción de biodiesel <sup>56</sup>	BG-11: (1,5) g de NaNO <sub>3</sub> , (0,04) g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , (0,075) g de MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O, (0,036) g de CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O, (0,001) g de sal Na <sub>2</sub> -EDTA y (0,006) g de ácido cítrico en 1 L de agua ultrapura.	11,07 mg lípidos/ g de biomasa		
<i>Coelastrum</i> sp.	Producción de biodiesel <sup>57</sup>	Agar nutritivo BG-11. La condición de estrés por nitrógeno se formó mediante la adición de 0,025 g/l de urea en el medio de muestra.	0,41±0,173 g lípidos/ g de biomasa	23-27°C	7,4-7,6
<i>Desmodesmus</i> sp.	Producción de biocombustibles <sup>58</sup>	BG11 al 1,5%	5,7±0,5 mg de lípidos/ L día	26-28°C	7,5
<i>Acutodesmus bajacalifornicus</i>		Medio AF6, medio Bold Basal (BBM), medio C, medio Chu #10, medio DY-V, medio Franquil y medio WC)	47% g lípidos/ g biomasa	25°C	7,5

ño. Las algas han sido estudiadas por sus numerosas ventajas que brindan como fuente de biocombustibles y bio-productos. El alto contenido de lípidos de las algas (hasta un 50% en peso seco) es beneficioso para la producción de biocombustibles, junto con un mayor contenido de proteínas y almidón. Los lípidos y el almidón se pueden transformar en biocombustibles, sin embargo, las proteínas se pueden procesar ya sea en alimentos o suplementos para animales. Los compuestos de alto valor se extraen a manera de ingredientes naturales para nutracéuticos, suplementos y productos alimenticios. El uso de algas como materia prima para la bioenergética es ventajosa en comparación a la que se produce a partir de alimentos, debido a que no compete con la soberanía alimentaria y a su vez, con el uso de tierras cultivables para la producción de biocombustibles<sup>50</sup>. En

la tabla 3 se exponen distintos tipos de microalgas con productos enfocados a la bioenergía.

Las bacterias son microorganismos procarióticos unicelulares que miden algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 µm, por lo general) y contienen distintas formas incluyendo esferas, bastones y espirales. Las bacterias se caracterizan por ser uno de los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas, es decir que se pueden encontrar en todo hábitat de la tierra, ya sea, creciendo en el suelo, en las profundidades del mar y de la corteza terrestre. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en condiciones extremas como el espacio exterior. Se estima que el número de procariotas en la Tierra es de 4-6 x 10<sup>30</sup> células y la mayoría de estas se encuentran en el océano abierto, en

el suelo y en las subsuperficies oceánicas y terrestres, siendo el número de células de  $1,2 \times 10^{29}$ ,  $2,6 \times 10^{29}$ ,  $3,5 \times 10^{30}$  y  $0,25-2,5 \times 10^{30}$ , respectivamente<sup>51,52</sup>. En la tabla 4 se exponen distintos tipos de bacterias con productos enfocados a la bioenergía.

Desde que se descubrieron las arqueas, han llamado la atención por su capacidad para sobrevivir en entornos hostiles, como altas temperaturas, niveles de pH extremos o altas concentraciones de sal. Aunque comparten muchas características básicas de los mecanismos genéticos y metabólicos con las bacterias, se ha propuesto que las arqueas tienen una estructura y una organización metabólica similar a las de los organismos ancestrales, ya que tienen propiedades básicas diferentes a las de las bacterias y los eucariotas. Las arqueas son un grupo muy heterogéneo en términos de metabolismo energético. Las reacciones que producen energía en este grupo de organismos incluyen: respiración aeróbica y anaeróbica (usando bacteriodopsina como bomba de protones activada por luz), reacciones de transferencia de energía que generan metilo y gradientes de sodio de hidrogenasas de protones<sup>66</sup>. En la tabla 5 se exponen distintos tipos de arqueas enfocadas a la producción de metano.

Las levaduras son de los organismos más ampliamente utilizados en la industria alimentaria, biofarmacéutica, química fina y síntesis de biocombustibles. Ofrecen ventajas significativas sobre algunas especies procarióticas y eucarióticas en aplicaciones de bioprocesos debido a su sólida fisiología, propiedades de fermentación natural, maleabilidad genética y capacidad para tolerar condiciones adversas de crecimiento (como pH bajo y temperaturas elevadas). Asimismo, las levaduras brin-

dan la oportunidad de las modificaciones postraduccionales eucarióticas complejas, que son cruciales para la producción de proteínas humanas y son inalcanzables en las bacterias<sup>70</sup>.

En la tabla 6 se exponen distintos tipos de levaduras con productos enfocados a la bioenergía.

*Fábrica de células y su implicación en la producción de bioenergía*

Desde la antigüedad, los humanos han utilizado la transformación microbiana para producir alimentos y bebidas a través de fermentaciones tempranas. Con el surgimiento de la ingeniería genética en la década de 1970, y su posterior desarrollo tecnológico, se han creado herramientas moleculares para diseñar y producir proteínas de interés en diversos microorganismos, como bacterias, levaduras y hongos. En la actualidad, la biotecnología moderna utiliza directamente células microbianas para producir una amplia gama de productos de interés económico, como aminoácidos, enzimas, proteínas, antibióticos, combustibles, medicamentos, alimentos y biomateriales.

El concepto de "fábrica de células" es más relevante que nunca y su implementación se basa en la biología de sistemas, la biología sintética, la ingeniería metabólica y de proteínas y las tecnologías ómicas. La idea de una fábrica de células implica un enfoque interdisciplinario que examina las capacidades metabólicas de las células productoras en relación con la naturaleza del producto y el proceso de bio-producción. En este sentido, las células se modifican como una "fábrica de células inteligentes" para llevar a cabo la bio-fabricación de diversos productos<sup>71</sup>.

**Tabla 4.** Aplicación de bacterias en la producción de bioenergía.

Bacterias	Aplicación	Medios de cultivos	Rendimiento	Temperatura	pH
<i>Enterococcus</i> sp	Biogás <sup>59</sup>	Estiércol de vaca	0,02 m <sup>3</sup> biogás/ m <sup>3</sup> día	15°C	7
<i>Bacillus toyonensis</i> cepa BCT-71120 <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> cepa e-p10	Producción de Metano <sup>60</sup>	Se utilizó medio agar y medio mineral compuesto de MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O de (0,2) g, CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O de (0,1) g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> de (4,5) g, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> de (0,2) g, NaCl de (0,1) g, FeCl <sub>3</sub> de (0,02) g, extracto de carne de (3) g, extracto de levadura. de (5) g y aceite vegetal de (20) mL en agua de (1) L.	41,05 %/ 500 mL de muestra	37°C	7,8-8,3
<i>Pseudomonas de Gamma Proteobacteria</i>	Mejora en la producción de biogás <sup>61</sup>	Bagazo de caña	Mejora el rendimiento de biogás hasta 22,5%	33-37°C	7,2
<i>Bacillus cerus</i>		Agar de aceite de oliva rojo fenol (p/v: rojo fenol 0,01%, aceite de oliva 0,1%, CaCl <sub>2</sub> 0,1% y agar 2%) (33) y agar rodamina B aceite de oliva (34) (p/v: caldo nutritivo 0,8%, NaCl 0,4%, rodamina B 0,001%, aceite de oliva 2%, extracto de levadura 0,05% y agar 2%).	Se alcanzó un rendimiento volumétrico de biodiésel del 102%	37°C	7,5
<i>Bacillus subtilis</i>	Producción de Biodiesel <sup>62-64</sup>	(g/L): Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (5,0), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (6,0), NH <sub>4</sub> Fe(COO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (2,0), MgSO <sub>4</sub> (1,0), CaCl <sub>2</sub> (0,05), extracto de levadura (0,5) y 1,0 mL de solución de oligoelementos que contiene (g/L): CoCl <sub>2</sub> (1,0), ZnSO <sub>4</sub> , (0,1); H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , (0,3); CuSO <sub>4</sub> , (0,006); MnCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O, (0,25), NiCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O, (0,020); Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O, (0,030). Este medio se complementó con NaHCO <sub>3</sub> (20 mM) y glucosa (0,1%).	Se alcanzó un rendimiento de hasta el 97,41% en peso	30°C	7
<i>Serratia</i> sp		Glucosa, almidón, xilosa, paja de arroz, bagazo, microalgas, según fuera necesario; (5) g de extracto de levadura; (0,75) g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , (0,75) g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , (2) g de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1 g de NaCl; (0,2) g MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O, (0,01) g MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O, (0,01) g FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O; (0,5) g de L-cisteína-HCl.	9,10 g/L	37°C	6
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Biobutanol <sup>65</sup>	Hidrolizado de paja de arroz.	12,3% en volumen de H <sub>2</sub>	26°C	5

