



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias de la Energía

Sistema de electrofermentación para la producción de bioetanol

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en
Ciencias de la Energía

Presenta:

LBT Iván Alejandro Gallegos Almanza

Dirigido por:

Dr. Aldo Amaro Reyes

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre de 2018



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química
Maestría en Ciencias de la Energía

Sistema de electrofermentación para la producción de bioetanol

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en
Ciencias de la Energía

Presenta:

LBT Iván Alejandro Gallegos Almanza

Dirigido por:

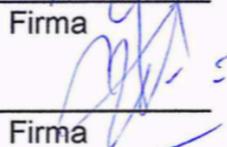
Dr. Aldo Amaro Reyes

Dr. Aldo Amaro Reyes
Director



Firma

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez
Asesor



Firma

Dr. Gonzalo Macías Bobadilla
Asesor



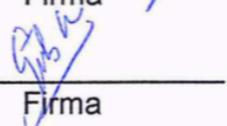
Firma

Dr. Carlos Regalado González
Asesor



Firma

Dra. Claudia Gutiérrez Antonio
Asesor



Firma



Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Querétaro, Qro.
Diciembre de 2018

RESUMEN

En tiempos recientes se ha observado cómo el gas, carbón e hidrocarburos han dejado de ser una opción energética viable, pues están directamente implicados en el calentamiento global. El uso irresponsable y la explotación de combustibles fósiles hace necesaria la inclusión de nuevas tecnologías, que apoyen la economía, la sociedad y el medio ambiente. En este contexto, el manejo de microorganismos para la producción de metabolitos de interés brinda beneficios, así como el aprovechamiento de residuos industriales para la producción de energías alternativas como los biocombustibles de segunda generación, caso específico del bioetanol. Recientemente técnicas de fermentación han logrado dirigir de manera más selectiva la producción de metabolitos primarios, a través de una corriente eléctrica que está en contacto directo con el fermento; a esta técnica se le ha definido como sistema de electrofermentación. La propuesta de este trabajo se centra en el aprovechamiento del sistema de fermentación electrostático para la producción de bioetanol usando cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, que serán sometidas a estímulos eléctricos con diferente intensidad de corriente mientras crecen en un medio de cultivo con sacarosa. Los mejores resultados se obtuvieron con un tratamiento de corriente eléctrica a 5 mA utilizando 2 electrodos de grafito con un área de 40 cm² a un volumen de fermentación de 100 mL. En dicho tratamiento se logró obtener un crecimiento reflejado en absorbancia de 1.3 veces mayor que el control a las 48 horas y una concentración 2 veces mayor de etanol que el control a las 12 horas de iniciado el tratamiento.

Palabras clave: biocombustibles, bioetanol, electrofermentación.

ABSTRACT

In recent years it has been observed how gas, coal and hydrocarbons have ceased to be a viable energy option, since they are directly involved in global warming. The irresponsible use and exploitation of fossil fuels makes necessary the inclusion of new technologies, which support the economy, society and the environment. In this context, the management of microorganisms for the production of metabolites of interest provides benefits, such as the use of industrial waste for the production of alternative energy like second generation biofuels, specific case the bioethanol. Recently fermentation techniques have achieved to manage more selectively the production of primary metabolites, through an electric current that is in direct contact with the fermentation mixture; this technique has been defined as an electrostatic fermentation system. The proposal of this work focuses on the use of the electrostatic fermentation system for the production of bioethanol using strains of *Saccharomyces cerevisiae*, which will be subjected to electrical stimuli with different current intensity and duration while growing in a culture medium with sucrose. The best results were obtained with an electric current treatment at 5 mA using 2 graphite electrodes with a total area of 40 cm² at a fermentation volume of 100 mL. In this treatment, it was possible to obtain a reflected growth in absorbance of 1.3 times greater than the control at 48 hours and a concentration 2 times higher than ethanol control 12 hours after the start of treatment.

Keywords: biofuels, bioethanol, electrofermentation.

DEDICATORIA

A mi madre Irma, a mi padre Daniel y a mis hermanos Alain y Andrea que siempre apoyaron a lo largo de este agridulce proceso.

A mi abuelita Pina, que sé estaría orgullosa de verme cumplir este objetivo.

A mi abuelito José, por enseñarme a ser humilde y a dar lo mejor de mí en todo compromiso.

A toda mi familia; primas, primos, tías y tíos que me dieron su apoyo, cariño y reconocimiento siempre.

A mí yo niño que siempre quiso ser científico.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Amaro, director de este trabajo de investigación, por brindarme el espacio de trabajo, su tiempo y su paciencia casi infinita. Al Dr. Gracida, al Dr. Bobadilla y al Dr. Regalado por aventurarse en esta pequeña y tramposa travesía.

A la Dra. Claudia por su ayuda siempre incondicional en los momentos difíciles.

Al Dr. Santos por apoyarme cuando las situaciones no pudieron ser menos favorecedoras.

Al Dr. Marcelino por enlistarse en el camino y apoyarnos con sus conocimientos.

Mi amiga Katy por su amistad y sus consejos en todos estos años.

Mi amiga Jan por recoger mis pedazos siempre que doy con la pared.

A todos los integrantes del laboratorio “el parquecito” que hicimos de nuestro espacio de trabajo un hogar con horario de 9:00 AM a 5:00 PM.

Mis compañeros y amigos de la maestría, Arturo, Dany, Karen, Don Dr. Jorge, Turbo y Cindy, por acompañarnos en el sufrimiento de las desveladas y las alegrías de nuestros méritos. También a Víctor, Ale y Gaby, exsoldados de esta guerra. Ojalá se encuentren bien en dondequiera que estén.

Al Dr. Sosa por su disposición con el equipos de IR y asesoramiento.

A los recursos que hicieron posible este proyecto, PRODEP-SEP y FOFI-UAQ.

A CONACYT por su apoyo a través de la beca No. 470890.

A la vida, que no se cansa de enseñarme que de las situaciones más difíciles aprendemos las lecciones más valiosas.

When you have eliminated all which is impossible,
then whatever remains, however improbable,
must be the truth.

Sir Arthur Conan Doyle (The case-book of Sherlock Holmes)

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Biocombustibles	4
1.1.1. Generaciones del bioetanol	5
1.1.2. Biocombustibles de segunda generación	7
1.2. Alcohol etílico	7
1.2.1. Etanol	7
1.2.2. Bioetanol	10
1.3. Fermentación	11
1.3.1. Levaduras	12
1.3.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.3.1.1.1. Rutas metabólicas de <i>Saccharomyces</i>	14
1.4. Sistemas de fermentación	15
1.4.1. Fermentación tradicional	15
1.4.2. Electrofermentación	16
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	21
4.1. Objetivo general	21
4.2. Objetivos particulares	21
5. METODOLOGÍA	22
5.1. Materia prima	22
5.2. Material biológico	22
5.3. Medio YPS	22
5.4. Medio de fermentación	22

5.5. Preinóculo	23
5.6. Inóculo	23
5.7. Construcción del bioreactor	23
5.8. Fermentación en lote	23
5.9. Fermentación en lote alimentado	24
5.11. Métodos analíticos	25
5.12. Tratamientos y unidad experimental	25
5.13. Análisis estadístico	26
6. RESULTADOS	28
6.1. Objetivo I. Construcción del sistema de electrofermentación	28
6.1.1. Biorreactor con electrodo de grafito con embobinado de cobre y voltaje aplicado (biorreactor I)	28
6.1.2. Biorreactor de 50 mL con electrodo de cobre, embobinado exterior de cobre y voltaje aplicado (biorreactor II)	37
6.1.3. Biorreactor de 100 mL con electrodo de cobre, embobinado exterior de cobre y voltaje aplicado (biorreactor III)	41
6.1.4. Biorreactor de electrodos de grafito y voltaje aplicado (biorreactor IV)	45
6.1.5. Sistema de electrofermentación con campo magnético aplicado de corriente directa (biorreactor V)	49
6.1.6. Sistema de electrofermentación con campo magnético aplicado de corriente alterna (biorreactor VI)	57
6.1.7. Biorreactor de electrodos de grafito y corriente aplicada (biorreactor VII)	61
6.1. Objetivo II. Evaluación del consumo de carbono y producción de etanol del sistema de electrofermentación	66
6.1. Objetivo III. Evaluación del flujo alimentación sobre el sistema de electrofermentación	74
7. DISCUSIÓN	77

8. CONCLUSIONES	81
9. REFERENCIAS	83

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Generaciones del bioetanol y sus características	6
Cuadro 2. Propiedades fisicoquímicas del etanol	9
Cuadro 3. Comparativa de las características de la gasolina y el etanol	10
Cuadro 4. Diseño experimental unifactorial	27

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tendencia de las emisiones de CO ₂ por combustibles fósiles.	2
Figura 2. Diferentes tipos de transporte y sus emisiones de CO ₂ .	3
Figura 3. Diferentes formas de representar el etanol o alcohol etílico.	8
Figura 4. Producción global de etanol.	12
Figura 5. Micrografía electrónica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	14
Figura 6. Principales rutas metabólicas del carbono en <i>Saccharomyces</i> .	16
Figura 7. Diseño del sistema de fermentación electrostático.	25
Figura 8. Ilustración de la fermentación por lote alimentado.	26
Figura 9. Ilustración del modo operacional del PLC.	27
Figura 10. Diseño del biorreactor de campo electrostático - biorreactor I.	29
Figura 11. Electrodo de carbono recubierto por alambre magneto.	29
Figura 12. Absorbancias en el tratamiento de 15 V - biorreactor I.	30
Figura 13. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h a 15 V - biorreactor I.	30
Figura 14. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 15 V - biorreactor I.	31
Figura 15. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 15 V - biorreactor I.	31
Figura 16. Absorbancia en el tratamiento de 20 V - biorreactor I.	32
Figura 17. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h a 20 V - biorreactor I.	33
Figura 18. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 a 20 V - biorreactor I.	33
Figura 19. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 a 20 V - biorreactor I.	34

Figura 20. Absorbancia en el tratamiento de 25 V - biorreactor I.	35
Figura 21. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h a 25 V - biorreactor I.	35
Figura 22. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 25 V - biorreactor I.	36
Figura 23. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 25 V - biorreactor I.	36
Figura 24. Diseño del biorreactor de campo electrostático - biorreactor II.	37
Figura 25. Absorbancia en el tratamiento a 15 V y 30 V - biorreactor II.	38
Figura 26. Absorbancias en tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor II.	38
Figura 27. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor II.	39
Figura 28. Absorbancias en tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor II.	40
Figura 29. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor II.	40
Figura 30. Diseño del biorreactor de campo electrostático - biorreactor III.	41
Figura 31. Absorbancia en el tratamiento a 15 V y 30 V - biorreactor III.	42
Figura 32. Absorbancias en tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor III.	42
Figura 33. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor III.	43
Figura 34. Absorbancias en tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor III.	44
Figura 35. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor III.	44
Figura 36. Diseño del biorreactor de voltaje aplicado - biorreactor IV.	45
Figura 37. Absorbancia en el tratamiento a 0.8 V y 1 V - biorreactor IV.	46
Figura 38. Absorbancias en tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor IV.	46
Figura 39. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor IV.	47

Figura 40. Absorbancias en tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor IV.	48
Figura 41. Prueba de Tukey para absorbancia en tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor IV.	48
Figura 42. Diseño del biorreactor de campo magnético aplicado - biorreactor V.	49
Figura 43. Absorbancia en el tratamiento a 5 V - biorreactor V.	50
Figura 44. Absorbancias en de tiempo 24 h y tiempo 48 h a 5 V - biorreactor V.	51
Figura 45. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 5 V - biorreactor V.	51
Figura 46. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 5 V - biorreactor V.	52
Figura 47. Absorbancia en el tratamiento a 15 V - biorreactor V.	53
Figura 48. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h a 15 V - biorreactor V.	53
Figura 49. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 15 V - biorreactor V.	54
Figura 50. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 15 V - biorreactor V.	54
Figura 51. Absorbancia en el tratamiento a 25 V - biorreactor V.	55
Figura 52. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h a 25 V - biorreactor V.	56
Figura 53. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 25 V - biorreactor V.	56
Figura 54. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 25 V - biorreactor V.	57
Figura 55. Diseño del biorreactor de campo magnético aplicado - biorreactor VI.	58
Figura 56. Absorbancia en el tratamiento con 130 μ Teslas - biorreactor VI.	59

Figura 57. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h con 130 μ Teslas - biorreactor VI.	59
Figura 58. Prueba de Tukey al tiempo 24 h con 130 μ Teslas - biorreactor VI.	60
Figura 59. Prueba de Tukey al tiempo 48 h con 130 μ Teslas - biorreactor VI.	60
Figura 60. Diseño del biorreactor de corriente eléctrica aplicada - biorreactor VII.	61
Figura 61. Absorbancia en el tratamiento con corriente eléctrica - biorreactor VII.	62
Figura 62. Absorbancias en tiempo 24 h con corriente eléctrica - biorreactor VII.	63
Figura 63. Prueba de Tukey al tiempo 24 h con corriente eléctrica - biorreactor VII.	63
Figura 64. Absorbancias en tiempo 48 h con corriente eléctrica - biorreactor VII.	64
Figura 65. Prueba de Tukey al tiempo 48 h con corriente eléctrica - biorreactor VII.	65
Figura 66. Consumo de carbono con corriente eléctrica - biorreactor VII.	66
Figura 67. Consumo de carbono al tiempo 24 h con corriente eléctrica - biorreactor VII.	67
Figura 68. Prueba de Tukey para azúcares al tiempo 24 h - biorreactor VII.	67
Figura 69. Consumo de carbono al tiempo 48 h con corriente eléctrica - biorreactor VII.	68
Figura 70. Prueba de Tukey para azúcares al tiempo 48 h - biorreactor VII.	69
Figura 71. Producción de etanol por IR al tiempo 12 h - biorreactor VII.	70
Figura 72. Producción de etanol por IR al tiempo 24 h - biorreactor VII.	70
Figura 73. Producción de etanol por IR al tiempo 36 h - biorreactor VII.	71

Figura 74. Producción de etanol por IR al tiempo 48 h - biorreactor VII.	71
Figura 75. Producción de bioetanol al tiempo 12 - biorreactor VII.	72
Figura 76. Prueba de Tukey para bioetanol al tiempo 12 h - biorreactor VII.	73
Figura 77. Absorbancia con corriente eléctrica - biorreactor VII con LA.	75
Figura 78. Absorbancias en tiempo 24 h y 48 h - biorreactor VII con LA.	75
Figura 79. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h - biorreactor VII con LA.	76
Figura 80. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h - biorreactor VII con LA.	76

1. ANTECEDENTES

La crisis energética y la contaminación ambiental son dos grandes retos medioambientales a los que se enfrenta actualmente el mundo. Por su parte, la energía es un factor fundamental para cada sector de la economía moderna, la cual es obtenida principalmente de combustibles fósiles; alrededor del 80 % de la oferta total de energía en el mundo depende de esta fuente (Potumarthi *et al.*, 2014). Productos derivados del petróleo crudo como la gasolina y el diésel son los principales combustibles fósiles utilizados para la generación de energía; dichos combustibles se emplean en el sector transporte, comercial, doméstico, industrial y agrícola (Liew *et al.*, 2014).

Los climatólogos han observado que las concentraciones de dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera ha aumentado significativamente durante el siglo pasado; en comparación con la era preindustrial, alrededor de 280 partes por millón (ppm) de acuerdo con la Agencia Internacional de Energía (2015). La concentración de CO₂ de 2014 (397 ppm) fue aproximadamente 40 % más alta que a mediados de los años 1800, con un crecimiento promedio de 2 ppm/año en los últimos diez años (NOAA/ESRL, 2015). También se han producido aumentos significativos en los niveles de metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O). En 2013, las emisiones mundiales de dióxido de carbono alcanzaron 32.2 GtCO₂, un aumento del 2.2 % con respecto a los niveles de 2012. Este crecimiento fue superior al de 2012 (0.6 %), pero inferior al promedio anual desde 2000 (2.5 %). Este crecimiento puede verse en la Figura 1 (IEA, 2015) que muestra la creciente demanda mundial de energía a partir de combustibles fósiles, la cual juega un papel clave en la tendencia al alza de las emisiones de CO₂. Desde la Revolución Industrial, las emisiones anuales de CO₂ procedentes de la quema de combustibles han aumentado dramáticamente de cerca de cero a más de 32 GtCO₂ en 2013 (CDIAC, 2014).

Otra evidencia de la futura crisis ambiental y energética son las emisiones globales de CO₂ por combustibles no renovables. La Figura 2 ilustra los diferentes tipos de transporte con sus respectivas emisiones de CO₂, donde puede verse que en transporte terrestre fueron de 5.5 Gigatoneladas en 2013, un 68 % más que en 1990. Añadiendo la aviación y la navegación, tanto internacionales como nacionales, las emisiones ascienden a cerca de 7.2 Gigatoneladas en 2013 (IEA, 2015).

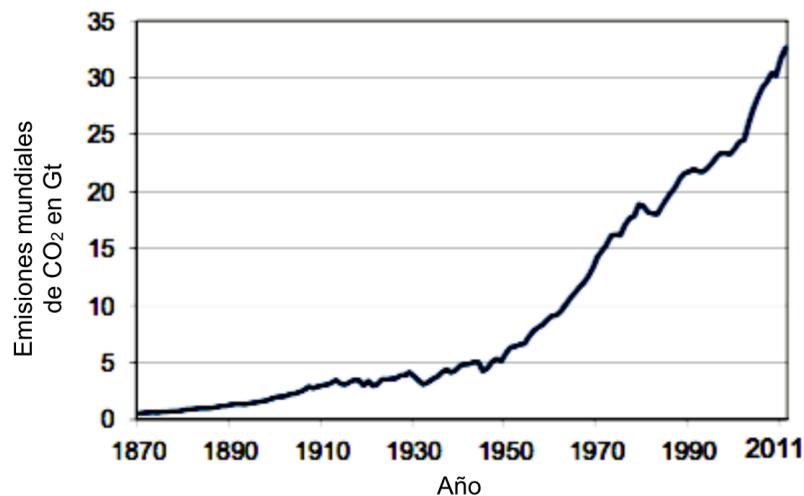


Figura 1. Tendencia de las emisiones de CO₂ por combustibles fósiles.

Si bien la producción mundial de combustibles fósiles, como los derivados del petróleo crudo, ha venido aumentando, las tendencias actuales apuntan a que estas fuentes se tornarán escasas y costosas; en la medida en que aumenta la población mundial y que las economías se industrializan (IBRD, 2015). Diversos autores concuerdan al mencionar que estas fuentes han sufrido un agotamiento progresivo, debido a la creciente demanda de energía; además de que han sido los mayores contribuyentes en las emisiones de gases invernadero (Maltsoğlu *et al.*, 2015; Thangavelu *et al.*, 2016; Lopez-Hidalgo *et al.*, 2017)

Entre las alternativas de energía que han sido estudiadas para la sustitución de combustibles fósiles están el hidrógeno, el gas natural, el gas de síntesis y los biocombustibles; siendo estos últimos la fuente de energía más amigable con el

medio ambiente, ya que provienen de fuentes renovables, son biodegradables y su baja emisión de gases es aceptable (Gaurav *et al.*, 2017; Rastogi y Shrivastava, 2017). Dentro de los biocombustibles, el etanol como combustible renovable, y favorable para el medio ambiente, ha atraído interés significativo. En años recientes la producción de etanol en los Estados Unidos ha aumentado de 4.89 mil millones de galones en 2006 a 14 mil millones de galones en 2011, lo que indica un aumento de casi tres veces (RFA, 2016). Aumentos similares se han producido en otros países como China e India (Mathew *et al.*, 2015). Sin embargo, Brasil ha sido el pionero y líder en el despliegue del etanol como energía renovable proveniente de la caña de azúcar; pues desde 1979 tuvo la introducción del motor a etanol y hasta 1985 90 % de los automóviles nuevos se fabricaban esta tecnología (Isabella, 2017). Para 2014 Brasil tuvo una producción de 7.2 mil millones de galones (Gonçalves, 2015).

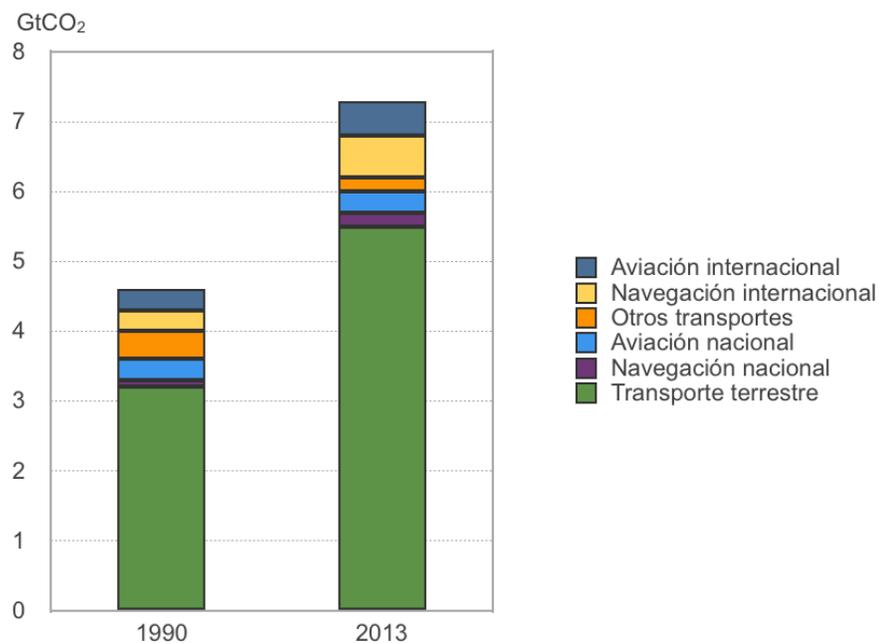


Figura 2. Diferentes tipos de transporte y sus emisiones de CO₂.

1.1. Biocombustibles

Biocombustibles es un término utilizado para describir la biomasa que fue procesada para ser utilizada como combustible. Es comúnmente aplicado a los biocombustibles líquidos para el transporte, pero también puede referirse a los combustibles gaseosos y sólidos (como pellets y briquetas). Los biocombustibles se producen a partir de recursos vegetales renovables que reciclan el dióxido de carbono generado cuando se queman los biocombustibles (Saladini *et al.*, 2016). Los biocombustibles tienen el potencial de reemplazar los actuales combustibles derivados del petróleo para el transporte, en donde quedan incluidos el biodiésel y bioetanol (Nagarajan, 2017).

En este contexto, los biocombustibles líquidos, biodiésel y bioetanol se consideran opciones prometedoras debido a varias ventajas como la sostenibilidad, el cuidado con el medio ambiente y una buena adaptabilidad para ser utilizados en motores de combustión existentes en mezclas con gasolina o diésel de petróleo (Ashokkumar, 2017).

Enfocando el uso de bioetanol como combustible se ha observado una reducción de las emisiones nocivas de monóxido de carbono, reducción de las partículas resultantes de la combustión y en los óxidos nitrosos (Baeyens, 2015). Un estudio realizado por el Laboratorio Nacional Argonne (EE.UU.) comparó las emisiones de gases de efecto invernadero de diferentes combinaciones de motores y combustibles. Las mezclas de etanol con la gasolina mostraron reducciones de 17 % cuando se utilizaba una la mezcla de etanol convencional E85 (85 % etanol y 15 % gasolina en volumen), mientras que se observó una reducción de las emisiones de 64 % cuando se utilizó la mezcla E85 de etanol proveniente de materia lignocelulósica (Baeyens, 2015).

1.1.1. Generaciones del bioetanol

A diferencia de la producción de combustibles fósiles, la producción de bioetanol es sustentable, y la biomasa de la que es obtenido más ampliamente distribuida. Actualmente, existen tres generaciones de bioetanol que han florecido basándose en sus diferentes materias primas (Jambo, 2016).

El bioetanol de primera generación se obtiene de la fermentación de la glucosa contenida en los cultivos de almidón y azúcar utilizados con fines alimentarios. Estados Unidos y Brasil son los principales productores de bioetanol en el mundo a partir de maíz y caña de azúcar, respectivamente; mientras que la patata, el trigo y la remolacha azucarera son la materia prima común para la producción de bioetanol en Europa. Sin embargo, el principal inconveniente del bioetanol de primera generación es la competencia con el suministro de alimentos, que podría afectar a la población mundial (Arifin *et al.*, 2014).

El bioetanol de segunda generación surgió para superar la rivalidad "alimento versus combustible" que veía enfrentada el bioetanol de primera generación. El bioetanol de segunda generación, también denominado biocombustible avanzado, se produce mediante procesos innovadores que utilizan principalmente materia prima lignocelulósica y residuos forestales agrícolas. Las ventajas de estas materias primas son la facilidad de disponibilidad, que no compiten con los alimentos y presentan un impacto mucho menor en el medio ambiente (Mohr y Raman, 2013).

El bioetanol de tercera generación se centra en el uso de organismos acuáticos como las algas. Las algas representan una materia prima alternativa prometedora, debido a su alto contenido en lípidos e hidratos de carbono; tienen una alta conversión de protones, y sus métodos de cultivo son sencillos en una amplia variedad de ambientes acuáticos, su uso de tierra es relativamente bajo y tienen una alta absorción de dióxido de carbono (CO₂) (Singh y Olsen, 2011). El cuello de

botella que enfrenta esta generación de bioetanol es la huella hídrica que implica su cultivo (Yang *et al.*, 2011).

A continuación se muestra el Cuadro 1 que resume las generaciones de bioetanol con sus principales características. Del Cuadro 1 se observa que el bioetanol de segunda generación con las actuales tecnologías tiene un rendimiento medio mientras que la tercera un rendimiento alto. En el impacto al ambiente puede observarse cómo la segunda y tercera generación de bioetanol aportan una alta contribución a la mitigación de CO₂, debido a su aprovechamiento como residuo y la incorporación de CO₂ algal, respectivamente. Otra importante comparación a resaltar son sus principales desventajas; para la segunda generación son las estructuras recalcitrantes que están relacionadas con el contenido de lignina de la biomasa lignocelulósica; para el caso de la tercera generación son las inversiones limitadas y las dificultades que enfrentan para el diseño del proceso, como lo es cosecha de las algas.

Cuadro 1. Generaciones del bioetanol y sus características.

Comparación	Primera Generación	Segunda Generación	Tercera Generación
Materia prima	Cultivos alimenticios	Cultivos no alimenticios (residuos lignocelulósicos y forestales)	Biomasa algal
Suelo para cultivo	Tierras para cultivo	Tierras para cultivo y tierras marginadas	Agua de mar, agua dulce y agua de desecho
Tecnologías de conversión	Extracción de azúcar, fermentación, destilación	Pretratamiento, hidrólisis, fermentación, destilación	Hidrólisis, fermentación, destilación
Rendimiento de bioetanol	Bajo	Medio	Alto
Impacto al medio ambiente	Baja contribución a la mitigación del CO ₂	Alta contribución a la mitigación del CO ₂	Alta contribución a la mitigación del CO ₂
Principales ventajas	Proceso de conversión relativamente simple	No hay competencia por los recursos alimentarios	Alta tasa de crecimiento
Principales desventajas	Debate "Alimentos vs combustible"	Estructuras recalcitrantes de la materia prima	Inversiones limitadas y dificultades en el diseño del proceso Huella hídrica

1.1.2. Biocombustibles de segunda generación

La biomasa lignocelulósica se puede dividir en varios grupos, como cultivos energéticos (hierbas perennes y otros cultivos energéticos dedicados), plantas acuáticas (como el jacinto de agua), materiales forestales (madera blanda, madera dura, aserrín, y residuos de corteza y de la poda de árboles y arbustos), residuos agrícolas (paja de cereales, tallos y bagazo), y la porción orgánica de los residuos sólidos municipales. De esta forma, la biomasa lignocelulósica evidencia ser una prometedora y abundante materia prima que puede utilizarse para producir bioetanol; sin necesidad del uso de tierra para cultivos o la interferencia en la producción de alimentos. La producción mundial de biomasa vegetal es de aproximadamente 200×10^9 t/año, donde se pueden utilizar cerca de $8 \times 10^9 - 20 \times 10^9$ t para la producción de biocombustibles (Zabed, 2017).

Si se consideran los desechos agroindustriales y de la confitería como una materia prima de desecho puede tomarse ventaja de su falta de competencia como alimento; y a la vez como una biomasa previamente procesada pudiendo ser directamente fermentada, como es el caso de la sacarosa o azúcar de barredura de diversas empresas. Estas materias primas se convierten en un desperdicio para la empresa, pero pueden emplearse para la producción de productos con mayor valor agregado como el bioetanol.

1.2. Alcohol etílico

1.2.1. Etanol

Los alcoholes, y entre ellos el etanol, son compuestos muy frecuentes en la naturaleza, útiles en la industria y la vida diaria que pueden ser sintetizados a partir de una gran variedad de métodos. La Figura 3 muestra sus diferentes formas de representación, donde puede apreciarse el grupo hidroxilo que denota a estas moléculas. La palabra alcohol es uno de los términos más antiguos de la

química, deriva del término árabe *al-kuhl*, originalmente significaba “el poder” y más tarde “la esencia”. El etanol, destilado a partir del vino, fue considerado como “la esencia del vino” (Wade, 2004).

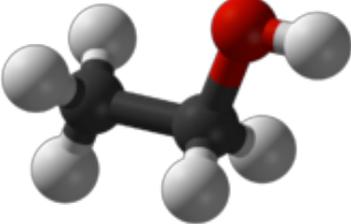
C_2H_5OH	CH_3-CH_2-OH
Fórmula condensada	Fórmula semidesarrollada
$ \begin{array}{c} H & H \\ & \\ H-C & -C-OH \\ & \\ H & H \end{array} $	
Fórmula desarrollada	Estructura tridimensional

Figura 3. Diferentes formas de representar el etanol o alcohol etílico.

El etanol o alcohol etílico (CH_3CH_2OH) es un líquido incoloro, volátil e inflamable, con un peso molecular de 46.07 g y una densidad de 789 kg/m³ a 294 K (la Figura 3 muestra las diferentes formas de representar la fórmula del etanol). El etanol presenta una combustión con una flama azul sin humo que generalmente es invisible a la luz. Las mezclas de etanol y agua a presión atmosférica forman un azeótropo de ~ 89 % en moles de etanol a una temperatura de 351 K.

Las principales propiedades fisicoquímicas del etanol se presentan en el Cuadro 2. La temperatura de autoignición es la temperatura más baja a la que el etanol se encenderá espontáneamente en una atmósfera normal sin una fuente externa de ignición, como una llama o una chispa. El punto de inflamabilidad es una de las propiedades físicas más importantes utilizadas para determinar el potencial de riesgo de incendio y explosión de los líquidos, así como su almacenamiento y transporte. Un valor de punto de inflamación bajo indica que un líquido dado es

más peligroso en relación con un líquido diferente con un valor más alto (Baeyens, 2015).

Cuadro 2. Propiedades fisicoquímicas del etanol.

Propiedad	Valor
Punto de ebullición	351.37 K
Punto de inflamabilidad	289.6 K
Temperatura de autoignición	698 K
Calor de combustión	26.800 kJ/kg

Sin importar si proviene de biomasa o procesos tanto petroquímicos como carboquímicos el etanol es un combustible; es decir, libera significativas cantidades de calor al quemarse. Sin embargo, el etanol presenta algunas diferencias importantes con relación a los combustibles convencionales derivados de petróleo. La principal es el elevado contenido de oxígeno, que constituye cerca del 35 % en masa del etanol, comparada con la ausencia de éste en la gasolina. Esta característica posibilita una combustión más limpia y un mejor desempeño de los motores; lo que contribuye a reducir las emisiones contaminantes aún en mezclas con gasolina. El etanol puede ser utilizado como combustible en motores de combustión interna con ignición a chispa (ciclo Otto) de dos maneras básicamente: 1) en mezclas de gasolina y etanol anhidro; o 2) como etanol puro. El Cuadro 3 presenta una comparativa de las principales características del etanol y de la gasolina, donde puede verse que el poder calórico inferior del etanol es poco más de tres quintas partes al de la gasolina; sin embargo, los octanajes son más altos lo que reduce las combustiones tempranas por compresión, favoreciendo el movimiento coordinado del cigüeñal y el rendimiento del combustible (BNDES y CGEE, 2008).

Cuadro 3. Comparativa de las características de la gasolina y el etanol

Parámetro	Unidad	Gasolina	Etanol
Poder calorífico inferior	kJ/kg	43.5	28.225
Densidad	kg/litro	0.71-0.78	0.792
Octanaje RON (Research Octane Number)	—	90 - 100	102 - 130
Octanaje MON (Motor Octane Number)	—	80 - 92	89 - 96
Calor latente de vaporización	kJ/kg	330 - 400	842 - 930
Relación aire/combustible estequiométrica	—	14.5	9.0
Presión de vapor	kPa	40-65	15 - 17
Temperatura de ignición	°C	220	420
Solubilidad en agua	% Vol	~ 0	100

Entre las características del etanol que lo definen como un combustible sostenible pueden mencionarse: la reducción en el consumo de los combustibles fósiles, en los gases de efecto invernadero, y en las emisiones tóxicas de gases de escape. Para un motor de combustión interna encendido por chispa, la mezcla del etanol como aditivo mejora en el octanaje la capacidad antidetonante, reduce las emisiones de monóxido de carbono (CO) y de hidrocarburos no quemados (Yusri, 2017).

