

# UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

CAMPUS GUANAJUATO

---

**ANÁLISIS DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN Y PERVAPORACIÓN  
(PDMS) PARA LA PRODUCCIÓN Y REMOCIÓN EFICIENTE DE  
BIOETANOL**

---

DR. HÉCTOR HERNÁNDEZ ESCOTO

DIRECTOR DE TESIS

TESIS QUE PRESENTA

LAURA EDITH RIVERA GRANADOS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA (INTEGRACIÓN DE PROCESOS)

MAYO 2019

Miembros del comité del Examen Profesional para obtener el título de Maestro en Ingeniería Química (Integración de Procesos), presenta Laura Edith Rivera Granados con el trabajo de tesis titulado:

**“Análisis de un proceso de fermentación y pervaporación (PDMS) para la producción y remoción eficiente de bioetanol”**

---

Dr. Juan Carlos Torres Guzmán

---

Dr. Guillermo Martínez Rodríguez

---

Dr. Fernando López Caamal

---

Dr. Martín Trinidad Martínez García

## Resumen

La fermentación alcohólica convencional presenta una fuerte inhibición por producto; la producción de BioEtOH-1G intensificado con el uso de una membrana de pervaporación es un proceso prometedor para la producción eficiente de EtOH, ya que la inhibición por alcohol se elimina. Este trabajo de tesis exploró el efecto del pH, concentración celular, temperatura y altas concentraciones de sustrato en fermentaciones para la producción de etanol de primera generación utilizando dos tipos de sustrato, glucosa grado reactivo y miel tipo B, utilizando *Saccharomyces Cerevisiae*, además, de la separación de etanol/agua por medio de procesos de pervaporación utilizando membrana de PDMS, teniendo como objetivo obtener caldos de fermentación con alto contenido en etanol y remover el alcohol producido mediante un sistema de membrana.

Para determinar los valores de los factores que resultan con un mejor desempeño del proceso se siguió un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken, con cuyos resultados se construyó una superficie de respuesta. Los intervalos de exploración fueron de temperatura (28, 33 y 35 °C), número de células iniciales ( $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  y  $3 \times 10^7$  células/ml) y pH (3, 4.5 y 4), resultando un diseño con un pH de 3.5, temperatura de 33 °C y una concentración celular de  $3.0 \times 10^7$  células/mL, con los cuales se obtuvo una mayor productividad a nivel matraz utilizando una concentración de glucosa de 100 g/L con un rendimiento del 40%. Sin embargo, para fermentaciones a altas concentraciones de miel B ( 200, 250, 300 y 400 g/L ) se obtuvo una producción de etanol de 90 g/L para 200 g/L de azúcar, 70 g/L de etanol para 250 g/L de azúcar y 50 g/L de etanol para 350 g/L de azúcar, encontrando inhibición por sustrato a una concentración de 400 g/L. Una vez obtenidos los mostos de fermentación se realizaron pervaporaciones con membrana de Polidimetilsiloxano (PDMS) de las cuales se obtiene una concentración de permeado de etanol de 260 g/L en 4 h, un factor de separación de 6.5 a bajas concentraciones de etanol alimentado al sistema y una mayor selectividad de membrana a altas concentraciones de glucosa.

Los procesos de fermentación con membrana se realizaron en una Estancia de Investigación en la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Campus la Nubia en colaboración con el Dr. Javier Fontalvo Alzate y el Dr. Juan Carlos Higueta con el Grupo de Investigación en Aplicación de Nuevas Tecnologías en el Laboratorio de Intensificación de Procesos y Sistemas Híbridos.

# Agradecimientos

A CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría y durante la estancia de investigación realizada en Colombia, así mismo quiero agradecer a DAIP por el apoyo económico otorgado en mi movilidad estudiantil.

A mis papás: Laura Granados y Felipe Rivera por haberme forjado como la persona que soy; todos mis logros son para ustedes. Gracias por ser mis pilares.

A mi amigo, asesor y director de tesis el Dr. Héctor por hacerme crecer como estudiante, como profesional y como persona; además de su apoyo incondicional en esta etapa tan importante.

Al LABPI por el apoyo en la parte experimental; en especial gracias a Perla, Alicia y Ulises por enseñarme a trabajar las fermentaciones, al panqué por hacer tan amenos tantos momentos, a Elena por siempre estar en las crisis; gracias a Daniel, Miguel, Rubí, José Josué y a cada miembro actual o nuevo del Laboratorio, todos formamos parte de los logros del grupo.

A mis anfitriones colombianos el Dr. Javier Fontalvo y el Dr. Juan Carlos Higueta por abrirme las puertas de su equipo de trabajo y de su Universidad. Gracias por el tiempo, los nuevos conocimientos y las experiencias. Fue muy satisfactorio conocer otras formas de trabajo, otras costumbres y nuevos amigos.

Al Grupo de Investigación en Aplicación de Nuevas Tecnologías. Laboratorio de Intensificación de Procesos y Sistemas Híbridos de la Universidad Nacional de Colombia por la infraestructura prestada durante mi estancia. Gracias a mis amigos y compañeros de trabajo que fueron mi familia y confidentes, gracias, Iván, Paula, Laura, kike, Ronald, Juan Álvaro, Alán, Sebastián, Valentina, Caro, Natalia Silvia y las Alejas. Gracias por las experiencias rumberas, gastronómicas y científicas.

A Sam, Paloma, Sindy, Fabián, Paty, Ivonne, Diana, Martha, Sandro, Vere por siempre preocuparse por mí, por estar presentes en buenas y malas situaciones. Gracias por su amistad y por mantenerme cerca de ustedes.

# Índice General

Índice de Figuras .....	III
Índice de Tablas .....	IV
Abreviaciones .....	V
1. Introducción .....	1
1.1. Biocombustibles .....	2
1.2. Bioetanol .....	3
1.3. Bioetanol en México.....	5
1.4. Fermentación Alcohólica .....	6
1.4.1. Inhibición (Tolerancia al etanol) .....	7
2. Intensificación de Procesos .....	9
2.1. Intensificación de procesos .....	9
2.2. Pervaporación. Tecnología de membrana para la remoción de etanol .....	9
2.3. Proceso de Fermentación y Pervaporación híbrida .....	12
3. Planteamiento del Problema .....	15
3.1. Objetivo General .....	15
3.2. Hipótesis .....	15
3.3. Objetivos específicos.....	16
3.4. Justificación.....	16
3.5. Metodología.....	17
4. Procedimientos Experimentales .....	18
4.1. Fermentación Alcohólica.....	18
4.1.1 Fermentación a nivel matraz.....	18
4.1.2. Fermentación alcohólica a nivel tanque agitado.....	19
4.2. Mediciones de muestra y evaluación del proceso de fermentación alcohólica. .....	20
4.2.1. Conteo celular.....	20
4.2.2. Azúcares Reductores Totales .....	22
4.2.3. Cromatografía de Alta Eficiencia (HPLC). .....	22
4.3 Pervaporación (Membrana PDMS).....	23
4.3.1 Pervaporación de solución ideal. ....	24
4.3.2. Pervaporación a mostos de fermentación. ....	25
4.4. Medición de muestras y evaluación del proceso de PV .....	25
5. Resultados.....	27
5.1. Fermentaciones. ....	27
5.1.1. Fermentaciones de Soluciones de Glucosa (nivel matraz) .....	27