**Tabla 5.** Aplicación de Arqueas en la producción de metano

Arqueas	Técnica	Medios de cultivo	Rendimiento	Temperatura	pH
<i>Methanococcus vannielii</i>	Electrosíntesis Microbiana (MES) <sup>67</sup>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80/20, v/v) y M141 compuesto por: (0,35 g/l) de KCl, (4 g/l) de MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O, (3,45 g/l) de MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O, (0,25 g/l) de NH <sub>4</sub> Cl, (0,14 g/l) de CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O, (0,14 g/l) de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , (18 g/l) de NaCl, (0,002 g/l) de Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O, (1 g/l) de acetato de Na, (2 g/l) de extracto de levadura, (2 g/l) de triptona y (10 ml/l) solución de oligoelementos DSMZ M141.	19,14(±0.86) mmol/h	37°C	7
<i>Methanococcus maripaludis</i>			21,85 (±0.32) mmol/h		
<i>Methanolacinia petrolearia</i>			17,23(±0.02) mmol/h		
<i>Methanobacterium congolense</i>			19,10(±0.53)		
<i>Methanoculleus submarinus</i>			16,15(±0.07) mmol/h		
<i>Methanosarcina</i>	Digestión Anaeróbica <sup>68</sup>	Desechos de matadero, los digestores se suplementaron con L-cisteína-HCl (0,5 g/L) y bicarbonato de sodio (5 g/L). Se agregaron cloruro de níquel (2,2 mg/L) y sulfato de cobalto (2,6 mg/L) a los digestores como promotores de crecimiento metanogénicos.	0,83 g/g Sólidos Volátiles Iniciales	37°C	7,04
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	Reactor de H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> <sup>69</sup>	Medio ORBIT: NaCl (7,7 mM), NaHCO <sub>3</sub> (11,9 mM), MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O (0,4 mM), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,65 mM), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 3H <sub>2</sub> O (1,3 mM), (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1,7 mM), CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O (0,41 mM), (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ni(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O (0,0076 mM), FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O (0,0072 mM), 1 ml de minerales de Wolfe 10x (Huber y Stetter, 2006 ), 1 ml de vitaminas de Wolfe 10x (Balch et al., 1979) y tampón Sørensen (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (22 mM) y NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O (22 mM))	0,35 m <sup>3</sup> /h m <sup>3</sup> reactor	63-67°C	6,5-8

**Tabla 6.** Aplicación de levaduras en la producción de bioenergía

Levaduras	Aplicación	Medios de Cultivo	Rendimiento	Temperatura	pH
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Producción de biodiésel <sup>75,76</sup> .	((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 3 g/L); (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 3 g/L); (MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O: 1 g/L); (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O: 3 g/L); (ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O: 0,040 g/L); (FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O: 0,016 g/L); (CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O: 0,023 g/L); (MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O: 0,0038 g/L); (CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O: 0,0005 g/L); (CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O: 0,0009 g/L); (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> : 0,003 g/L); (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O: 0,00006 g/L) y solución madre de vitamina de 1 ml/L que estaba compuesta de ácido nicotínico: 1 g/L; d-biotina: 0,05 g/L; ácido p-aminobenzoico: 0,20 g/L; ácido pantoténico: 1 g/L; clorhidrato de piridoxal: 1 g/L; clorhidrato de tiamina: 1 g/L y mioinositol: 25 g/L.	33,5% (p/p) de lípidos	25°C	6
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>		2,37±0,009			
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Producción de etanol <sup>77-79</sup>	Medio compuesto de 1% de glucosa, 0,5% de peptona, 0,3% de extracto de levadura, 0,3% de extracto de malta, 1,5% de agar. Bagazo de Caña	1,93±0,009	25°C	5,5
<i>Pichia manshurica</i>			1,83±0,015		
<i>Pichia kudriavzevii</i>			2,39±0,012		
<i>Candida albicans</i>			1,84±0,009		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			1,96±0,009		
<i>P. stipitis</i>		Caldo YM estéril (extracto de levadura 3,0 g/L, extracto de malta 3,0 g/L, peptona 5,0 g/L, glucosa 10,0 g/L). y caldo 20,0 g/L)	7,98±0,33 g/L de etanol	30°C	8,3**
<i>S. cerevisiae</i>		Agua de mar SW-YPD; 1% extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa; melaza	113,72 g/L de etanol	30°C	6
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>		Medio YPD (20 g/l de glucosa, 10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de peptona, NaOH 5 M o H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M)	73,11 g/L de etanol	30°C	5,5

La ingeniería genética ha demostrado ser una herramienta esencial y poderosa para optimizar los sistemas de producción de biocombustibles. Se ha aplicado a diferentes aspectos, como la modificación de microorganismos, sus rutas metabólicas y las enzimas necesarias para estos procesos, así como a la alteración de sustratos para facilitar su conversión en biogás, biodiésel, bioetanol y otros biocombustibles. En los últimos años, se ha despertado un

gran interés en biocombustibles denominados “avanzados”, y la ingeniería genética se ha utilizado para mejorar su producción. Esta tecnología ha permitido la creación de microorganismos y sistemas más eficientes para la producción de biocombustibles, lo que contribuye a hacer que estas fuentes de energía sean más sostenibles y económicamente viables<sup>72</sup>.

### Modificaciones genéticas en los microorganismos.

La biología sintética y las tecnologías de ingeniería metabólica son la clave para la construcción de fábricas de células microbianas. La biología sintética combina la ingeniería y la biología para diseñar y construir nuevos componentes, redes y vías biomoleculares, y utilizar estas construcciones para reorganizar y reprogramar organismos con el fin de mejorar la producción de sus diferentes bioproductos<sup>73</sup>. En la tabla 7 se exponen los métodos que se utilizan para modificar genéticamente a los microorganismos.

La investigación realizada por Mandal *et al.*<sup>74</sup> señala que las microalgas tienen la capacidad de ajustar sus rutas biosintéticas bajo condiciones de estrés por nutrientes, lo que resulta en un aumento en la acumulación de lípidos. En dicho estudio, se sometió a *Graesiella emersonii* NC-M1 y *Chlorophyta* sp. NC-M5 a un entorno limitado en nitrógeno, y se observó que, en presencia de fitohormonas, el rendimiento de lípidos y lípidos neutros aumentó en 1,6 y 1,08 veces, respectivamente, en comparación con las condiciones estándar. La adición de fitohormonas no solo aumentó la producción de lípidos, sino que también tuvo efectos positivos adicionales. Redujo el daño oxidativo ocasionado por la limitación de nitrógeno y mejoró el contenido de áci-

dos grasos monoinsaturados en las microalgas estudiadas. Además, se observó un aumento significativo, de 5,2 y 3,17 veces, respectivamente, en los niveles de expresión de las enzimas GPAT (glicerol-3-fosfato aciltransferasa) y DGAT (diglicérido aciltransferasa). Estas enzimas desempeñan un papel crucial en la síntesis de lípidos y el aumento en su expresión sugiere una adaptación de las microalgas a las condiciones de estrés, favoreciendo la acumulación de lípidos.

Yan *et al.*<sup>101</sup> modificaron genéticamente la microalga *Chlorella protothecoides* para sobre expresar una enzima clave, la enzima málica. Esta enzima desempeña un papel crucial en las vías metabólicas relacionadas con la síntesis de lípidos. Al clonar y sobre expresar el gen responsable de la enzima málica en *Chlorella protothecoides* se logró aumentar significativamente la acumulación de lípidos en la microalga. Según los resultados del estudio, la acumulación total de lípidos en la microalga modificada genéticamente aumentó en 2,8 veces en comparación con la microalga tipo salvaje o no modificada.

La investigación realizada por Kim *et al.*<sup>102</sup> se centró en la ingeniería genética de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* PTS42 para mejorar la acumulación de lípidos. Se diseñó una cepa transgénica que sobre expresaba