1.2.2. Bioetanol

El bioetanol es producido a través de la fermentación anaerobia de diferentes fuentes de carbohidratos (como la celulosa y la hemicelulosa), siendo las levaduras quienes llevan a cabo la conversión metabólica de éstos a bioetanol.

El bioetanol es un combustible líquido renovable y sostenible, que se espera tenga un futuro prometedor para hacer frente a la crisis energética global de hoy y al empeoramiento de la calidad del medio ambiente. En 2011, la producción mundial de bioetanol se declaró por encima de los 100,000 millones de litros, y se espera

que aumente hasta un 3-7 % anual en el período 2012-2015; lo que demuestra que el bioetanol ya está siendo visto como una fuente de energía alternativa preferible para sustituir a la gasolina (OECD/FAO, 2016).

Muchos países como Brasil, Estados Unidos, China, Canadá y varios miembros de la Unión Europea ya han proclamado compromisos con los programas de bioetanol, como intentos para reducir la dependencia de los combustibles fósiles ; donde Brasil y los Estados Unidos han mostrado los mayores compromisos hasta el momento. En respuesta a la demanda actual, la producción mundial de bioetanol se ha incrementado con el tiempo, como se muestra en la Figura 4a. Estados Unidos produce la mayor cantidad de etanol, que se estima es más de la mitad del total del etanol mundial producido en 2015. La producción total de etanol en los Estados Unidos ha aumentado dramáticamente de 175 millones de galones en 1980 a 14,810 millones de galones en 2015, como se muestra en la Figura 4b (Zabed, 2017).

1.3. Fermentación

La fermentación ha jugado un papel fundamental en la producción, transformación y conservación de alimentos a través de la historia de la humanidad. Durante siglos, los alimentos han sido fermentados para facilitar su almacenamiento, incrementar su estabilidad y modificar sus propiedades organolépticas (Soccol *et al.*, 2013). La fermentación es la operación unitaria en la que el etanol es producido directamente a partir de la actividad metabólica del agente de fermentación. Al hidrolizado, en este proceso, se introduce un agente de fermentación específico (levadura o bacterias), que mejor se acople con la idoneidad de la digestión para los respectivos compuestos de azúcar (Aditiya *et al.*, 2016).

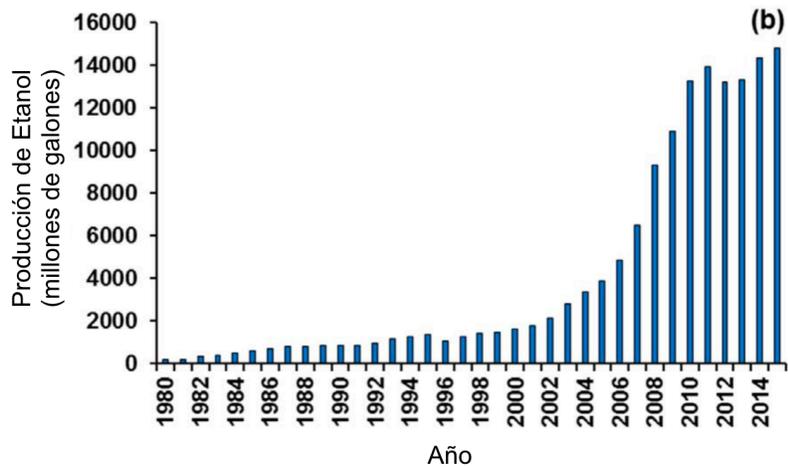
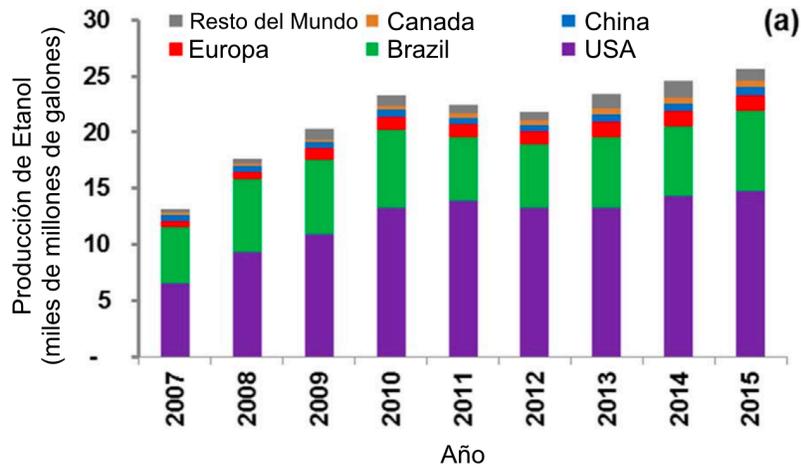


Figura 4. Producción global de etanol

(a) Producción global de etanol por país o región durante los años 2007–2015; (b) Producción de etanol por los Estados Unidos durante los años 1980–2015 (RFA, 2016).

1.3.1. Levaduras

Las levaduras son microorganismos eucarióticos que fermentan una variedad de azúcares de diferentes fuentes, teniendo como productos finales CO_2 y alcohol. Se clasifican en el reino Fungi, con 1500 especies descritas actualmente (alrededor del 1 % de todas las especies de hongos descritas). La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por mitosis, más a menudo por un proceso de

división asimétrica llamado gemación o brotación (Poughon, 2017). Las células de las levaduras son mucho más grandes que las bacterias, y pueden distinguirse de ellas no solamente por su tamaño sino también por poseer sistemas membranosos intracitoplasmáticos así como núcleo. Algunas levaduras poseen reproducción sexual por conjugación en la que se fusionan dos células. La célula resultante es un cigoto verdadero, y de él emergen esporas sexuales por reducción meiótica. Las levaduras prosperan típicamente en hábitat con azúcares, tales como frutos, flores y cortezas de árboles. Muchos de estos microorganismos viven en simbiosis con animales incluido el hombre. La levadura más conocida es *Saccharomyces cerevisiae* (Madigan, 2004).

1.3.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es una levadura ampliamente utilizada para producir etanol y CO₂, encontrada en varios materiales ricos en azúcar como zumos de fruta y néctar; esta levadura puede llevar a cabo dos tipos opuestos de metabolismo quimiorganotrófico: la fermentación y la respiración. Cuando el oxígeno está presente, las levaduras crecen eficazmente sobre el azúcar formando biomasa y CO₂. Sin embargo, en ausencia de oxígeno las levaduras cambian a un metabolismo anaeróbico que origina menor cantidad de biomasa celular, pero cantidades notables de etanol (Madigan, 2004).

Saccharomyces cerevisiae es el organismo más ampliamente utilizado para la producción de etanol a partir de azúcares en la industria; esto gracias a las altas tasas de crecimiento y producción de etanol en condiciones anaeróbicas, así como su tolerancia a una alta concentración de etanol y pHs bajos (Rosanov, 2015). Una micrografía electrónica de *Saccharomyces cerevisiae* se muestra en la Figura 5 donde puede observarse una morfología esférica o elipsoidal con dimensiones aproximadas de 8 x 7 µm, dependiendo de la cepa y el medio de crecimiento. La mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* son capaces de producir niveles de alcohol hasta el 16 % en volumen (Sharma, 2017).

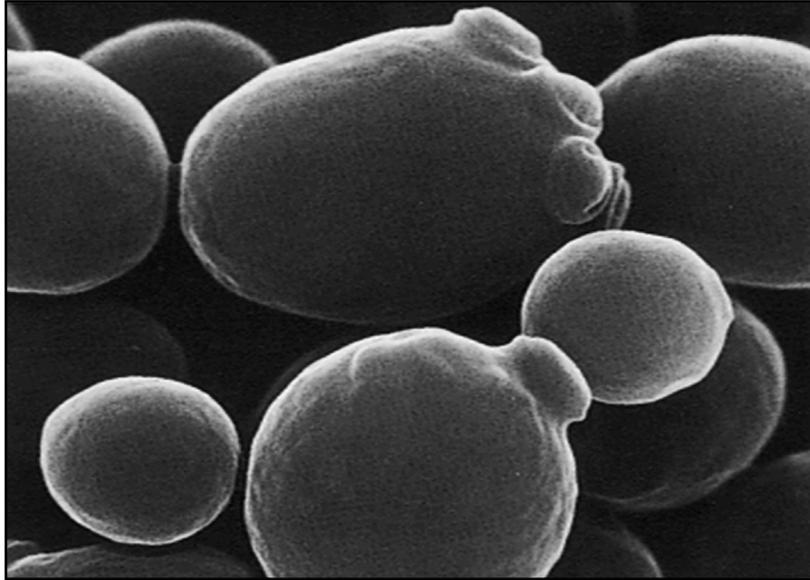


Figura 5. Micrografía electrónica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Por lo anterior esta levadura es uno de los microorganismos más utilizados para la producción de biocombustibles, debido a sus altos flujos de carbono en sus vías metabólicas y por su maleabilidad genética (Wei *et al.*, 2015).

1.3.1.1.1. Rutas metabólicas de *Saccharomyces*

Las principales rutas del metabolismo del carbono en *Saccharomyces* se representan en la Figura 6. Las rutas operacionales dependerán del sustrato disponible y de las condiciones de crecimiento. La disponibilidad de oxígeno desempeña un papel crítico en el metabolismo, ya que se requiere oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones durante la respiración, pero teniendo un papel diferente durante altas concentraciones de azúcar, en fermentaciones relativamente anaerobias (Boulton *et al.*, 1999).

1.4. Sistemas de fermentación

La fermentación puede ser llevada a cabo en lote, lote alimentado y de modo continuo. La fermentación por lote es un sistema de cultivo cerrado. La biomasa y el sustrato se iniciales se conservan durante toda la fermentación; es decir no se retira o añade medio al biorreactor en el tiempo que se realiza la fermentación. La principal desventaja de este modo de fermentación es la inhibición por sustrato que afecta el crecimiento de la levadura. La otra modalidad de fermentación es por lote alimentado, que se inicia como una fermentación por lote pero con una cantidad inicial de biomasa y sustrato menores; posteriormente se alimenta con medio, a intervalos o de forma continua, una vez el biorreactor haya consumido la mayor parte del sustrato inicial. Este proceso puede aumentar el contenido total de sustrato en el biorreactor mientras se mantiene una baja concentración de sustrato durante la fermentación para reducir los efectos negativos de la presión osmótica sobre la levadura. Las ventajas de este procedimiento incluyen la reducción de la inhibición del sustrato, mayor productividad, tiempos menores de fermentación y una reducción de los efectos tóxicos de los componentes del medio, que están presentes a altas concentraciones (Phukoetphim, 2017).

1.4.1. Fermentación tradicional

Una fermentación tradicional suele realizarse en un rango de temperatura de 32–34 °C con una concentración inicial de glucosa inferior a 180 g/L; y produce una concentración máxima de etanol del 7–8 % (v/v), concentración que se limita principalmente por el estrés producido a la levadura por el etanol. Para lograr un mayor rendimiento de etanol se ha demostrado que la fermentación de alta gravedad (HG por sus siglas en inglés), con una alta concentración inicial de glucosa en un rango de 180–220 g/L, puede llegar a producir una concentración máxima de etanol del 10–12 % (v/v) (Mathew *et al.*, 2015). En ambos casos el tiempo requerido para llevar a cabo tanto una fermentación tradicional como una

de alta gravedad para producir su concentración máxima de etanol es usualmente 50 a 70 horas (Bai, 2008).

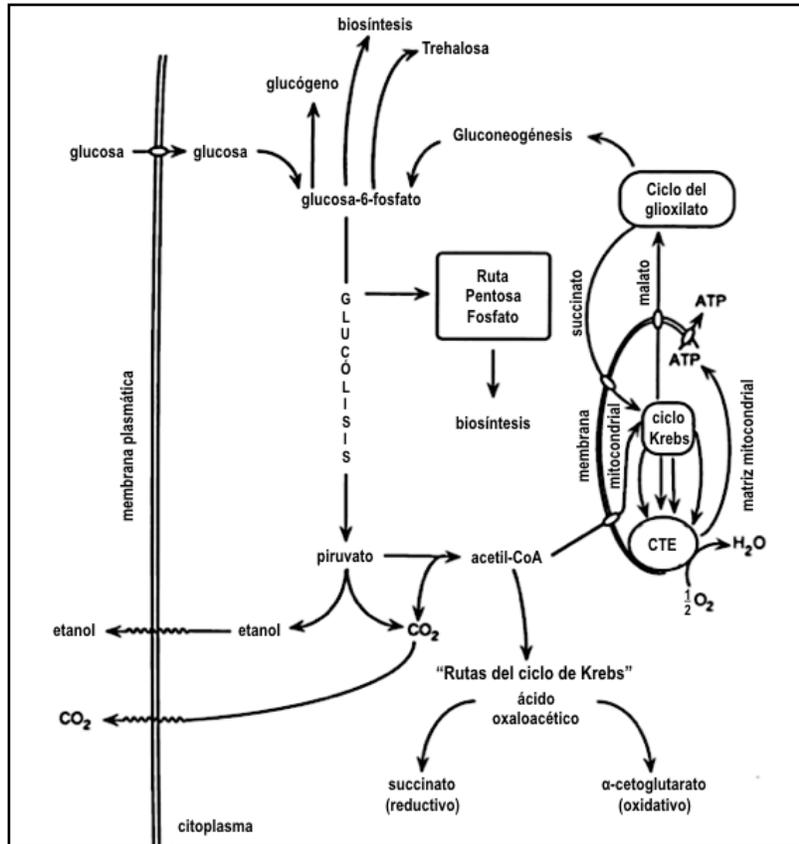


Figura 6. Principales rutas metabólicas del carbono en *Saccharomyces*.

1.4.2. Electrofermentación

Tomando en consideración que los tiempos de fermentación convencionales son largos en un rango de 50 a 70 horas y que la producción más alta de etanol obtenida a través de concentraciones de sustrato elevadas de hasta 220 g/L hace necesaria la inclusión de nuevos sistemas de fermentación con una productividad más elevada como la electrofermentación o fermentación electrostática; en la cual un campo eléctrico fluye en el medio de fermentación y modifica el metabolismo microbiano de una manera reductiva u oxidativa. Las ventajas de este sistema incluyen la producción de metabolitos de manera más selectiva, aumento en la

eficiencia del carbono, disminución en el uso de reactivos para equilibrio redox o control del pH, aumento del crecimiento microbiano y un mejoramiento en la recuperación del producto (Schievano *et al.*, 2016). Este sistema se basa en el principio del equilibrio metabólico electroquímico, en el cual todos los organismos necesitan un donador y aceptor de electrones para mantener su metabolismo. Una alternativa al proceso biológico es proveer o sustraer electrones al metabolismo microbiano a través de medios electroquímicos de una fuente externa (Rabaey y Rozendal, 2010).

Los microorganismos capaces de usar compuestos inorgánicos como donadores/ aceptores de electrones son denominados litótrofos; que dependiendo de la fuente de carbono pueden ser litheterótrofos utilizando compuestos orgánicos o litoautótrofos utilizando el CO₂ atmosférico. Estos organismos han demostrado tener la particular capacidad de usar conductores sólidos como donadores o aceptores de electrones (Lovley, 2011). Este efecto puede lograrse directamente a través de la transferencia extracelular de electrones (EET por sus siglas en inglés) y membranas transportadoras, nanocables, citocromos, oxidoreductasas de NADH-ubiquinona, hidrogenasas y otras enzimas de ancladas a membrana (Reguera, 2005).

En una electrofermentación que comprende una fermentación de un sustrato rico en energía, tal como un carbohidrato o un alcohol, los electrodos proporcionan un donador o aceptor de electrones. Cuando el producto final está más oxidado que el sustrato (por ejemplo, etanol a partir de glicerol), un electrodo que aplica el potencial de trabajo funciona como un ánodo y se usa para disipar el exceso de electrones. Por el contrario, para un producto final reducido (por ejemplo, butanol a partir de glucosa), el electrodo suministra electrones como un cátodo (Moscoviz *et al.*, 2016).

Si bien los mecanismos subyacentes en la fermentación electrostática no se encuentran bien descritos, debido a la temprana etapa de investigación en este

campo, se sabe que algunos mecanismos básicos se encuentran involucrados; por ejemplo, la transferencia de electrones hacia el ánodo para la conversión directa del sustrato en producto, la generación de NADH por vías celulares compensatorias cuando la disipación de electrones en el ánodo tiende a disminuir la relación NADH / NAD⁺. Cuando hay interacción de dos microorganismos, uno fermentativo y uno electroactivo, el fermentativo consume el sustrato y el electroactivo actúa como mediador entre el microorganismo fermentativo y el ánodo a través de mecanismos de transferencia de electrones interespecies (Choi y Sang, 2016).

A lo anterior se puede también añadir que la corriente eléctrica sirve no sólo para sostener la reacción de fermentación, ya que se ha visto que pequeñas densidades de corriente pueden afectar al potencial oxido-reductor extracelular e intracelular; y por lo tanto a la regulación biológica global, a través de cambios en el balance de NADH / NAD⁺, que pueden afectar significativamente el espectro de productos finales de fermentación (Lui *et. al.*, 2013)

1.5. Destilación

Entre las operaciones unitarias para la separación del etanol del medio de fermentación pueden encontrarse muchas pero la más ampliamente estudiada es la destilación. La operación unitaria de destilación es un método que se usa para separar los componentes de una solución líquida, el cual depende de la distribución de estos componentes entre una fase de vapor y una fase líquida. Los componentes están presentes en las dos fases. La fase de vapor se origina de la fase líquida por vaporización en el punto de ebullición. El requisito básico para separar los componentes por destilación consiste en que la composición del vapor sea diferente de la composición del líquido con el cual está en equilibrio en el punto de ebullición de este último. La destilación se basa en soluciones en las que todos los componentes son bastantes volátiles, como soluciones etanol-agua, en las que ambos componentes también están en fase de vapor (Geankoplis, 2006).

El bioetanol, que es producido por la fermentación de la biomasa, es obtenido en una solución acuosa de aproximadamente 10 % en peso generalmente. Después de la destilación una nueva solución de etanol con agua es obtenida cuya composición es cercana al punto azeotrópico etanol / agua de 96.5 % en peso de etanol. A partir de este punto el proceso de destilación ya no puede obtener un porcentaje más alto de etanol (Uragami *et al.*, 2015), por lo que otros métodos de separación son necesarios para obtener el bioetanol en una concentración de 99.5 % en peso para su uso como combustible o aditivo.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido al incremento de las emisiones de CO₂ producidas a partir de la combustión de combustibles fósiles se han comenzado a desarrollar tecnologías que sean sostenibles, pero sin tener implicaciones negativas para el medio ambiente. Teniendo en cuenta que México es un país productor de materia prima para una innumerable cantidad de alimentos, bebidas, y consecuentemente desechos agroindustriales, se puede tomar ventaja de estos últimos para la transformación de biomasa a otros productos de valor agregado. Dentro de estos productos se puede hacer mención de los biocombustibles o biopolímeros de origen orgánico. Específicamente el bioetanol como un biocombustible de segunda generación puede ser generado a partir de desechos agroindustriales; y ofrece una solución que trata a la vez dos problemáticas en la sociedad actual: el manejo responsable de los desechos orgánicos y la generación de energía de manera renovable.

Para la producción de bioetanol se existen sistemas como el lote y lote alimentado que han ofrecido una solución a la demanda actual. Sin embargo, para hacer la oferta más atractiva y evolucionar como un combustible con alto impacto en la sociedad es necesario tener una producción con mayores rendimientos y mejores tiempos de biosíntesis. Nuevos sistemas como la fermentación electrostática implementan un campo eléctrico constante, que simula un ambiente reductor que puede ser capaz de aumentar los rendimientos y productividad.

Por estas razones la propuesta de este trabajo es la aplicación de las nuevas técnicas de electrofermentación en un fermentador capaz de generar ambientes reductores que permitan modular la producción de bioetanol y consumo de carbono de *Saccharomyces cerevisiae* por lote y lote alimentado. El desarrollo de este fermentador será la base para la futura utilización del sistema de electrofermentación en sustratos como los desechos agroindustriales.

3. HIPÓTESIS

La aplicación de un voltaje continuo durante la fermentación puede coadyuvar a dirigir el metabolismo microbiano de *Saccharomyces cerevisiae*, modificando el carácter óxido reductor del medio de cultivo para aumentar la producción de bioetanol.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la corriente eléctrica constante aplicada a un sistema de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* sobre la producción de bioetanol.

4.2. Objetivos particulares

Construir un sistema de electrofermentación de 100 mL de capacidad evaluando diferentes electrodos de carbono y cobre.

Evaluar el efecto de diferentes voltajes y corrientes aplicados al sistema de electrofermentación por lote sobre la producción de bioetanol y consumo de carbono de *Saccharomyces cerevisiae*.

Evaluar el efecto del flujo por lote alimentado al mejor tratamiento encontrado en el sistema de electrofermentación utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

5. METODOLOGÍA

5.1. Materia prima

Se utilizó como materia prima azúcar comercial obtenida de distribuidores locales.

5.2. Material biológico

La cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* que se usó en experimentación para el sistema de electrofermentación fue WLP530 Abbey Ale Yeast (White Labs, San Diego, CA, EE.UU.). La cepa se propagó en medio líquido con extracto de levadura, peptona de caseína y sacarosa (YPS) compuesto por (g/L): extracto de levadura, 10; peptona de caseína, 20; y sacarosa, 20; a pH 5.0. Para la preservación la cepa, ésta se mantuvo en criopreservación (- 80 °C) con glicerol al 20 % (v/v) y 80 % (v/v) del inóculo de levadura en medio YPS, según la metodología descrita por Sherman (2002).

5.3. Medio YPS

El medio estándar YPS para activación de levaduras se elaboró con las concentraciones de (g/L): 10 extracto de levadura, 20 peptona de caseína y 20 sacarosa en agua corriente. Para la elaboración de agar YPS se añadió 10 g/L de agar base al medio estándar YPS.

5.4. Medio de fermentación

Las fermentaciones llevadas a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* contenían en el medio una relación C/N = 20, con las concentraciones de (g/L): 90 de sacarosa, 10.2 de sulfato de amonio y 1 fosfato de sodio. El medio se inoculó con 10 % (v/v) de *S. cerevisiae* previamente activada con una densidad celular de 107 o 108 UFC/mL.

5.5. Preinóculo

Se preparó un preinóculo tomando una colonia de caja petri con agar YPS para ser cultivada en 100 mL de medio estándar YPS. Posteriormente fueron incubadas por 24 horas a 30 °C y pH 5.0. Posteriormente, se midió la absorbancia con un espectrofotómetro hasta alcanzar valores de 0.5–0.8.

5.6. Inóculo

Se determinó la curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* para hacer su correlación en unidades formadoras de colonia (UFC). Se creció la levadura en 250 mL de medio YPS a pH 5.0, y una vez alcanzada una densidad celular de 107 o 108 UFC/mL a 30 °C fue utilizada para los medios de fermentación de la sección 5.4.

5.7. Construcción del biorreactor.

Se construyeron siete sistemas de electrofermentación a lo largo de la experimentación. El sistema de electrofermentación inicial fue un modelo modificado del reportado en la metodología de Mathews *et al.* (2015), en donde un electrodo embobinado y el medio de fermentación son contenidos en un frasco de 100 mL de capacidad. El electrodo consistió en una pieza de grafito y un alambre de cobre AWG 24 que lo revestía. El electrodo fue suspendido de la tapa del recipiente, y conectado a una fuente de voltaje (rango iniciales de voltaje de 15 - 30 V), como se muestra en la Figura 7.

5.8. Fermentación en lote.

Se llevaron a cabo las fermentaciones con los medios descritos en las secciones 5.3. y 5.4. para evaluar su cinética de crecimiento siendo ésta la primera prueba para validar el sistema de electrofermentación. Las fermentaciones se llevaron a

cabo en 100 mL de medio de fermentación de modo estático, a temperatura ambiente, pH 5.0 y durante 48 o 72 horas. Estos tiempos de fermentación fueron dependientes del tipo de biorreactor. Obteniendo una diferencia significativa entre controles y tratamiento en biomasa se prosiguió a la cuantificación de consumo de carbono y producción de bioetanol. Las fermentaciones tuvieron un lapso de tiempo de 48 o 72 horas.

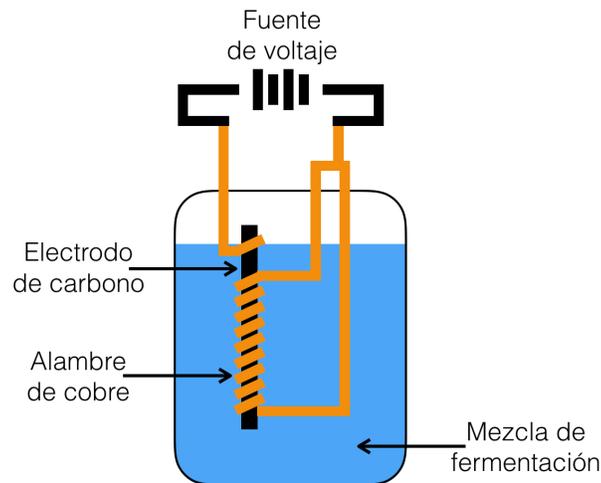


Figura 7. Diseño del sistema de fermentación electrostático.

5.9. Fermentación en lote alimentado.

De las fermentaciones previamente realizadas en lote se continuó trabajando únicamente con el tratamiento que tuvo la mejor velocidad de crecimiento, consumo de carbono y producción de bioetanol. Para la fermentación en lote alimentado a pequeña escala, a 50 mL de lote inicial (ilustrado en en la Figura 8) se alimentó continuamente a una velocidad de 0.05 L/h utilizando el medio descrito en la sección 4.4. La alimentación fue controlada utilizando un controlador lógico programable (PLC) Zelio SR3 B261BD (Schneider Electric, Francia) que suministró cada hora durante 14 segundos el medio de fermentación; para tal fin se empleó una bomba de flujo peristáltico Masterflex L/S 07516-10 (Cole Parmer, USA) a través de una manguera silicona de calibre 14. La ilustración del sistema se muestra en la Figura 9.

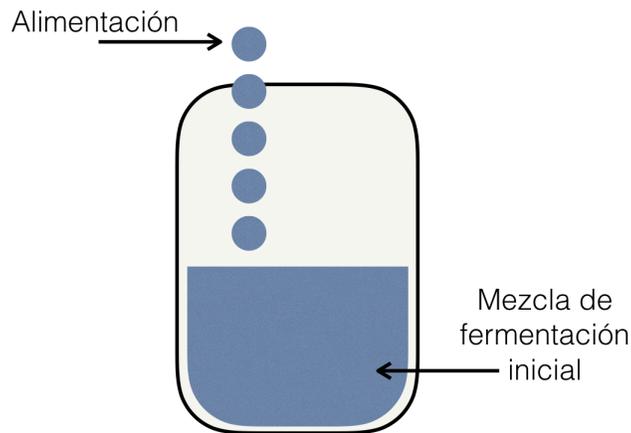


Figura 8. Ilustración de la fermentación por lote alimentado.

5.10. Métodos analíticos

Para los ensayos de biomasa, 250 μL de las muestras fueron adicionadas a una microplaca a la que se midió su absorbancia a 595 nm. Para la cuantificación de azúcares totales y producción de bioetanol, el medio fermentado fue centrifugado a 10,000 rpm durante 10 min a 21 °C, el sobrenadante fue recolectado y resguardado para su cuantificación en congelación a -20 °C. El consumo de azúcares fue cuantificado utilizando 300 μL del sobrenadante previamente recolectado con un refractómetro Hanna Hi 96813 (Hanna Instruments, Italia) cuya lectura resultante fue en grados Brix (°Bx). La cuantificación de bioetanol se realizó usando curvas estándar determinadas por espectroscopía infrarroja (IR). 100 μL del sobrenadante previamente recolectado fueron utilizados para dicha cuantificación.

5.11. Tratamientos y unidad experimental.

Se manejó como unidad experimental el sistema de electrofermentación, en la cual se evaluó la cepa descrita en la sección 5.2. a los voltajes de 15, 20 y 25 Volts para la fermentación en lote. Los primeros voltajes evaluados y

seleccionados fueron los basados en la experimentación de Mathew *et al.* (2015). El Cuadro 4 muestra los factores y niveles iniciales que fueron aplicados a la unidad experimental. El blanco a comparar para los consumos de carbono y producción de bioetanol en los experimentos fue una fermentación tradicional, con las mismas concentraciones de sustrato y temperatura. Cabe mencionar que debido a la naturaleza de los experimentos tuvieron que ser realizados diferentes bioreactores a lo largo de la investigación, cada uno con su diseño unifactorial.

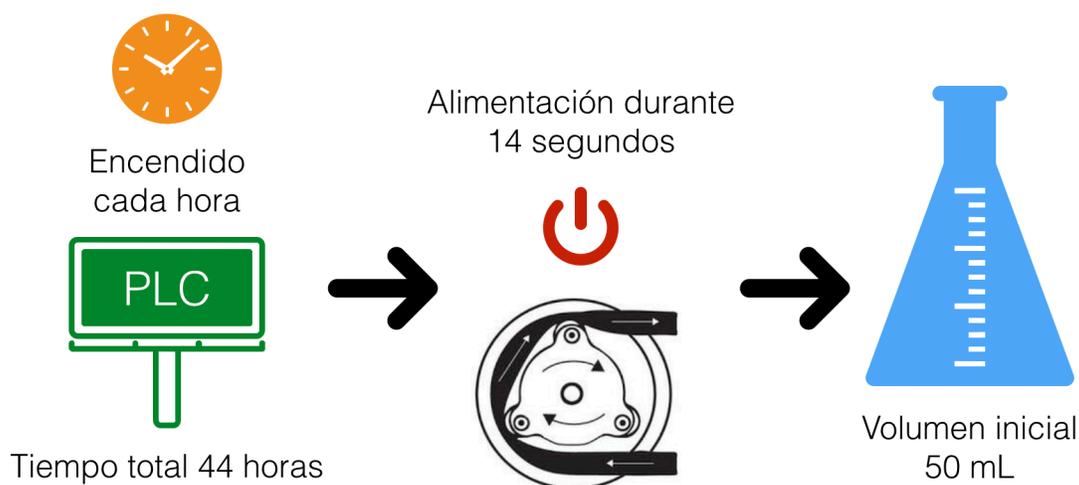


Figura 9. Ilustración del modo operacional por PLC.

5.12. Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron reportadas como la media de los ensayos. El diseño unifactorial y la comparación de medidas (con $p < 0.05$ como el nivel mínimo significativo) se realizó haciendo uso del software J.M.P 5.0.1 (2002, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

Cuadro 4. Diseño experimental unifactorial

	Variable
	Voltajes
Niveles	15
	20
	25

6. RESULTADOS

6.1 Objetivo I

El primer objetivo específico del presente proyecto es construir un sistema de electrofermentación de 100 mL de capacidad evaluando diferentes electrodos de carbono y cobre. A continuación se describen los diferentes biorreactores construidos junto con sus configuraciones y resultados preliminares.

6.1.1 Biorreactor con electrodo de grafito con embobinado de cobre con voltaje aplicado (biorreactor I)

Para este primer diseño de biorreactor de campo electrostático se construyeron 3 réplicas conformadas por un frasco de 125 mL con un electrodo de grafito, recubierto por 75 vueltas de alambre magneto (calibre 24 AWG) con un área aplicada resultante de 20 cm². Las Figuras 10 y 11 representan el biorreactor y configuración del electrodo, respectivamente. Los tratamientos aplicados fueron de 15, 20 y 25 V. Con estos biorreactores se evaluó el efecto de dichos voltajes sobre la cinética de crecimiento. Siendo esta primera prueba de biomasa la descartante para las pruebas de consumo de carbono y producción de bioetanol.

Los resultados de absorbancia muestran que no existe una diferencia entre el control y el tratamiento aplicado de 15 V. Como se muestra en la curva de absorbancia de la Figura 12 no se refleja una diferencia entre el tratamiento y el respectivo control. La prueba de Tukey para el tratamiento de 15 V se realizó en dos tiempos, 24 y 48 horas, siendo éstos los resultantes de un valor intermedio y final de la fermentación. Estos tiempos se siguieron evaluando en el resto de los biorreactores.

En el análisis de comparación de medias por Tukey, la Figura 14 no muestra diferencia significativa para la aplicación de voltaje a 15 V y el control pues son

englobados al mismo grupo A. Además de mostrar un valor alto de p 0.2030 que nos indica que hay una alta probabilidad de que las medias no sean distintas entre sí. Una situación similar se observa para los tiempos de 48 horas para el control y tratamiento de 15 V, donde nuevamente son pertenecientes al mismo grupo A de la prueba de Tukey; y además tienen un valor alto de p 0.9493 que indica que prácticamente son idénticos los valores obtenidos. Estos primeros resultados muestran un comportamiento de crecimiento de la levadura muy distinto a lo reportado en el diseño de Mathew *et al.* (2015).