5.2. Fermentación Alcohólica (Altas concentraciones de sustrato, miel B) .....	30
5.3. Pervaporaciones. ....	34
5.3.1. Pervaporaciones con soluciones ideales.....	34
5.3.2. Pervaporaciones con mostos de fermentación.....	35
6. Conclusiones .....	40
Apéndice A .....	41
Reactivos y Equipos .....	41
A.1. Fermentación alcohólica .....	41
A.2. Método DNS- Miller (Zohri, Abdelazim and Ibrahim, 2018).....	42
A.3. Características de la columna CHO782pb .....	43
Apéndice B.....	44
Diseño de Experimentos Box- Behnken .....	44
B.1. El Diseño de Experimentos Box-Behnken (BBD).....	44
Bibliografía .....	48

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> Materias primas para la producción de bioetanol y composición de pared celular ....	3
<b>Figura 1.2</b> Desarrollo del mercado mundial de etanol .....	4
<b>Figura 1.3</b> Principales materias primas para la producción de bioetanol .....	4
<b>Figura 1.4</b> Proceso de fermentación industrial para la producción de etanol de 1G .....	6
<b>Figura 2.1</b> Funcionamiento de membrana en un proceso de PV .....	10
<b>Figura 2.2</b> Configuración del proceso híbrido de fermentación y PV con a) unidad externa de PV y b) unidad interna de PV .....	11
<b>Figura 4.1</b> Configuración experimental de PV .....	19
<b>Figura 4.2</b> Cámara de Neubauer. A) cuadrícula neubauer, b) forma de llenado de la cámara y c) dirección de conteo en la cámara de neubauer .....	22
<b>Figura 4.3</b> Colorimetría DNS .....	23
<b>Figura 4.4</b> Equipo HPLS Elite Chrom .....	23
<b>Figura 5.1</b> Superficies de respuesta.....	25
<b>Figura 5.2</b> Graficas de optimización para las variables de diseño .....	25
<b>Figura 5.3</b> Trayectorias de consumo de sustrato y crecimiento celular de una fermentación alcohólica utilizando glucosa nivel reactivo .....	26
<b>Figura 5.4</b> Trayectorias normalizadas de biomasa de la fermentación alcohólica utilizando como sustrato miel tipo B.....	27
<b>Figura 5.5</b> Trayectorias normalizadas de consumo de sustrato durante la fermentación alcohólica utilizando miel tipo B .....	28
<b>Figura 5.6</b> Trayectorias de formación de producto (etanol) durante la fermentación alcohólica utilizando sustrato miel tipo B .....	29
<b>Figura 5.7</b> Desempeño de PV utilizando solución ideal de etanol/agua a) flujo de etanol en función de la fuerza impulsora, b) factor de separación en función de la fuerza impulsora .....	31
<b>Figura 5.8</b> Flujos totales de PV a distintas concentraciones de etanol. PV1- 90 g/L de etanol; PV2- 70 g/L de etanol y PV3-50 g/L de etanol.....	32
<b>Figura 5.9</b> Flujos de a) etanol y b) agua en función de la fuerza impulsora de etanol con diferentes concentraciones de alcohol provenientes de mostos de fermentación.....	33
<b>Figura 5.10</b> Flujos de separación del módulo de membrana PDMS utilizando diferentes concentraciones de etanol.....	34
<b>Figura 5.11</b> Influencia de la concentración de azúcar en a) selectividad y b) flujos individuales de etanol/agua.....	35

## Índice de Tablas

<b>Tabla 2.1</b> Presiones de vapor parciales de etanol y agua con y sin sacarosa.....	12
<b>Tabla 4.1</b> Composición miel B.....	18
<b>Tabla 4.2</b> Nutrientes utilizados durante la fermentación a nivel tanque agitado.....	19
<b>Tabla 5.1</b> Rendimiento de biomasa y producto a partir del sustrato de las fermentaciones a altas concentraciones .....	30
<b>Tabla A.1</b> Reactivos y materiales en la experimentación de fermentación.....	38
<b>Tabla A.3</b> Nutrientes utilizados en fermentación alcohólica.....	39
<b>Tabla B.1</b> Tabla de diseño en MiniTab .....	41

## Abreviaciones

1G	Primera Generación
2G	Segunda Generación
3G	Tercera Generación
4G	Cuarta Generación
BBD	Box- Behnken
BioEtOH	Bioetanol
EtOH	Etanol
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DNS	Ácido 3, 5 dinitrosalicílico
GEI	Gases de Efecto Invernadero
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
O <sub>2</sub>	Oxígeno
PDMS	Polidimetilsiloxano
PV	Pervaporación
RMS	Metodología de Superficie de Respuesta
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Pesca y Alimentación
UG	Universidad de Guanajuato
UNAL	Universidad Nacional de Colombia
YPD	Levadura, Peptona y Dextrosa

# Capítulo 1

## 1. Introducción

La dependencia por los combustibles fósiles, la creciente preocupación sobre el cambio climático, la reducción de la calidad del aire y las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) provocadas por la quema de combustibles fósiles han motivado a la búsqueda; desarrollo de nuevas tecnologías y formas alternativas de energía, para permitir la sustitución de combustibles fósiles por energías renovables.

El sector de transporte mundial contribuye con el 19% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) emitido a la atmósfera (8 kg de CO<sub>2</sub>/galón de gasolina), y más del 70 % de monóxido de carbono (CO) (Aditya *et al.*, 2016). Debido a que la quema de combustibles fósiles genera efectos nocivos al medio ambiente y humano se han desarrollado en los últimos años el uso de nuevas tecnologías basadas en fuentes de energía alternativas y renovables como lo son los biocombustibles (bioetanol, biohidrógeno, biogas, biodiesel, bioaceite). El bioetanol es una de las alternativas más prometedoras para sustituir parcial o totalmente a la gasolina.

El BioEtOH, que se obtiene por fermentación alcohólica tiene como principal inconveniente la inhibición por producto, esto debido a condiciones estresantes durante el proceso por las cuales la levadura no puede sobrevivir durante la fermentación; debido a esto hay varios desafíos y tendencias actuales para mejorar la producción de este alcohol como son nuevas configuraciones de diseño de proceso, como la inmovilización celular y la intensificación del proceso a través de la integración reacción-separación (Santos *et al.*, 2018)

## 1.1. Biocombustibles

Un biocombustible es de origen biológico al poderse obtener de materiales orgánicos (caña de azúcar, trigo, maíz, semillas); estos, mezclados en pequeñas proporciones (5-25%) con otros combustibles fósiles, dan como resultado una reducción de gases de efecto invernadero (Pal *et al.*, 2018).