**Tabla 7.** Métodos empleados en la modificación genética de microorganismos

Técnica	¿Qué es?	Procedimiento	Aplicación
<b>CRISPR-Cas9</b>	Herramienta de edición genética, capaz de utilizar la proteína Cas9 como una especie de tijera molecular que puede cortar las cadenas de ADN en lugares específicos <sup>80-82</sup> .	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Diseño del gRNA: Se diseña un modelo de ARN que corresponda a la secuencia específica que se desea editar en el microorganismo.</li> <li>2) Construcción del plásmido: Este gRNA se añade a un plásmido.</li> <li>3) Transformación: El plásmido se añade a las células del microorganismo. Por ejemplo, se suele utilizar el método de choque térmico.</li> <li>4) Selección y confirmación: Después de la transformación las células se cultivan, y se confirma si ocurrió la edición genética.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Producción de etanol celulósico: Se optimizó la capacidad para descomponer la xilosa uno de los principales componentes de la celulosa en la biomasa vegetal, en <i>S. cerevisiae</i>.</li> <li>2) Producción de butanol y otros biocombustibles avanzados: Se modificó la levadura <i>Yarrowia lipolytica</i> para producir isobutanol, que puede utilizarse en motores de combustión interna.</li> <li>3) Se eliminó genes en la arquea <i>Sulfolobus islandicus</i> para redirigir el flujo de carbono y aumentar los rendimientos de biocombustibles.</li> </ol>
<b>Recombinación homóloga</b>	Proceso de reparación del ADN en células vivas para corregir roturas en ambas hebras de ADN <sup>83,84</sup> .	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Diseño del constructo de ADN: Se diseña un fragmento de ADN que tenga el cambio genético deseado.</li> <li>2) Transformación: El fragmento de ADN se introduce en las células del microorganismo.</li> <li>3) Selección de transformantes: Las células transformadas, es decir a las cuales se les añadió el ADN, se seleccionan utilizando marcadores.</li> <li>4) Verificación de la recombinación homóloga: Luego de permitir el crecimiento de las células, se utilizan técnicas de biología molecular, como PCR, para verificar la recombinación.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Capacidad de la levadura para fermentar celulosa a etanol: Se introdujo modificaciones en los genes implicados en la descomposición de la celulosa en <i>S. cerevisiae</i>. Esto mejoró la capacidad para fermentar celulosa a etanol, y mayor producción de etanol celulósico.</li> <li>2) Producción de biocombustibles avanzados en levaduras: Se mejoró este proceso al modificar las vías metabólicas en <i>Yarrowia lipolytica</i> para producir ácidos grasos; que son precursores del biodiesel.</li> </ol>
<b>Evolución dirigida</b>	Esta es una técnica que implica la selección de cepas de levadura con características deseables a través de varias rondas de mutación y selección <sup>85-87</sup> .	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Generación de diversidad: Se crea una biblioteca de variantes de genes en los microorganismos; la cual se puede realizar por ejemplo con mutagénesis al azar.</li> <li>2) Transformación: Las variantes del gen se introducen en las células del microorganismo.</li> <li>3) Crecimiento y selección: Las células transformadas se cultivan</li> <li>4) Iteración: Las variantes seleccionadas se utilizan como punto de partida para una nueva ronda de diversificación y selección. Este proceso se repite hasta que se obtenga una variante con las propiedades deseadas.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) La evolución de la tolerancia de la levadura a los inhibidores formados durante el pretratamiento de la biomasa mejora la fermentación de los hidrolizados lignocelulósicos. Esto permite mayores rendimientos de biocombustibles a partir de materias primas renovables como los residuos agrícolas.</li> <li>2) La evolución de la levadura para utilizar azúcares de pentosa como la xilosa aumenta de manera más eficiente los rendimientos de bioetanol a partir de polímeros de hemicelulosa en la biomasa.</li> </ol>

		5) Análisis: Una vez seleccionada la variante, se realiza análisis de las mejoras y se determina la secuencia de ADN para identificar las mutaciones.	3) Mediante la evolución dirigida se llegó a la selección de mejores tasas de utilización de sustratos, lo que aumentó la productividad de los biocombustibles, en <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
<b>Síntesis genómica</b>	Es una técnica que implica la creación de secuencias de ADN largas. Se basa en la síntesis de oligonucleótidos, fragmentos cortos de ADN, que luego se ensamblan en estructuras más grandes <sup>88-90</sup> .	1) Diseño de la secuencia de ADN: La secuencia de ADN que se desea sintetizar se diseña utilizando un software de bioinformática. 2) Síntesis de oligonucleótidos: Se producen fragmentos cortos de ADN que corresponden a la secuencia diseñada. 3) Ensamblaje de los oligonucleótidos: Se ensamblan en fragmentos más largos de ADN, utilizando técnicas como PCR de ensamblaje o la reacción de Gibson. 4) Transformación: Los fragmentos ensamblados se introducen en las células. 5) Selección y análisis: Las células transformadas se seleccionan y se analizan para confirmar la correcta incorporación de la secuencia de ADN sintetizada.	1) Racionalización del genoma de la levadura mediante la eliminación de genes no esenciales y elementos repetitivos, lo que permite mayores rendimientos del producto. 2) En la microalga oleaginosa <i>Chlorella protothecoides</i> , los cromosomas sintéticos permitieron influir en las rutas metabólicas para mejorar el rendimiento de los biocombustibles. 3) En <i>E. coli</i> se efectuó la racionalización del genoma mediante la eliminación de regiones no esenciales. Los fragmentos potenciados, aumentaron la producción de la enzima n-butanol hasta 1.6 veces.
<b>Transformación por electroporación</b>	Este método utiliza una corriente eléctrica para crear poros temporales en la membrana celular del microorganismo, permitiendo la entrada de ADN extraño <sup>91,92</sup> .	1) Preparación de las células: Se coloca las células a transformar en un medio especial para su crecimiento. Posteriormente se las recolecta en su fase logarítmica de crecimiento. 2) Preparación del ADN: El ADN que se va a introducir se prepara para mezclarlo con las células competentes. 3) Electroporación: La mezcla de células y ADN se coloca en un tubo para electroporación. Se aplica un campo eléctrico breve y de alta intensidad. Esto crea poros temporales en la membrana celular por los cuales ingresa el ADN. 4) Recuperación: Posterior a la electroporación se añade un medio de cultivo rico para cerrar los poros y permitir la recuperación de las células. 5) Selección: Se seleccionan las células que fueron transformadas, a través de marcadores selectivos en el ADN. 6) Cultivo: Se cultivan para permitir la expresión del ADN introducido.	1) En las microalgas <i>Chlamydomonas</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Nannochloropsis</i> y <i>Phaeodactylum</i> , se introdujeron circuitos metabólicos sintéticos para optimizar las vías de producción, y así aumentar la producción de lípidos o la secreción de hidrocarburos. 2) Se utilizó en <i>Methanosarcina barkeri</i> , <i>Methanosarcina acetivorans</i> , <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> , <i>Methanobacterium formicicum</i> , para transformar estas arqueas metanogénicas con genes que codifican enzimas que producen gas hidrógeno. Los genes introducidos permitieron redirigir el metabolismo lejos de la producción de metano, y más hacia la producción de hidrógeno, que es un combustible limpio.
<b>Conjugación bacteriana</b>	Es un método de transferencia de material genético de una bacteria a otra a través de un contacto físico directo, generalmente en forma de un puente de proteínas <sup>93,94</sup> .	1) Iniciación: La bacteria donante que posee un plásmido de conjugación establece contacto con una bacteria receptora. 2) Transferencia del plásmido: El plásmido en la bacteria donante se replica. Una de las cadenas de ADN del plásmido se transfiere hacia la bacteria receptora. 3) Síntesis de la cadena complementaria: La cadena de ADN transferida actúa como molde para sintetizar una cadena complementaria de ADN. 4) Finalización: Se separan las dos bacterias, ambas con una copia de plásmido.	1) Se utilizaron plásmidos en <i>E. coli</i> y <i>Clostridium acetobutylicum</i> para mejorar la producción de butanol y biodiesel. 2) En <i>Clostridium acetobutylicum</i> se utilizó conjugación bacteriana para transferir plásmidos que contenían genes para la biosíntesis de butanol. Estos plásmidos contenían genes para CoA transferasa, thl, ctfB, y adhe para mejorar los rendimientos de butanol.
<b>RNA Interferente</b>	Es una técnica que se utiliza para silenciar la expresión de genes específicos en un organismo. Se utilizan pequeñas moléculas de ARN que se unen a moléculas de ARN mensajero en la célula y previene que sean traducidas a proteínas <sup>95-97</sup> .	Proceso general: 1) Diseño de pequeños ARN de interferencia: Se diseñan moléculas de siARN que sean complementarias a la secuencia del ARNm del gen que se quiere silenciar. 2) Producción de siRNA: Pueden ser sintetizados químicamente o dentro de la célula. 3) Introducción de siARN: Se introduce en la célula mediante varios métodos, incluyendo la transfección. 4) Incorporación en el complejo RISC: Una vez en la célula, el siRNA se incorpora en un complejo de proteínas llamado RISC. 5) Degradación del ARNm objetivo: El complejo RISC, guiado por el siRNA, se une al ARNm y lo degrada, impidiendo así su traducción en proteína. 6) Silenciamiento del gen: El gen asociado con el ARNm específico no se expresa.	1) Se utilizó RNAi para regular los genes de lipasa en <i>Nannochloropsis gaditana</i> , lo que resultó en un aumento del 46% en la producción de lípidos. 2) En la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , el RNAi se utilizó para eliminar las lipasas de triacilglicerol, lo que mejoró la producción de ésteres de ácidos grasos en un 60%. 3) Se diseñó un RNAi artificial en <i>E. coli</i> para reprimir el gen <i>ackA</i> que codifica el acetato quinasa. Esto aumentó la disponibilidad de acetyl-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos, lo que resultó en una producción tres veces mayor para la producción de biodiesel.
<b>Técnica del plásmido.</b>	Es una técnica en la cual se utilizan a los plásmidos para introducir material genético nuevo o modificado en las células <sup>98-100</sup> .	1) Selección del plásmido: Se selecciona el plásmido adecuado que funcionará como vector. 2) Inserción del gen de interés: Se corta el plásmido en un sitio específico y se inserta el gen de interés. Luego se utiliza la enzima ligasa para unir estas dos piezas de ADN. 3) Transformación: El plásmido recombinante se introduce en bacterias competentes. Se puede realizar mediante el método de choque térmico, electroporación, o con productos químicos. 4) Crecimiento y selección: Las bacterias seleccionadas se cultivan en un medio con antibiótico para el cual el plásmido tiene resistencia. Sobreviven las que puedan expresar esta resistencia. 5) Confirmación y cultivo: Las colonias resultantes se comprueban que tengan el plásmido recombinante. Una vez confirmado, se pueden cultivar estas bacterias.	1) Se añadieron plásmido que contenían una ruta de utilización de xilosa en <i>S. cerevisiae</i> para permitirle fermentar azúcares de xilosa abundante en la biomasa vegetal. Esto permitió mayores rendimientos de bioetanol. 2) En arqueas, los plásmidos que contenían genes de alcohol deshidrogenasa se transformaron en <i>Pyrococcus furiosus</i> para permitir la producción de etanol. 3) Se añadieron plásmidos en la vía de biosíntesis de isobutanol en <i>E. coli</i> para mejorar su producción.

la isoforma d2 de la enzima málica (ME2), la cual juega un papel en la conversión de malato a piruvato en la vía

metabólica de la microalga. Se observó un aumento en los niveles de ARN mensajero (ARNm) relacionado

con la enzima, con incrementos aproximados de 2 a 3 veces en las cepas transgénicas M16 y M17 en comparación con las cepas parentales. Además, se registró un aumento notable en el contenido de piruvato, con incrementos del 42,4% y 44,8% en las cepas M16 y M17, respectivamente. Uno de los hallazgos más relevantes fue el aumento en el contenido de ácidos grasos y lípidos en la cepa M17 bajo condiciones de privación de nitrógeno. En particular, se observaron incrementos del 23,4% y 19,9% en el contenido de ácidos grasos totales y lípidos, respectivamente, en comparación con las líneas parentales.