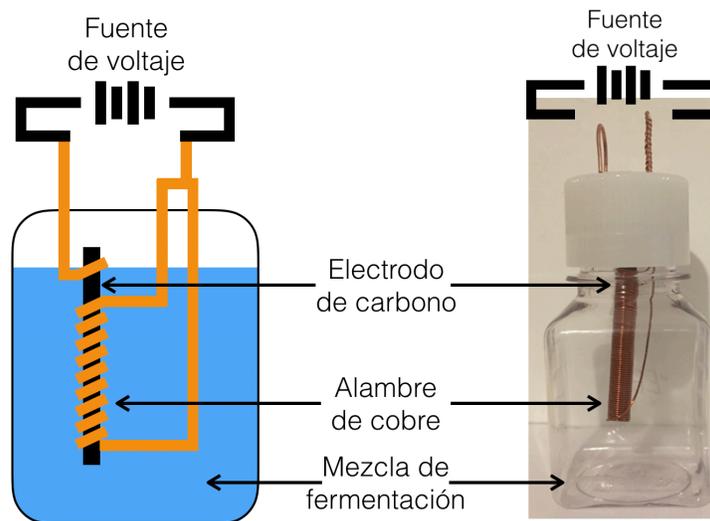


Figura 10. Diseño del biorreactor de campo electrostático - biorreactor I.

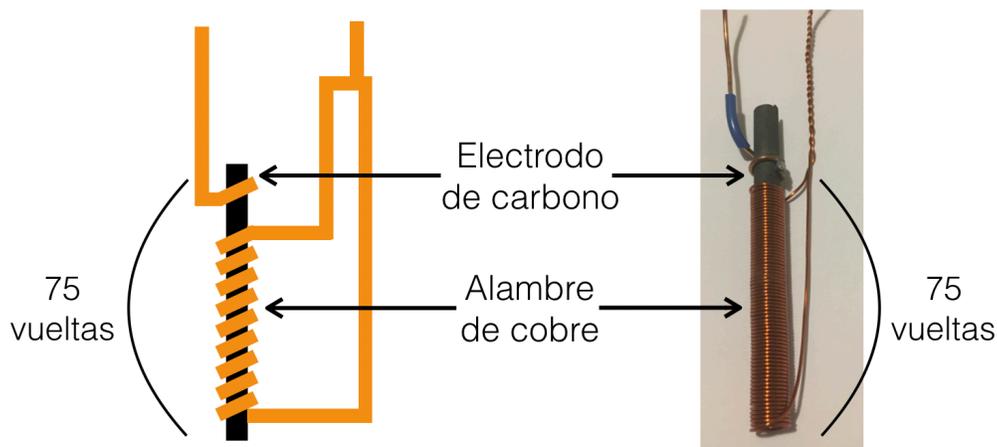


Figura 11. Electrodo de carbono recubierto por alambre magneto.

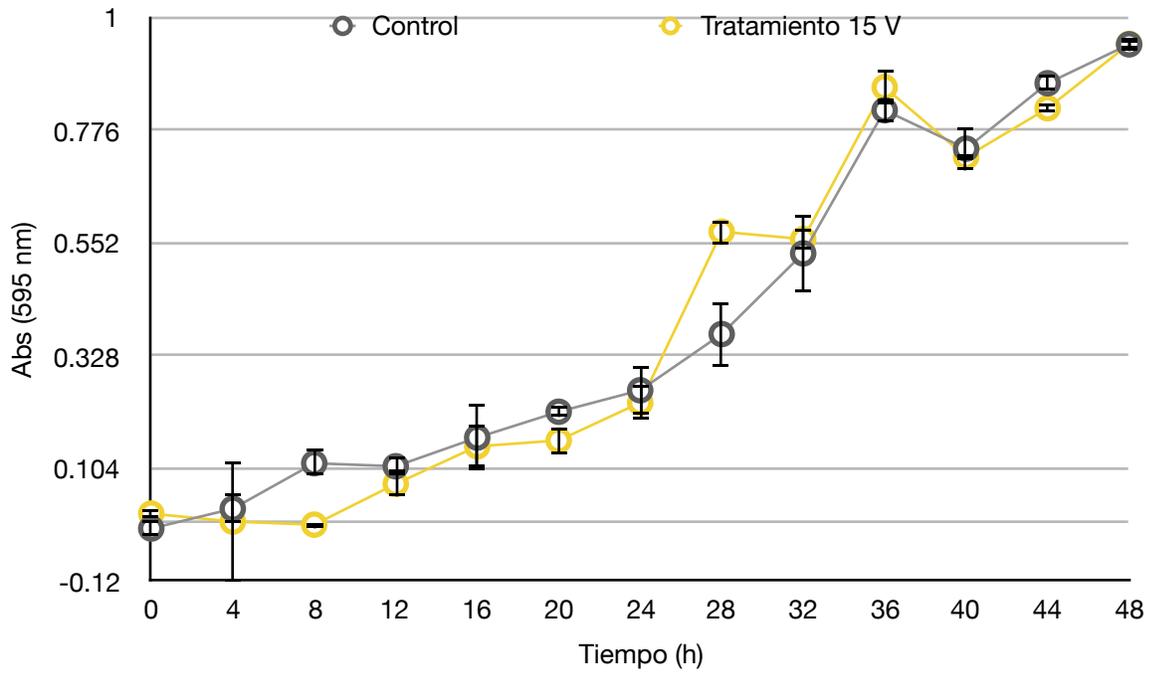


Figura 12. Absorbancias en el tratamiento de 15 V - biorreactor I.

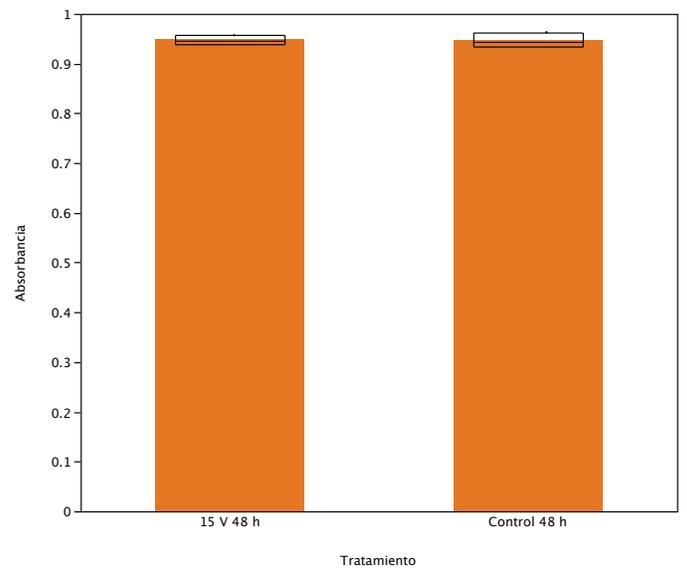
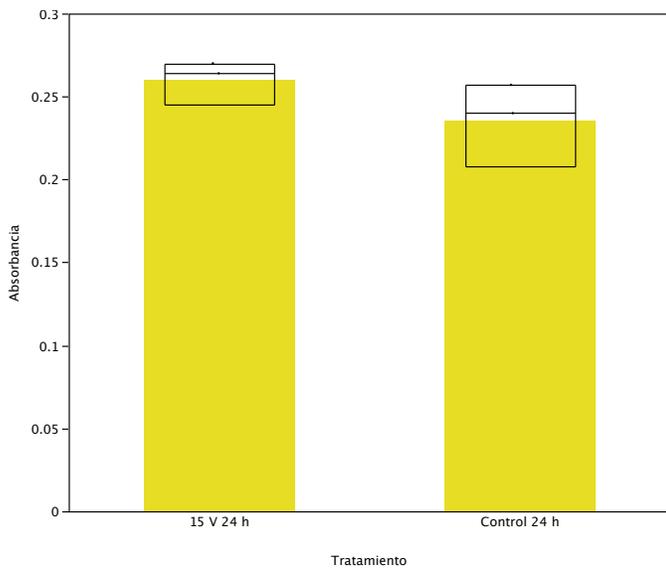


Figura 13. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h a 15 V - biorreactor I.

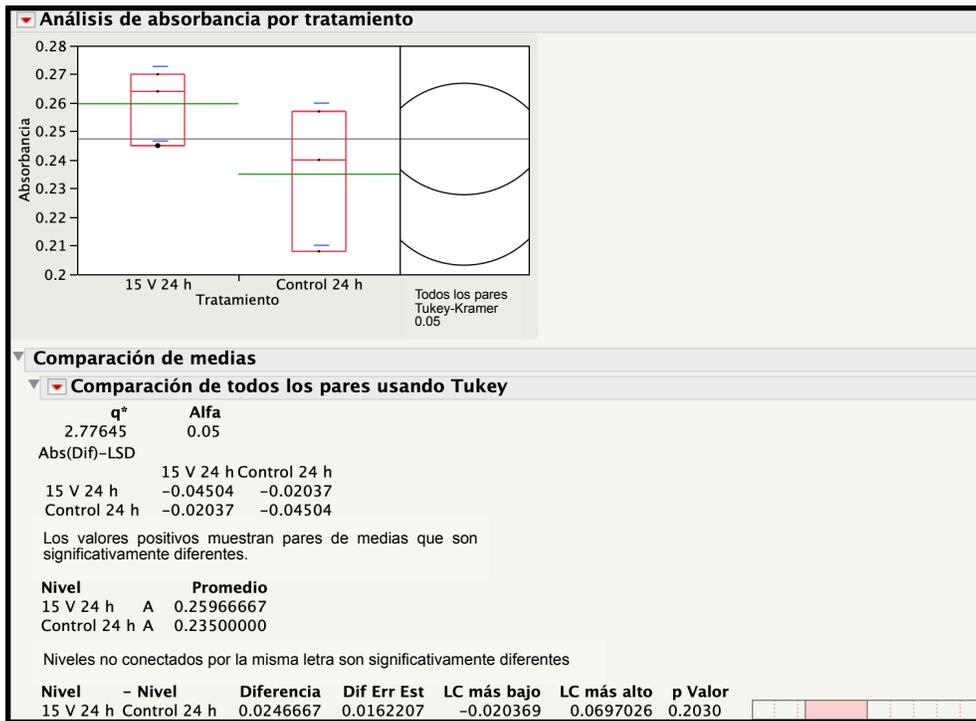


Figura 14. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 15 V - biorreactor I.

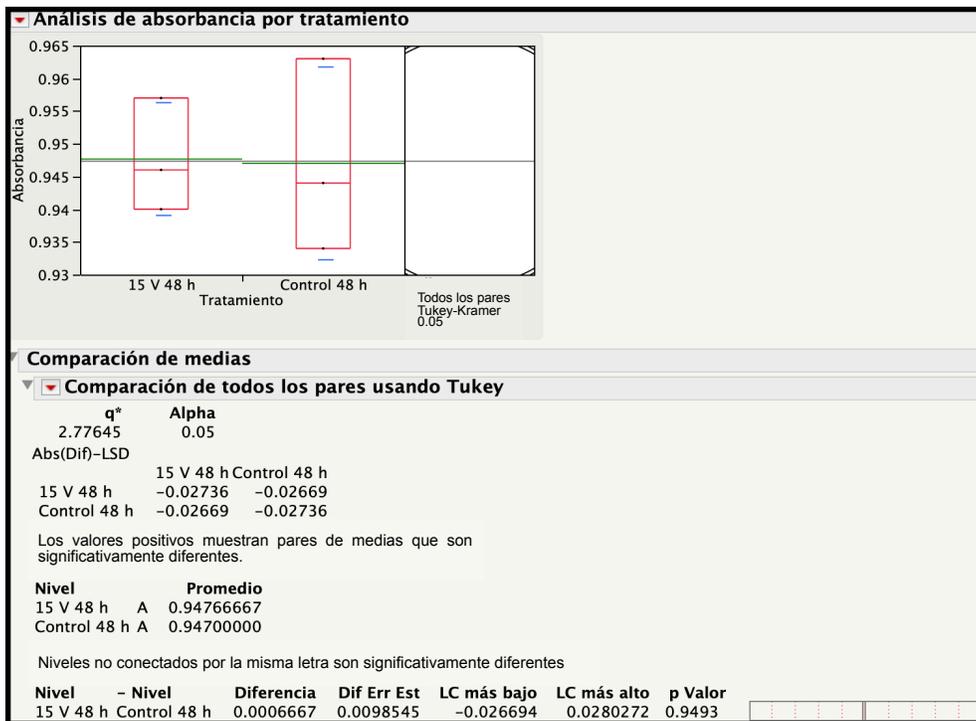


Figura 15. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 15 V con biorreactor I.

Para el tratamiento con el biorreactor tipo I a 20 V se observó que el crecimiento de biomasa reflejado en absorbancia se vio aminorado, comparado con los 15 V aplicados. En la Figura 16 se observa que tanto el control como el tratamiento son muy similares en su comportamiento. Por su parte, en la Figura 17 se observa una variación para el tiempo de 24 horas entre control y tratamiento a 20 V; por otra parte la variación correspondiente al tiempo de 48 horas no es tan notoria. Para corroborar la diferencia de ambos tiempos se realizó una prueba de Tukey, en la cual se observa en la Figura 18 que no existe una diferencia de grupos para el tiempo 24 control y tiempo 24 con los 20 V aplicados pues ambos están en el grupo A; con el p valor de 0.9715 se confirma que no hay una diferencia entre los valores. Para el tiempo 48 en la prueba de Tukey de la Figura 19 se obtuvo nuevamente un mismo grupo para ambos valores y un valor p de 0.2557 que es un valor alto para corroborar que no son estadísticamente diferentes los datos comparados.

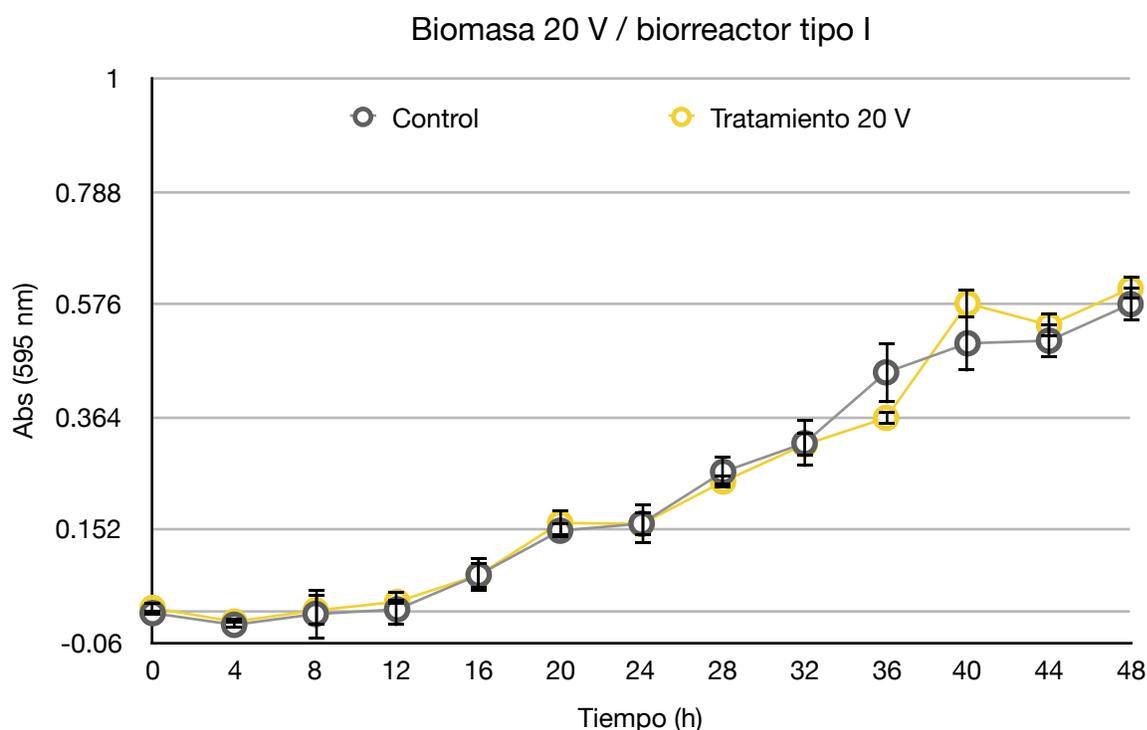


Figura 16. Absorbancia en el tratamiento de 20 V - biorreactor I.

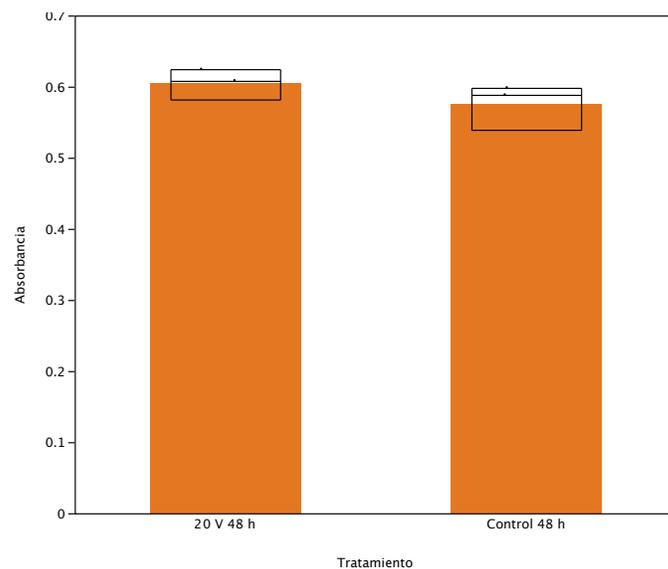
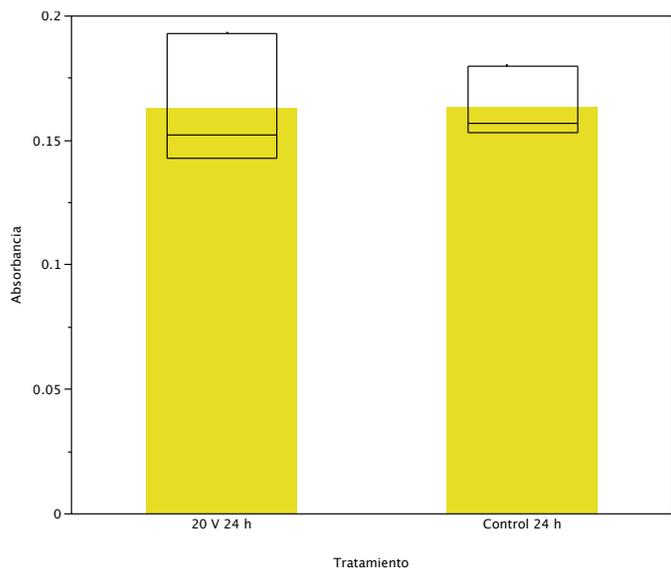


Figura 17. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h a 20 V - biorreactor I.

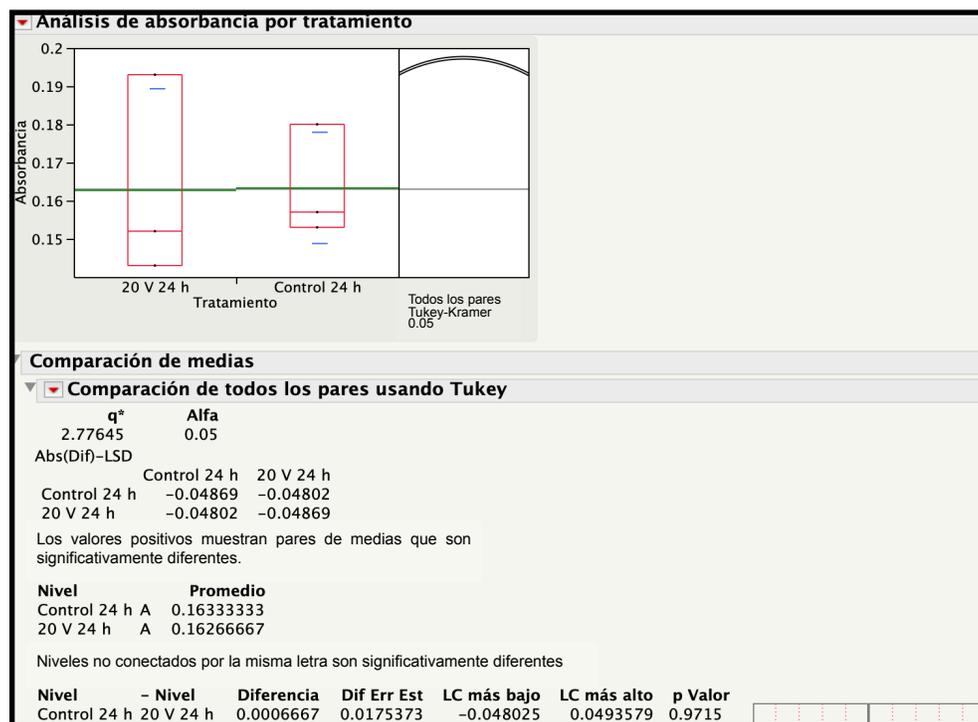


Figura 18. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 a 20 V - biorreactor I.

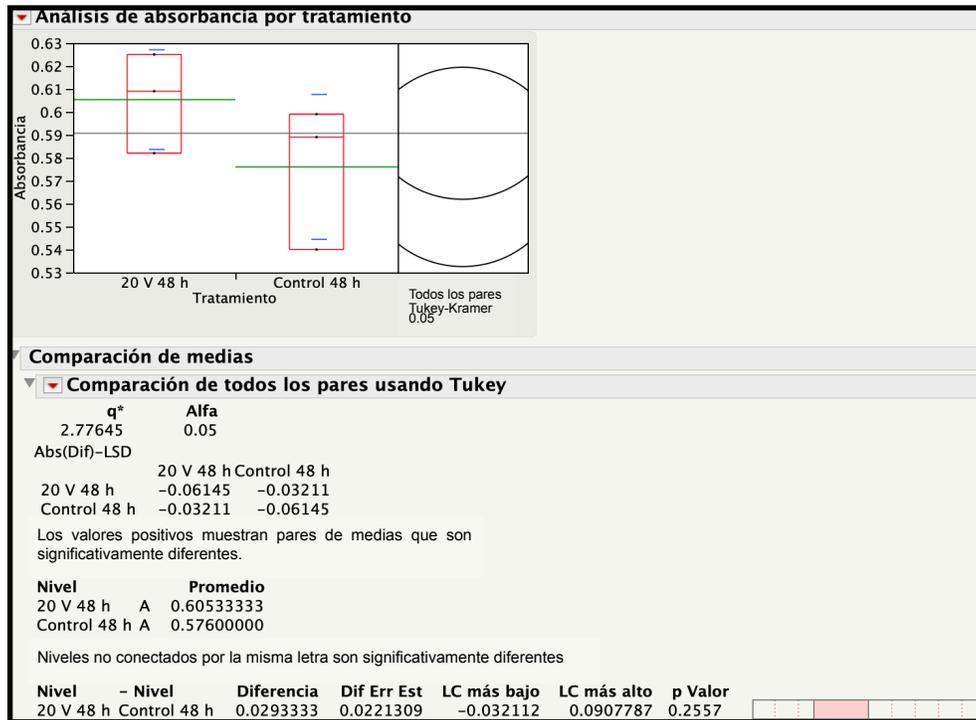


Figura 19. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 a 20 V - biorreactor I.

Para el tratamiento de 25 V aplicados con el biorreactor tipo I se observa que no hay un comportamiento distinto en las cinéticas de crecimiento por la aplicación de dicho voltaje comparado con el control dentro de las 48 horas que duró el experimento. La Figura 21 correspondiente a las absorbancias al tiempo de 24 horas no muestran una diferencia el control y el tratamiento de 25 V; este argumento es soportado en la prueba de Tukey donde no hay una separación de grupos ni una p pequeña en la Figura 22. Por otra parte a las 48 horas en la Figura 22 se muestra una diferencia que es corroborada en la prueba de Tukey. La Figura 23 muestra al control y al tratamiento de 25 V en grupos distintos, A y B, con una p pequeña con un valor de 0.0283 que indica que hay una baja probabilidad de que los datos comparados sean estadísticamente similares.

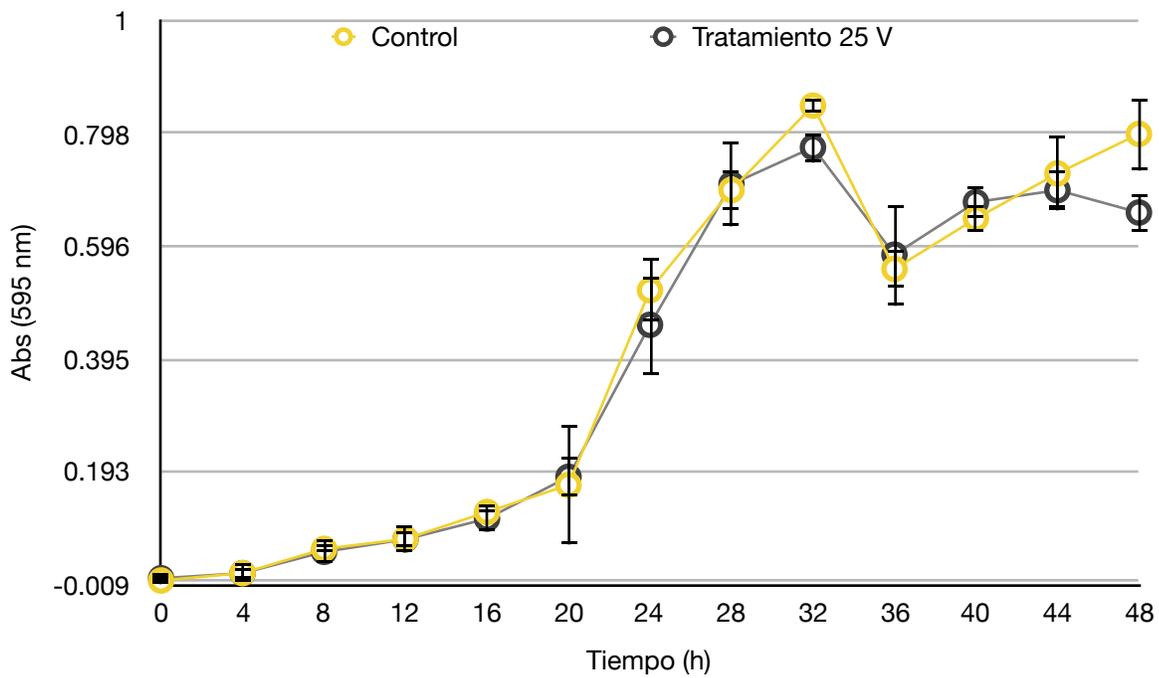


Figura 20. Absorbancia en el tratamiento de 25 V - biorreactor I.

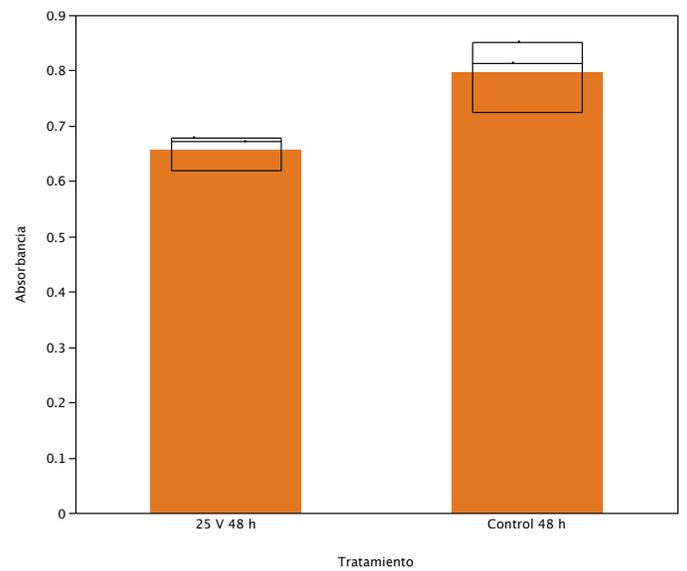
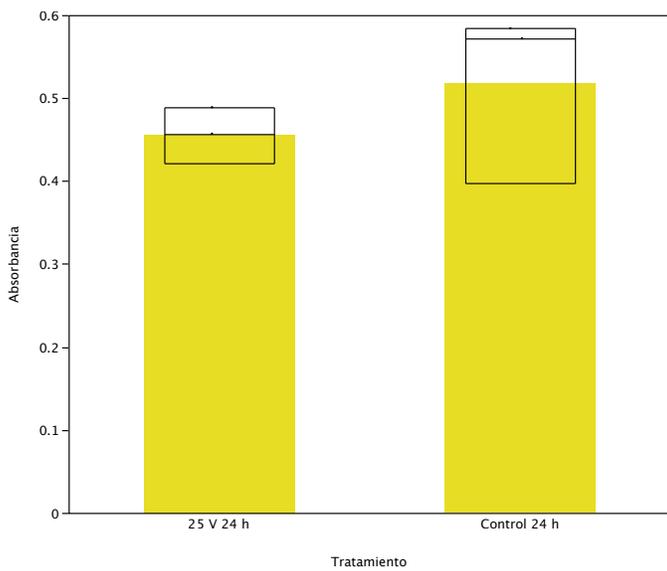


Figura 21. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h a 25 V - biorreactor I.

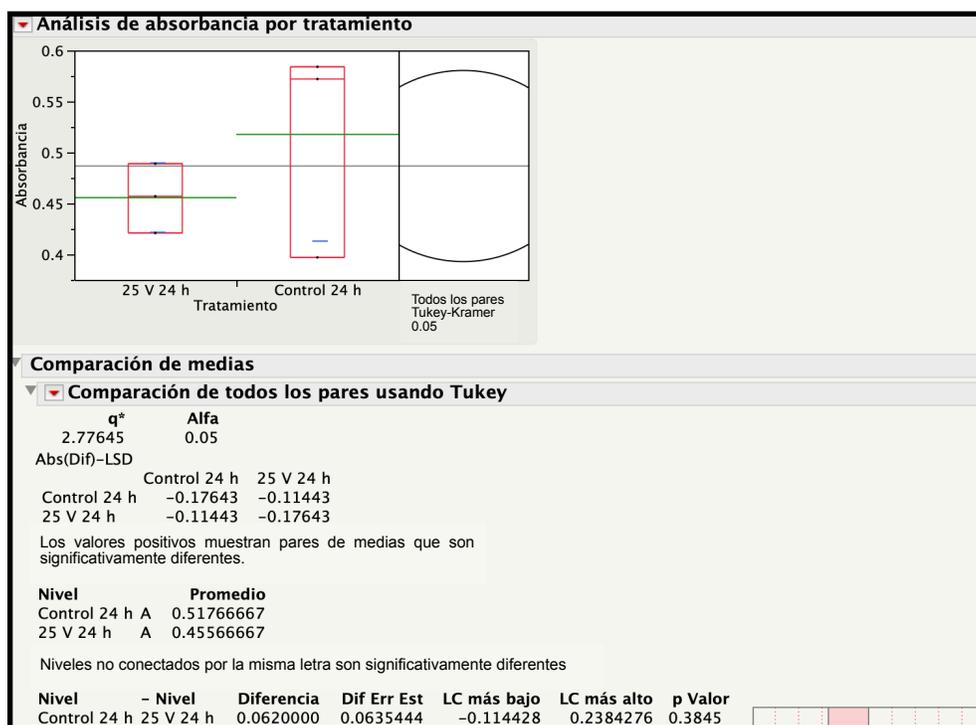


Figura 22. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 25 V - biorreactor I.

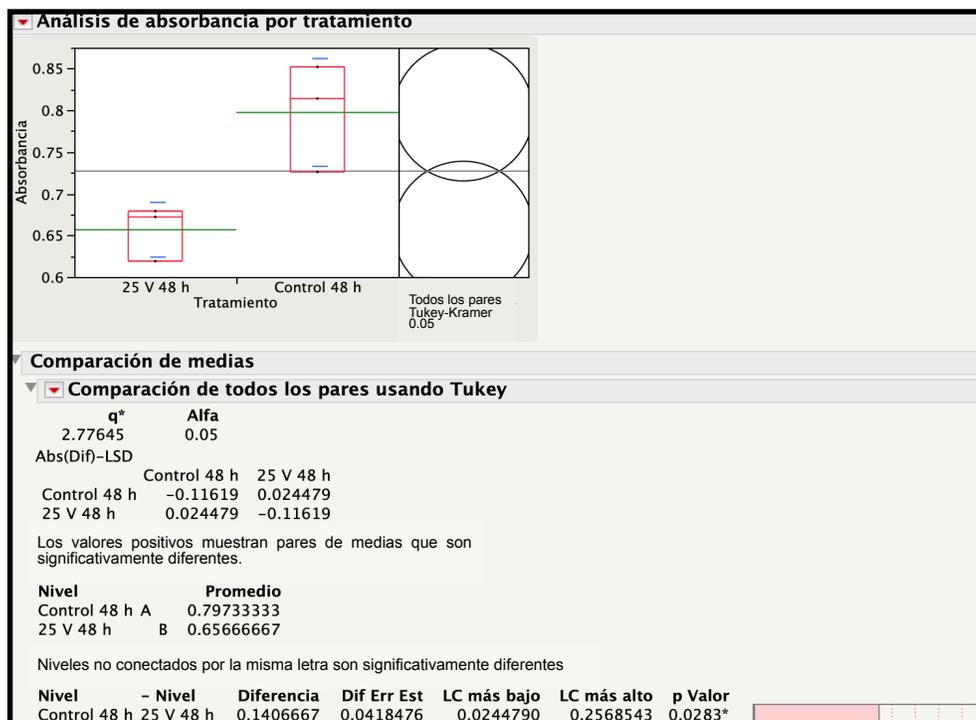


Figura 23. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 25 V - biorreactor I.