De acuerdo con el origen de la materia prima y la tecnología utilizada para la producción de bioetanol se conocen cuatro generaciones. La primera generación (1G) se obtiene a partir de materiales amiláceos, una de sus ventajas es su facilidad de procesamiento, pero sus materias primas son una fuente de alimento muy importante (Maryana *et al.*, 2014). La segunda generación (2G) proviene de material lignocelulósico el cual generalmente se lleva a cabo en procedimientos secuenciales (pretratamiento, hidrólisis, fermentación y separación); este ha sido concebido como el biocombustible con mayor potencial para reemplazar los combustibles fósiles con menor impacto que el biocombustible de primera generación que compite con la parte de la alimentación. Los biocombustibles de tercera generación (3G) usan algas y los de cuarta generación (4G) que produce biocombustible a través de cianobacterias modificadas genéticamente a través de un proceso llamado foto fermentación (conversión directa de la luz y el dióxido de carbono en etanol (Abud and Silva, 2019).

El bioetanol se puede producir a partir de cualquiera de las 4 generaciones, las composiciones de las materias primas y sus estructuras de monosacáridos, polisacáridos se muestran en la (**Figura 1.1**) (Mohapatra *et al.*, 2019).

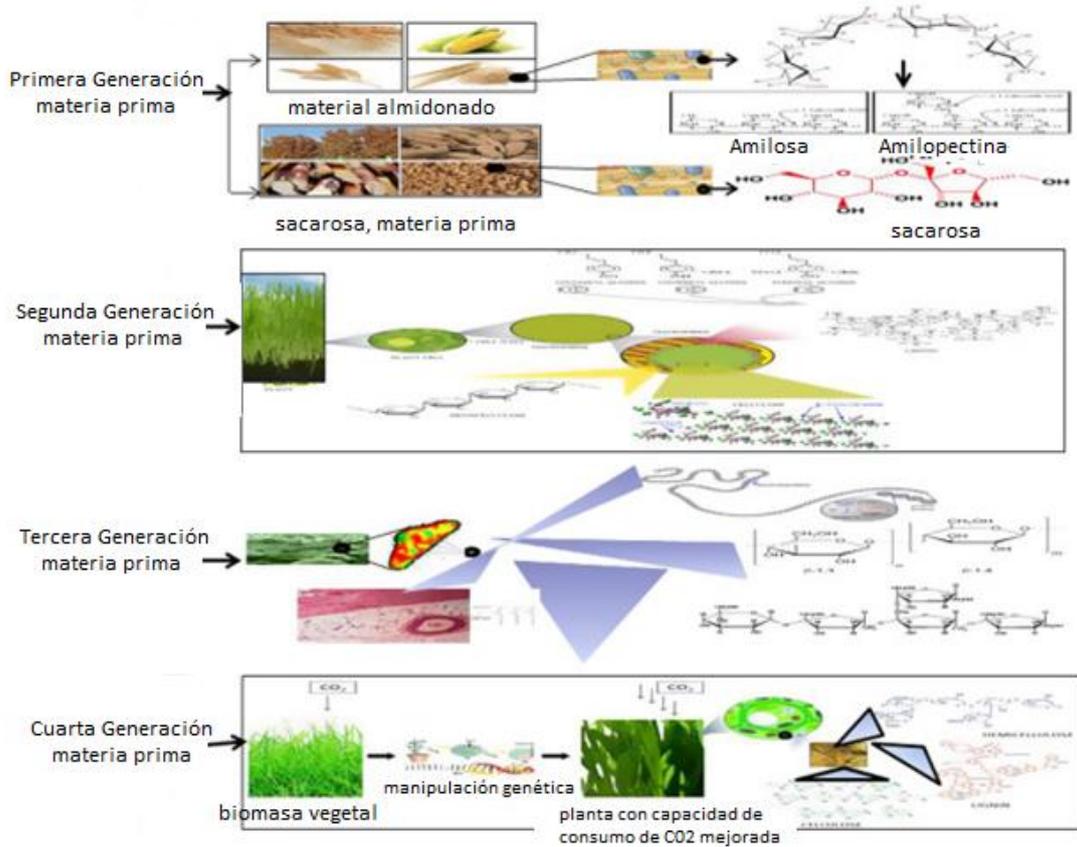


Figura 1.1 Materias primas para la Producción de Bioetanol y composiciones de pared celular.

## 1.2. Bioetanol

El bioetanol es una de las alternativas más prometedoras de combustible renovables. La quema de etanol en lugar de gasolina reduce las emisiones de gases de efecto invernadero que provocan el calentamiento global; aproximadamente se reduce el 20 % de gases de efecto invernadero con etanol proveniente de maíz y el 85 % con etanol proveniente de material celulósico, además de que se elimina completamente la liberación de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) que causa la lluvia ácida (Wei *et al.*, 2014).

El combustible etanol se puede usar en motores de combustión interna con encendido con chispa, directamente en vehículos diseñados para funcionar con etanol puro (etanol

hidratado que contiene 5 % de agua) o mezclando etanol deshidratado (anhidro) con gasolina hasta un 25 %. (Aguilar-Rivera *et al.*, 2018) En Brasil, más del 15 % de los automóviles pueden funcionar con etanol puro (Demirbaş, 2005), la gasolina vendida en Brasil contiene al menos un 25 % de etanol anhidro (Haelssig *et al.*, 2012).

El etanol se puede usar para aumentar el octanaje y reducir la contaminación por aditivos en la gasolina con plomo sustituyendo los aditivos químicos, el mayor nivel de octanaje del etanol también permite que se quemé a una relación de compresión más alta con un tiempo de combustión más corto, lo que resulta en un menor golpe del motor (Zabed *et al.*, 2017), este es un combustible oxigenado ecológico ya que contiene un 34.7 % de oxígeno, mientras que el oxígeno está ausente en la gasolina, por lo que esto da como resultado aproximadamente un 15 % más de eficiencia de combustión de etanol que la gasolina (Kar and Deveci, 2006).

Se estima que la producción de bioetanol podría reemplazar el 32 % de la gasolina global (Santos *et al.*, 2018), y se prevé que la producción mundial de etanol aumentará 14 % cerca de 120 Mml en 2016 y alrededor de 137 Mml para 2026 (**Figura 1.2**). Se espera que el 60 % del aumento de bioetanol se originé en Brasil, los otros grandes contribuyentes son Estados Unidos, China y Tailandia con una participación de 14 % y 11 %. OCDE/FAO (2017).