El estudio realizado por Shin *et al.*<sup>103</sup>, se dirigió específicamente al sistema CRISPR-Cas9 para desactivar el gen de la fosfolipasa A2 en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Este gen es fundamental ya que codifica una enzima central en el ciclo de Lands, una vía metabólica relevante en estas microalgas. Los resultados obtenidos mostraron cambios significativos en el perfil metabólico de los mutantes. Específicamente, se observó un incremento en la reserva de diacilgliceroles, que son precursores importantes en la síntesis de lípidos, seguido de una acumulación aumentada de triacilgliceroles. Estos triacilgliceroles son formas de almacenamiento de lípidos que tienen aplicaciones potenciales en la producción de biocombustibles.

Ko *et al.*<sup>104</sup> abordaron un desafío importante en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica utilizando levaduras. La xilosa es un azúcar pentosa abundante en la biomasa lignocelulósica, pero su conversión eficiente a bioetanol en presencia de inhibidores como el ácido acético lo hace un proceso complejo. Se mejoró la robustez de una cepa de levadura denominada XUSE, conocida por su capacidad para utilizar xilosa. Utilizaron una estrategia de evolución adaptativa en el laboratorio para someter a la cepa a condiciones de estrés por ácido acético, con el objetivo de seleccionar variantes que pudieran tolerar mejor este tipo de estrés inhibitorio. Se obtuvo la cepa evolucionada XUSAE57 mediante evolución adaptativa en el laboratorio. Esta ha demostrado una capacidad excepcional para convertir la xilosa, en etanol, incluso en condiciones adversas de estrés por ácido acético. Los rendimientos de etanol obtenidos, que varían entre 0,43 y 0,50 g de etanol por gramo de xilosa, son particularmente notables, ya que esta cepa mantuvo su eficiencia incluso en presencia de altas concentraciones de ácido acético. En condiciones de estrés por ácido acético a 4 g/L, la cepa mejorada mostró más del doble de eficiencia en la utilización de xilosa en comparación con la

cepa parental XUSE. Uno de los aspectos más destacados de XUSAE57 es su capacidad para fermentar tanto glucosa como xilosa simultáneamente, alcanzando un rendimiento de etanol de 0,49 g de etanol por gramo de azúcares totales. Este representa uno de los rendimientos más altos reportados hasta la fecha para la fermentación de una mezcla de azúcares.

El estudio realizado por Jun & Jiayi<sup>105</sup> destaca el éxito de la ingeniería genética al modificar los genes que codifican la xilosa reductasa (XYL1) y el xilitol deshidrogenasa (XYL2) de *Pichia stipitis* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Los resultados de esta modificación genética fueron altamente prometedores, con mejoras significativas en varios aspectos clave de la fermentación de xilosa en etanol:

- Biomasa microbiana: La cepa modificada mostró un aumento considerable en la producción de biomasa, alcanzando 8,1 g/L, en comparación con la cepa de control que alcanzó 3,4 g/L;
- Tasa de consumo de xilosa: La ingeniería genética de XYL1 y XYL2 en levaduras condujo a una tasa de consumo de xilosa significativamente más alta, con una velocidad de 0,15 g/h, en comparación con la cepa de control, que tuvo una tasa de 0,02 g/h;
- Rendimiento de etanol: Después de 72 horas de fermentación en un medio basado en xilosa, la cepa modificada produjo 6,8 g/L de etanol, en comparación con los 3,5 g/L de la cepa de control.

Wu *et al.*<sup>106</sup> expresaron que la transferencia del gen PHO4 de una cepa MC15 de crecimiento rápido y baja producción de etanol a una cepa industrial MF01 de alta producción de etanol a través de la recombinación homóloga aumentaría el rendimiento y acortaría el tiempo de fermentación. Los resultados indicaron que PHO4 en la cepa de ingeniería industrial MF01-PHO4 mostró estabilidad genómica con un rendimiento de etanol máximo medio que aumentó a 114,71 g/L, lo que representa un aumento del 5,30% en el rendimiento de etanol y una disminución del 12,5% en el tiempo de fermentación en comparación con el de la cepa original MF01. Semkiv *et al.*<sup>107</sup> exponen que se informaron dos enfoques para reducir los niveles celulares de ATP y, en consecuencia, aumentar el rendimiento de etanol y reducir la producción de biomasa en la cepa de laboratorio BY4742: (i) la sobreexpresión de un gen de *Escherichia coli* que codifica apirasa o parte SSB1 del acompañante que exhibe actividad ATPasa y (ii) la activación de dos ciclos fútiles en *S. cerevisiae* que consisten

**Tabla 8.** Comparativa de rendimientos en microorganismos genéticamente modificados y no modificados.

Producto	Técnica utilizada	Especie empleada	Rendimiento sin modificar	Rendimiento modificado
<b>Etanol</b>	Técnica del plásmido <sup>98</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,43 g C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/g C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> consumido	0,49 g C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/g C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> consumido, aumento del 14%
	Evolución dirigida <sup>86</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Menor a 0,1 g C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/g de C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	0,42 g C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/g C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> . Aumentó un 320% en el rendimiento
	Técnica de desequilibrio del uso de codones <sup>108</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Menor a 0,1 g C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/g de C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	0,43 g C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/g C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> Aumentó un 330% en el rendimiento
	Sobreexpresión de genes (Probablemente con plásmidos o electroporación) <sup>109</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	De manera salvaje la <i>S. cerevisiae</i> no puede utilizar celobiosa para producir etanol.	0,43 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/g C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>
	Sobreexpresión de genes (Probablemente con plásmidos o electroporación) <sup>110</sup>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0,11 g C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/g C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0,22 g C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/g C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> Aumentó la producción en un 100%.
<b>2,3-Butanodiol</b>	Evolución dirigida <sup>87</sup>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18 g/L	35 g/L Aumentó un 94% su rendimiento.
<b>Lípidos para producir biodiesel</b>	Recombinación homóloga <sup>84</sup>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	No producía lípidos a través de la celobiosa antes de la modificación.	0,33 g de lípidos/g C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>
	CRISPR-Cas <sup>91</sup>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0,11 gramos de ácidos grasos.	0,27 de ácidos grasos. Aumentó un 145% su rendimiento.
	Recombinación homóloga <sup>83</sup>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0.152 gramos de lípidos por cada gramo de glucosa.	0.279 gramos de lípidos por cada gramo de glucosa, un aumento del 84%.
	Transformación por electroporación <sup>111</sup>	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,21 g/L/día de biomasa y 36,2% de lípidos.	La biomasa aumentó a 0,31 g/L/día y los lípidos aumentaron a 52,4%.
	Evolución dirigida <sup>112</sup>	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	La cepa salvaje acumuló 22-28% de lípidos	Aumentó el contenido de lípidos al 42-52%.
	Evolución dirigida <sup>113</sup>	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	La cepa salvaje acumuló 18% de lípidos.	La cepa mutante aumentó el contenido al 40%.
<b>Alcoholes grasos para producir biodiesel</b>	Técnica de desequilibrio del uso de codones <sup>114</sup>	<i>Escherichia coli</i>	Menor de 1mg/L.	553,6 mg/L de alcoholes grasos totales.
<b>Gas biohidrógeno</b>	Técnica de desequilibrio del uso de codones <sup>115</sup>	<i>Cyanobacteria Anabaena</i> sp. PCC 7120 y <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942.	<i>Anabaena</i> : alrededor de 0,25 μmol H <sub>2</sub> /mg clorofila/hora.	<i>Anabaena</i> modificada produjo 0,9 μmol H <sub>2</sub> /mg de clorofila/h. Aumentó su producción en un 260%.
			<i>Synechococcus</i> : alrededor de 0,15 μmol H <sub>2</sub> /mg clorofila/hora.	<i>Synechococcus</i> produjo 0,5 μmol H <sub>2</sub> /mg de clorofila/h. Aumentó su producción en un 233%.
<b>Metano</b>	Técnica del plásmido <sup>116</sup>	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	0.2 gramos de metano por cada gramo de acetato.	0.3 g CH <sub>4</sub> /g CH <sub>3</sub> COO. Una mejora del 50%.
	Transformación por electroporación <sup>117</sup>	<i>Methanosarcina maze</i>	No se proporciona un porcentaje. Se indica que la eficiencia es insignificante.	Electrosíntesis de metano con eficiencia de recuperación de energía eléctrica del 63%.

en la sobreexpresión de genes que codifican fosfoenolpiruvato carboxilasa y piruvato carboxilasa. En la tabla 8 se comparan los rendimientos de microorganismos genéticamente modificados y sin modificar.