6.1.2. Biorreactor de 50 mL con electrodo de cobre, embobinado exterior de cobre y voltaje aplicado (biorreactor tipo II)

Debido a la falta de un efecto en la aplicación de voltajes de 15, 20 y 25 V sobre las cinéticas de crecimiento reflejadas en absorbancia utilizando el biorreactor I se decidió modificar la configuración del embobinado en la nueva configuración denominada biorreactor II con una capacidad de 50 mL. El embobinado en esta configuración fue alrededor del propio biorreactor y no del electrodo, constando de 300 vueltas, como puede observarse en la Figura 24.

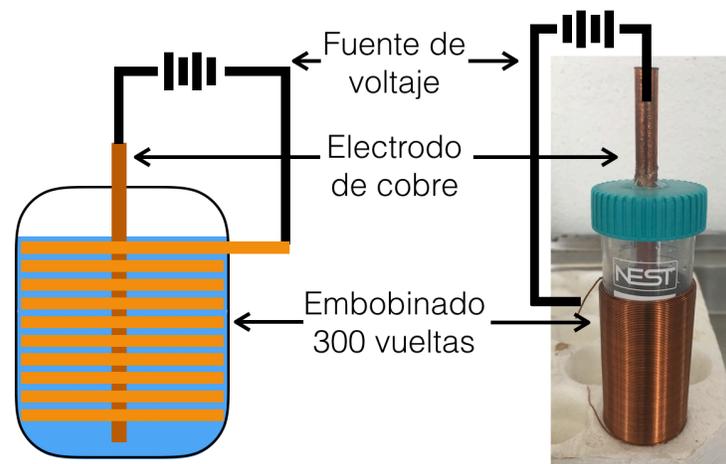


Figura 24. Diseño del biorreactor de campo electrostático - biorreactor II.

Dentro de los resultados obtenidos con el biorreactor tipo II puede observarse en la Figura 25 una clara disminución en el crecimiento de la levadura en los tratamientos correspondientes de 15 y 30 V. En la Figura 26 se muestra una gran separación del grupo control contra los tratamientos, siendo este control 1.7 y 2.4 veces mayor que voltaje aplicado a 15 y 30 V respectivamente. Para las pruebas de Tukey en la Figura 27, se muestra que entre el control y tratamientos existe una diferencia significativa entre grupos a las 24 horas. Por otro lado entre los mismos tratamientos de 15 y 30 V no la hay; argumento que es soportado con un valor p 0.2439 que nos indica que es poco probable que haya diferencias entre los tratamientos de 15 y 30 V aplicados con el biorreactor II.

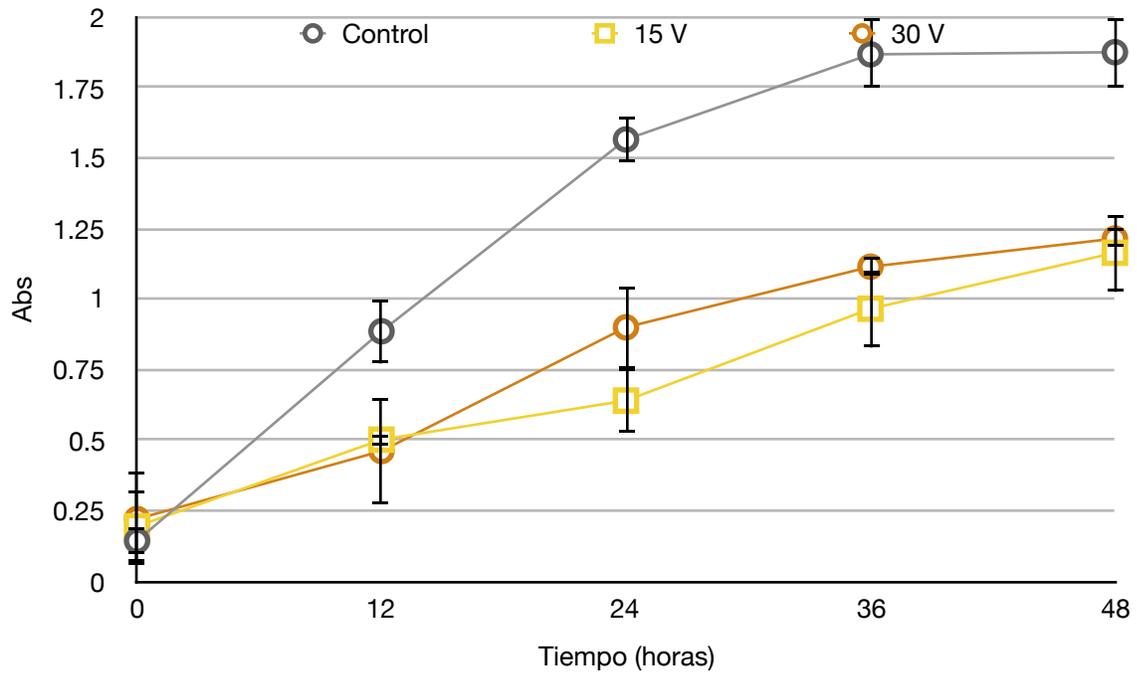


Figura 25. Absorbancia en el tratamiento a 15 V y 30 V - biorreactor II.

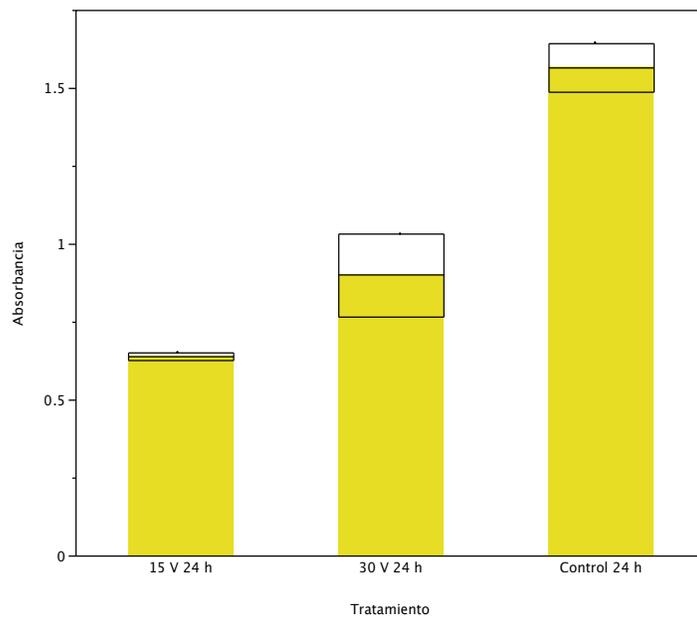


Figura 26. Absorbancias en tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor II.

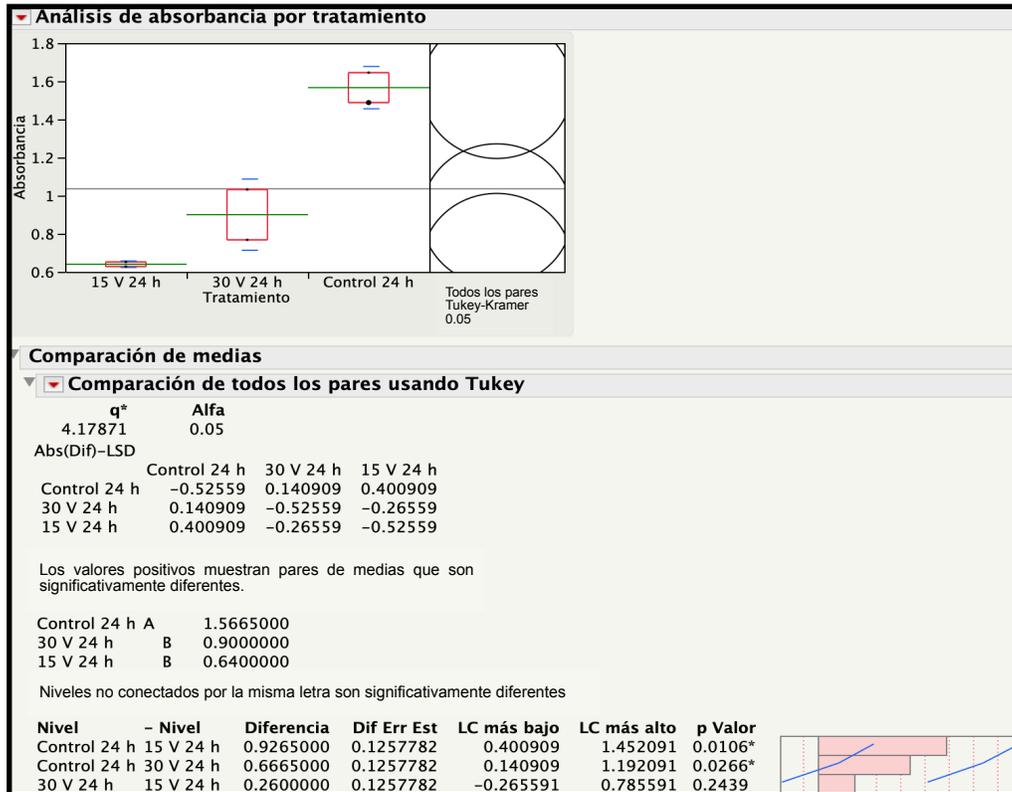


Figura 27. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor II.

Para los tiempos de 48 horas se observa en la Figura 25 que el crecimiento de los tratamientos están por debajo del control. En la Figura 28 el tiempo de 48 horas no muestra nuevamente una separación de los tratamientos, pero sí del control, siendo éste 1.5 y 1.6 veces mayor que el tratamiento a 30 y 15 V respectivamente. Este argumento se refuerza con la prueba de Tukey que agrupa en B a ambos tratamientos con los voltaje de 15 y 30 V; Además de tener un p valor de 0.8902 confirma que no existe diferencia significativa entre los tratamientos Por otro lado ambos tratamientos tienen una valor p pequeño 0.0144 y 0.0177 para 15 y 30 V, respectivamente, que sugiere es distinto el control a los tratamientos.

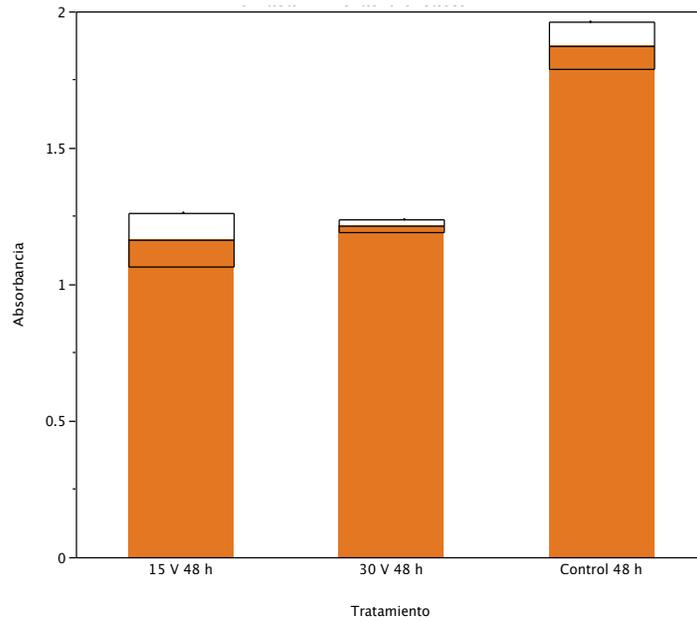


Figura 28. Absorbancias en tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor II.

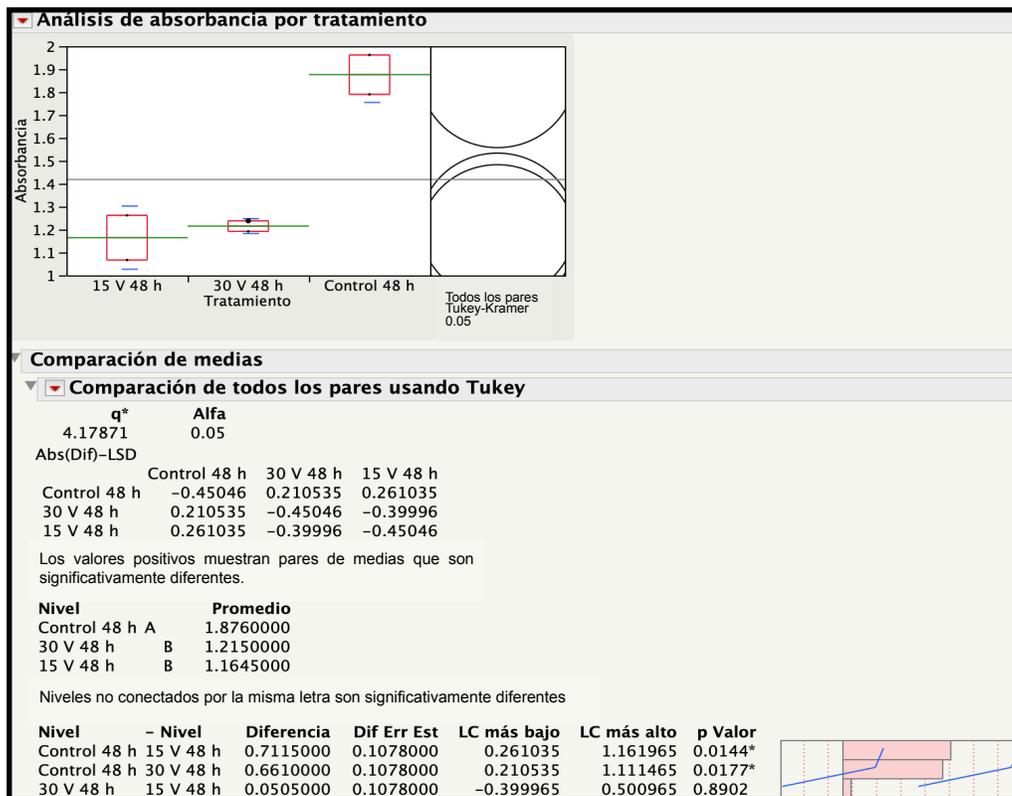


Figura 29. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor II.

6.1.3. Biorreactor de 100 mL con electrodo de cobre, embobinado exterior de cobre y voltaje aplicado (biorreactor III)

El biorreactor tipo III a diferencia del biorreactor tipo II cambia en la forma del biorreactor, que fue un frasco cuadrado con capacidad para 100 ml de medio. Este cambio se hizo con la finalidad de aumentar la cantidad de cobre por número de vueltas del embobinado al reducirse la altura a 5 cm y aumentar el perímetro a 20 cm del bioreactor. Concentrando de esta manera el voltaje aplicado en 25 cm^3 que se esperaba tuviera un efecto positivo en el crecimiento de la levadura y así mejorar el consumo de carbono y la producción de bioetanol.

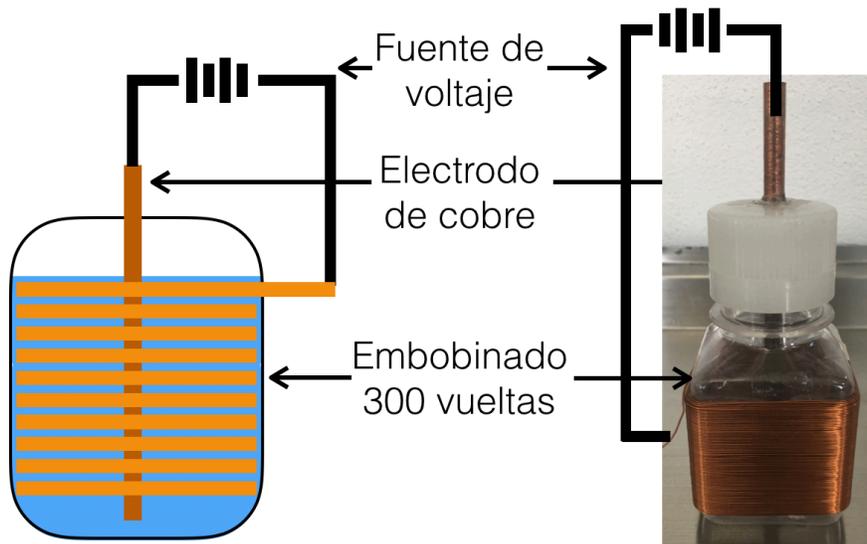


Figura 30. Diseño del biorreactor de campo electrostático - biorreactor III.

Cómo puede verse en la Figura 31 nuevamente se ve el efecto negativo del crecimiento de la levadura en los biorreactores que aplicaban el tratamiento con voltaje. En la Figura 32 para las 24 horas comienza a apreciarse la separación del control respecto a los tratamientos. En la Figura 33 muestra la prueba de Tukey cómo tanto control como los tratamientos pertenecen al mismo grupo A y por lo tanto no son significativamente diferentes entre sí. En el p valor se observa cómo ninguna comparación de medias tiene un valor pequeño que indique distinción entre los tratamientos y control.

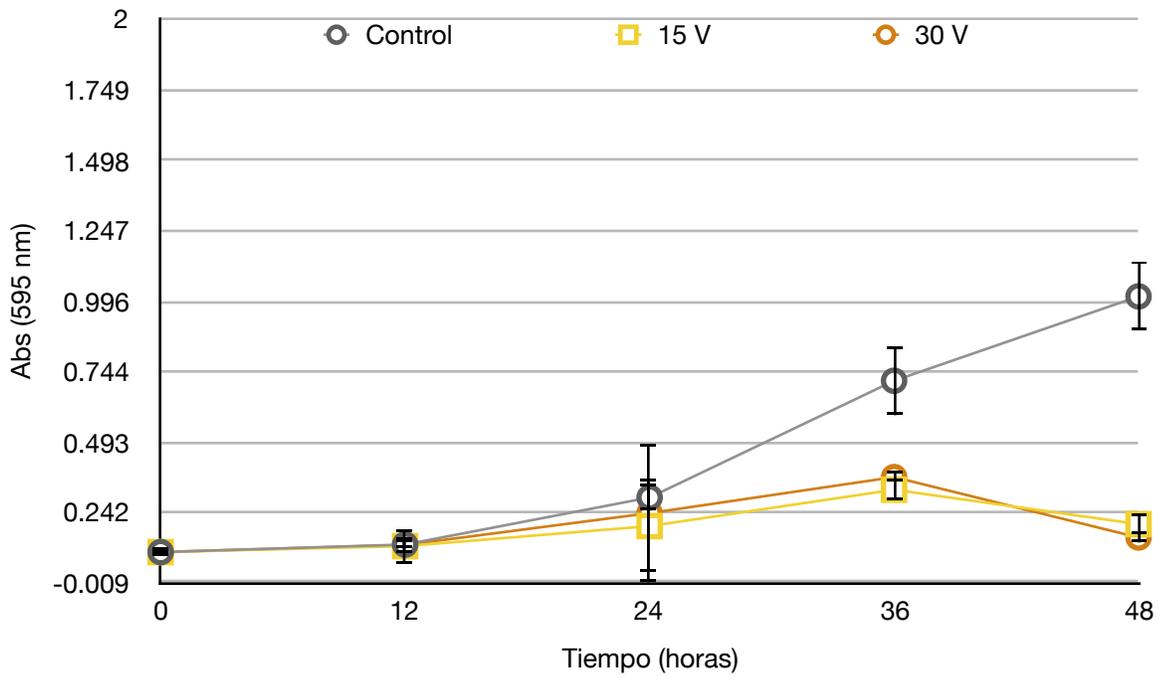


Figura 31. Absorbancia en el tratamiento a 15 V y 30 V - biorreactor III.

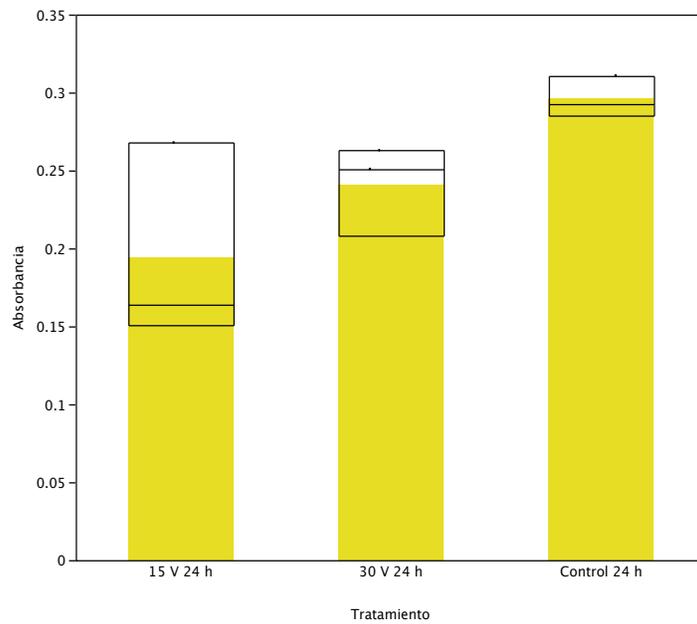


Figura 32. Absorbancias en tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor III.

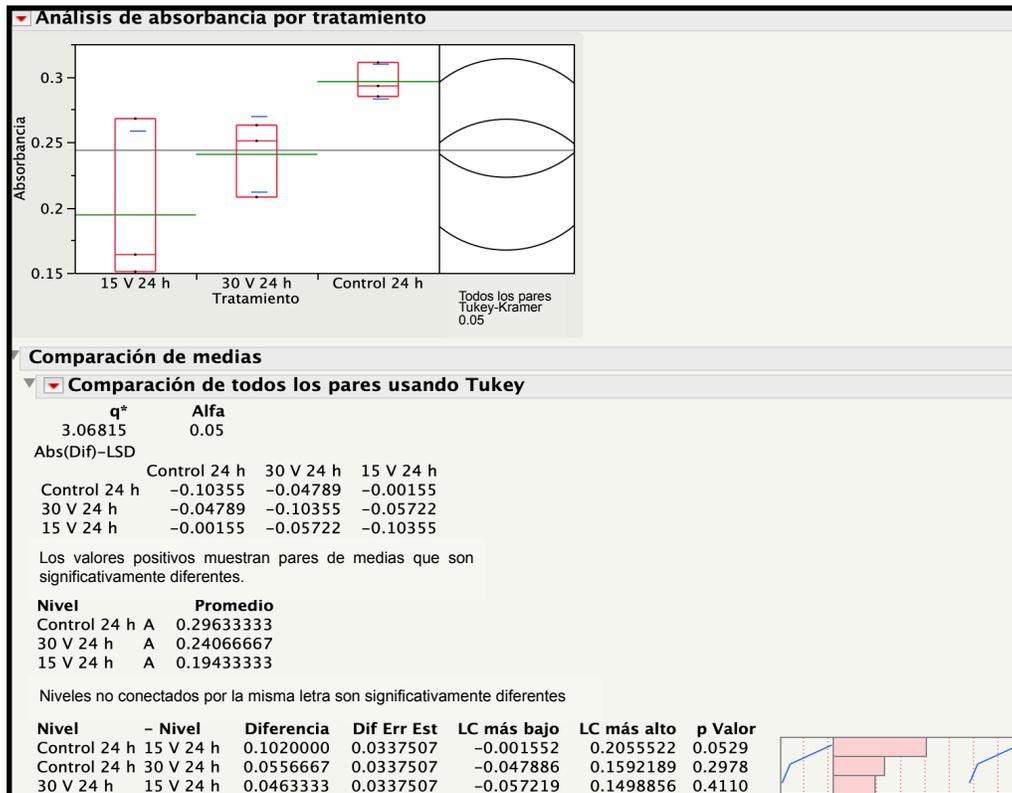


Figura 33. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor III.

En la Figura 31 se aprecia como a las 48 horas es más notoria la diferencia por absorbancia del control comparado con los tratamientos con el voltaje aplicado de 15 y 30 V del biorreactor III. En la Figura 34 se observa un crecimiento del control 6.7 y 5 veces mayor que el tratamiento con 30 y 25 V aplicados, respectivamente. En la prueba de Tukey, mostrada en la Figura 35, se observa que el valor de p resultante de la comparación de las medias del tratamiento de 15 V como de 30 V con el control es menor a 0.001. Este resultado indica con firmeza que ninguno de los tratamientos es similar con el control. Estos valores obtenidos son menores al control, y por ende este biorreactor no es adecuado obtener mejores condiciones de fermentación.

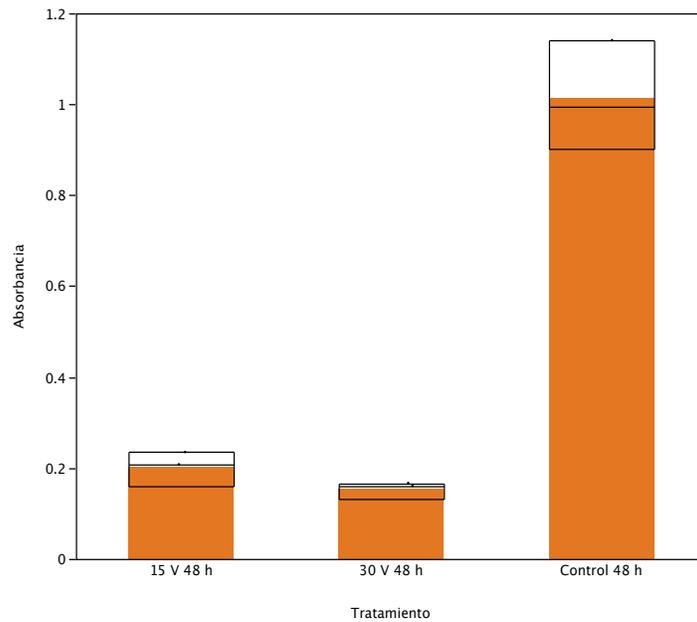


Figura 34. Absorbancias en tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor III.

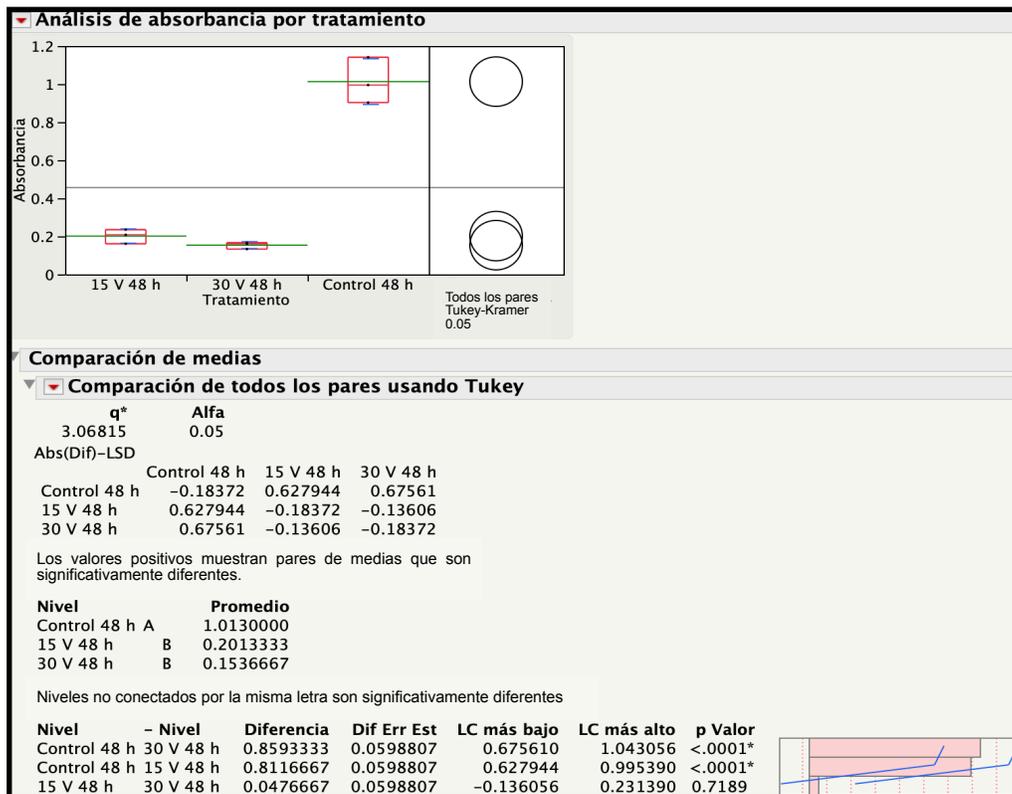


Figura 35. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor III.

6.1.4. Biorreactor de electrodos de grafito y voltaje aplicado (biorreactor IV)

En base a los resultados obtenidos con el biorreactor III se prosiguió en con la búsqueda en la bibliografía de otro sistema de electrofermetnación. El modelo descrito por Kumar *et al.* (2018) fue utilizado como base para la construcción del biorreactor con voltaje aplicado, en donde se utilizaron dos electrodos de grafito conectados a una fuente de poder que les suministró en diferentes tratamientos 0.8 y 1 V. Estos biorreactores de 100 mL de capacidad se muestran en la Figura 36.

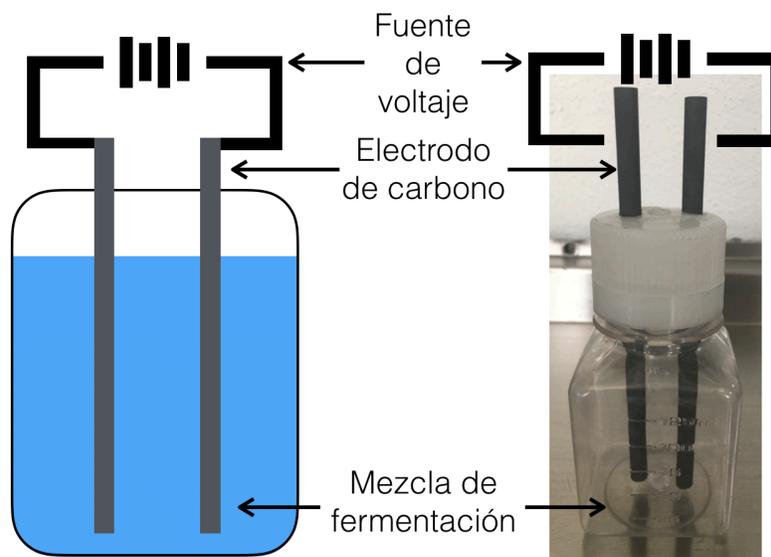


Figura 36. Diseño del biorreactor de voltaje aplicado - biorreactor IV.

En la Figura 37 de los resultados obtenidos por absorbancia puede verse que no existe una diferencia en las cinéticas de crecimiento, pues el comportamiento del control y tratamientos con voltaje de 0.8 y 1 V aplicados son muy similares, siendo así que el voltaje aplicado tiene un efecto nulo. En la Figura 38 puede verse que no están separados entre sí los valores de los tratamientos y control. Argumento corroborado por la prueba de Tukey, mostrada en la Figura 39, indica que las medias correspondientes al tiempo 24 no son diferentes entre sí al agruparlas a todas en A. De igual manera el p valor en su comparación es alto para cada grupo de medias, lo que sugiere que no existe diferencia significativa entre ellos.

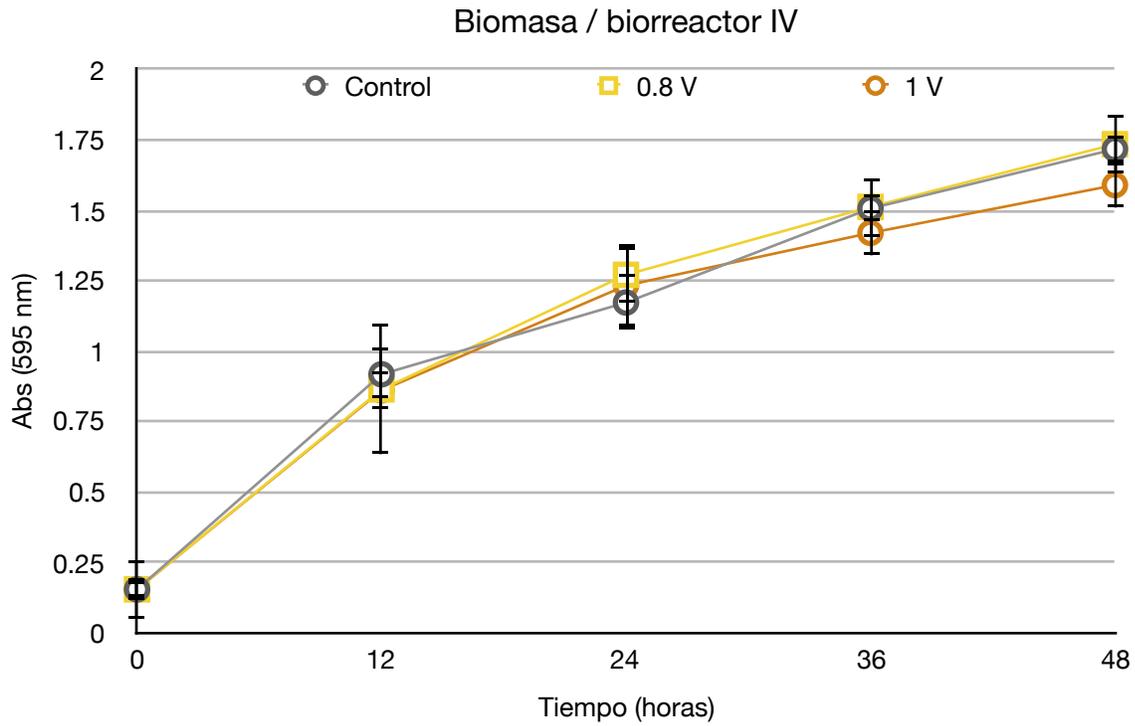


Figura 37. Absorbancia en el tratamiento a 0.8 V y 1 V - biorreactor IV.