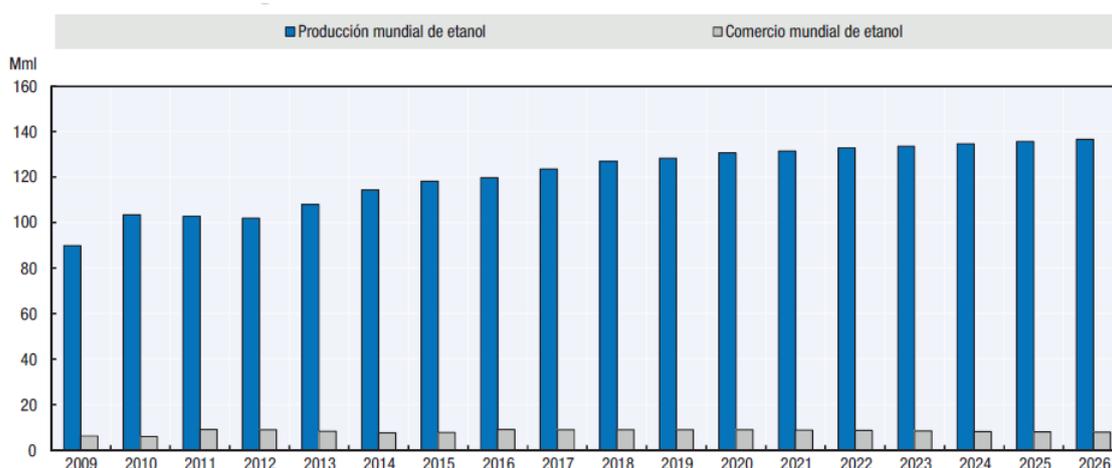
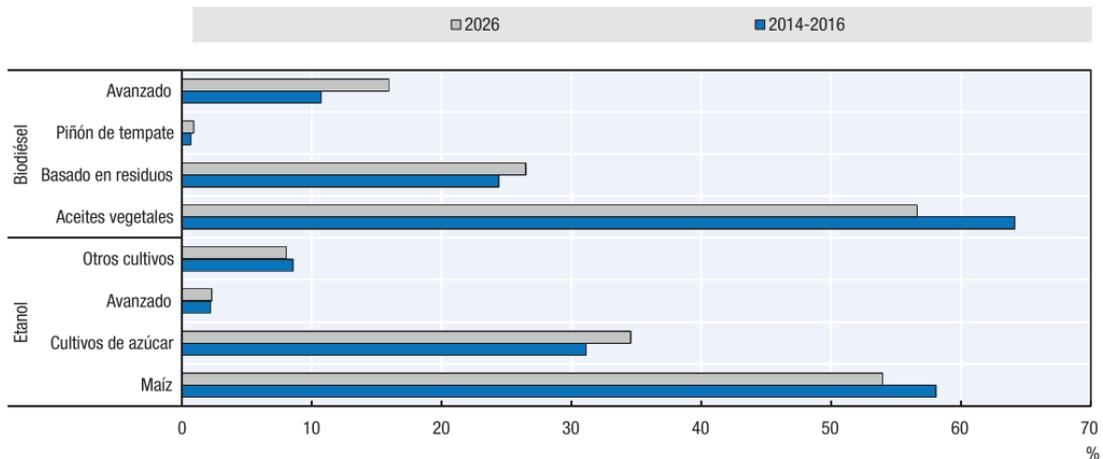


Figura 1.2 Desarrollo del mercado mundial de etanol OCDE/FAO.

Según la OCDE/FAO (2017) los cereales secundarios y la caña de azúcar se mantendrán como la principal materia prima para la producción de etanol (**Figura 1.3**). Se prevé que la producción de etanol utilizará 15 % y 20 % de la producción mundial de maíz y caña de azúcar, respectivamente en 2026.



**Figura 1.3** Principales materias primas para la producción de bioetanol OCDE/FAO (2017)

### 1.3. Bioetanol en México

México se está enfocando en la gestión eficiente de los desechos y su transformación en fuentes de energía renovables como bioetanol. Según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) México ocupa el puesto 13 en el mundo en la producción de alimentos, con 818 productos agroalimentarios de los cuales 71 ocupan el primer lugar en volumen de producción; por lo tanto, es un país con mayor número en desechos agroindustriales y se espera que la generación de etanol de 2G sea más importante.

La Secretaría de Energía de México, a través del Fondo de Sustentabilidad Energética fomenta la producción de biocombustibles a partir de materias primas de biomasa lignocelulósica (residuos agrícolas, forestales, celulósicos) a través del financiamiento de investigaciones fundamentales y aplicadas que contribuirán al desarrollo de tecnologías para la recolección, conversión y sostenibilidad de biomasa en el Centro Mexicano para la Innovación en bioenergía (Carrillo-Nieves *et al.*, 2019).

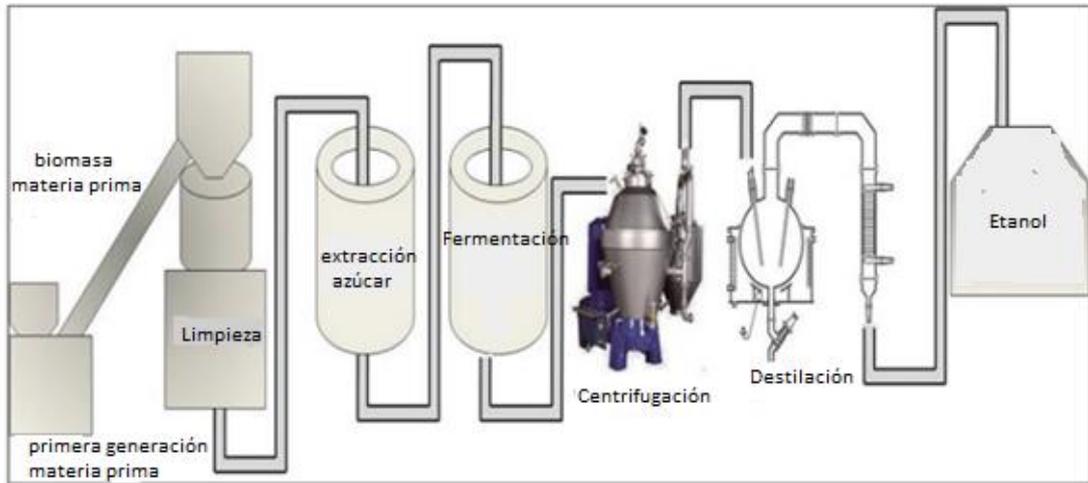
Por último cabe mencionar que la Comisión Reguladora de Energía de México actualizó la “NOM-016-CRE-2016” en junio de 2017, permitiendo la mezcla y venta de hasta un 10 % (v/v) de etanol anhidro en gasolina regular y premium vendida (Ruiz *et al.*, 2016).