#### Avances en las modificaciones genéticas y uso de microorganismos

En China extrajeron lípidos de conversión simultánea a biocombustible de un cultivo de microalgas de *Chlorella sorokiniana* CY-1 en un medio de cultivo de melaza residual. Además, lograron una pronta extracción de lípidos con una recuperación del 92,84% y una mejora de la disrupción celular de 8,3 veces en la fase de disolvente orgánico. El proceso de extracción de lípidos se basó en un sistema bifásico líquido híbrido (HLBS) que consta de disolventes disruptivos y extractivos en un solo sistema<sup>118</sup>. En Grecia se investigó la valorización

energética de la biomasa de *Chlorella vulgaris* cultivada en condiciones heterótrofas limitadas en azufre a través de los biocombustibles biodiesel, biogás (biometano) y biomasa seca combustible. Se alcanzó una productividad de lípidos de 442,9 ± 6,5 mg/L/d conteniendo ácidos grasos aptos para la producción de biodiesel<sup>119</sup>.

En India se utilizaron dos tipos de microalgas *Dictyococcus* sp. VSKA18 y *Coelastrella* sp. M-60 para la producción de lípidos. El medio de cultivo se compuso de hidrolizado de biomasa lignocelulósica, además se privó de nitrógeno para aumentar la acumulación de lípidos. El contenido de lípidos de *Dictyococcus* sp. VSKA18 y *Coelastrella* sp. M 60 fueron 44% y 52%, respectivamente<sup>120</sup>. También en India se realizó un análisis exhaustivo de una microalga oleaginoso autóctona

*P. kessleri*, mediante el ensamblaje híbrido que combina lecturas de secuenciación de alta resolución generadas por la tecnología Illumina (lecturas cortas) y Nanopore (lecturas de mayor longitud), lo que condujo al ensamblaje de un genoma de 64,90 Mb con una alta continuidad y cobertura con 8371 genes funcionales y 874 factores de transcripción putativos. La reconstrucción del genoma se complementa con el análisis filogenético del metabolismo de los acil lípidos que reveló la conservación evolutiva de estas proteínas entre varias especies de microalgas con un enfoque de mejorar la producción de biocombustibles<sup>121</sup>. En Grecia se utilizaron dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus awamori* como fábrica de células para transformar almidón en bioetanol. Estos microorganismos se ubicaron en un biocatalizador inmóvil y se encontró una mayor producción de etanol (32,17 mL/L), productividad (4,60 mL/L/d) y rendimiento (0,51 g etanol/g almidón)<sup>122</sup>.

En India y Taiwán se desarrollaron fábricas robustas de células de levadura mediante evolución adaptativa en el laboratorio para optimizar la producción de bioetanol celulósico. La levadura etanogénica termotolerante *Kluyveromyces marxianus* JKH5 fue diseñada a través de pases en serie durante 60 generaciones, en un medio con una concentración progresivamente mayor de inhibidores (ácido acético, furfural y vainillina), que se generan durante el pretratamiento con ácido diluido. La cepa mejorada, *K. marxianus* JKH5 C60, demostró una eficiencia de fermentación un 80% superior a 42 °C en comparación con la cepa original. La producción de bioetanol, mediante sacarificación y fermentación simultáneas del bagazo de caña de azúcar pretratado con ácido alcalino diluido en presencia de inhibidores, resultó en una concentración de etanol de  $54,8 \pm 0,9$  g/L y un rendimiento de 0,40 g/g<sup>123</sup>.

#### *Identificación de vacíos, limitaciones en la literatura*

A pesar de los avances logrados, las investigaciones actuales presentan ciertas limitaciones y vacíos de información. Uno de los principales desafíos identificados es la necesidad de optimizar los procesos y tecnologías desarrolladas para que puedan ser escalados y aplicados a nivel industrial y comercial. La mayoría de los estudios se han realizado a escala de laboratorio o en entornos controlados, lo que dificulta la transferencia directa de los resultados a operaciones a gran escala. Por lo tanto, se requiere trabajo adicional en áreas como el diseño de procesos, la ingeniería de sistemas, el análisis de viabilidad económica y la evaluación de impactos

ambientales para lograr una implementación exitosa de estas soluciones energéticas sostenibles en el mundo real.

La necesidad de optimizar los procesos descritos en la presente investigación, permitirían aumentar la eficiencia y la rentabilidad a gran escala. Asimismo, evaluar la viabilidad económica y los impactos ambientales a gran escala es esencial para garantizar la sostenibilidad a largo plazo de la producción de bioenergía. La logística en la producción comercial de biocombustibles de segunda generación sigue siendo un desafío, y la transición de protocolos piloto a implementaciones a gran escala requiere una cuidadosa consideración de los costos y beneficios. Por ello, se puede recomendar que futuras investigaciones se centren en la integración de técnicas avanzadas, como CRISPR-Cas9, y el desarrollo de nuevas estrategias de ingeniería metabólica para optimizar aún más la producción de biocombustibles.

#### **Conclusiones**

Los microorganismos como levaduras, algas y bacterias han demostrado ser fuentes prometedoras para la producción de bioenergía y biocombustibles. Su versatilidad para aprovechar una amplia gama de sustratos, incluyendo desechos orgánicos y residuos agroindustriales, los convierte en opciones atractivas y sostenibles. Los avances recientes en ingeniería genética y modificación de microorganismos han permitido mejorar significativamente su rendimiento en la producción de biocombustibles como bioetanol, biodiesel, biogás e hidrógeno. Estos avances resaltan el potencial de la ingeniería metabólica para optimizar los procesos de bioconversión y lograr una producción eficiente y económicamente viable de biocombustibles a gran escala. La investigación también ha demostrado un enfoque en las biorrefinerías y la economía circular, aprovechando los desechos orgánicos y residuos agroindustriales como materia prima. Asimismo, las técnicas avanzadas como CRISPR-Cas9 han revolucionado la capacidad de diseñar microorganismos optimizados para la producción de bioenergía a nivel industrial. Estos avances en la producción de bioenergía a partir de microorganismos podrían contribuir en un futuro cercano a varios Objetivos de Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas, incluyendo la seguridad energética (ODS 7), la mitigación del cambio climático (ODS 13), la producción y consumo responsables (ODS 12) y el fomento de la industria, la innovación y la infraestructura (ODS 9). Al diversificar la matriz energética con fuentes renovables

y sostenibles se reduce la dependencia de los combustibles fósiles y se promueve un futuro más limpio. Sin embargo, persisten desafíos y limitaciones, como la necesidad de mejorar la escalabilidad de los procesos, reducir los costos y evaluar cuidadosamente los impactos ambientales y socioeconómicos. Futuras investigaciones deberían centrarse en la integración de técnicas avanzadas y el desarrollo de nuevas estrategias de ingeniería metabólica para optimizar la producción de biocombustibles, tal como lo es el uso de tecnologías ómicas para mejorar la tolerancia de levaduras a diversos factores de estrés durante la fermentación y con ello, aumentar los rendimientos en la producción de dichos bioproductos.