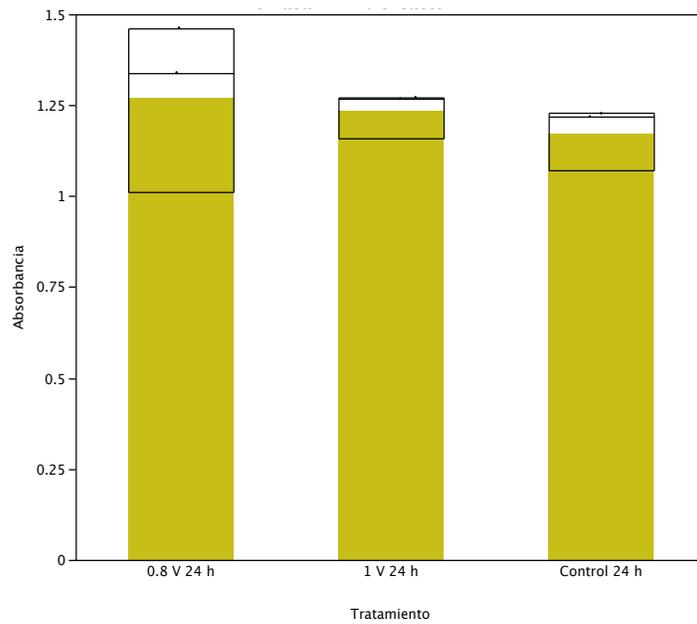


Figura 38. Absorbancias en tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor IV.

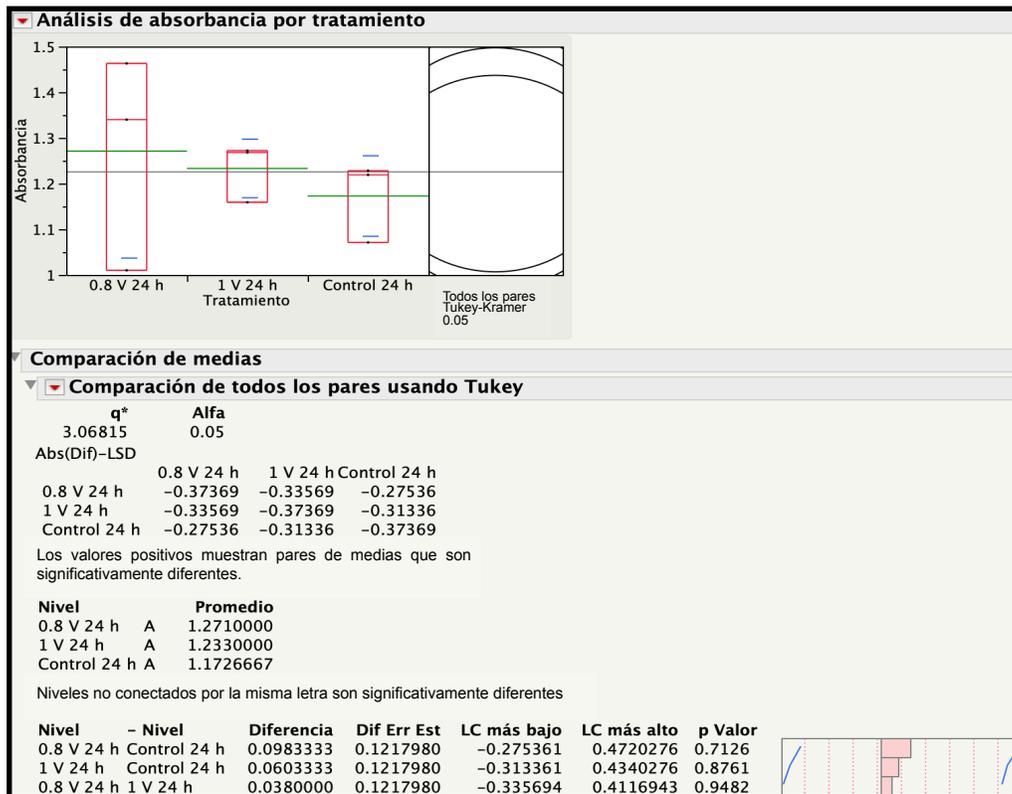


Figura 39. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 15 y 30 V - biorreactor IV.

Para el tiempo de 48 horas se observa el mismo comportamiento, lo cual sugiere que no existe una diferencia en el comportamiento del crecimiento de biomasa reflejado en absorbancia. La Figura 40 muestra claramente que los tres grupos de medias comprendidos por el control y tratamientos de 0.8 y 1 V son parecidos entre sí. La prueba de Tukey en la Figura 41 clasifica a todas las medias al mismo grupo A. Además, el p valor asignado a la comparación de medias del voltaje aplicado de 1 V a las 48 horas con el voltaje aplicado 0.8 V a las 48 horas es 0.1495 corroborando que no hay diferencia entre los tratamientos. Por otra parte el control a las 48 horas comparado con el tratamiento de 1 V aplicado a las 48 horas tiene un valor de 0.2087 que sugiere lo mismo, que es alta la probabilidad de que no sean distintos significativamente entre sí. Finalmente, el control comparado con el voltaje aplicado de 0.8 V muestra un p valor de 0.9628, que igualmente sugiere que no existe diferencia significativa entre ellos.

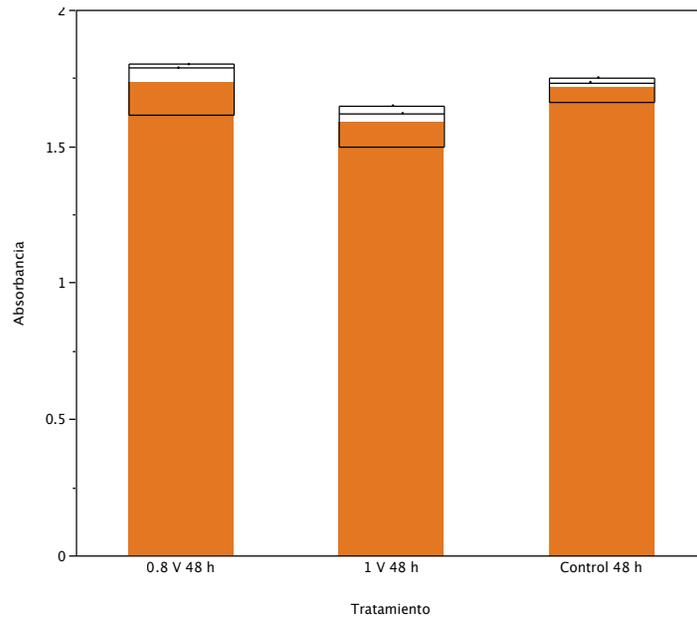


Figura 40. Absorbancias en tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor IV.

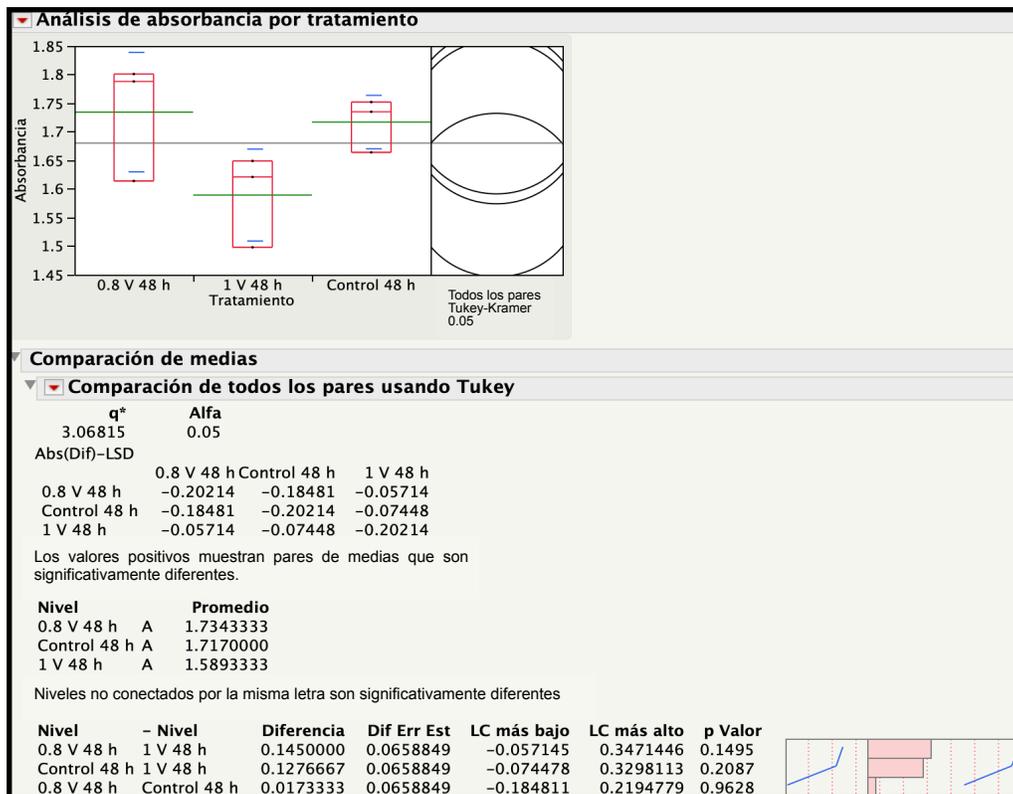


Figura 41. Prueba de Tukey para absorbancia en tiempo 48 h a 15 y 30 V - biorreactor IV.

6.1.5. Sistema de electrofermentación con campo magnético aplicado de corriente directa (biorreactor V)

Siendo los resultados de absorbancia no favorables del biorreactor IV se prosiguió al diseño y construcción de un nuevo biorreactor de campo magnético llamado biorreactor V. El biorreactor fue construido por la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las campanas S/N, Col. Las Campanas, Querétaro, Qro. El biorreactor consistió en un cilindro embobinado por alambre magneto AWG 24, al que podía controlarse el voltaje aplicado para la generación del campo magnético circundante. Los tratamientos para este sistema fueron de 5, 15 y 25 V correspondientes a 13, 14 y 17 μ Teslas respectivamente. En la Figura 42 puede verse la ilustración y fotografía del biorreactor V. El voltaje aplicado en ese momento fue de 5 V.



Figura 42. Diseño del biorreactor de campo magnético aplicado - biorreactor V.

Como puede verse en la Figura 43 el campo magnético generado por los 5 V no muestra un efecto distinto al control sobre la cinética de crecimiento de la levadura reflejada en absorbancia. Lo que sugiere que no existe un consumo de azúcares mayor ni un aumento en la producción de etanol. En la Figura 44 puede verse que tanto el tiempo de 24 horas como el tiempo 48 horas no existe una diferencia entre tratamiento y control. Esto es corroborado por la prueba de Tukey en la Figura 45, que coloca tanto el tratamiento de 5 V como el control en mismo grupo A. Así como el p valor de 0.7764 confirma que no existe una diferencia significativa entre el tratamiento de 5 V y el control para el tiempo de 24 horas. La misma conclusión se obtiene con el p valor de 0.5086 para el tiempo de 48 h, mostrado en la Figura 46.

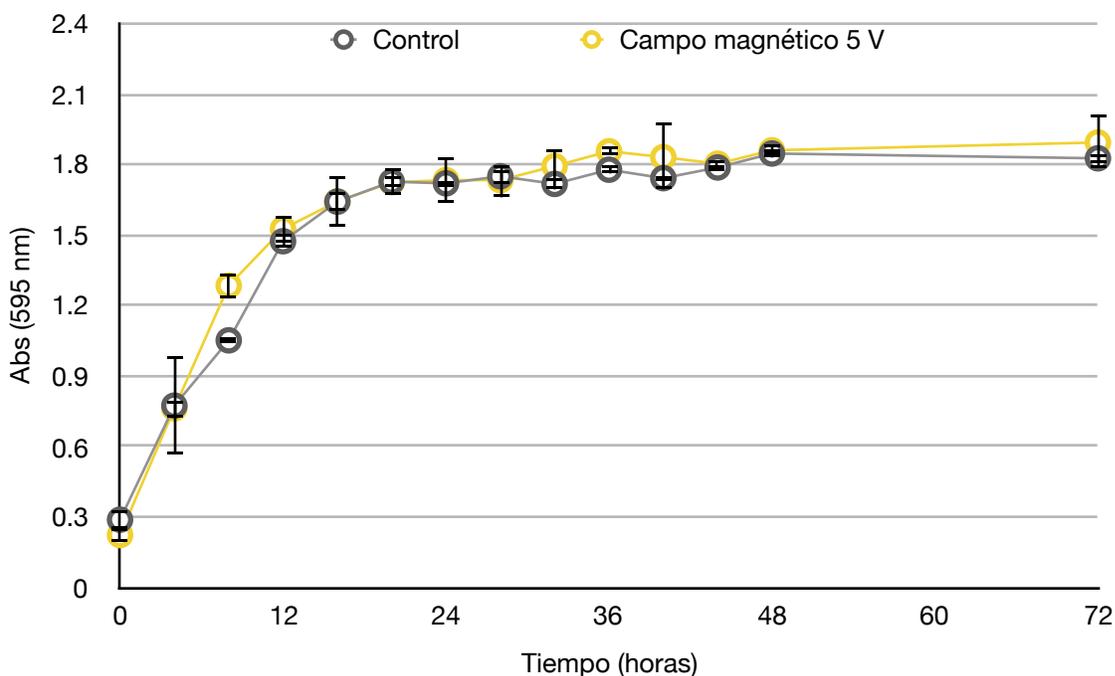


Figura 43. Absorbancia en el tratamiento a 5 V - biorreactor V.

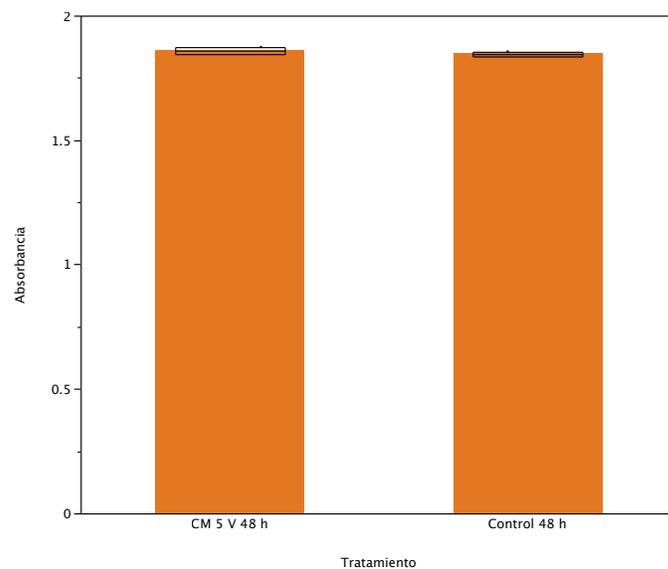
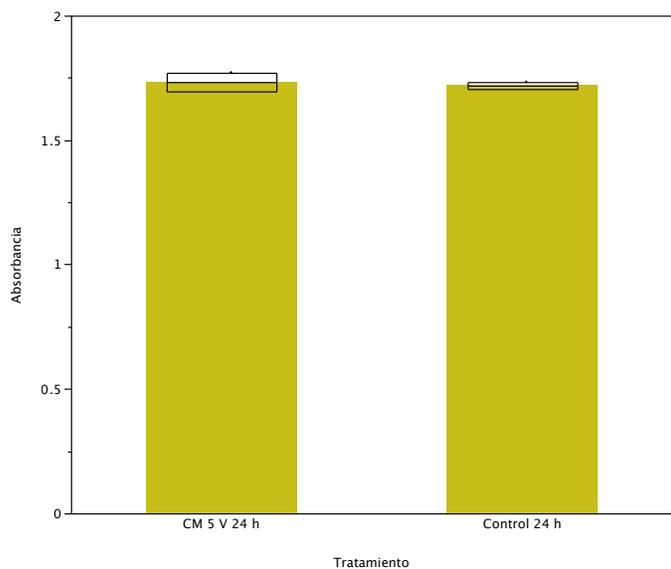


Figura 44. Absorbancias en de tiempo 24 h y tiempo 48 h a 5 V - biorreactor V.

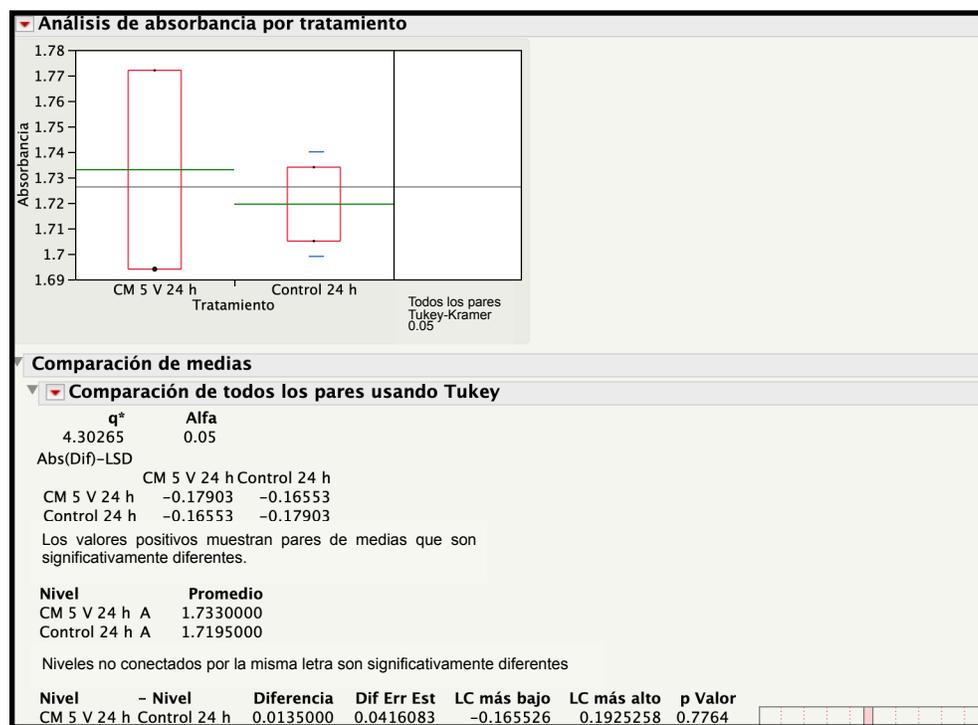


Figura 45. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 5 V - biorreactor V.

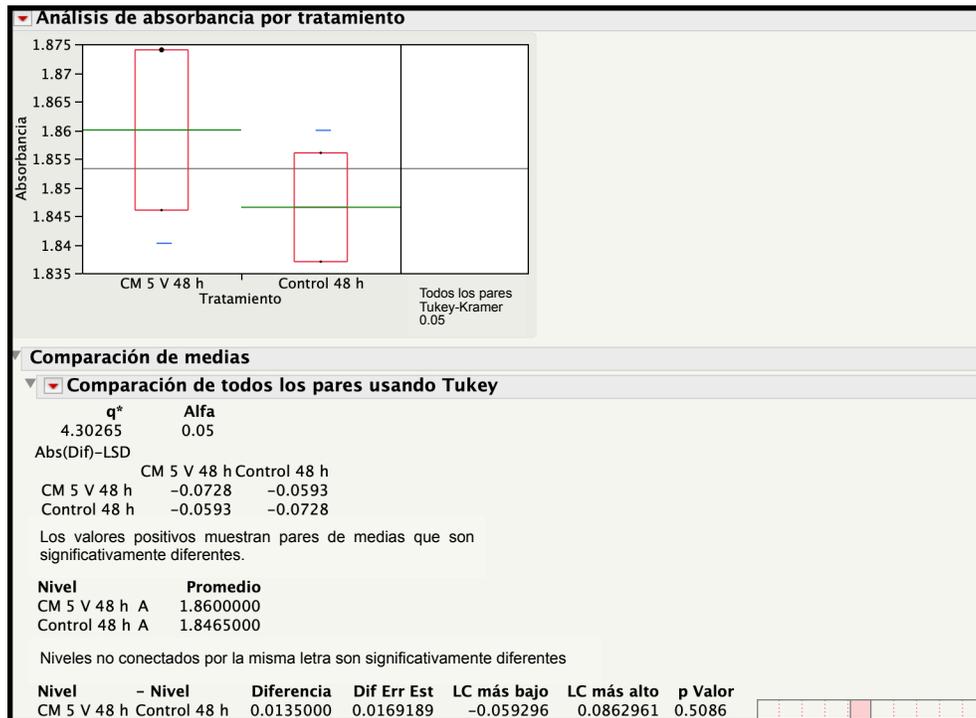


Figura 46. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 5 V - biorreactor V.

Para el tratamiento del campo magnético generado por los 15 V aplicados en el sistema de fermentación del biorreactor V se observa nuevamente que no existe una diferencia en las cinéticas de crecimiento. En la Figura 47 se observa cómo la levadura control y la levadura que se encuentra el campo magnético tienen el mismo comportamiento en su crecimiento de biomasa, que sugiere un mismo consumo de azúcares y producción de bioetanol. En la Figura 48 puede verse que no hay una separación entre tratamiento y control para los tiempos de 24 horas y 48 horas. La prueba de Tukey, mostrada en las Figuras 49 y 50 para los mismos tiempos, lo corrobora al clasificarlos bajo la misma letra A; además, el p valor 0.7890 para las 24 horas y 0.7505 para las 48 horas indican que no existe una diferencia significativa entre el tratamiento de 15 V aplicados y el control.

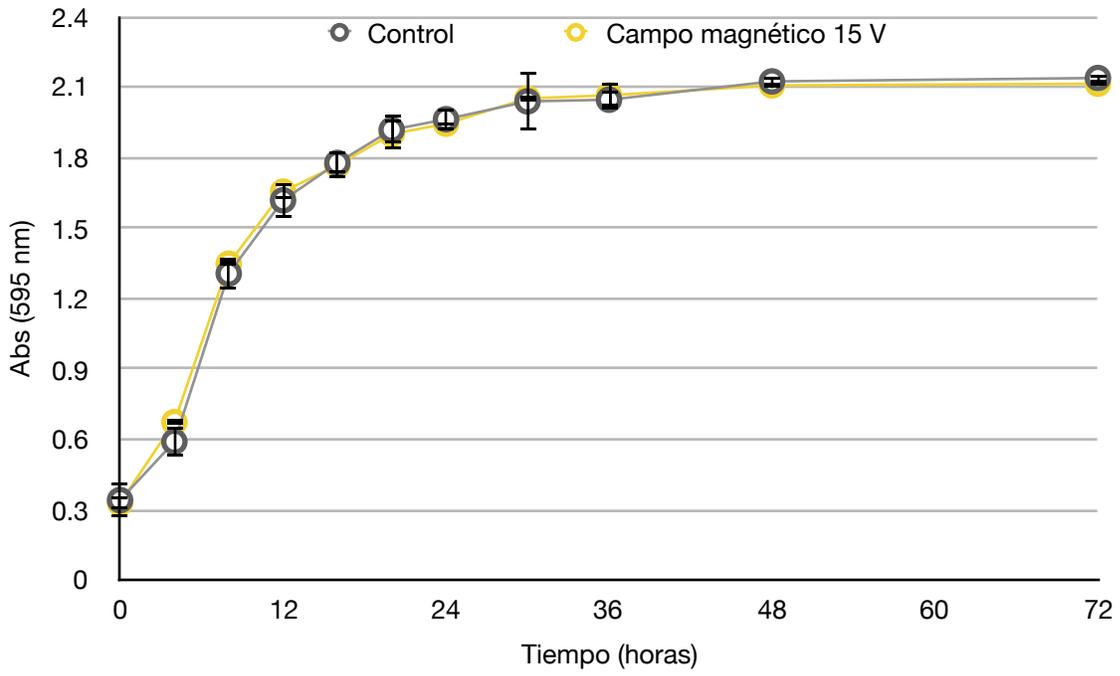


Figura 47. Absorbancia en el tratamiento a 15 V - biorreactor V.

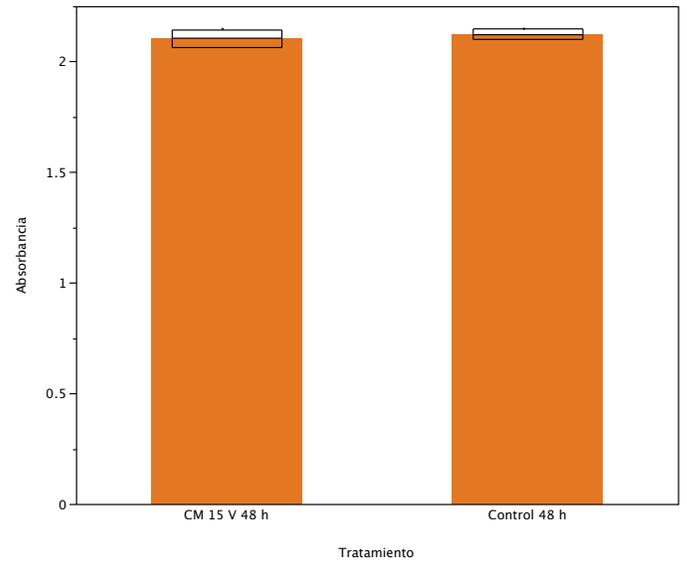
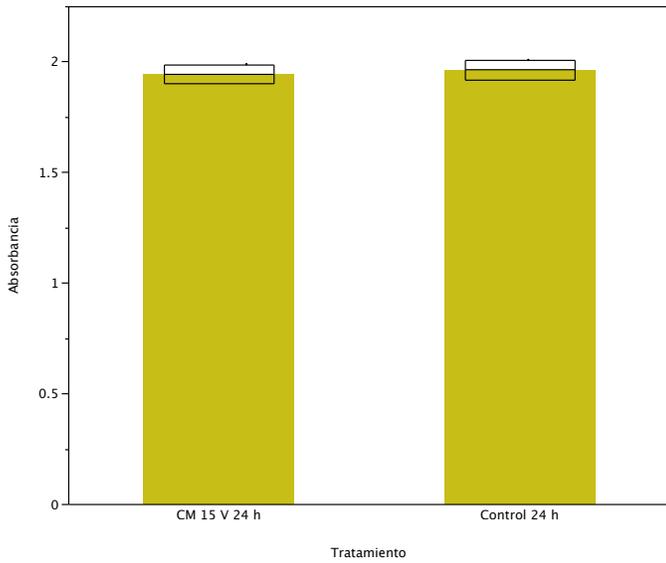


Figura 48. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h a 15 V - biorreactor V.

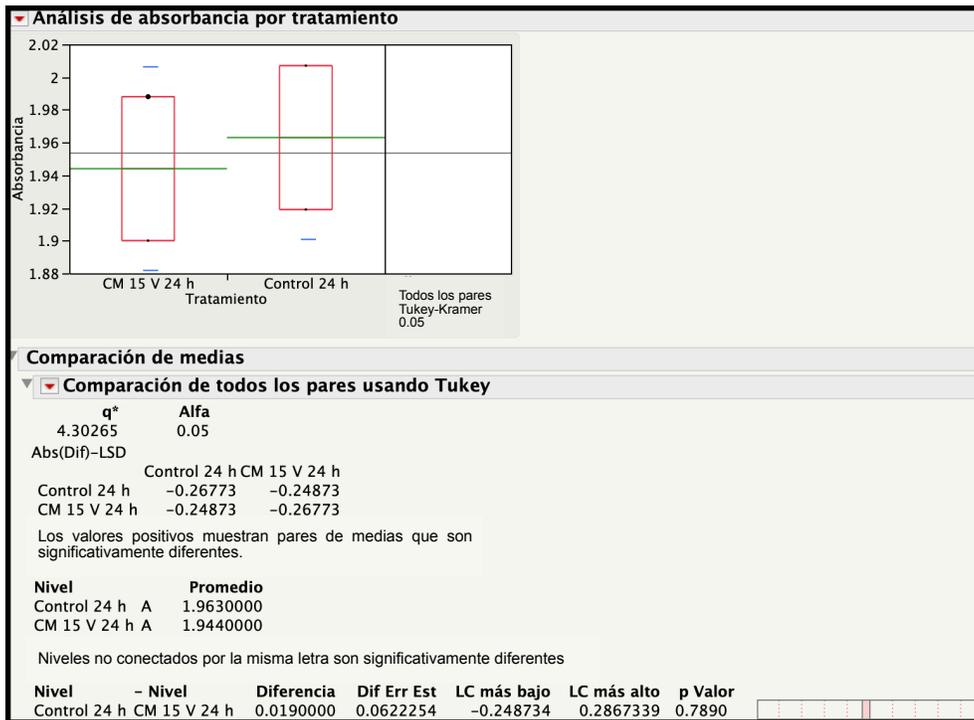


Figura 49. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 15 V - biorreactor V.

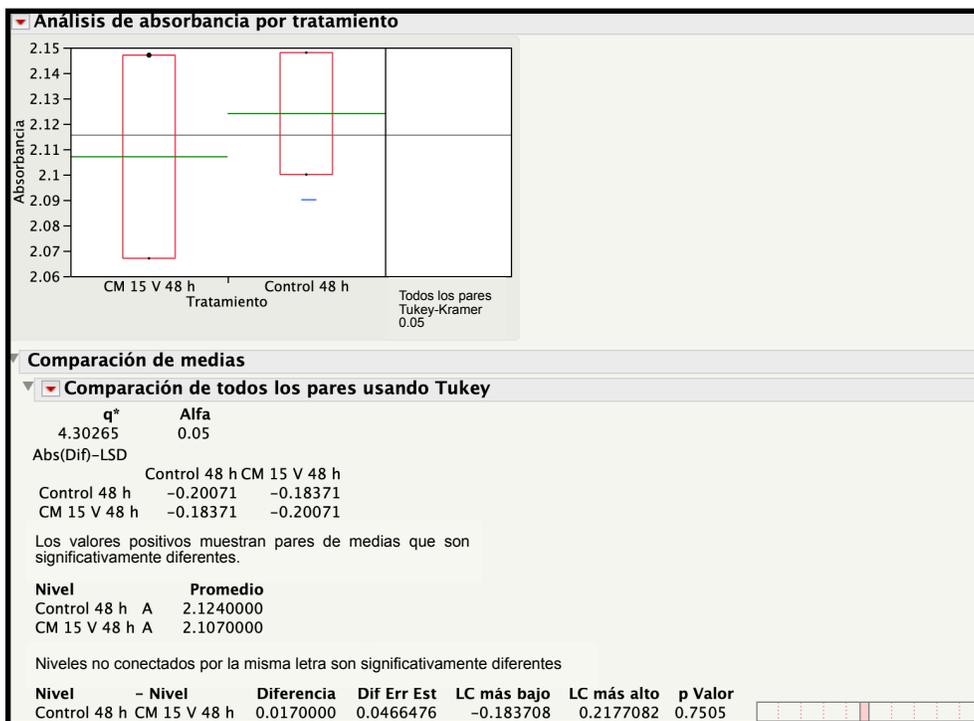


Figura 50. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 15 V - biorreactor V.

En el tratamiento de campo magnético generado por los 25 V aplicados al sistema de fermentación puede observarse en la Figura 51 cómo ambos tratamientos tienen un mismo comportamiento en la cinética de crecimiento. Si bien es posible notar un crecimiento mayor en el campo magnético, el error que presentan los controles lo solapan haciendo que sean iguales. Esto puede verse de manera más clara en la Figura 52 para los tiempos de 24 y 48 horas que no están separados entre sí. La prueba de Tukey mostrada en las Figuras 53 y 54 para este tratamiento confirma que control y tratamiento de 25 V no son diferentes entre sí al pertenecer al mismo grupo A; esto ocurre tanto para el tiempo de 24 horas como para el tiempo de 48 horas. Finalmente, el p valor de 0.2523 y 0.5042 correspondientes a los tiempos de 24 y 48 horas respectivamente, indican que no hay diferencia entre el tratamiento a 25 V y el control.