#### 1.4. Fermentación Alcohólica

El proceso de fermentación consiste en la transformación de azúcares (glucosa y fructosa) en alcohol y CO<sub>2</sub>, en la que se utiliza la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, debido a su alta productividad y tolerancia al etanol (Mohd Azhar *et al.*, 2017). Durante el proceso de fermentación es importante tener condiciones adecuadas para que el microorganismo se desempeñe de mejor manera, y esto quiere decir que lleve a cabo la mayor conversión posible de azúcares a etanol dada por su capacidad de producción aunada a su tolerancia a factores inhibidores como son la temperatura, pH, así como la capacidad de producción de etanol (Aditiya *et al.*, 2016).

La ruta bioquímica de la fermentación alcohólica consta de tres etapas principales, la primera de ellas consiste en el transporte de azúcares al interior celular por medio de transportadores; la segunda en la transformación de los azúcares en piruvato, por medio de una reacción de glucólisis y finalmente la conversión de piruvato a etanol (Maya *et al.*, 2012). Durante este proceso, las moléculas de azúcar se rompen dentro de la célula por acción enzimática y se convierten en energía con la producción de etanol y dióxido de carbono (Brexó and Ana, 2017).

Por otra parte, en un marco industrial en general, hay tres pasos principales en la producción de etanol: (1) obtener una solución que contenga azúcares fermentables, (2) convertir los azúcares en etanol por fermentación y (3) separar y purificar etanol (Behera *et al.*, 2010) (**Figura 1.4**).



**Figura 1.4** Proceso de fermentación industrial para la producción de etanol 1G.

Según la ecuación descrita por Gay Lussac (Hamelinck *et al.*, 2005), el rendimiento teórico es de 0.511 gramos de etanol por gramo de glucosa utilizado como sustrato. Sin embargo se sabe que bajo condiciones industriales, el rendimiento alcanza un valor máximo de aproximadamente el 90 % cuando las condiciones son excepcionales (Basso *et al.*, 2008; Brexó and Ana, 2017; Mohd Azhar *et al.*, 2017).

#### 1.4.1. Inhibición (Tolerancia al etanol)

Una de las principales problemáticas que ocurre durante el proceso de fermentación alcohólica es la inhibición por producto. La inhibición ocurre cuando la concentración de un producto químico, ya sea producido durante la reacción o presente en la mezcla de reacción, alcanza un valor tóxico, por lo que la tasa de reacción se ve disminuida o posiblemente detenida por la desactivación de enzimas o por la muerte del microorganismo (Baeyens *et al.*, 2015). Las condiciones estresantes, como un aumento en la concentración de etanol, la temperatura, el estrés osmótico y la contaminación bacteriana son las razones por las cuales la levadura no puede sobrevivir durante la fermentación (Basso *et al.*, 2008); debido a esto hay varios aspectos negativos frecuentes para las levaduras durante

la fermentación del azúcar, que son, el aumento de temperatura (35-45 °C) y la concentración de etanol (más del 20 %) (Tofighi *et al.*, 2014). La levadura *Saccharomyces Cerevisiae* se siente cómoda en un medio entre 30-35 °C, con un pH entre 4 y 5, y una composición de azúcar menor al 25 % w/v (Aditiya *et al.*, 2016), por lo que durante una fermentación un reto operativo es mantener el valor de los factores entre dichos valores.

Aún más la inhabilidad de la levadura para crecer en medios con alto nivel de alcohol conduce a la inhibición de la producción de etanol (Aguilar, 2011; Dogan, 2014). La concentración máxima alcanzada en la mayoría de los procesos de fermentación es de 10-12 % w/v, ya que el etanol menoscaba al sistema de tres maneras; inhibe el crecimiento celular, inhibe la fermentación y acelera la muerte celular.

Por consiguiente, es importante buscar alternativas para que el proceso de fermentación se lleve a cabo de la mejor manera para la producción eficiente de bioetanol; resolviendo la situación de estrés de los microorganismos con la inhibición por producto. Esto puede lograrse aumentando el uso de levaduras que sean adaptables y resistentes a los efectos de inhibición, la modificación genética de levaduras, buscar nuevas configuraciones del proceso o bien la aplicación de nuevas tecnologías que mejoren el proceso con un menor consumo energético y una mayor productividad en el proceso fermentativo; lo que quiere decir un mayor aprovechamiento del sistema logrando una mayor conversión de azúcares a etanol, sin llegar a un nivel tóxico por producto en la reacción.

# Capítulo 2

## 2. Intensificación de Procesos

### 2.1. Intensificación de procesos

Cualquier desarrollo de ingeniería química que conduzca a una tecnología sustancialmente más pequeña, más limpia, más segura y más eficiente en el uso de energía, se le llama intensificación de procesos (Antunes *et al.*, 2018). En consecuencia, se espera que los procesos intensificados tengan menos costos de capital y un impacto ambiental menor en comparación a los procesos convencionales.

Algunos ejemplos actuales de intensificación en procesos de fermentación se encuentran en trabajos como la fermentación alcohólica en presencia de microondas la cual promete aumentar la velocidad del proceso (Calinescu *et al.*, 2018); la fermentación asistida con membrana de múltiples etapas que garantiza un alto rendimiento, productividad y pureza a un costo reducido (Pal *et al.*, 2017), el sistemas de integración híbrida con membrana (Leon *et al.*, 2016) en el que se logró una alta eficiencia energética en la destilación para producir alcohol hidratado y destilación híbrida con pervaporación en una sola unidad (Fontalvo and Keurentjes, 2015) donde un módulo de PV con una membrana de fibra hueca reemplaza una sección de empaque o bandejas en una columna de destilación; este sistema supera los límites de destilación, además de que el área de membrana se reduce en comparación con sistemas híbridos convencionales de destilación.

### 2.2. Pervaporación. Tecnología de membrana para la remoción de etanol

La pervaporación (PV) es un proceso de membrana para remover selectivamente dos o más compuestos de mezclas orgánicas u acuosas (Vane, 2005), estas membranas son de

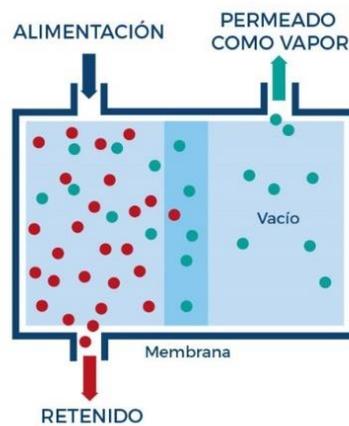
interés debido a su aplicación a la eliminación de alcohol en caldos de fermentación (Cheng *et al.*, 2017).