## Referencias

1. MV Rodionova, AM Bozieva, SK Zharmukhamedov, YK Leong, J Chi-Wei Lan, A Veziroglu, TN Veziroglu, T Tomo, J-S Chang, SI Allakhverdiev. A comprehensive review on lignocellulosic biomass biorefinery for sustainable biofuel production. *Int. J. Hydrogen Energy*, **47(3)**, 1481–98 (2022).
2. P Duarah, D Haldar, AK Patel, CD Dong, RR Singhania, MK Purkait. A review on global perspectives of sustainable development in bioenergy generation. *Bioresour. Technol.*, **348**, 126791 (2022).
3. A Kalair, N Abas, MS Saleem, AR Kalair, N Khan. Role of energy storage systems in energy transition from fossil fuels to renewables. *Energy Storage*, **3(1)**, e135 (2021).
4. K Calvin, A Cowie, G Berndes, A Arneeth, F Cherubini, J Portugal-Pereira, G Grassi, J House, FX Johnson, A Popp, M Rounsevell, R Slade, P Smith. Bioenergy for climate change mitigation: Scale and sustainability. *GCB Bioenergy*, **13(9)**, 1346–71 (2021).
5. SS Siwal, Q Zhang, N Devi, AK Saini, V Saini, B Pareek, S Gaidukovs, V K Thakur. Recovery processes of sustainable energy using different biomass and wastes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **150**, 111483 (2021).
6. LG Nair, K Agrawal, P Verma. An overview of sustainable approaches for bioenergy production from agro-industrial wastes. *Energy Nexus*, **6**, 100086 (2022).
7. C Navarrete, IH Jacobsen, JL Martínez, A Procentese. Cell Factories for Industrial Production Processes: Current Issues and Emerging Solutions. *Processes*, **8(7)**, 768 (2020).
8. S Mavridis, EA Voudrias. Using biogas from municipal solid waste for energy production: Comparison between anaerobic digestion and sanitary landfilling. *Energy Convers Manag.*, **247**, 114613 (2021).
9. J Chen, B Zhang, L Luo, F Zhang, Y Yi, Y Shan, B Liu, Y Zhou, X Wang, X Lü. A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **149**, 111370 (2021).
10. AR Behera, K Dutta, P Verma, A Daverey, DK Sahoo. High lipid accumulating bacteria isolated from dairy effluent scum grown on dairy wastewater as potential biodiesel feedstock. *J. Environ. Manage.*, **252**, 109686 (2019).
11. S Park, THT Nguyen, ES Jin. Improving lipid production by strain development in microalgae: Strategies, challenges and perspectives. *Bioresour. Technol.*, **292**, 121953 (2019).
12. N Singh, M Puri, DK Tuli, RP Gupta, CJ Barrow, AS Mathur. Bioethanol production potential of a novel thermophilic isolate *Thermoanaerobacter* sp. DBT-IOC-X2 isolated from Chumathang hot spring. *Biomass Bioenergy*, **116**, 122–30 (2018).
13. WW Li, HQ Yu. Editorial overview: Microbial “cell factory” for bioenergy production from low-value carbon sources. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **59**, A4–6 (2020).
14. MA Chaney. So You Want to Write a Narrative Review Article? *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, **35(10)**, 3045–9 (2021).
15. S Kugley, A Wade, J Thomas, Q Mahood, A-MK Jørgensen, K Hammerstrøm, N Sathe. Searching for studies: a guide to information retrieval for Campbell systematic reviews. *Campbell Systematic Reviews*, **13(1)**, 1–73 (2017).
16. J Md Khudzari, J Kurian, B Tartakovsky, GSV Raghavan. Bibliometric analysis of global research trends on microbial fuel cells using Scopus database. *Biochem. Eng. J.*, **136**, 51–60 (2018).
17. ET Rother. Revisão sistemática X revisão narrativa. *Acta Paulista de Enfermagem.*, **20(2)**, v–vi, (2007).
18. AH Dehkordi, E Mazaheri, HA Ibrahim, S Dalvand, RG Gheshlagh. How to Write a Systematic Review: A Narrative Review. *Int. J. Prev. Med.*, **12(27)**, PMC8218799 (2021).
19. M Kabusi, H Khoddam. Principle-based concept analysis: A narrative review from a nursing perspective. *Journal of Nursing Advances in Clinical Sciences*, **1(1)**, 51–8 (2024).
20. Y Wang, K Huang. Research progress of diagnosing methodology for lumbar segmental instability. *Medicine*, **101(1)**, e28534 (2022).
21. HM Brandt, RC Vanderpool, M Pilar, M Zubizarreta, LR Stradtman. A narrative review of HPV vaccination interventions in rural U.S. communities. *Prev. Med. (Baltim)*, **145**, 106407, (2021).
22. J Tai, R Ajjawi, M Bearman, P Wiseman. Conceptualizations and Measures of Student Engagement: A Worked Example of Systematic Review. In: *Systematic Reviews in Educational Research*. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden, p. 91–110 (2020).
23. JM Chisholm, R Zamani, AM Negm, N Said, MM Abdel Daiem, M Dibaj, M Akrami. Sustainable waste management of medical waste in African developing countries: A narrative review. *Waste Management & Research*, **39(9)**, 1149–63 (2021).

24. La Asamblea General adopta la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible (2015). <https://www.un.org/sustainable-development/es/2015/09/la-asamblea-general-adopta-la-agenda-2030-para-el-desarrollo-sostenible/>
25. A Singh, V Anand, A Bai, Z Gabnai, SK Prajapati. Waste Algae for Bioenergy Generation to Mitigate Eutrophication and Greenhouse Emissions in Water Bodies. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, **67(3)**, 355–66 (2023).
26. S Das, R Raj, Das S, MM Ghangrekar. A Sustainable Approach for the Production of Green Energy With the Holistic Treatment of Wastewater Through Microbial Electrochemical Technologies: A Review. **Frontiers in Sustainability**, **2** (2021).
27. YW Tjong, P Sharma, H Tian, TH Tsui, HT Lam, YW Tong. Startup performance and microbial communities of a decentralized anaerobic digestion of food waste. **Chemosphere**, **318**, 137937 (2023).
28. KTX Tong, IS Tan, HCY Foo, PL Show, MK Lam, MK Wong. Sustainable circular biorefinery approach for novel building blocks and bioenergy production from algae using microbial fuel cell. **Bioengineered**, **14(1)**, 246–89 (2023).
29. A Jabłońska-Trypuć, E Wołejko, MD Ernazarovna, A Głowacka, G Sokołowska, U Wydro. Using Algae for Biofuel Production: A Review. **Energies (Basel)**, **16(4)**, 1758 (2023).
30. CM Igwebuike, S Awad, Y Andrès. Renewable Energy Potential: Second-Generation Biomass as Feedstock for Bioethanol Production. **Molecules**, **29(7)**, 1619 (2024).
31. V Okoro, U Azimov, J Munoz. Recent advances in production of bioenergy carrying molecules, microbial fuels, and fuel design - A review. **Fuel**, **316**, 123330 (2022).
32. AP Eswari, YK Ravi, S Kavitha, JR Banu. Recent insight into anaerobic digestion of lignocellulosic biomass for cost effective bioenergy generation. **e-Prime - Advances in Electrical Engineering, Electronics and Energy**, **3**, 100119 (2023).
33. V Ahuja, A Arora, S Chauhan, S Thakur, C Jeyaseelan, D Paul. Yeast-Mediated Biomass Valorization for Biofuel Production: A Literature Review. **Fermentation**, **9(9)**, 784 (2023).
34. J Eardley, DJ Timson. Yeast Cellular Stress: Impacts on Bioethanol Production. **Fermentation**, **6(4)**, 109 (2020).
35. K Kumar, L Ding, H Zhao, MH Cheng. Waste-to-Energy Pipeline through Consolidated Fermentation–Microbial Fuel Cell (MFC) System. **Processes**, **11(8)**, 2451 (2023).
36. SF Ahmed, M Kabir, A Mehjabin, FTZ Oishi, S Ahmed, S Mannan, M Mofijur, F Almomani, IA Badruddin, S Kamanagar. Waste biorefinery to produce renewable energy: Bioconversion process and circular bioeconomy. **Energy Reports**, **10**, 3073–91 (2023).
37. JC López-Linares, M Coca, PE Plaza, S Lucas, MT García-Cubero. Waste-to-fuel technologies for the bioconversion of carrot discards into biobutanol. **Renew Energy**, **202**, 362–9 (2023).
38. A Erensoy, S Mulayim, A Orhan, N Çek, A Tuna, N Ak. The system design of the peat-based microbial fuel cell as a new renewable energy source: The potential and limitations. **Alexandria Engineering Journal**, **61(11)**, 8743–50 (2022).
39. B Kazmi, T Sadiq, SAA Taqvi, S Nasir, MM Khan, SR Naqvi, SR Naqvi, H AlMohamadi. Towards a sustainable future: Bio-hydrogen production from food waste for clean energy generation. **Process Safety and Environmental Protection**, **83**, 555–67 (2024).
40. SA Razzak, RA Lucky, MM Hossain, H deLasa. Valorization of Microalgae Biomass to Biofuel Production: A review. **Energy Nexus**, **7**, 100139 (2022).
41. Ng RTL, P Fasahati, K Huang, CT Maravelias. Utilizing stillage in the biorefinery: Economic, technological and energetic analysis. **Appl. Energy**, **241**, 491–503 (2019).
42. K Arora, P Kumar, D Bose, X Li, S Kulshrestha. Potential applications of algae in biochemical and bioenergy sector. **3 Biotech.**, **11(6)**, 296 (2021).
43. R Kutscha, S Pflügl. Microbial Upgrading of Acetate into Value-Added Products—Examining Microbial Diversity, Bioenergetic Constraints and Metabolic Engineering Approaches. **Int. J. Mol. Sci.**, **21(22)**, 8777 (2020).
44. M Zupanc, BB Humar, M Dular, J Gostiša, M Hočevar, SK Repinc, M Krzyk, L Novak, J Ortar, Ž Pandur, B Stres, M Petkovšek. The use of hydrodynamic cavitation for waste-to-energy approach to enhance methane production from waste activated sludge. **J. Environ. Manage.**, **347**, 119074 (2023).
45. A Anca-Couce, C Hochenauer, R Scharler. Bioenergy technologies, uses, market and future trends with Austria as a case study. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, **135**, 110237 (2021).
46. P Majidian, M Tabatabaei, M Zeinolabedini, MP Naghsbandi, Y Chisti. Metabolic engineering of microorganisms for biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, **82**, 3863–85 (2018).
47. BS Dhanya, A Mishra, AK Chandel, ML Verma. Development of sustainable approaches for converting the organic waste to bioenergy. **Science of the Total Environment**, **723**, 138109 (2020).
48. LEN Ekpeni, FF Nkem-Ekpeni, KY Benyounis, AKM Aboderheeba, J Stokes, AG Olabi. Yeast: A potential biomass substrate for the production of cleaner energy (Biogas). **Energy Procedia**, **61**, 1718–31 (2014).
49. GM Salkhozhayeva, KM Abdiyeva, SY Arystanova, GD Ultanbekova. Technological Process of Anaerobic Digestion of Cattle Manure in a Bioenergy Plant. **Journal of Ecological Engineering**, **23(7)**, 131–42 (2022).
50. SR Chia, SBHM Nomanbhay, KW Chew, HSH Munawaroh, AH Shamsuddin, PL Show. Algae as potential feedstock for various bioenergy production. **Chemosphere**, **287(P1)**, 131944 (2022).
51. D Marcano. El lado positivo de las bacterias. **Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel**, **39(2)**, 63–5 (2008).