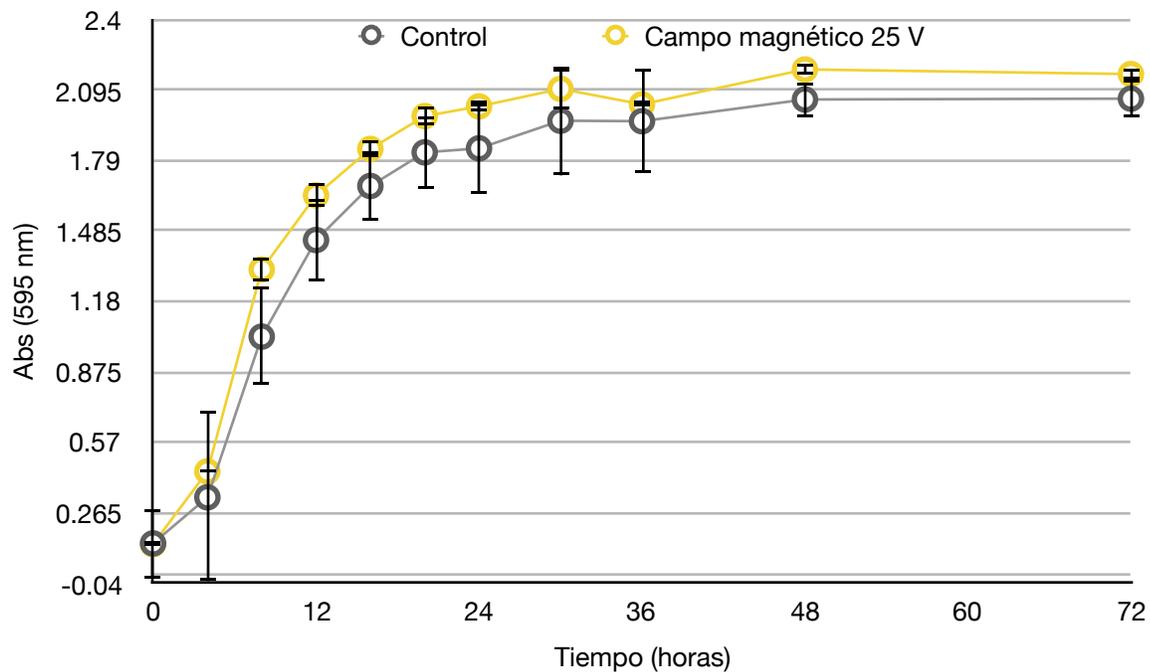


Figura 51. Absorbancia en el tratamiento a 25 V - biorreactor V.

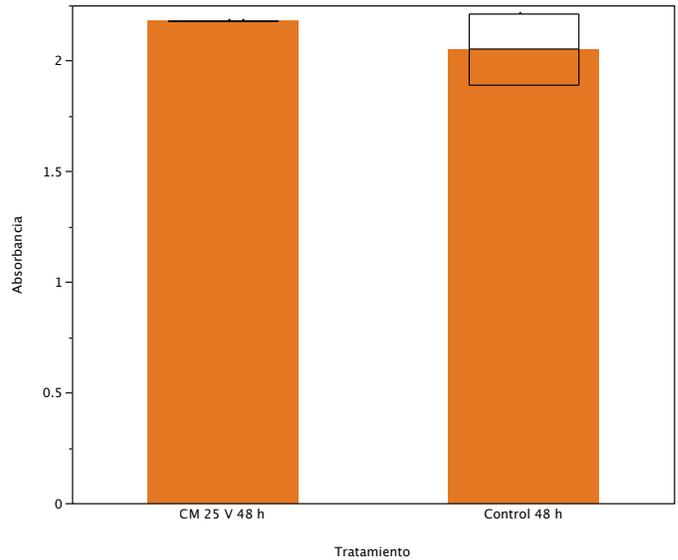
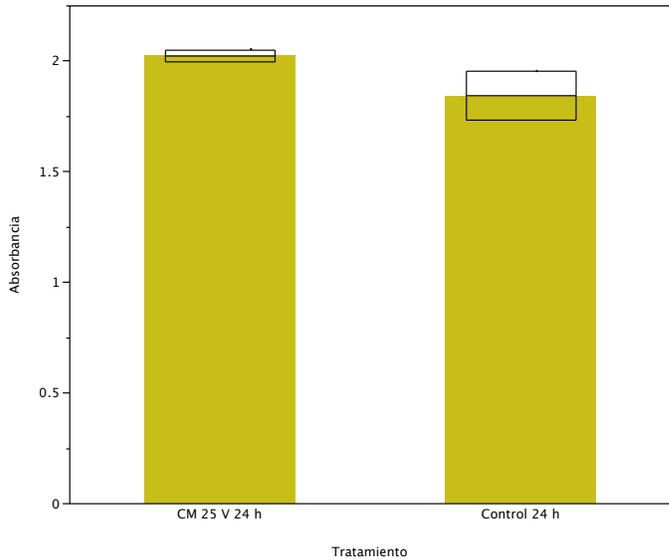


Figura 52. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h a 25 V - biorreactor V.

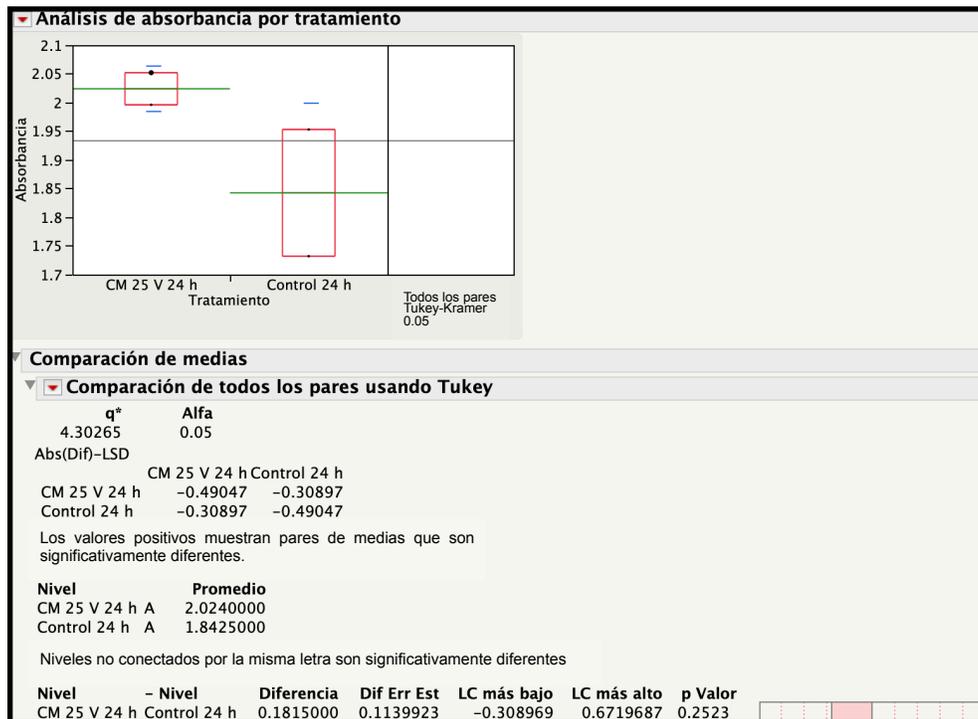


Figura 53. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h a 25 V - biorreactor V.

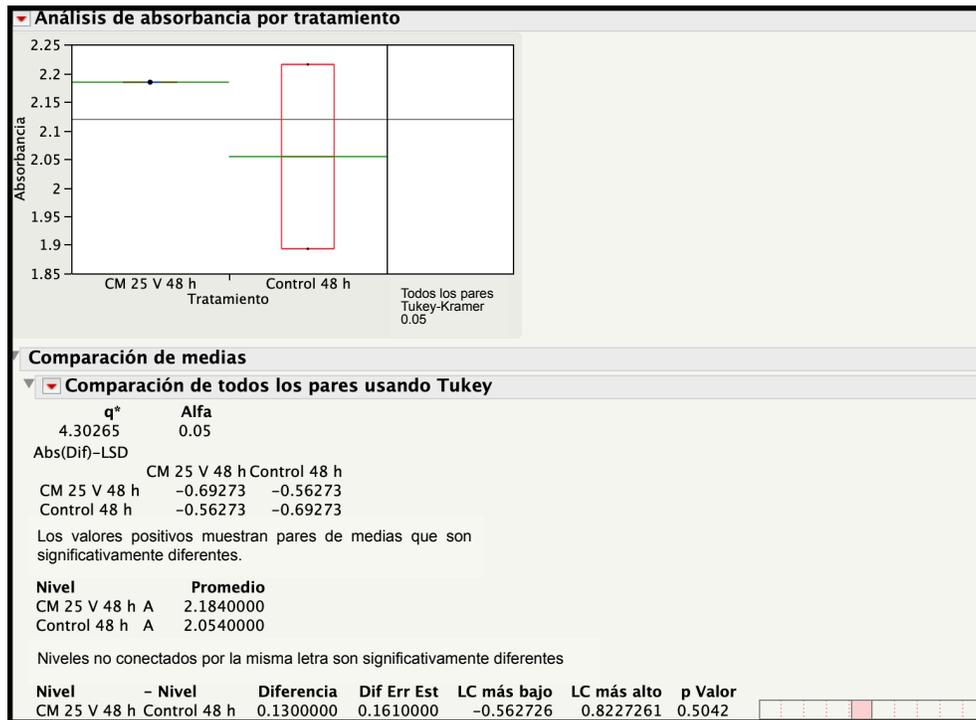


Figura 54. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h a 25 V - biorreactor V.

6.1.6. Sistema de electrofermentación con campo magnético aplicado de corriente alterna (biorreactor VI)

Comprobados los resultados del biorreactor V y asociados al bajo campo magnético generado se hizo necesaria la adquisición de un equipo con una mayor generación de campo magnético. La construcción del biorreactor de campo magnético de corriente alterna es un sistema sencillo en el que los biorreactores son colocados sobre la fuente generadora constante de 130 μ Teslas. Los biorreactores de 100 mL de capacidad se mantuvieron en tratamiento hasta cumplidas las 72 horas de fermentación. En la Figura 55 puede verse la ilustración de este sistema de fermentación.

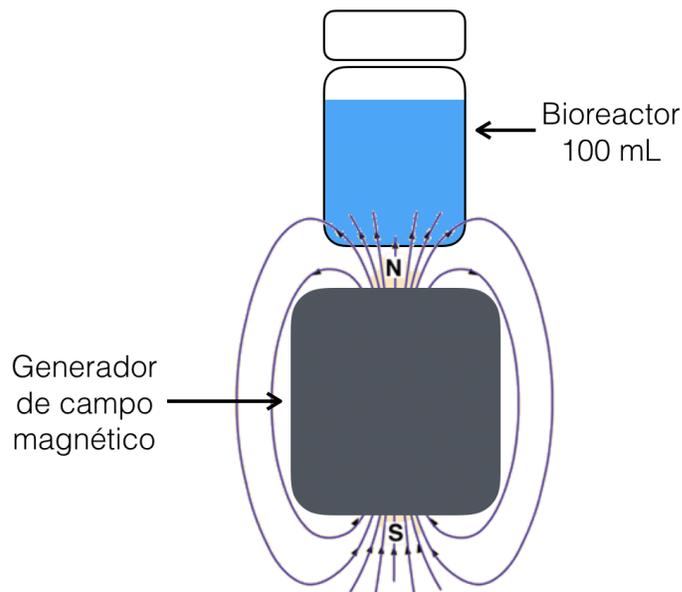


Figura 55. Diseño del biorreactor de campo magnético aplicado - biorreactor VI.

El aumento en el campo magnético por el generador de corriente alterna no refleja un aumento o una disminución en el crecimiento por absorbancia de la levadura. Lo anterior puede verse en la Figura 56 que muestra un mismo comportamiento para la cinética de crecimiento del control y el tratamiento con el campo magnético con 130 μ Teslas. En la Figura 57 puede observarse que no existe una diferencia del tratamiento con el control en los tiempos de 24 y 48 horas. Finalmente, la prueba de Tukey, mostrada en las Figuras 58 y 59 para los tiempos de 24 y 48 horas respectivamente, se observa que no existe una diferencia significativa entre control y tratamiento de 130 μ Teslas pues son clasificados el mismo grupo A. Esto se confirma con los valores p de 0.2137 y 0.2201 correspondientes a 24 y 48 horas respectivamente, determinando que no son distintas las medias del control y tratamiento de 130 μ Teslas entre sí.

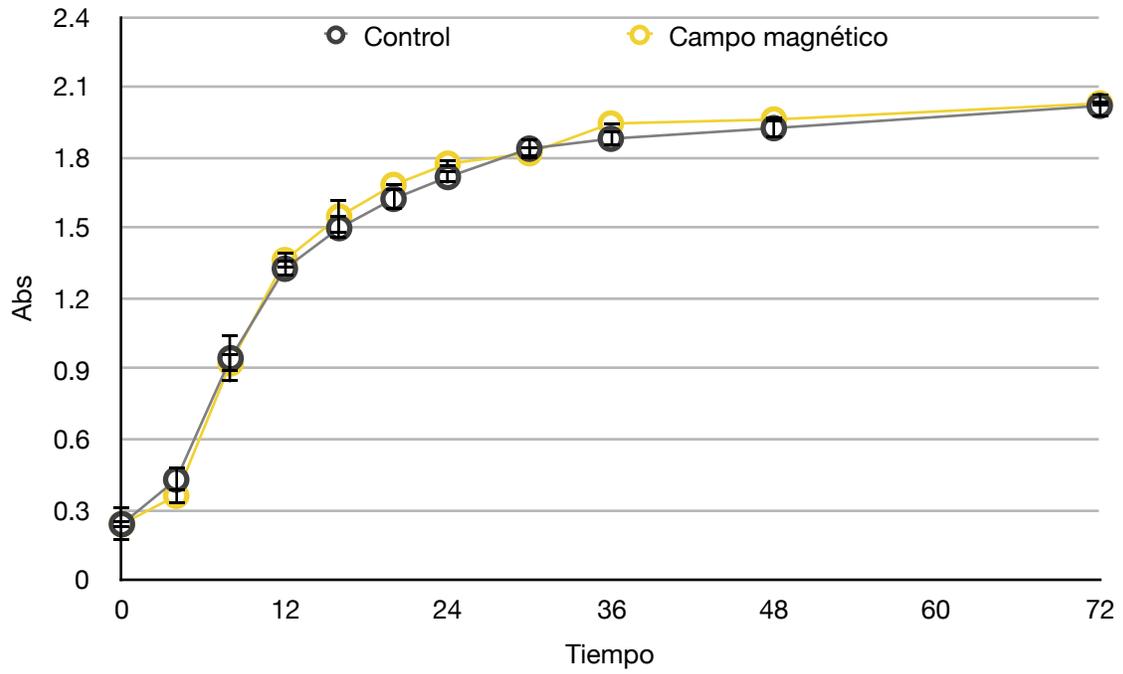


Figura 56. Absorbancia en el tratamiento con 130 μ Teslas - biorreactor VI.

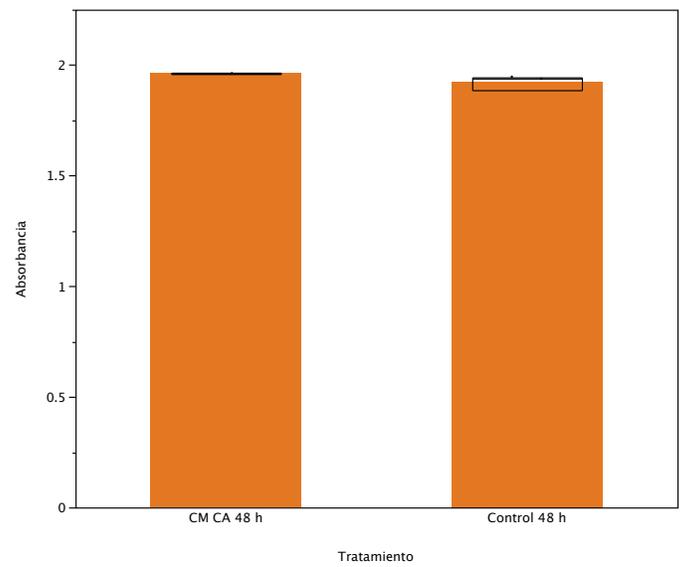
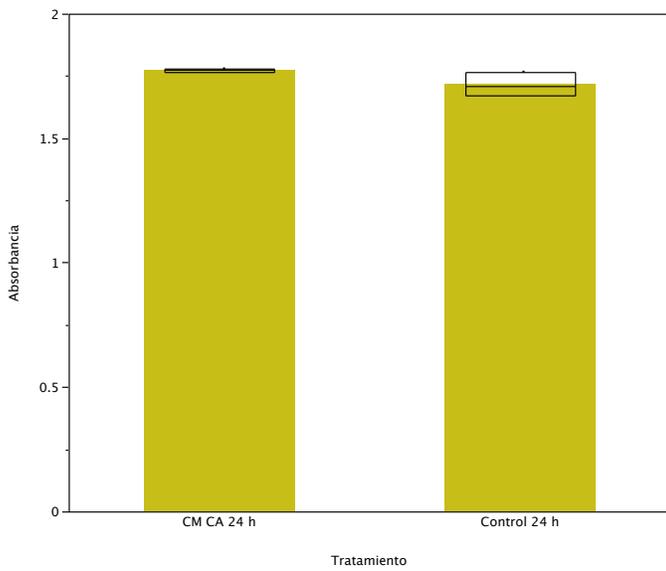


Figura 57. Absorbancias en tiempo 24 h y tiempo 48 h con 130 μ Teslas - biorreactor VI.

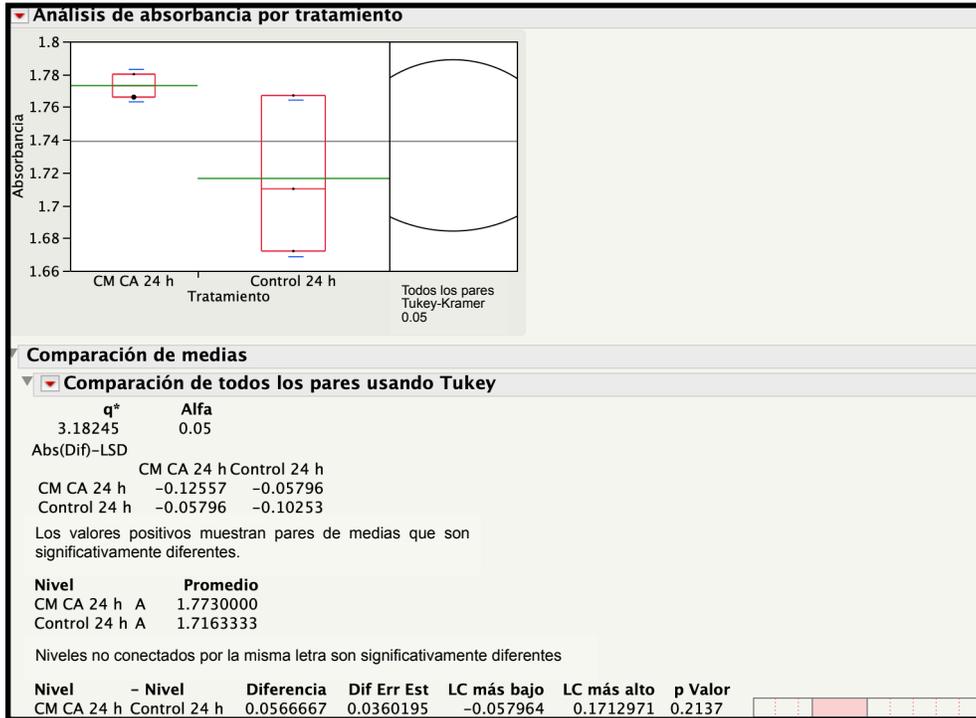


Figura 58. Prueba de Tukey al tiempo 24 h con 130 μ Teslas - biorreactor VI.

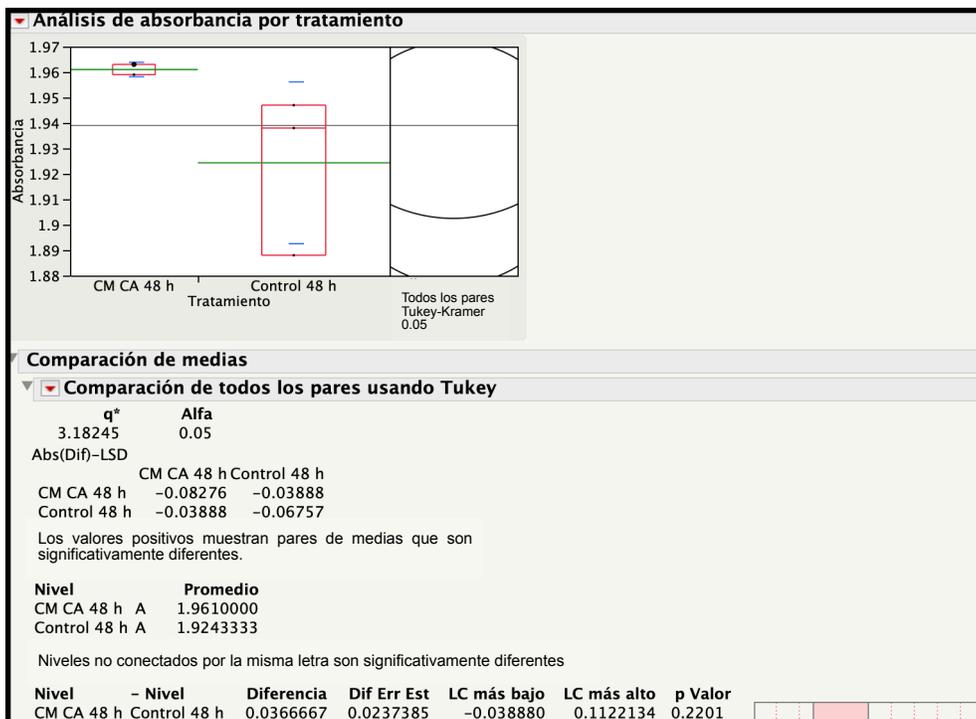


Figura 59. Prueba de Tukey al tiempo 48 h con 130 μ Teslas - biorreactor VI.

6.1.7. Biorreactor de electrodos de grafito y corriente aplicada (biorreactor VII)

Una vez descartados los sistemas electrostáticos y de campo magnético se optó por construir un biorreactor al que pudiese variar una corriente a electrodos de carbono. La capacidad del biorreactor fue 100 mL, y el área aplicada del electrodo fue de 40 cm² al medio circundante. La ilustración y fotografía del biorreactor puede observarse en la Figura 60. Después de un escrutinio de amperajes se definieron los mejores resultados de fermentación a los 5 mA y 7 mA. Amperajes más altos que éstos provocaron la degradación de los electrodos de grafito en menos de 24 horas.

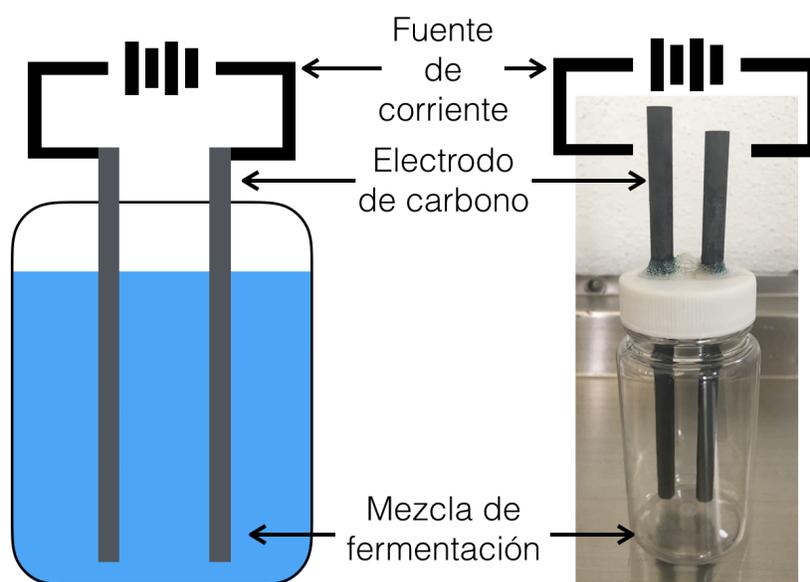


Figura 60. Diseño del biorreactor de corriente eléctrica aplicada - biorreactor VII.

Como puede verse en la Figura 61 los tratamientos de 5 mA y 7 mA tienen un crecimiento reflejado en absorbancia mayor al control. Antes de las 24 horas la absorbancia de los dos tratamientos había superado la máxima absorbancia de los controles a las 48 horas. Este dato refleja un mayor crecimiento de biomasa, así como un posible mayor consumo de azúcares y mayor producción de bioetanol. En la Figura 62 se observa una diferencia de 1.25 veces más crecimiento por parte de los tratamientos que el control.

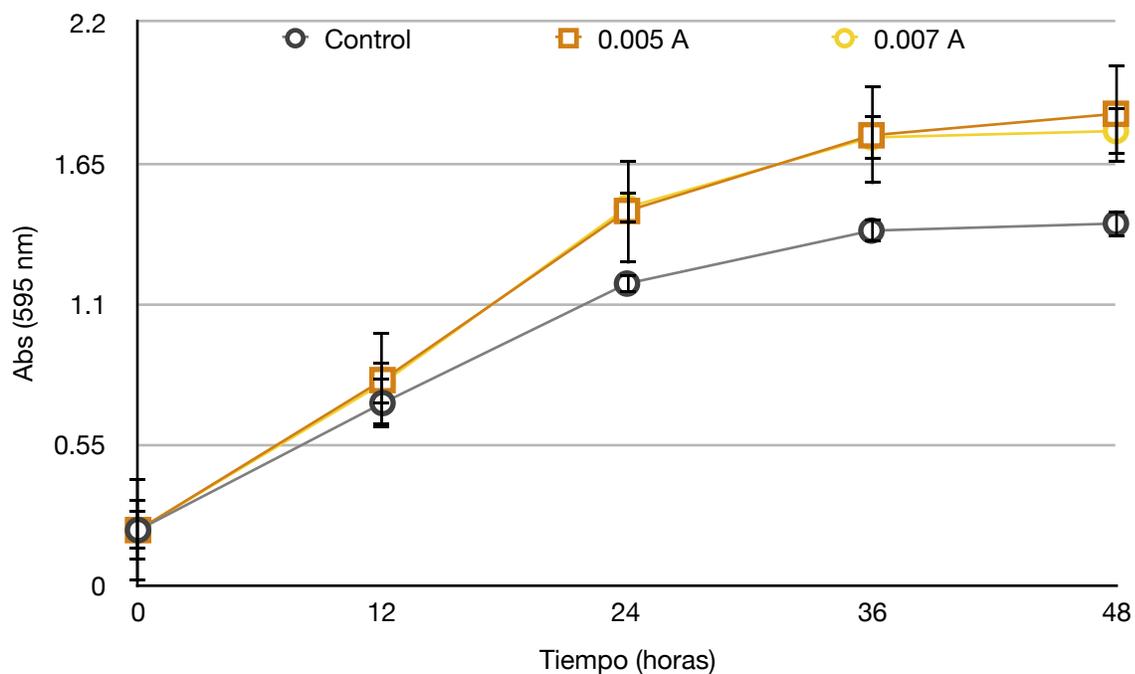


Figura 61. Absorbancia en el tratamiento con corriente eléctrica - biorreactor VII.

Sin embargo la Figura 63 muestra por la prueba de Tukey que todas las medias son agrupadas en A, para el tiempo de 24 horas. Lo que indica que no existe una diferencia significativa entre la corriente aplicada y el control en ese tiempo. De igual manera los valores altos de p nos indica que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos y control. Cabe mencionar que el p valor 0.9903 que compara el tratamiento de 5 mA y 7 mA es un fuerte indicativo de la similitud de los tratamientos en su respuesta de absorbancia.

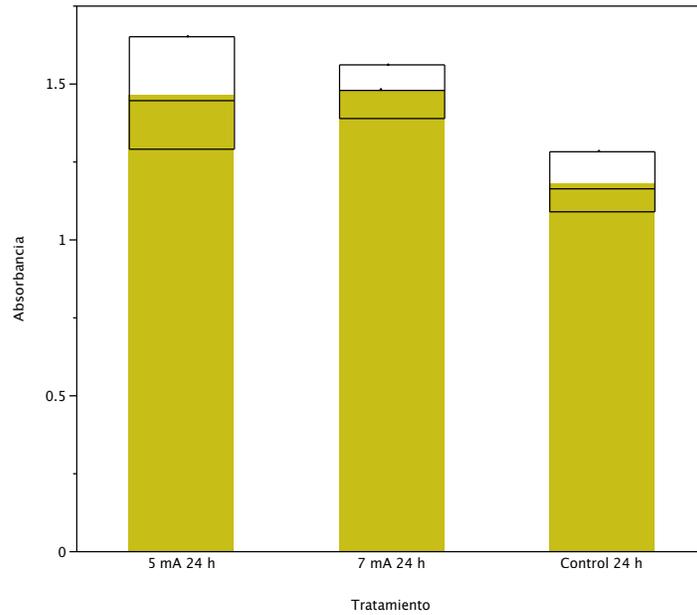


Figura 62. Absorbancias en tiempo 24 h con corriente eléctrica - biorreactor VII.

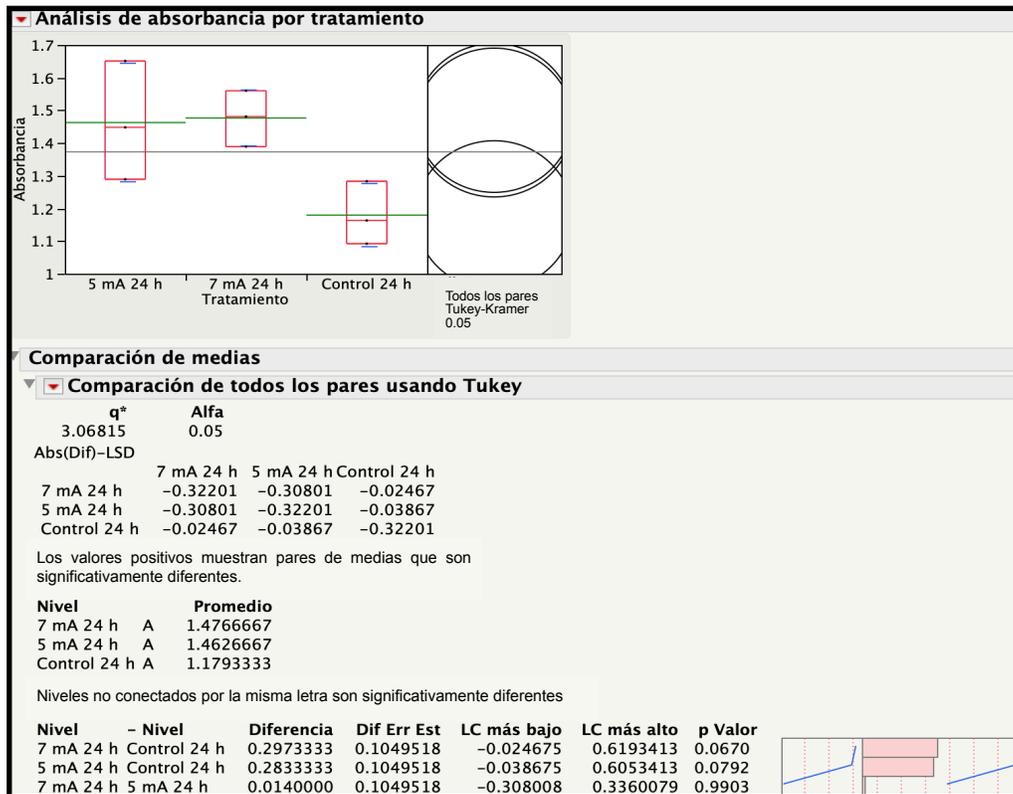


Figura 63. Prueba de Tukey al tiempo 24 h con corriente eléctrica - biorreactor VII.

Para el tiempo de 48 horas, que se muestra en la Figura 61, puede verse claramente la diferencia entre el control y los tratamientos de 5 y 7 mA. Este argumento es sustentado con la Figura 64 que muestra una separación de los tratamientos y el control, en donde el tratamiento de 5 mA es 1.3 veces mayor que el control y para el tratamiento de 7 mA 1.25 veces mayor que el control. Sin embargo, es notorio como los tratamientos de 5 mA y 7 mA no son distintos entre sí. La prueba confirmatoria de Tukey, en la Figura 65, corrobora qué tratamientos agrupados en A son diferentes del control en B. El p valor de 0.0134 del control comparado con 5 mA indica una diferencia significativa en sus medias; un comportamiento similar se observa para el p valor de 0.0283 resultante de la comparación entre el control y el tratamiento de 7 mA. Finalmente, el p valor resultante de la comparación de medias del tratamiento de 5 mA y 7 mA de 0.7936 indica que los tratamientos entre sí no son distintos, es decir no hay una diferencia significativa.

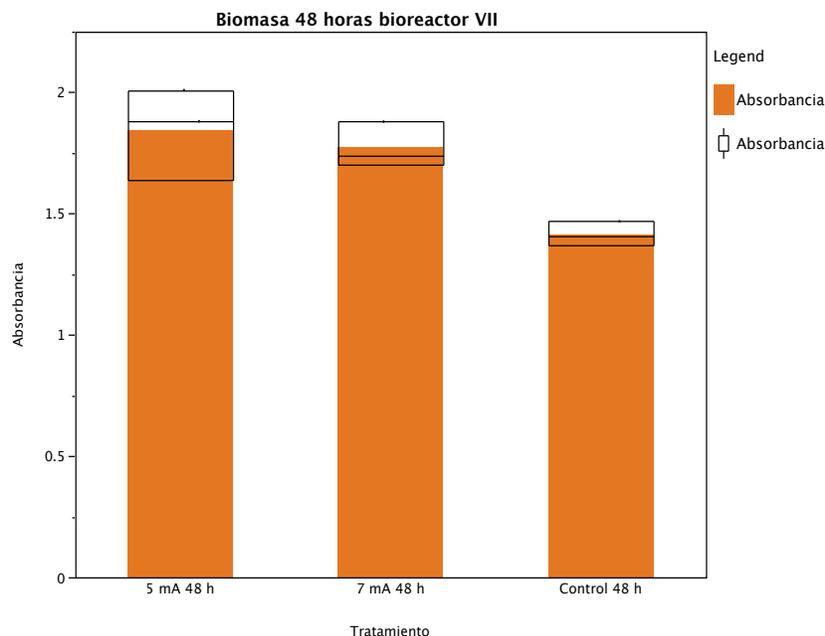


Figura 64. Absorbancias en tiempo 48 h con corriente eléctrica - biorreactor VII.