El método convencional para eliminar y concentrar el etanol es la destilación, pero este no es atractivo según Press (2008) ya que el requerimiento de energía es significativamente mayor a bajas concentraciones de alcohol (< 4 % w), además de que los mayores aportes de energía en la producción de etanol son para el vapor y la electricidad utilizados en el proceso de fermentación/destilación (Baker, 2010). La tecnología de membrana tiene potencial en el proceso de producción de bioetanol como un proceso de separación altamente selectivo y que ahorra energía.(Wei *et al.*, 2014); ya que no está limitada por las diferencias en la volatilidad relativa de los componentes de la mezcla, por lo que la tecnología de membrana tiene potencial de ser utilizada para la separación de azeótropos, lo cual no es posible mediante destilación ordinaria (Khalid *et al.*, 2019).

Esta tecnología se ha aplicado en muchos procesos de producción de bioetanol; algunos de estos son para la producción y separación de etanol mediante un sistema híbrido con membrana (Sun *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2018); dentro de la literatura también se tienen presentes la aplicación de membranas modificadas, a las cuales se les añade en su estructura diversos elementos que mejoran el desempeño de estas en la remoción del BioEtOH, como lo son zeolitas, dodecanol y silicalita; por mencionar algunos (Vane, *et al.*, 2008; Zhuang *et al.*, 2016; León and Fontalvo, 2019). Estos procesos han utilizado la tecnología de membrana en lugar del proceso tradicional para remover etanol de los mostos de fermentación; por lo tanto, esta tecnología es conveniente para ahorrar energía, costos y concentrar el producto antes del próximo proceso de refinación; además de que esta tecnología con membrana hidrófoba es uno de los enfoques más prometedores para la eliminación de etanol in situ durante el proceso de fermentación, ya que no puede causar ningún efecto perjudicial sobre los microorganismos y tiene un buen rendimiento de separación (Qiu *et al.*, 2019).

Los objetivos de la membrana de pervaporación son: (1) eliminar el etanol de la mezcla de reacción para que el rendimiento del producto se incremente en reacciones inhibidas por alta concentración de EtOH y (2) concentrar etanol más allá de la concentración azeotrópica (Luis, 2018b). La permeabilidad y selectividad de la membrana determinarán el beneficio obtenido por el uso de la pervaporación.

De manera general el funcionamiento de un proceso de pervaporación con membrana (**Figura 2.1**) consiste en una alimentación con dos o más componentes en la que el compuesto de interés por medio de difusión pasa a través de la membrana en la que ocurre un cambio de fase, y por medio de presión al vacío como fuerza impulsora se recupera un permeado el cual posteriormente se condensa con nitrógeno líquido. Este mecanismo de transporte es denominado solución- difusión; este mecanismo se usa principalmente para describir la transferencia de masa a través de la membranas no porosas durante el proceso de pervaporación (Fu *et al.*, 2014).



**Figura 2.1** Funcionamiento de membrana en un proceso de pervaporación.

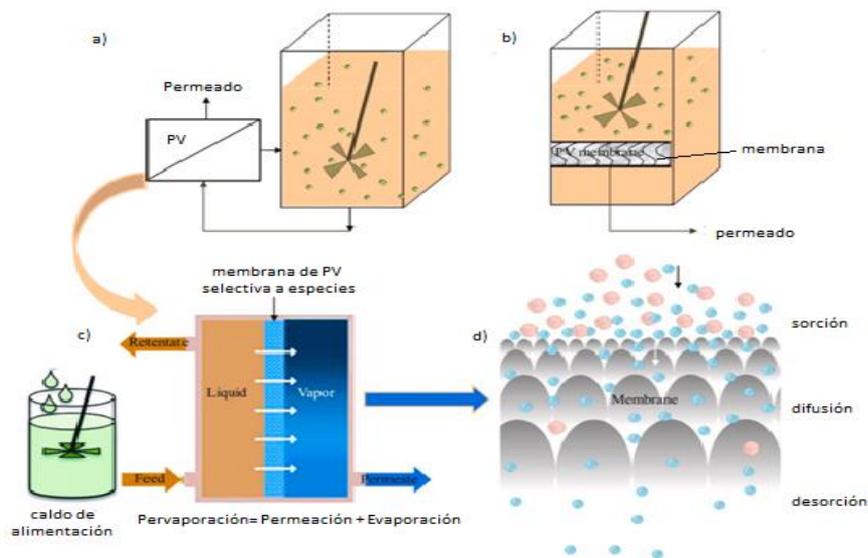
Las membranas se clasifican por su naturaleza en inorgánicas, orgánicas o poliméricas (Rebollar, *et al.*, 2010). Las membranas inorgánicas pueden ser cerámicas o metálicas y las de tipo orgánico se dividen por su estructura en porosas y densas o no porosas. Las membranas densas se consideran membranas no porosas o “no defectuosas” ya que el tamaño del poro es muy pequeño y las propiedades de separación van a depender de las interacciones de la matriz polimérica y el material a separar; es así como para estas membranas el transporte de las especies se realiza por medio de difusión en la matriz de la membrana y se difunden a través de ella debido al potencial químico, diferencia o gradiente de concentración. Este mecanismo de transporte de solución- difusión, rige la transferencia de masa en la membrana el cual considera que no hay gradiente de presión dentro de la membrana densa (la presión es constante en el valor de la presión más alta existente en los dos lados de la membrana); por lo tanto, el potencial químico a través de la membrana está dominado por el gradiente de actividad o por el gradiente de

concentración, en conclusión el transporte masivo se puede describir por el coeficiente de actividad (Qiu *et al.*, 2019, Luis, 2018a).

La membrana densa de Polidimetilsiloxano (PDMS) es uno de los materiales más estudiados para la remoción de etanol de los mostos de fermentación ya que presenta mayor estabilidad, flujos altos, resistencia química y estabilidad térmica; para evaluar su desempeño durante el proceso de pervaporación, en cuestiona a la efectividad de la separación del producto de interés la PV es cuantificada con dos parámetros: la Selectividad, que es la medida de la remoción selectiva de un compuesto orgánico , y el Flux, que se refiere a la velocidad a la cual los componentes removidos pasan a través de la membrana por unidad de área de esta.

### 2.3. Proceso de Fermentación y Pervaporación híbrida

La fermentación continua tradicional tiene limitaciones con la inhibición de producto que afecta en la productividad del proceso; en la literatura, una de las alternativas para mejorar la inhibición por producto es mediante la eliminación in situ de etanol mediante un sistema híbrido de pervaporación-fermentación mediante el uso de membranas. La posición de la membrana en un sistema híbrido se puede encontrar en dos modos de acoplamiento: (1) pervaporación se lleva a cabo externamente y (2) la tecnología de membrana se integra en el interior del reactor (**Figura 2.2**) (Khalid *et al.*, 2019).