52. WB Whitman, DC Coleman, WJ Wiebe. Prokaryotes: the unseen majority. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**(12), 6578-83 (1998).
53. AK Sadvakasova, NR Akmukhanova, K Bolatkhan, BK Zayadan, AA Ussebayeva, MO Bauenova, AE Akhmetkaliyeva, SI Allakhverdiev. Search for new strains of microalgae-producers of lipids from natural sources for biodiesel production. **Int. J. Hydrogen Energy**, **44**(12), 5844-53 (2019).
54. B Namitha, A Sathish, P Senthil Kumar, K Nithya, S Sundar. Micro algal biodiesel synthesized from *Monoraphidium sp.*, and *Chlorella sorokiniana*: Feasibility and emission parameter studies. **Fuel**, **301**, 121063 (2021).
55. T Fazal, MSU Rehman, F Javed, M Akhtar, A Mushtaq, A Hafeez, AA Din, J Iqbal, N Rashid, F Rehman. Integrating bioremediation of textile wastewater with biodiesel production using microalgae (*Chlorella vulgaris*). **Chemosphere**, **281**, 130758 (2021).
56. P Bhuyar, S Sundararaju, MHA Rahim, GP Maniam, N Govindan. Enhanced productivity of lipid extraction by urea stress conditions on marine microalgae *Coelastrum sp.* for improved biodiesel production. **Bioresour. Technol. Rep.**, **15**, 100696 (2021).
57. G Li, J Zhang, H Li, R Hu, X Yao, Y Liu, Y Zhou, T Lyu. Towards high-quality biodiesel production from microalgae using original and anaerobically-digested livestock wastewater. **Chemosphere**, **273**, 128578 (2021).
58. J Grobler, KG Harding, M Smit, S Ramchuran, P Durand, M Low. Biodiesel production potential of an indigenous South African microalga, *Acutodesmus bajacalifornicus*. **Sci Afr.**, **13**, e00952 (2021).
59. J Dai, J Li, Y Xinping, J Chen, W Zhifang, X Yuqing, W Xiaou, H Zhang, A Guli, F Lei. Understanding working conditions for *Enterococcus sp. LI* on methane production: A low temperature condition-based biogas production experiment. **Biomass Bioenergy**, **153**, 106210 (2021).
60. M Said, AS Sitanggang, R Julianda, SP Estuningsih, A Fudholi. Production of methane as bio-fuel from palm oil mill effluent using anaerobic consortium bacteria. **J. Clean Prod.**, **282**, 124424 (2021).
61. V Arelli, NK Mamindlapelli, S Juntupally, S Begum, GR Anupoju. Solid-state anaerobic digestion of sugarcane bagasse at different solid concentrations: Impact of bio augmented cellulolytic bacteria on methane yield and insights on microbial diversity. **Bioresour. Technol.**, **340**, 125675 (2021).
62. Rana Q ul ain, Laiq Ur Rehman M, Irfan M, Ahmed S, Hasan F, Shah AA, S Khan, M Badshah. Lipolytic bacterial strains mediated transesterification of non-edible plant oils for generation of high quality biodiesel. **J. Biosci. Bioeng.**, **127**(5), 609-17 (2019).
63. V Kumar, IS Thakur. Biodiesel production from transesterification of *Serratia sp.* ISTD04 lipids using immobilised lipase on biocomposite materials of biomineralized products of carbon dioxide sequestering bacterium. **Bioresour. Technol.**, **307**, 123193 (2020).
64. TY Tsai, YC Lo, C Dong Di, Nagarajan D, Chang JS, Lee DJ. Biobutanol production from lignocellulosic biomass using immobilized *Clostridium acetobutylicum*. **Appl. Energy**, **277**(C), 115531 (2020).
65. YC Tsai, YQ Du, CF Yang. Anaerobic biohydrogen production from biotreated rice straw hydrolysate. **J. Taiwan Inst. Chem. Eng.**, **123**, 134-40 (2021).
66. HV Miranda Astudillo. Estructura y función de la ATP sintasa de las arqueas aeróbicas. **Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, **15**(2), 104-15 (2012).
67. F Mayer, F Enzmann, AM Lopez, D Holtmann. Performance of different methanogenic species for the microbial electrosynthesis of methane from carbon dioxide. **Bioresour. Technol.**, **289**, 121706 (2019).
68. S Saha, MB Kurade, GS Ha, SS Lee, HS Roh, YK Park, B-H Jeon. Syntrophic metabolism facilitates Methanosarcinella-mediated methanation in the anaerobic digestion of lipidic slaughterhouse waste. **Bioresour. Technol.**, **335**, 125250 (2021).
69. H Huber, M Thema, T Weidlich, A Kaul, B Andrea, A Bellack. Optimized biological CO<sub>2</sub>-methanation with a pure culture of thermophilic methanogenic archaea in a trickle-bed reactor. **Bioresour. Technol.**, **333**, 125135 (2021).
70. P Patra, M Das, P Kundu, A Ghosh. Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. **Biotechnol Adv.**, **47**, 107695 (2021).
71. H Xiao, J Zhong J jiang. Production of Useful Terpenoids by Higher-Fungus Cell Factory and Synthetic Biology Approaches. **Trends Biotechnol.**, **34**(3), 242-255 (2015).
72. FJ Ríos-Fránquez, CA Alba-Fierro, C Escamilla-Alvarado. Advances, challenges, and opportunities in genetic engineering for biofuels production. **Sustainable Biofuels: Opportunities and Challenges**, 399-424 (2021).
73. Y Zhang, J Yu, Y Wu, M Li, Y Zhao, H Zhu, C Chen, M Wang, B Chen. Efficient production of chemicals from microorganism by metabolic engineering and synthetic biology. **Chin. J. Chem. Eng.**, **30**, 14-28 (2021).
74. MK Mandal, NK Chanu, N Chaurasia. Exogenous addition of indole acetic acid and kinetin under nitrogen-limited medium enhances lipid yield and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase & diacylglycerol acyltransferase genes in indigenous microalgae: A potential approach for biodiesel production. **Bioresour. Technol.**, **297**, 122439 (2020).
75. S Chatterjee, SV Mohan. Yeast fermentation towards biodiesel: Maximizing resource recovery by integrating with biohydrogen production in biorefinery framework. **Biomass Bioenergy**, **142**, 105747 (2020).
76. V Ananthi, GS Prakash, S Woong, B Ravindran. Enhanced microbial biodiesel production from lignocellulosic hydrolysates using yeast isolates. **Fuel**, **256**, 115932 (2019).