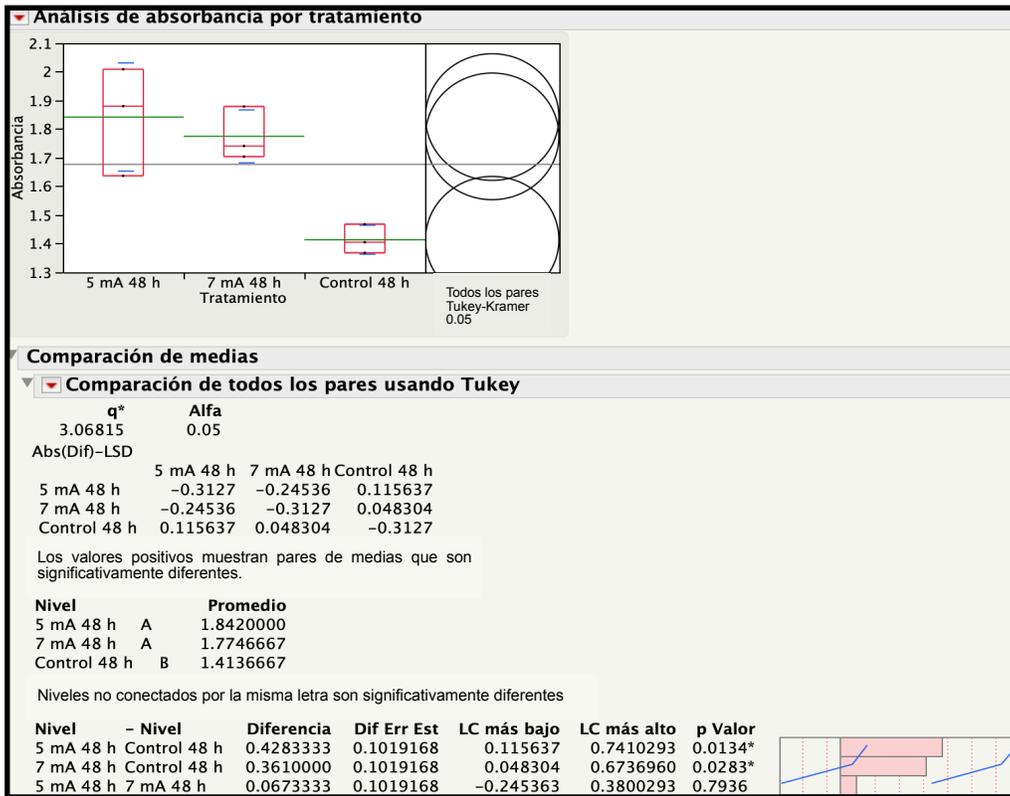


Figura 65. Prueba de Tukey al tiempo 48 h con corriente eléctrica - biorreactor VII.

6.2 Objetivo II

6.2.1. El segundo objetivo del presente trabajo es valorar el efecto de diferentes voltajes o corrientes aplicados al sistema de electrofermentación por lote sobre la producción de bioetanol y consumo de carbono de *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación se presentan los resultados obtenidos en relación a este objetivo particular.

Dado que la aplicación de corriente a 5 y 7 mA tenía un efecto positivo en el crecimiento de biomasa se prosiguió a cuantificar el consumo de carbono por °Bx. En la Figura 66 se observa un consumo ligeramente mayor de azúcares para los tratamientos de 5 y 7 mA, comparados con el control. En la Figura 67 puede verse nuevamente esta ligera diferencia a las 24 horas. Sin embargo, la prueba de Tukey, en la Figura 68, muestra que las medias de controles y tratamientos están agrupados en el mismo conglomerado A. Asimismo, los valores de p altos indican que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos y los controles. Entre los valores p más altos está el 0.9135, resultante de la comparación de medias de los tratamientos de 5 mA y 7 mA indica que estos tratamientos son prácticamente indistintos entre sí.

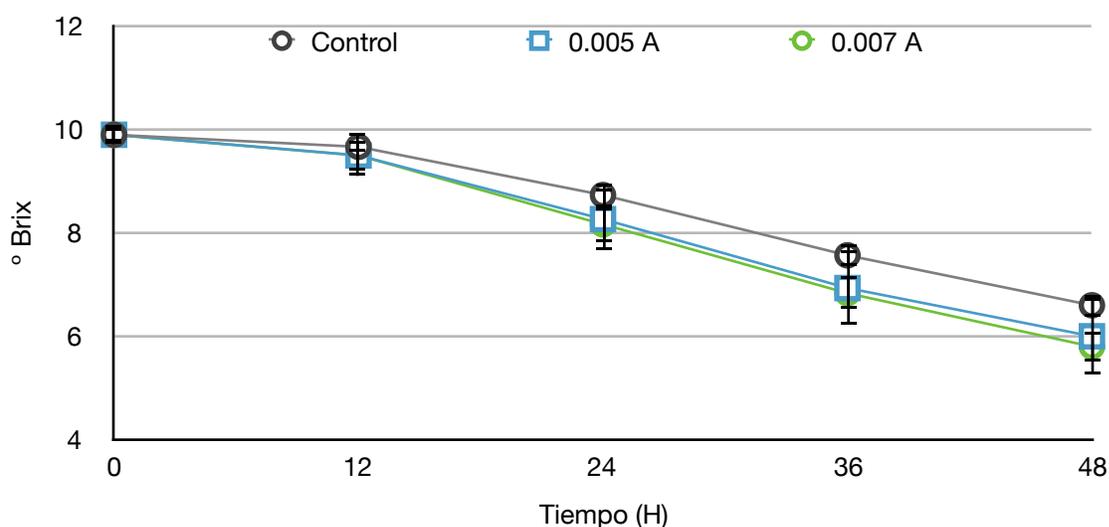


Figura 66. Consumo de carbono con corriente eléctrica - biorreactor VII.

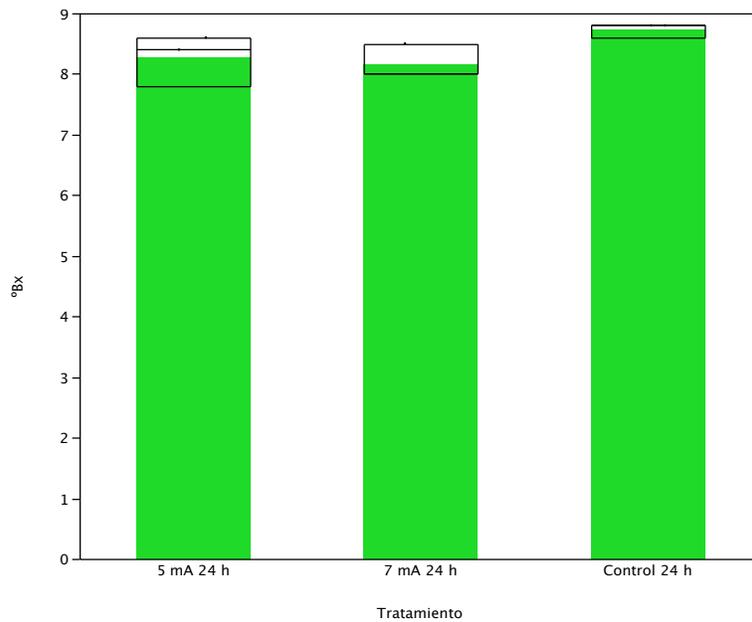


Figura 67. Consumo de carbono al tiempo 24 h con corriente eléctrica - biorreactor VII.

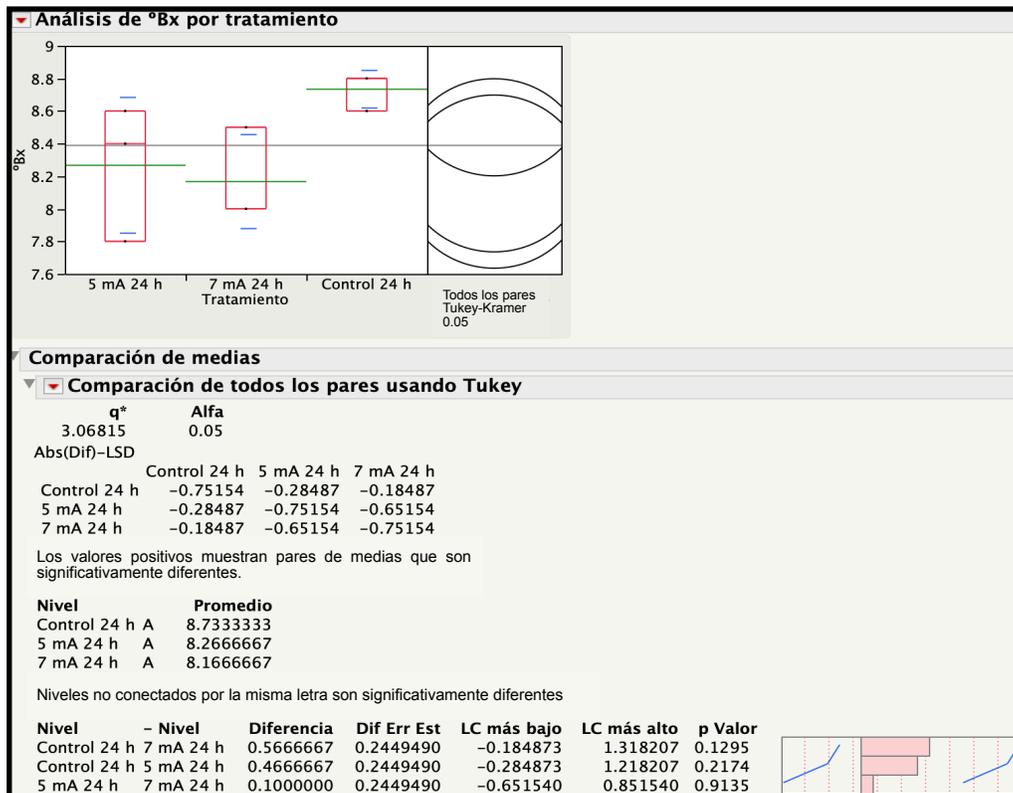


Figura 68. Prueba de Tukey para azúcares al tiempo 24 h - biorreactor VII.

Para las 48 horas de fermentación con corriente eléctrica se observa la Figura 69 que el control tiene un consumo menor de azúcares. Si bien la diferencia no es muy marcada las variaciones de las muestras afectan la diferencia entre tratamientos y control. La prueba de Tukey, mostrada en la Figura 70, agrupa a ambos tratamientos y controles en el mismo conglomerado A. Por su parte, el p valor para todas las comparaciones de medias es alto lo que indica que no hay una diferencia significativa entre ellos. Cabe mencionar que el p valor de la comparación del control con el tratamiento de 7 mA es de 0.1689, lo da una pauta para lograr una distinción entre estas medias al hacer el flujo de corriente más constante, pudiendo así disminuir la variabilidad en el muestreo, y por ende confirmar que los tratamientos son diferentes entre sí.

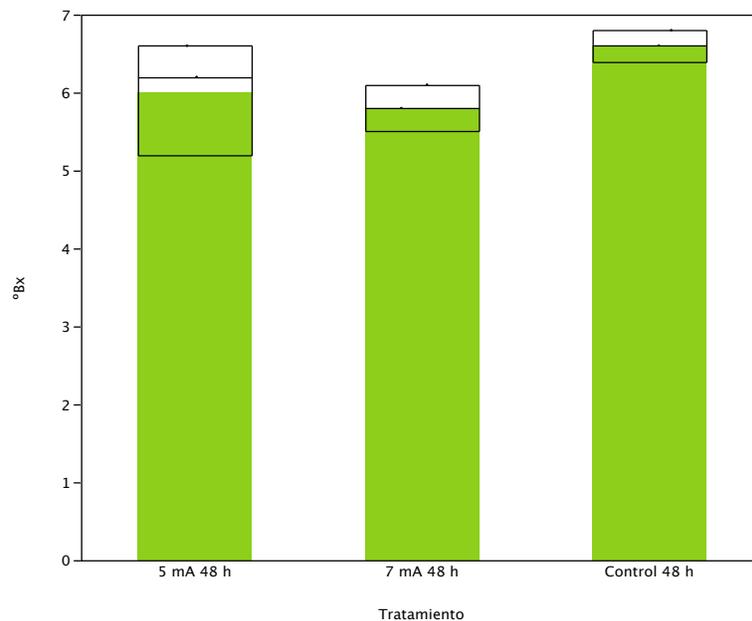


Figura 69. Consumo de carbono al tiempo 48 h con corriente eléctrica- biorreactor VII.

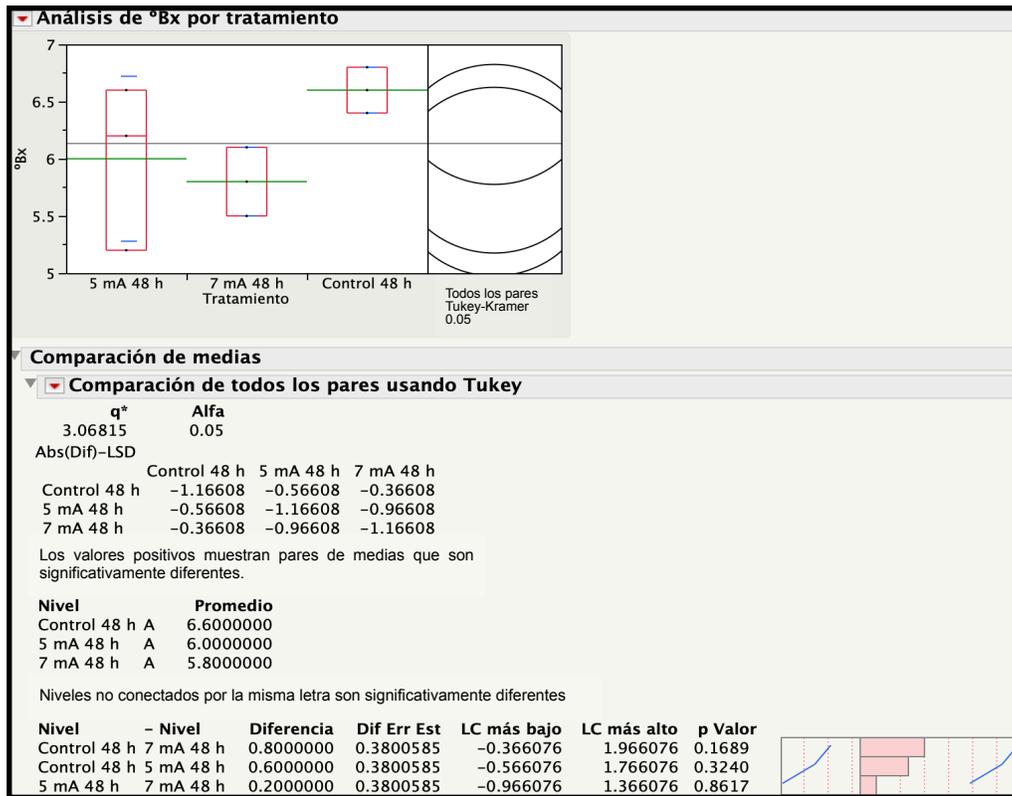


Figura 70. Prueba de Tukey para azúcares al tiempo 48 h - biorreactor VII.

Para la cuantificación de bioetanol se hizo uso de espectroscopía infrarroja (IR), técnica por la cual es posible identificar los grupos funcionales mediante enlaces, como las tensiones C-O características de los alcoholes. Los picos característicos de los alcoholes primarios se encuentran entre 1030 a 1050 cm^{-1} . El fondo que se eligió para las muestras fue el medio utilizado en las fermentaciones. Cabe mencionar que para facilitar la interpretación de los espectrogramas se ingresó al programa solamente una de las réplicas. Las curvas de calibración fueron de 0, 2, 4 y 6 % de etanol. La curva fue elaborada con la misma concentración de azúcares que el medio de fermentación. Las muestras a cuantificar fueron las tomadas a las 12, 24, 36 y 48 horas. Como se observa en la Figura 71 a las 12 horas existen picos mayores a 1035 cm^{-1} para los tratamientos de 5 mA y 7 mA, comparados con el control.

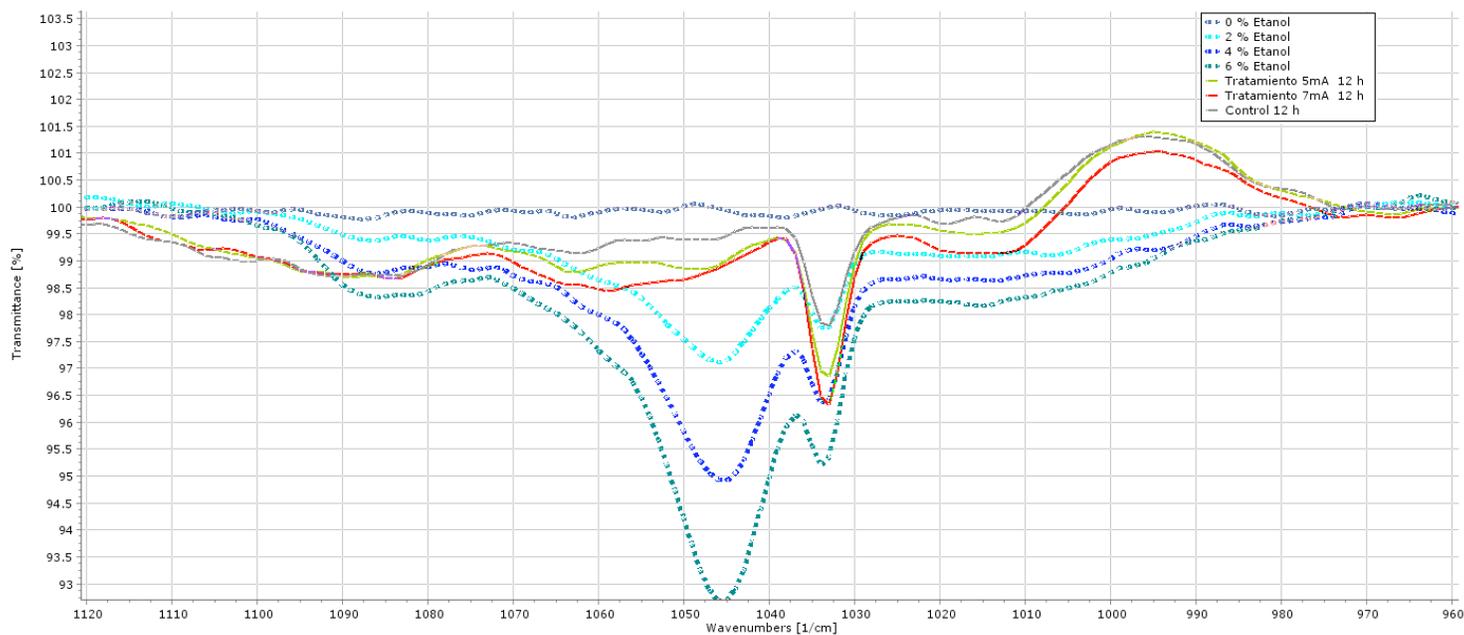


Figura 71. Producción de etanol por IR al tiempo 12 h - biorreactor VII.

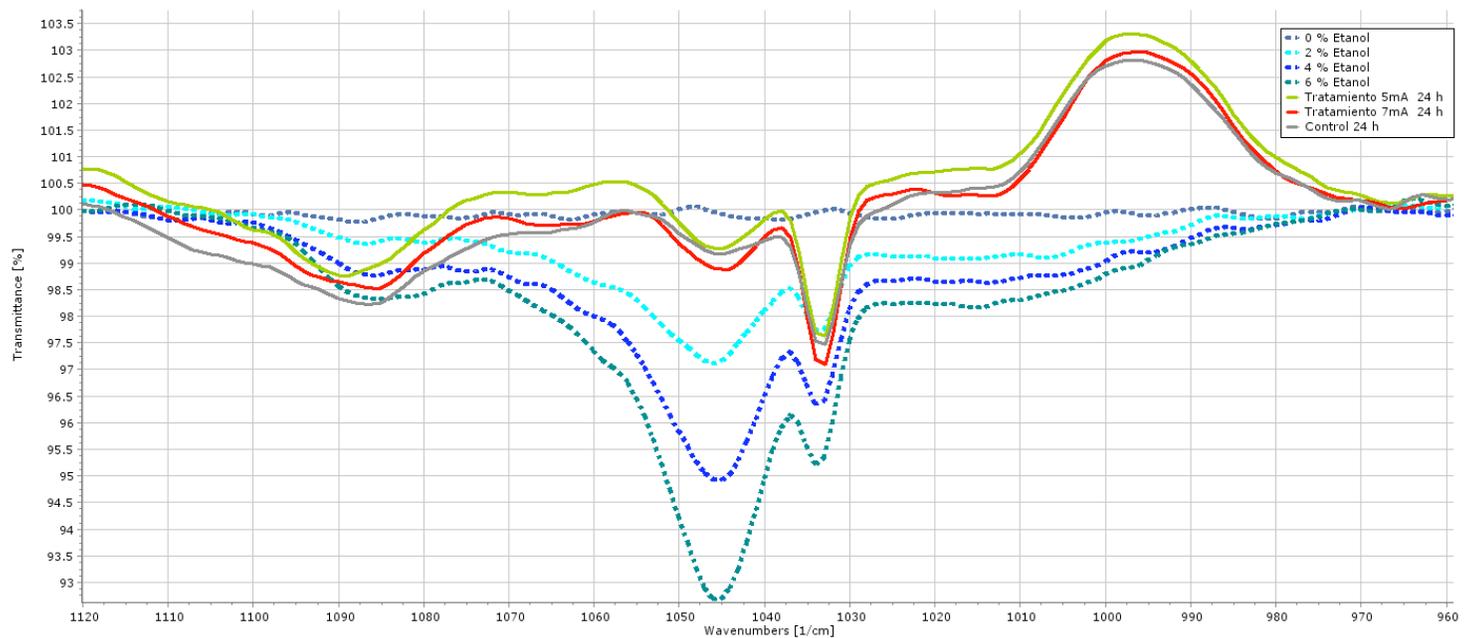


Figura 72. Producción de etanol por IR al tiempo 24 h - biorreactor VII.

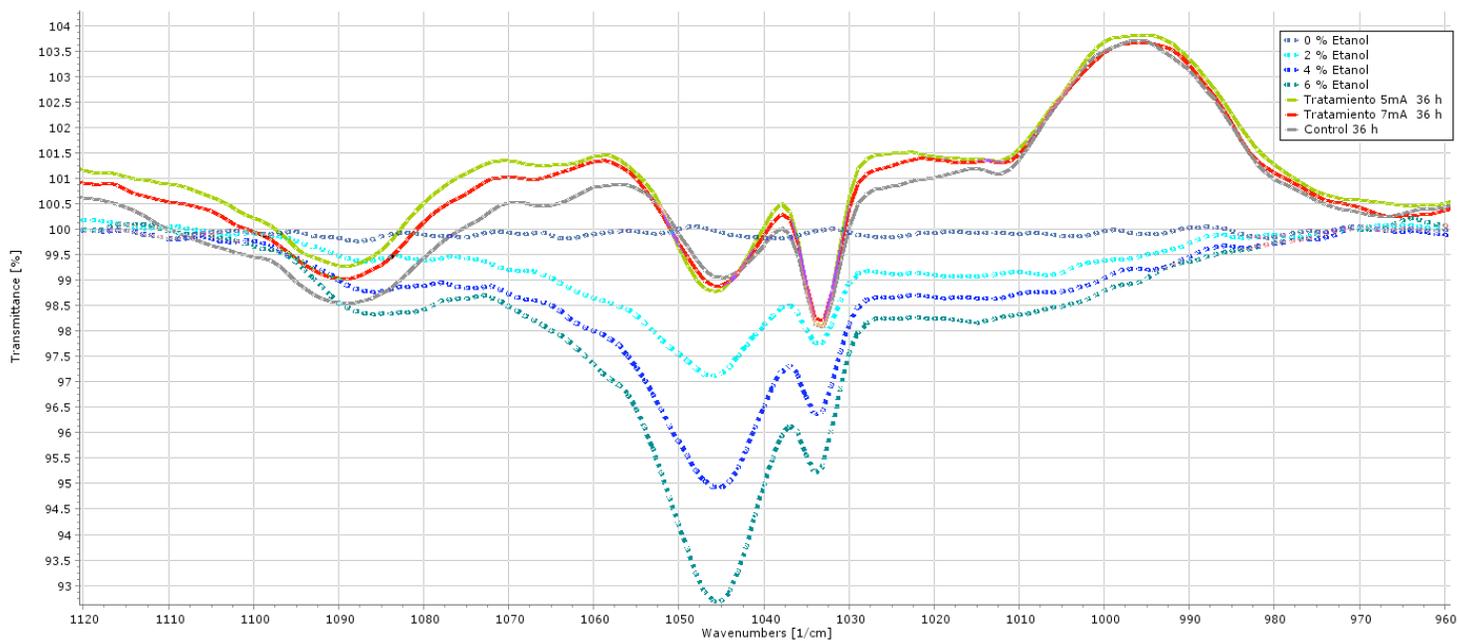


Figura 73. Producción de etanol por IR al tiempo 36 h - biorreactor VII.

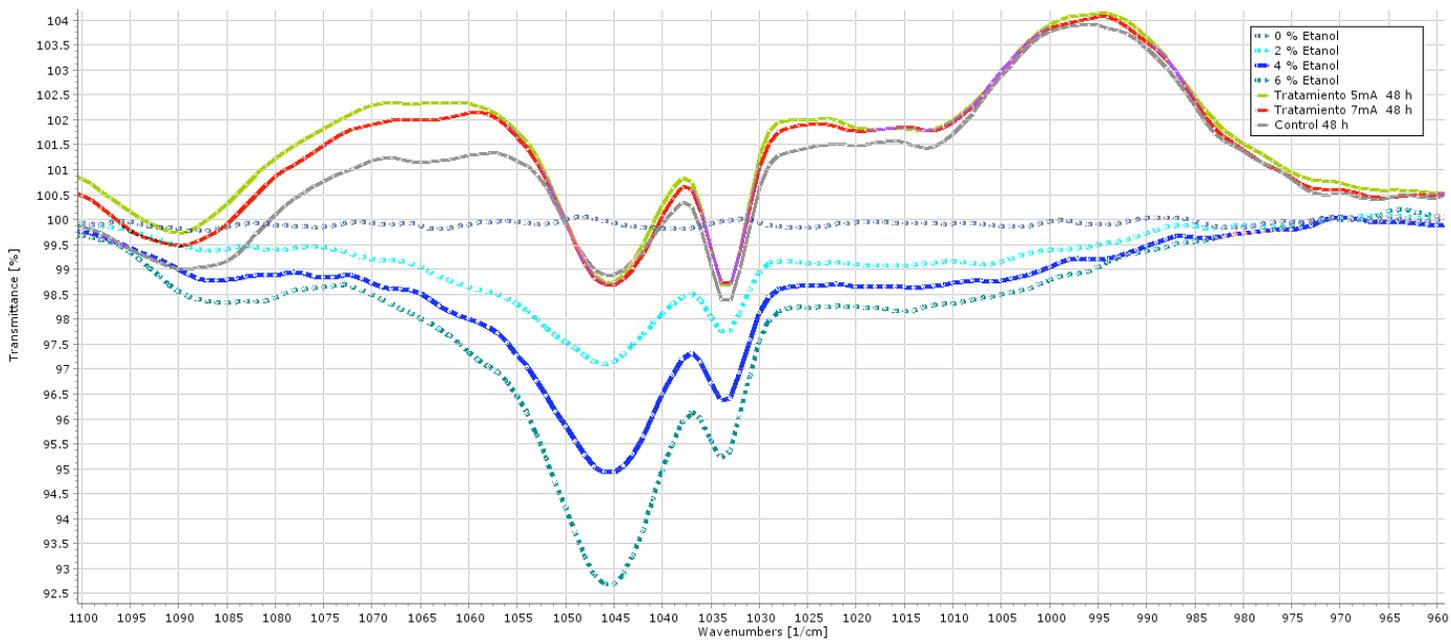


Figura 74. Producción de etanol por IR al tiempo 48 h - biorreactor VII.

Es interesante mencionar que medida que pasaban las horas de fermentación dos mesetas crecieron en el intervalo de 1010 y 970 cm^{-1} y en el intervalo de 1080 a 1050 cm^{-1} . Este crecimiento de las mesetas puede apreciarse en las Figuras 71 a la 74, que puede atribuirse a la diferencia de concentraciones de los compuestos que conformaban el medio de fermentación. Debido a este ruido presente en las mediciones no fue posible obtener una cuantificación en los tiempos de 24, 36 y 48 horas. Sin embargo, en el resultado de las 12 horas fue posible cuantificar las concentraciones relacionadas con las áreas bajo la curva. En la Figura 75 se observa de manera distinguible la separación de los tratamientos comparados con el control. Donde la concentración del tratamiento a 7 mA fue de 3.2 %, a 5 mA del 3 % y el control del 1.6 %. La prueba de Tukey, mostrada en la Figura 76 muestra una separación de los tratamientos de 5 mA y 7 mA en el grupo A, mientras se agrupa al control en el conglomerado B. El p valor menor a 0.0001 correspondiente a 7 mA y el p valor de 0.002 correspondiente a 5 mA, ambos comparados con las medias del control, sugieren una diferencia significativa entre ellos. Por otra parte el p valor de 0.3412 correspondiente a la comparación de medias de los tratamientos de 5 mA y 7 mA sugiere que no existe una diferencia significativa entre ellos.

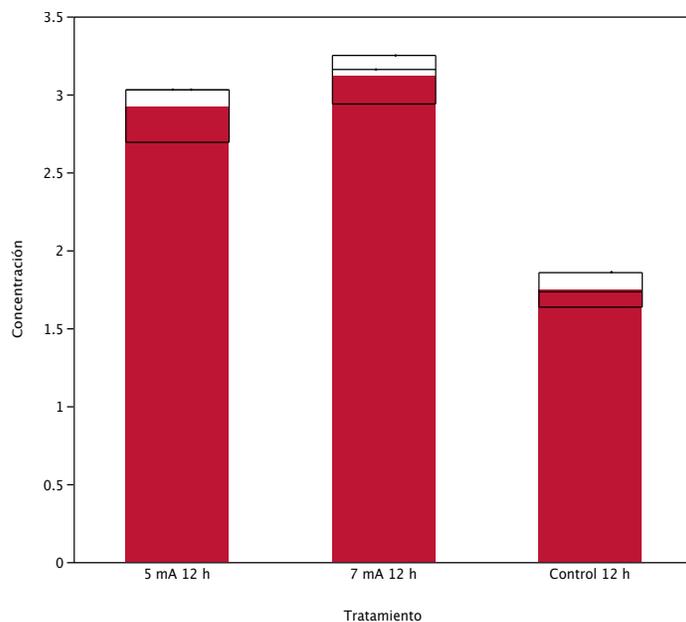


Figura 75. Producción de bioetanol al tiempo 12 - biorreactor VII.

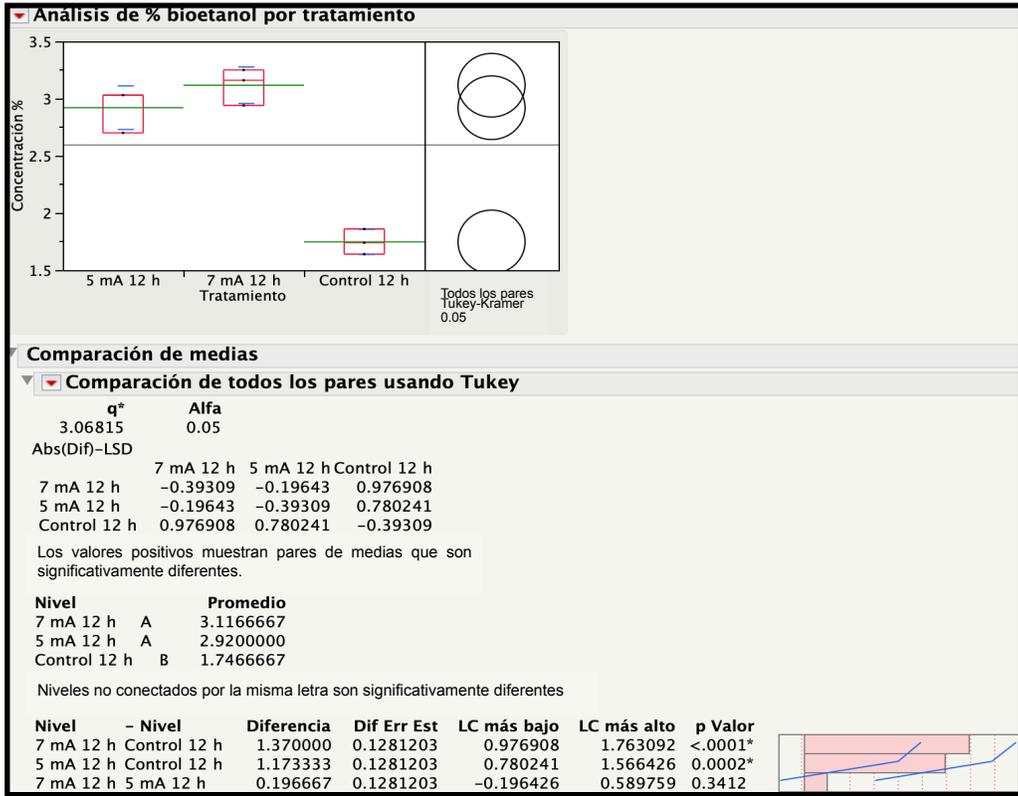


Figura 76. Prueba de Tukey para bioetanol al tiempo 12 h - biorreactor VII.