**Figura 2.2** Configuración del proceso híbrido de fermentación y pervaporación con a) unidad externa de pervaporación y b) una unidad interna de pervaporación. (Khalid *et al.*, 2019)

(Carstensen *et al.*, 2012) discuten las ventajas y desventajas de las configuraciones en los sistemas de pervaporación; ellos determinaron que una configuración externa puede llegar a ser problemática ya que las células o enzimas se someten innecesariamente a estrés de corte, deficiencias de oxígeno y fluctuaciones del proceso de reacción. En cambio, una configuración con membrana sumergida en el mosto tiene buenos valores de flujo, no requiere el uso de bombas y se descarta un esfuerzo de cizallamiento adicional, además de que este sistema interno de PV permite que las condiciones de reacción se mantengan controladas, así mismo (He *et al.*, 2012) añade a la investigación que la presencia de levadura favorece el proceso de pervaporación al interior del mosto; por lo tanto las membranas sumergidas son en esencia una mejor alternativa en configuración.

En el proceso de remoción de etanol empleando membranas son importantes parámetros como selectividad, flux y el tiempo que tarda la membrana en estabilizarse (Aguilar, 2011); estos parámetros pueden ser afectados o favorecidos en función de la composición de los mostos de fermentación. (Chovau *et al.*, 2011) comprobó que tanto los azúcares como las sales aumentan significativamente la presión de vapor del etanol y disminuye la presión de vapor del agua, lo que significa que la selectividad aumenta, (Aroujalian *et al.*, 2006) presenta la (**Tabla 2.1**) donde las presiones de vapor parciales de etanol/agua en una solución de volúmenes iguales de cada uno con y sin sacarosa en la que se observa que la presión de vapor parcial aumenta en alrededor el 5 % mientras que la presión de vapor parcial del agua disminuye en, aproximadamente 18 % en presencia de azúcar. Estos efectos según lo explica (Aguilar, 2011) se deben a los grupos hidroxilo en el azúcar que interactúan en los enlaces hidrógeno principalmente con agua y en menor medida con etanol formando un puente de hidrogeno

**Tabla 2.1** Presiones de vapor parciales de etanol y agua con y sin sacarosa.

Concentración de sacarosa (mol/L)	Presión de vapor de etanol (mmHg)	Presión de vapor de agua (mmHg)
0	20.2	17.2
0.072	21.3	14.6

Sin embargo otros estudios presentan que los residuos en el caldo de fermentación como azúcares, sales, bacterias y subproductos disminuyeron el flujo y la selectividad de PV, lo cual se es atribuido a una polarización en la concentración (Si *et al.*, 2018).

La concentración de alimento de etanol es otro de los factores importantes que afectan en un sistema de pervaporación, una concentración alta de producto favorece la penetración de etanol como la hinchazón en la membrana, por lo tanto, la resistencia a la permeación disminuye al aumentar la concentración de alimentación (Khalid *et al.*, 2019), cuanto mayor sea la concentración de etanol, mayor será el flujo, pero se obtendrá una menor permeabilidad, por lo que, la membrana es selectiva hacia etanol en bajas concentraciones de este compuesto, mientras que pierde selectividad cuando se usan concentraciones más altas de etanol (Luis, 2018a).

# Capítulo 3

## 3. Planteamiento del Problema

La baja conversión de azúcares en la fermentación alcohólica y la inhibición de los microorganismos por producto (etanol) han motivado a buscar alternativas para que el proceso de fermentación se lleve a cabo de la mejor manera para la producción eficiente de etanol. La aplicación de tecnología de membrana es una alternativa prometedora debido a su bajo costo, bajo consumo energético y la aportación de mayor productividad a el proceso fermentativo; es por ello que en este trabajo de tesis se pretendió la exploración de dicha tecnología aplicándola a mostos con contenido de etanol de primera generación.

### 3.1. Objetivo General

En un proceso de fermentación alcohólica, con base en la tecnología de membrana, obtener un producto de fermentación con una concentración de etanol mayor al 10 % w/v y una conversión de azúcares a etanol casi completa.

### 3.2. Hipótesis

Mediante el uso de la tecnología de membrana (pervaporación) en un sistema de fermentación en tanque agitado se removerá etanol del sistema de una manera eficiente, lo cual aumentará la conversión de azúcares a etanol, manteniendo una concentración no inhibitoria en el caldo fermentativo y obteniendo así un producto con alta concentración de etanol

### 3.3. Objetivos específicos.

1. Diseñar un proceso de fermentación con el mayor rendimiento y/o velocidad de producción posible.
2. Realizar procesos de fermentación alcohólica probando diferentes concentraciones de sustrato.
3. El etanol proveniente de las fermentaciones sea removido por un proceso de pervaporación.
4. Evaluar el desempeño del proceso de fermentación y pervaporación.

### 3.4. Justificación

En un proceso de fermentación alcohólica convencional los microorganismos responsables de la fermentación se inhiben cuando la concentración de etanol alcanza un nivel crítico de (10% w/v), teniendo como consecuencia que no sea posible una conversión alta de azúcares a etanol.

Una alternativa para resolver esta problemática es acoplar la tecnología de membrana de pervaporación a un proceso de fermentación, solucionando la inhibición con la remoción continua de etanol, lo que permite reducir la concentración del producto de interés en el caldo fermentativo y alcanzar mayores conversiones de glucosa a etanol incrementando el rendimiento de la reacción y recuperando continuamente una corriente concentrada de etanol.

Esta tecnología de separación es una alternativa eficiente de bajo costo, que no requiere el uso de aditivos en comparación con la destilación.

### 3.5. Metodología.

Debido a los principales inconvenientes de una fermentación alcohólica convencional relacionada con la inhibición por producto se decidió estudiar esta problemática enfocada en algunas de las variables que presenta un cambio representativo durante un proceso fermentativo; proponiendo un diseño de experimentos tipo Box-Behnken (BBD) (Apéndice A) utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta (RMS) en el cual se manipularon las variables de temperatura (28, 33 y 35 °C) , número de células iniciales ( $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  y  $3 \times 10^7$  células/ml) utilizando *Saccharomyces Cerevisiae* la cual fue provista por el Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato, campus Guanajuato y pH (3, 3.5 y 4), con el fin de evaluar la respuesta de estas tres variables y obtener diseños que presenten el mejor desempeño de fermentación.

La visualización del desempeño fermentativo se siguió continuamente generando las cinéticas, en base al conteo celular, consumo de azúcares, y formación de etanol. Mediante las técnicas de conteo por Cámara de Neubauer, DNS-Miller.

Los procesos de fermentación con membrana se llevaron a cabo en una Estancia de Investigación en la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Campus la Nubia en colaboración con el Dr. Javier Fontalvo Alzate y el Dr. Juan Carlos Higueta con el Grupo de Investigación en Aplicación de Nuevas Tecnologías en el Laboratorio de Intensificación de Procesos y Sistemas Híbridos.