77. S Polprasert, O Choopakar, P Elefsiniotis. Bioethanol production from pretreated palm empty fruit bunch (PEFB) using sequential enzymatic hydrolysis and yeast fermentation. **Biomass Bioenergy**, **149**, 106088 (2021).
78. AS Zaky, CE French, GA Tucker, C Du. Improving the productivity of bioethanol production using marine yeast and seawater-based media. **Biomass Bioenergy**, **139**, 105615 (2020).
79. I Ben, I Ntaikou, G Antonopoulou, M Alexandropoulou, M Brysch-herzberg, M Nasri, G Lyberatos, T Mechichi. Evaluation of the non-conventional yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) X19 for enhanced bioethanol production using date palm sap as renewable feedstock. **Renew. Energy**, **154**, 71–81 (2020).
80. Q Li, J Song, X Chen, J Ji, J Wang, W Xiao. CRISPR-Cas9-assisted recombineering in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **85**(8), e02786-18 (2019).
81. R Ledesma-Amaro, R Dulermo, X Niehus, JM Nicaud. Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids. **Metab. Eng.**, **58**, 38–46 (2020).
82. X Li, J Yang, X Zhao, F Bai, S Song. The efficient CRISPR/Cas9-based genome editing method in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, **46**(11), 1585–93 (2019).
83. K Qiao, SH Imam Abidi, H Liu, H Zhang, S Chakraborty, N Watson, PK Ajikumar, G Stephanopoulos. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Metab. Eng.**, **56**, 28–39 (2020).
84. S Lane, S Zhang, N Wei, C Rao, YS Jin. Development and physiological characterization of cellobiose-consuming *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnol. Bioeng.**, **13**(1), 1–15 (2020).
85. EN Smith, L Kruglyak. Evolution. A role for natural selection in yeast quantitative trait evolution. **Science**, **365**(6453), 819–821 (2019).
86. MM Demeke, MR Foulquié-Moreno, F Dumortier, JM Thevelein. Rapid Evolution of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for Xylose Fermentation through Formation of Extra-chromosomal Circular DNA. **PLoS Genet.**, **11**(3), e1005010, (2019).
87. R Ferreira, O Skovgaard, JG Cardoso, J Anckner, C Solem. Enhanced 2,3-butanediol production in *Klebsiella pneumoniae* by adaptive laboratory evolution. **AMB Express**, **9**(1), 57 (2019).
88. Y Qin, C Luo, Y Jiang, Y Li, Q Wang, N Wang, et al. An integrated genomic and transcriptomic analysis unveils industrial relevant traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Nat. Commun.**, **10**(1), 2893 (2019).
89. C Gao, Y Wang, Y Shen, D Yan, X He, J Dai, Q Wu. Oil accumulation mechanisms of the oleaginous microalga *Chlorella protothecoides* revealed through its genome, transcriptomes, and proteomes. **BMC Genomics**, **20**(1), 1–26 (2019).
90. P Hao, A He, T Li, S Li, X Zhu, B Wu. Screening and characterization of DNA fragments that promote gene expression in *Escherichia coli*. **ACS Synth. Biol.**, **8**(4), 755–65 (2019).
91. D Guzmán-Zapata, KA Macedo-Ororio, C Almaraz-Delgado, NV Durán-Figueroa, JA Badillo-Corona, I Monje-Ramirez. Electroporation protocols for microalgae: current state and perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **103**(1), 73–85 (2019).
92. FA Khan, HK Min, SK Khanal. Electroporation mediated genetic manipulation in methanogens and its applications for bioenergy production. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, **35**(3), 41 (2019).
93. Y Luo, HV Le, EA Jackson, KC Gross, KM Tesh, L Dice. Biological Engineering of Synthetic Microbial Pathways for Biofuel Production. **Biotechnol. Biofuels**, **12**(164) (2019).
94. Y Wang, X Li, Y Mao, HP Blaschek. Recent advances in metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for butanol production. **Metab. Eng.**, **60**, 25–42 (2020).
95. JA Gimpel, EA Specht, DR Georgianna, SP Mayfield. Advances in microalgae engineering and synthetic biology applications for biofuel production. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, **17**(3), 489–95 (2019).
96. R Chao, S Mishra, T Si, H Zhao. Engineering biological systems using automated biofoundries. **Metab. Eng.**, **56**, 71–83 (2019).
97. D Na, DY Lee, SY Lee. Mathematical modeling of RNA interference for the effective control of its dynamics and optimization of its biotechnological applications. **Biotechnol. Adv.**, **37**(5) (2019).
98. J Blazeck, A Hill, M Jamjoom, HS Alper. Tuning gene expression in yeast by orthogonal integration of a tightly regulated bacteriophage promoter system. **Nat. Commun.**, **10**(1), 225–225 (2019).
99. M Kreuzer, K Schmutzler, I Waegel, M Thomm, W Hausner. Genetic engineering of *Pyrococcus furiosus* to use chitin as a carbon source. **BMC Biotechnol.**, **13**(9) (2013).
100. JG Linger, WS Adney, A Darzins. Heterologous expression and engineering of proteases in bacterial hosts. **Biotechnol. Biofuels**, **12**(1) (2019).
101. J Yan, Y Kuang, X Gui, X Han, Y Yan. Engineering a malic enzyme to enhance lipid accumulation in *Chlorella protothecoides* and direct production of biodiesel from the microalgal biomass. **Biomass Bioenergy**, **122**, 298–304 (2019).
102. J Kim, HS Kwak, SJ Sim, ES Jin. Overexpression of malic enzyme isoform 2 in *Chlamydomonas reinhardtii* PTS42 increases lipid production. **Bioresour. Technol. Rep.**, **7**, 100239 (2019).
103. YS Shin, J Jeong, THT Nguyen, JYH Kim, ES Jin, SJ Sim. Targeted knockout of phospholipase A2 to increase lipid productivity in *Chlamydomonas reinhardtii* for biodiesel production. **Bioresour. Technol.**, **271**, 368–74 (2019).
104. JK Ko, T Enkh-Amgalan, G Gong, Y Um, SM Lee. Improved bioconversion of lignocellulosic biomass by *Saccharomyces*

- cerevisiae* engineered for tolerance to acetic acid. **GCB Bioenergy**, **12**(1), 90–100 (2020).
105. H Jun, C Jiayi. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for increased bioconversion of lignocellulose to ethanol. **Indian J. Microbiol.**, **52**(3), 442–8 (2012).
106. R Wu, D Chen, S Cao, Z Lu, J Huang, Q Lu, Y Chen, X Chen, N Guan, Y Weia, R Huang. Enhanced ethanol production from sugarcane molasses by industrially engineered: *Saccharomyces cerevisiae* via replacement of the PHO4 gene. **RSC Adv.**, **10**(4), 2267–76 (2020).
107. MV Semkiv, KV Dmytruk, CA Abbas, AA Sibirny. Activation of futile cycles as an approach to increase ethanol yield during glucose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioengineered**, **7**(2), 106–11 (2016).
108. A Elfick, R Green, L Matumba, KA Smart. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of bioethanol from xylose and glucose. **Adv. Appl. Microbiol.**, **107**, 21–78 (2019).
109. Z Qiu, J Ding, Y Luo, R Gao, Y Zhang, Z Wang. Reconstruction of an artificial cellobiose pathway for enhancing ethanol production from cellobiose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Biofuels**, **13**(1), 1–11 (2020).
110. Z Lazar, T Dulermo, C Neuvéglise, AM Crutz-Le Coq, JM Nicaud. Hexose transporters in *Yarrowia lipolytica* and their importance for red bio-oil production. **Biotechnol. Biofuels**, **13**(1), 1–14 (2020).
111. X Li, H Hu, K Gan, Y Sun. Genetic engineering of *Chlorella pyrenoidosa* for improved growth and lipid production. **Biotechnol. Biofuels**, **13**(1), 1–11 (2020).
112. F Wang, Y Liu, P Shi, P Zhou, Y Wang. Enhanced lipid accumulation in *Chlorella pyrenoidosa* through vitamin B12 and magnesium-ion stimulation. **Bioresour. Technol.**, **302**, 122895 (2020).
113. L Zhu, Z Wang, Q Shu, J Takala, E Hiltunen, P Feng. Characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* generated by ARTP mutagenesis for lipid production. **Biotechnol. Biofuels.**, **14**(1), 1–12 (2021).
114. Y-N Zheng, L-L Li, Q Liu, J-M Yang, X-W Wang, W Liu, X Xu, H Liu, G Zhao, M Xian. Optimization of fatty alcohol biosynthesis pathway for selectively enhanced production of C12/14 and C16/18 fatty alcohols in engineered *Escherichia coli*. **Microb. Cell. Fact.**, **11**, 65 (2012).
115. VC Santos-Ebinuma, R Mora-Lugo, R Navarro-González. Improving biohydrogen production from unicellular and diazotrophic cyanobacteria by transcriptional tuning using the T7 RNA polymerase. **Int. J. Hydrogen Energy**, **44**(7), 3804–15 (2019).
116. W Johnston, DC Ducat, ER Stadtman. *Methanosarcina acetivorans* genetic engineering for methane production from carbon dioxide, acetate, and hydrogen. **Biotechnol. Biofuels**, **13**(1), 1–12 (2020).
117. H Luo, Q Bao, J Hu, J Liu, T Yuan, P Lei. Modular Pathway Engineering of *Methanosarcina mazei* for Electricity-Driven Methane Production from CO<sub>2</sub>. **ACS Synth. Biol.**, **8**(7), 1523–32 (2019).
118. GY Yew, KS Khoo, WY Chia, YC Ho, CL Law, HY Leong, PL Show. A novel lipids recovery strategy for biofuels generation on microalgae *Chlorella* cultivation with waste molasses. **Journal of Water Process Engineering**, **38**, 101665 (2020).
119. M Sakarika, M Kornaros. *Chlorella vulgaris* as a green bio-fuel factory: Comparison between biodiesel, biogas and combustible biomass production. **Bioresour. Technol.**, **273**, 237–43 (2019).
120. NS Vignesh, E Vimali, R Sangeetha, M Arumugam, B Ashokkumar, I Ganeshmoorthy, P Varalakshmi. Sustainable biofuel from microalgae: Application of lignocellulosic wastes and bio-iron nanoparticle for biodiesel production. **Fuel**, **278**, 118326 (2020).
121. KM Shaikh, P Kumar, AA Nesamma, MZ Abidin, PP Jutur. Hybrid genome assembly and functional annotation reveals insights on lipid biosynthesis of oleaginous native isolate *Parachlorella kessleri*, a potential industrial strain for production of biofuel precursors. **Algal Res.**, **52**, 102118 (2020).
122. A Drosos, K Boura, A Dima, IK Karabagias, PS Nigam, M Kanellaki, AA Koutinas. Consolidated bioprocessing of starch based on a bilayer cell factory without genetic modification of yeast. **Environ. Technol. Innov.**, **24**, 101844 (2021).
123. Hemansi, Himanshu, AK Patel, JK Saini, RR Singhania. Development of multiple inhibitor tolerant yeast via adaptive laboratory evolution for sustainable bioethanol production. **Bioresour. Technol.**, **344**(Pt B), 126247 (2022).