6.3 Objetivo III

El tercer objetivo del presente proyecto es evaluar el efecto del flujo de alimentación por lote alimentado al mejor tratamiento previo del sistema de electrofermentación utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación se presentan los resultados obtenidos en relación a este objetivo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el biorreactor VII se tomó en consideración el tratamiento de 5 mA para el lote alimentado (LA), ya que al no ser distinto al tratamiento de 7 mA en el crecimiento de biomasa, consumo de carbono y producción de bioetanol este amperaje representa un menor gasto energético de la fuente de poder que suministra la corriente. El flujo óptimo de alimentación empleado fue el reportado por Hernández (2017).

La Figura 77 muestra una ligera disminución en el tratamiento de 5 mA con lote alimentado. Esto se ve reflejado desde las 12 horas hasta las 72 horas, tiempo que había superado la alimentación al biorreactor. En la Figura 78 es posible ver esta disminución en los tiempos de 24 y 48 horas. Por otra parte, la variación de los datos en el tratamiento de 5 mA con lote alimentado podría sugerir que no existe una diferencia entre tratamientos. La prueba de Tukey, muestra en las Figuras 79 y 80, correspondientes a los tiempos 24 y 48 horas respectivamente, muestran que no existe una diferencia entre el tratamiento y el control pues son agrupados en el mismo conglomerado A. Esto es corroborado por el p valor de 0.2705 y 0.0976 para 24 horas y 48 horas, respectivamente; sentando que no hay una diferencia significativa entre el tratamiento de 5 mA con LA y el control.

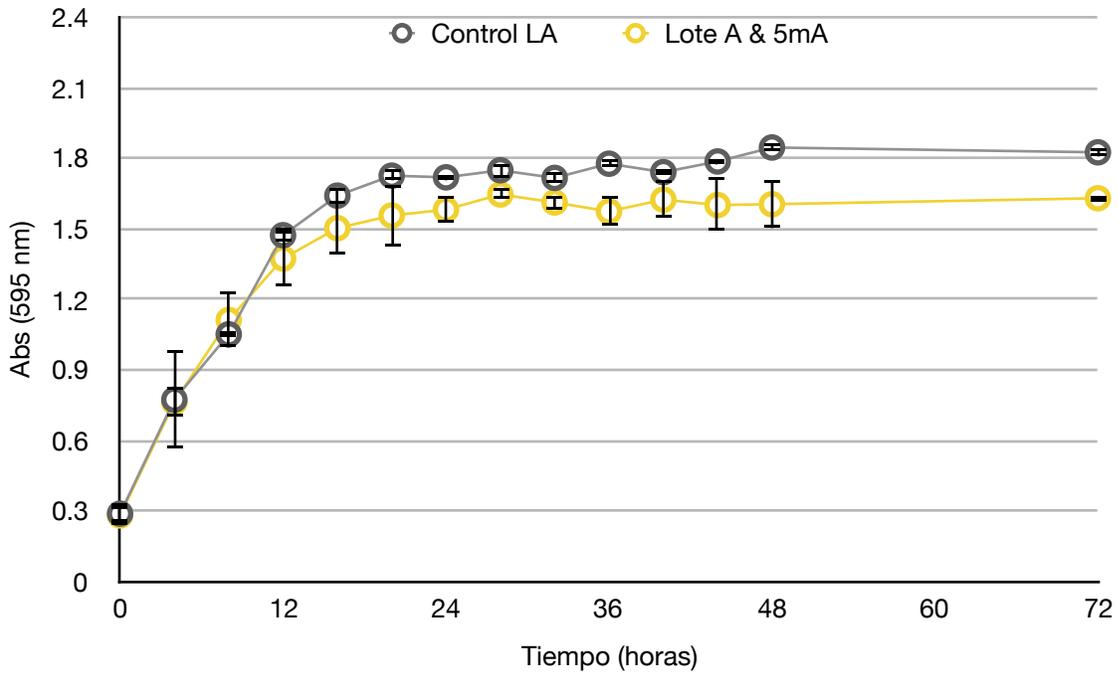


Figura 77. Absorbancia con corriente eléctrica - biorreactor VII con LA.

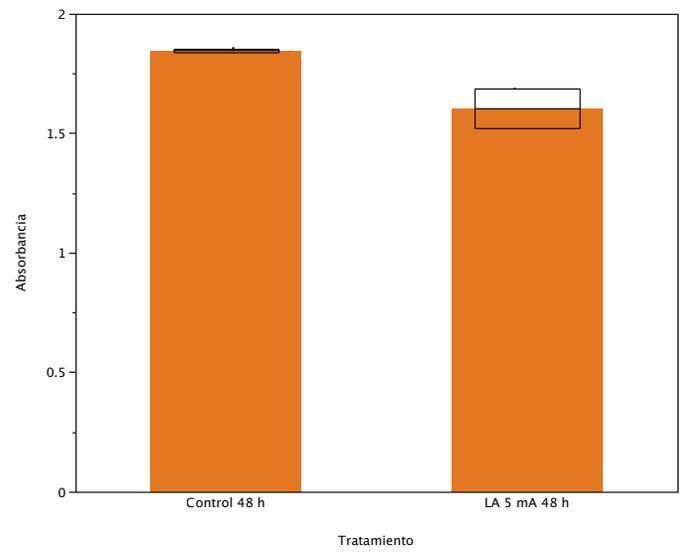
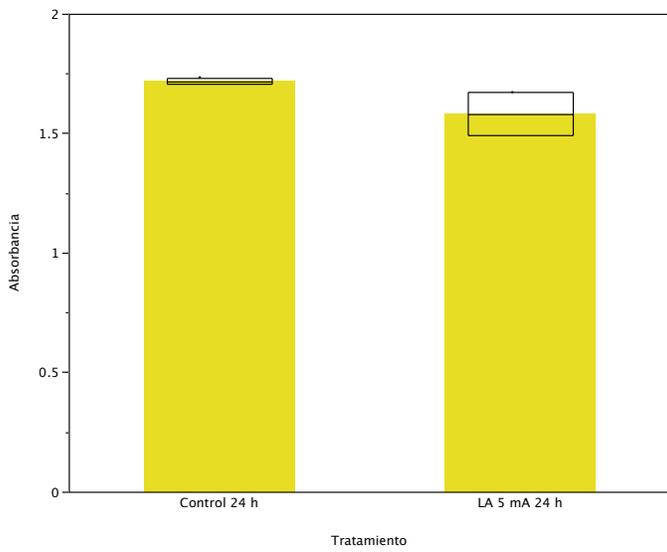


Figura 78. Absorbancias en tiempo 24 h y 48 h -biorreactor VII con LA.

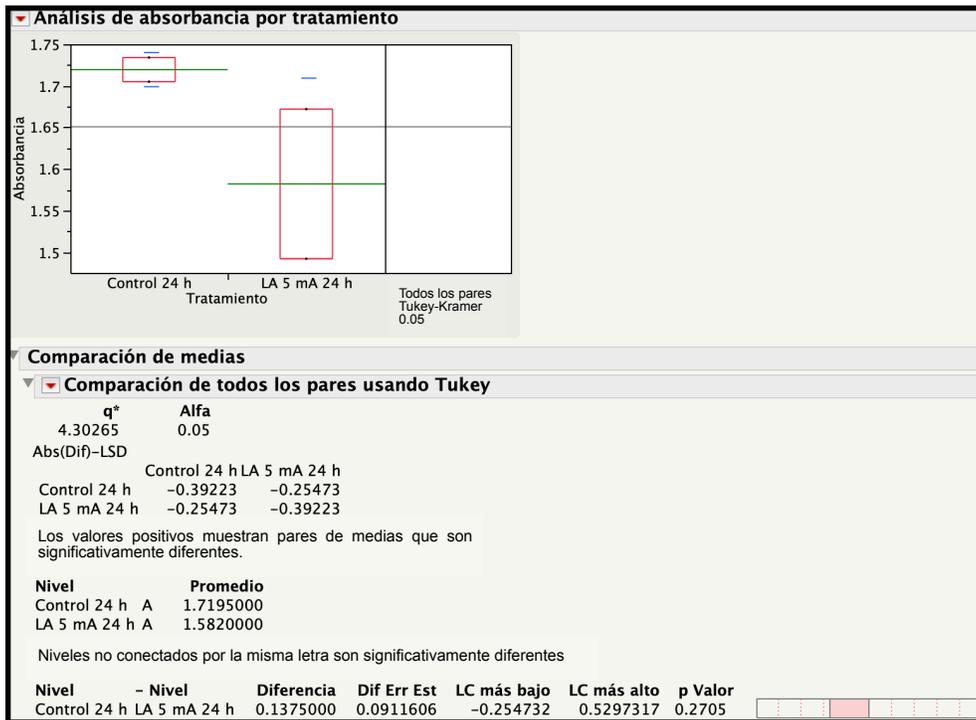


Figura 79. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 24 h - biorreactor VII con LA.

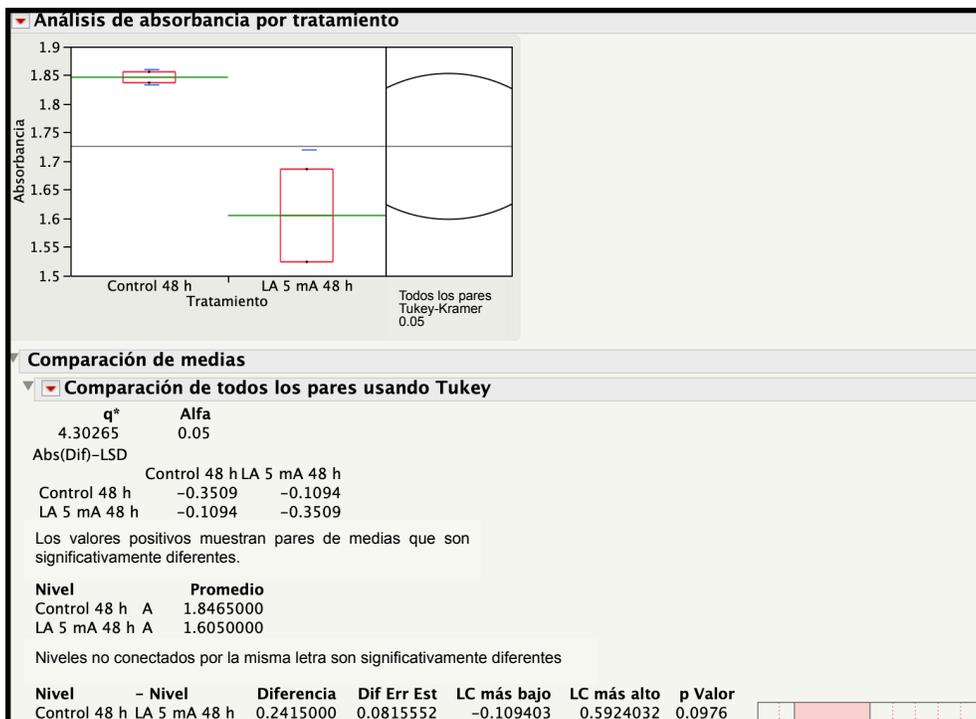


Figura 80. Prueba de Tukey para absorbancia al tiempo 48 h - biorreactor VII con LA.

7. DISCUSIÓN

Para los biorreactores I y IV dónde fue aplicado un voltaje, hubo en ambos casos un efecto nulo. Para el caso del biorreactor I cabe mencionar que la configuración inicial a falta de especificaciones en la literatura fue modificada para que el embobinado de cobre tuviese un efecto electrostático al aumentar el número de vueltas. Dicha corrección fue realizada en los biorreactores II y III. Por otra parte para el biorreactor IV hubieron diferentes condiciones que no favorecieron la producción esperada de bioetanol ni consumo de carbono. Menciona Pant *et al.* (2012) que al existir un ambiente de reducción-oxidación favorable es posible realizar una conversión donde aumente la producción del metabolito de interés, se disminuya el crecimiento de biomasa y haya una mejor distribución de los electrones en el medio. Esto de igual manera menciona que dependerá de la materia prima con la que se esté trabajando. Para el caso de nuestra fermentación en el biorreactor IV no se hizo propiamente un escrutinio para acertar las condiciones de reducción-oxidación propias del medio de sacarosa a 90 g/L con el que se trabajó en este proyecto. Siendo así queda pendiente el desarrollo de una optimización dónde se realice un espectro más amplio de voltajes a aplicar acompañado de diferentes concentraciones de una fuente de carbono para de esta manera obtener el ambiente propicio para la producción de bioetanol en el mejor ambiente de reducción-oxidación.

En el caso de los bioreactores V y VI en base a los resultados obtenidos resalta el hecho de que no hay un efecto en la producción de bioetanol cuando existe la aplicación de un campo magnético. Para el biorreactor V se aplicaron 13 μT , 14 μT y 17 μT para los voltajes de 5, 15 y 25 V, respectivamente. Para el biorreactor VI hubo una aplicación de 130 μT únicamente. Como se muestra en los bioreactores con el sistema de campo magnético no existe una diferencia entre los tratamientos y los controles. Siendo así que la aplicación de un campo magnético con μT no ejerce ningún tipo de polarización del medio, y por ende ningún cambio negativo o

positivo en la cinética de crecimiento, consumo de carbono o la producción de bioetanol.

Contrariamente Da Motta *et al.* (2008) muestra los efectos magnéticos inducidos en una fermentación utilizando la cepa DAUFPE-1012 de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio con 5 g/L de extracto de levadura y 50 g/L de glucosa. La aplicación del campo magnético a 220 mT fue de manera constante durante 24 horas utilizando imanes de neodimio (NdFeB). El pH del medio se mantuvo entre 4 y 5. Como resultado del tratamiento con campo magnético, la biomasa (g/L) aumentó 2.5 veces y la concentración de etanol 3.4 veces en comparación con los controles. Estas condiciones del medio si bien no son iguales, son similares con los utilizados en este trabajo de investigación. Por otra parte ni la corriente directa (biorreactor V) y corriente alterna (biorreactor VI) utilizadas llegaron al orden de magnitud 10^{-3} en la escala de los mT. Esto es un fuerte indicativo de que el uso de campos magnéticos en la escala de los mT o T podrían ser utilizados para la aplicación en sistemas de electrofermentación. Sin embargo el uso de estos campos magnéticos van de la mano con el uso de energía siendo cuestionable el la escalabilidad para su uso en biorefinerías, hablando de sistemas de corriente directa o corriente alterna. Si se optará por imanes de neodimio deberían de manejar dimensiones enormes o no generarían el campo magnético correspondiente a las dimensiones de producción para la necesidad de bioetanol actual.

Cabe mencionar que en esta investigación no se hizo uso de un campo eléctrico en los sistemas de electrofermentación. Éste es representado en el Sistema Internacional por las unidades de Voltio por metro ($V \cdot m^{-1}$). Dos investigaciones independientes muestran datos diferentes, ambos usando un campo eléctrico. En los resultados obtenidos por Bertrand *et al.* (2018) con la aplicación de un campo eléctrico (6.11 y 3.44 $V \cdot m^{-1}$) y alta frecuencia (900 MHz y 2400 MHz) a la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 en medio con Glucosa 50 g/L, KH_2PO_4 3 g/L y $(NH_4)_2SO_4$, no tenía un efecto sobre la tasa de crecimiento o el rendimiento de etanol. Por otra parte Mattar *et al.* (2014) ha utilizando un campo eléctrico pulsado

en una fermentación por lote con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* actiflore F33, este tratamiento de campo eléctrico pulsado se aplicó en estas levaduras a una concentración de 0.012 g/L a las intensidades de campo eléctrico de 1.0 y 60.0 $V \cdot m^{-1}$ usando el mismo protocolo de tratamiento (número de pulsos $n = 1000$, duración del pulso $t_i = 100 \mu s$, y tiempo de repetición del pulso $\Delta t = 100 ms$). La fermentación se realizó durante 150 h en una incubación a 30 ° C. Resultado de lo anterior el consumo de fructosa en los tratamientos superó al control 2.33 veces para 1.0 $V \cdot m^{-1}$ y 3.98 para 60.0 $V \cdot m^{-1}$.

De esta manera queda una brecha de investigación no sólo en el uso de campo eléctrico sino la aplicación de pulsos en sistemas de electrofermentación, que independientemente de la aplicación de un voltaje, un campo magnético, un campo eléctrico o una corriente eléctrica podrían tener un resultado distinto a la aplicación constante del respectivo tratamiento.

Para los biorreactores II y III se muestra un efecto negativo en el crecimiento de la levadura. Esto puede ser resultado del uso de electrodo de cobre no aislado; sustento que se reporta en varios trabajos con el uso de este elemento, por ejemplo en el trabajo de Kruk *et al.* (2015) donde sintetizaron nanopartículas de cobre de aproximadamente 50 nm, y observaron el efecto antimicrobiano en *Staphylococcus aureus*, cepas de *Staphylococcus epidermidis* y varias especies de *Candida*. Por su parte Gopinath *et al.* (2018) sintetizaron nanopartículas de cobre por electrodeposición a partir de sulfato de cobre. Estas partículas comprendían diámetros de 10 ~ 40 nm de diámetro, que causaban un efecto antimicrobiano demostrado con *Aspergillus niger*. Lo anterior sugiere que el electrodo de cobre que está en contacto con el medio y la levadura pudiese tener un efecto antimicrobiano que es dependiente del voltaje aplicado o no. De lo anterior quedaría pendiente la realización de un fermentación sin el voltaje aplicado, para dar por sentado el efecto antimicrobiano del electrodo descubierto de cobre.

Como se pudo observar en las fermentaciones con el bioreactor VII, la aplicación de una corriente eléctrica en el medio mediante los electrodos de grafito ejercía un efecto positivo en la cinética de crecimiento y la producción de bioetanol. Este argumento es sustentado con el trabajo de Shanthi *et al.* (2017), donde se obtuvo un aumento de ácidos grasos volátiles siendo el perfil total de ácidos acético, propiónico y butírico de 3593 mg/L comparado con su control 2666 mg/L. Esto fue logrado utilizando un electrodo de grafito de 25 cm² en un circuito cerrado con una resistencia de 100 Ω, y un residuo alimentario comprendido por arroz cocido, vegetales cocinados, aceite quemado, entre otros residuos de cocina. Al final de la electrofermentación se obtuvo un perfil en donde se favoreció el crecimiento de especies bacterianas proteobacteroides. Xafenias *et al.* (2017) por su parte demostró el potencial para mejorar las fermentaciones al duplicar la producción de lisina con *Corynebacterium glutamicum* utilizando reactores bioelectroquímicos bajo condiciones de CO₂. Cada reactor consistía de un electrodo de referencia, un contraelectrodo y un electrodo de trabajo; los últimos dos de grafito con un área total aplicada de 32 cm². Por otra parte, May *et al.* (2016) enfocó la revisión de un artículo en la producción de acetato haciendo mención de diferentes tipos de electrodos y microorganismo. Varios de estos estudios trabajados con electrodos de grafito. Todos estos estudios previos, por mencionar unos pocos, fortalecen la utilización de los sistemas bioelectroquímicos como una forma de mejorar las fermentaciones convencionales.

Finalmente, por parte de este trabajo de investigación se sugiere estudiar el efecto de amperajes más altos sobre el crecimiento, consumo de carbono y producción de bioetanol de *Saccharomyces cerevisiae*. Dicho amperajes no son soportados por el electrodo convencional de grafito. Esto podría lograrse mediante el uso otros electrodos de acero inoxidable, que ya han sido reportados en trabajos con fermentaciones anaerobias de material lignocelulósico (Qu *et al.* 2014).

8 CONCLUSIONES

El uso efectivo de voltaje aplicado a sistemas de electrofermentación para la generación de un ambiente adecuado de reducción-oxidación que promueva la producción de un metabolito de interés puede ser dependiente la concentración de sustratos iniciales de la materia prima en cuestión.

El uso de electrodos de cobre sin recubrimiento tiene un efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, que puede ser dependiente o no del voltaje aplicado.

La aplicación de un campo magnético en el orden de las μT no tiene un efecto positivo o negativo sobre el crecimiento de biomasa, el consumo de azúcares o la producción de bioetanol en *Saccharomyces cerevisiae*.

La aplicación de una corriente eléctrica de 5 mA en un medio de fermentación de 100 mL de capacidad tuvo el mejor efecto positivo sobre el crecimiento de biomasa y la producción de bioetanol en *Saccharomyces cerevisiae*.

Para mayor detalle de los protocolos, metodologías y técnicas realizadas en este trabajo de investigación comunicarse al correo ialejandrolab@gmail.com.

9. REFERENCIAS

- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H. y Sebayang, A. H. 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 66:631–653. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Arifin, Y., Tanudjaja, E., Dimiyati, A. y Pinontoan, R. 2014. A second generation biofuel from cellulosic agricultural by-product fermentation using clostridium species for electricity generation. *Energy Procedia*. 47:310–315. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.01.230>
- Ashokkumar, V., Salim, M. R., Salam, Z., Sivakumar, P., Chong, C. T., Elumalai, S., Suresh, V. y Ani, F. N. 2017. Production of liquid biofuels (biodiesel and bioethanol) from brown marine macroalgae *Padina tetrastromatica*. *Energy Conversion and Management*. 35:351–361. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.12.054>
- Avelino Gonçalves, F., Dos Santos, E. S. y De Macedo, G. R. 2015. Use of cultivars of low cost, agroindustrial and urban waste in the production of cellulosic ethanol in Brazil: A proposal to utilization of microdistillery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 50:1287–1303. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.047>
- Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., Dewil, R., Lv, Y. y Tan, T. 2015. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*. 47:60–88. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.10.003>

- Bai, F. W., Anderson, W. A. y Moo-Young, M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. 26:89–105. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>
- Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social y Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (BNDES y CGEE). Bioetanol de caña de azúcar: energía para el desarrollo sostenible. 1a. edición. Brasil: Dirección de Publicaciones del BNDES, 2008;39–65.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F. y Kunkee, R. E. 1999. Yeast and biochemistry of ethanol fermentation in *Principles and Practices of Winemaking*. 102–192. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4757-6255-6>
- Bertrand, E., Pasquier, C., Duchez, D., Girard, S., Pons, A., Bonnet, P. y Dussap, C.-G. 2018. High-frequency, high-intensity electromagnetic field effects on *Saccharomyces cerevisiae* conversion yields and growth rates in a reverberant environment. *Bioresource Technology*. 260:264–272. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.03.130>
- Carbon Dioxide Information Analysis Center (CDIAC). 2014 [consultado 2017 abril 15]; Disponible en: http://cdiac.ornl.gov/trends/emis/meth_reg.html
- Ccopa, R. E., Yamakawa, C. K., Saad, M. B. W., Atala, D. I. P., Ambrosio, W. B., Bonomi, A., Junior, J. N. y Rossell, C. E. V. 2017. Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 119:42–51. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.002>
- Choi, O. y Sang, B.-I. 2016. Extracellular electron transfer from cathode to microbes: application for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*. 9:11. <http://doi.org/10.1186/s13068-016-0426-0>

- Da Motta, M. A., Ferreira Muniz, J. B., Schuler, A., y Da Motta, M. 2004. Static Magnetic Fields Enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* Ethanolic Fermentation. *Biotechnology Progress*. 20(1):393–396. <https://doi.org/10.1021/bp034263j>
- Gaurav, N., Sivasankari, S., Kiran, G. S., Ninawe, A. y Selvin, J. 2017. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 73:205–214. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.070>
- Geankoplis, C. J. *Procesos de transporte y principios de procesos de separación*. 4a. edición. México: Editorial Continental. 2006;711–772.
- Gopinath, S. C. B., Wang, L., Rajapaksha, R. D. A. A., Anbu, P., Velusamy, P., Pandian, K., y Lee, C.-G. 2018. Photovoltaic and Antimicrobial Potentials of Electrodeposited Copper Nanoparticle. *Biochemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2018.10.009>
- Hernández, G. *Producción de bioetanol de segunda generación mediante fermentación por lote alimentado con levadura inmovilizada (Tesis de licenciatura)*. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro, 2017.
- International Bank for Reconstruction and Development (IBRD). *Data energy and mining*. 2015 [consultado 2017 abril 20]; Disponible en: data.worldbank.org/topic/energy-and-mining
- International Energy Agency (IEA). *CO2 Emissions From Fuel Combustion*. Edición 2015. Francia: Publicaciones IEA Publications, 2015;10–13

- Isabella, G., Yu, A. S. O., Silva, A. M. y Pegetti, A. L. 2017. Another driver of the Brazilian fuel ethanol supply chain: the consumers' preferences. *Revista de Administração*. 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.rausp.2017.05.003>
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Mohd Azhar, S. H., Marbawi, H., Gansau, J. A., y Ravindra, P. 2016. A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 65:756–769. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>
- Kiransree, N., Sridhar, M. y Venkateswar Rao, L. 2000. Characterisation of thermotolerant, ethanol tolerant fermentative *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Bioprocess Engineering*. 22(3):0243–0246. <https://doi.org/10.1007/PL00009114>
- Kruk, T., Szczepanowicz, K., Stefańska, J., Socha, R. P., y Warszyński, P. 2015. Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 128:17–22. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2015.02.009>
- Kumar, P., Chandrasekhar, K., Kumari, A., Sathiyamoorthi, E., y Kim, B. 2018. Electro-Fermentation in Aid of Bioenergy and Biopolymers. *Energies*. 11(2): 343. <https://doi.org/10.3390/en11020343>
- Mattar, J. R., Turk, M. F., Nonus, M., Lebovka, N. I., El Zakhem, H., y Vorobiev, E. 2015. *S. cerevisiae* fermentation activity after moderate pulsed electric field pre-treatments. *Bioelectrochemistry*. 103:92–97. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.08.016>

- Liew, W. H., Hassim, M. H. y Ng, D. K. S. 2014. Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. *Journal of Cleaner Production*. 71:11–29. <http://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.01.006>
- Liu, C. G., Xue, C., Lin, Y. H. y Bai, F. W. 2013. Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. *Biotechnology Advances*. 31:257–265. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.11.005>
- Lopez-Hidalgo, A. M., Sánchez, A. y De León-Rodríguez, A. 2017. Simultaneous production of bioethanol and biohydrogen by *Escherichia coli* WDHL using wheat straw hydrolysate as substrate. *Fuel*. 188:19–27. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.10.022>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. Brock. *Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Education S. A., 2003;123 y 485.
- Maltsoglou, I., Kojakovic, A., Rincón, L. E., Felix, E., Branca, G., Valle, S., Gianvenuti, A., Rossi, A., Thulstrup, A. y Thofern, H. 2015. Combining bioenergy and food security: An approach and rapid appraisal to guide bioenergy policy formulation. *Biomass and Bioenergy*. 79:80–95. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.007>
- Mathew, A. S., Wang, J., Luo, J. y Yau, S.-T. 2015. Enhanced ethanol production via electrostatically accelerated fermentation of glucose using *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*. 5(October):15713. <https://doi.org/10.1038/srep15713>
- May, H. D., Evans, P. J., y LaBelle, E. V. 2016. The bioelectrosynthesis of acetate. *Current Opinion in Biotechnology*. 42:225–233. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.09.004>

- Mecozi, M. 2005. Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 79(1–2):84–90. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.04.005>
- Mohr, A. y Raman, S. 2013. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. *Energy Policy*. 63:114–122. <http://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.08.033>
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E. y Bernet, N. 2016. Electro-Fermentation: How to drive fermentation using electrochemical systems. *Trends in Biotechnology*. 34(11):856–865. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.009>
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3):426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Nagarajan, S., Skillen, N. C., Irvine, J. T. S., Lawton, L. A. y Robertson, P. K. J. 2017. Cellulose II as bioethanol feedstock and its advantages over native cellulose. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 77:182–192. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.118>
- National Oceanic and Atmospheric Administration / Earth System Research Laboratory (NOAA/ESRL). 2015 [consultado 2017 mayo 10]; Disponible en: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>.
- OECD/FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025. Edición 2016. Paris: OECD Publishing, 2016;86. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en
- Pant, D., Singh, A., Van Bogaert, G., Irving Olsen, S., Singh Nigam, P., Diels, L., y Vanbroekhoven, K. 2012. Bioelectrochemical systems (BES) for

sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters. RSC Advances. <https://doi.org/10.1039/c1ra00839k>

Phukoetphim, N., Salakkam, A., Laopaiboon, P. y Laopaiboon, L. 2017. Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed-batch fermentations: Effects of sugar levels, nitrogen supplementation, and feeding regimes. *Electronic Journal of Biotechnology*. 26:84–92. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.01.005>

Potumarthi, R., Baadhe, R. R. y Bhattacharya, S. 2014. Fermentable sugars from lignocellulosic biomass: technical challenges. *Biofuel Technologies: Recent Developments*. 3–27. <http://doi.org/doi:10.1007/978-3-642-34519-7>

Poughon, L. y Dussap, C.-G. 2017. Microbiology of alcoholic fermentation in Current Developments. *Biotechnology and Bioengineering*. 10:263–279. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00010-8>

Qu, G., Qiu, W., Liu, Y., Zhong, D., y Ning, P. 2014. Electropolar effects on anaerobic fermentation of lignocellulosic materials in novel single-electrode cells. *Biosource Technology*. 159:88–94. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.052>

Rastogi, M. y Shrivastava, S. 2017. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 80:330–340. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>

Renewable Fuels Association (RFA). Industry statistics 2016 [consultado 2016 diciembre 15]; Disponible en: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>

- Rozanov, a. S., Kotenko, a. V., Akberdin, I. R. y Peltek, S. E. 2015. Recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production from plant biomass. Russian Journal of Genetics: Applied Research. 5(4):375–382. <https://doi.org/10.1134/S2079059715040139>
- Saladini, F., Patrizi, N., Pulselli, F. M., Marchettini, N. y Bastianoni, S. 2016. Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 66:221–227. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.073>
- Schievano, A., Sciarria, T. P., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Puig, S., Andersen, S. J., Rabaey, K. y Pant, D. 2016. Electro-Fermentation – Merging electrochemistry with fermentation in industrial applications. Trends in Biotechnology. 34(11):866–878. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.007>
- Sharma, S., Joshi, V. K. y Thakur, A. D. 2017. 13 Wines: white, red, sparkling, fortified, and cider in Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry. 353–406. doi:10.1016/B978-0-444-63666-9.00013-3
- Sherman, F. 2002. Getting started with yeast. Methods in Enzymology. 350. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50954-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50954-X)
- Singh, A. y Olsen, S. I. 2011. A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. Applied Energy. 88(10):3548–3555. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.012>
- Soccol, C. R., Pandey, A. y Larroche, C. Fermentation processes engineering in the food industry. Estados Unidos: Editorial CRC Press, 2013;47–74

- Shanthi, J., Butti, S. K., Sarkar, O., Vamshi Krishna, K. y Venkata Mohan, S. 2018. Electrofermentation of food waste – Regulating acidogenesis towards enhanced volatile fatty acids production. *Chemical Engineering Journal*. 334:1709–1718. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.11.005>
- Thangavelu, S. K., Ahmed, A. S. y Ani, F. N. 2016. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 56:820–835. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.089>
- Uragami, T., Saito, T. y Miyata, T. 2015. Pervaporative dehydration characteristics of an ethanol / water azeotrope through various chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers*. 120:1–6. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.032>
- Wade, L. G. *Química Orgánica*. 5a edición. Madrid: Editorial Pearson Education S. A., 2004: 405.
- Wei, N., Oh, E. J., Million, G., Cate, J. H. D. y Jin, Y. S. 2015. Simultaneous utilization of cellobiose, xylose, and acetic acid from lignocellulosic biomass for biofuel production by an engineered yeast platform. *ACS Synthetic Biology*. 4(6):707–713. <https://doi.org/10.1021/sb500364q>
- Xafenias, N., Kmezik, C., y Mapelli, V. 2017. Enhancement of anaerobic lysine production in *Corynebacterium glutamicum* electrofermentations. *Bioelectrochemistry*. 117:40–47. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.06.001>
- Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M. y Chen, Y. 2011. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*. 102(1):159–165. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.017>

Yusri, I. M., Mamat, R., Najafi, G., Razman, A., Awad, Omar I., Azmi, W. H., Ishak, W. F. W. y Shaiful, A. I. M. 2017. Alcohol based automotive fuels from first four alcohol family in compression and spark ignition engine: A review on engine performance and exhaust emissions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 77(March):169–181. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.080>

Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., y Faruq, G. 2017. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 71:475–501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>

Zoecklien, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H. y Nury, F. S. Wine analysis and production. Estados Unidos: Editorial Springer, 1999;621. <http://doi.org/doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2>