Durante la estadía se realizaron procesos de fermentación alcohólica probando diferentes concentraciones de sustrato (200, 250, 300, 400 g/L) en un sistema experimental de tanque agitado de 1 L; utilizando *Saccharomyces Cerevisiae* provista por el Laboratorio de Ciencias Biológicas y Moleculares de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Nacional de Colombia, campus Manizales. El etanol proveniente de las fermentaciones fue removido por procesos de pervaporación con membrana y se evaluó el desempeño del proceso de fermentación (cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y formación de producto) y de pervaporación (flujo, selectividad, factor de separación) haciendo uso de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y conteo por Cámara de Neubauer.

# Capítulo 4

## 4. Procedimientos Experimentales

Las cepas utilizadas de *Sacharomyces Cerevisiae* utilizadas en este estudio fueron la cepa de tipo salvaje AR5 (experimentos en Guanajuato, México) y la cepa CO (experimentos en Manizales, Colombia). Los reactivos utilizados fueron Peptona de Caseína (BIOXON), Dextrosa (BIOXON), Etanol (96 ° GI), miel tipo B (**Tabla 4.1**).

**Tabla 4.1.** Composición de Miel B

° Brix	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
77.3	619.92	136.16	77.3

### 4.1. Fermentación Alcohólica.

#### 4.1.1 Fermentación a nivel matraz.

Este proceso consta de dos etapas fundamentales: la realización del pre-inóculo y la fermentación.

##### 1. Pre-inoculo.

Las cepas de levadura se mantuvieron en agar y se cultivaron durante 48 h a 28 °C.

Se utilizaron medios líquidos de YPD (2% peptona, 1% de extracto de levadura y 2% de dextrosa [w/v]) para hacer el cultivo de la levadura AR5 (3 colonias); las condiciones de incubación fueron 28 °C con una agitación continua de 130 rpm durante 18 h.

Una vez pasadas las 18 h, se toma una muestra del medio a la cual se le realiza una dilución 1:100 para realizar el conteo celular y posteriormente realizar el cálculo correspondiente para inocular el medio a fermentar con el número de células iniciales requerido

## 2. Fermentación.

Los experimentos de fermentación a nivel matraz se llevaron a cabo mediante el uso de la cepa *Saccharomyces Cerevisiae* AR5 provista por el Laboratorio de Genética Molecular y de Hongos de la Universidad de Guanajuato (UG), utilizando como sustrato glucosa grado reactivo a una concentración de 100 g/L. Para la realización de esta etapa de experimentación se hizo uso de un diseño experimental tipo Box-Behnken (BBD) utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta (RMS) en el cual se manipularon las variables de temperatura (28, 33 y 35 °C), número de células iniciales ( $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  y  $3 \times 10^7$  células/mL) y pH (3, 3.5 y 4); con un total de 30 experimentos a una agitación constante de 100 rpm.

El proceso de fermentación a nivel matraz se monitorea por 12 h tomando muestra cada 2 h evaluando crecimiento celular por cámara de Neubauer, consumo de sustrato por la técnica DNS. Para cada uno de los pasos anteriores es de suma importancia mantener esterilidad.

### 4.1.2. Fermentación alcohólica a nivel tanque agitado

Una vez asimilado el proceso de fermentación a nivel matraz se decidió hacer experimentaciones en tanque agitado variando la cantidad de sustrato inicial (200, 250, 300, 400 g/L); para la realización de esta experimentación se utilizó como sustrato miel tipo B y la cepa *Saccharomyces Cerevisiae* (CO) la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Ciencias Biológicas y Moleculares de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), campus Manizales.

Para realizar estas fermentaciones se realizaron los siguientes pasos: un tratamiento ácido de sustrato, preinoculo y fermentación.

1. Tratamiento ácido: se ajustó el pH de la solución a 4 con una solución 1.5 M de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y se calentó a 90 °C durante 2 h. Este tratamiento permitió desdoblar el polisacárido sacarosa.

2. Se utilizaron 250 mL del medio previamente tratado con ácido, este medio se esteriliza y se inoculan con 50 mL de solución rica de levadura (proveniente de una fermentación anterior), este medio se pasa a incubadora a una temperatura de 30 °C durante 24- 48 h para la reproducción del microorganismo.
3. Fermentación: Se utilizaron 900 mL de solución de miel a la concentración requerida y nutrientes (**Tabla 4.2**) los cuales se esterilizaron por separado en autoclave a 121 °C durante 15 min. Los nutrientes utilizados fueron los siguientes; por cada 267.9 g de miel se tiene la siguiente relación de nutrientes. Se utilizó una concentración celular inicial de  $5 \times 10^7$  células/mL, una temperatura de 30 °C y una agitación de 80 rpm.

**Tabla4. 2.** Nutrientes utilizados durante la fermentación a nivel tanque agitado.

<i>Reactivos</i>	<i>Concentración [M]</i>	<i>Volumen utilizado (mL)</i>
<i>Sulfato de magnesio hepta hidratado (MgSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O)</i>	0.1	0.081
<i>Fosfato Trisódico (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)</i>	0.4	2.8
<i>Urea (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O)</i>	1	6.43
<i>Cloruro Férrico (FeCl<sub>3</sub>)</i>	0.1	0.158

Por lo tanto, según sea la cantidad de miel usada se hace el calculo correspondiente para obtener el volumen a utilizar de nutrientes.

Este proceso de fermentación se monitorea durante 24 h tomando muestra cada 2 h, evaluando crecimiento celular por cámara de Neubauer, consumo de sustrato, formación de etanol por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) utilizando la columna CHO782Pb.

## 4.2. Mediciones de muestra y evaluación del proceso de fermentación alcohólica.

### 4.2.1. Conteo celular.

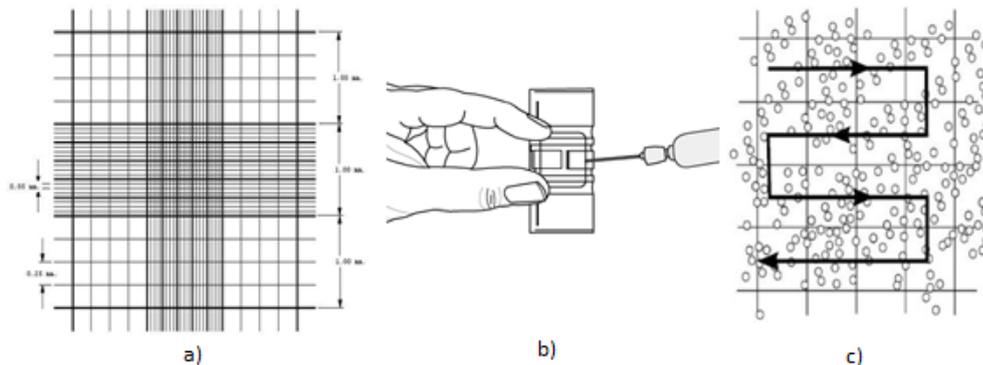
Para realizar el recuento celular se utilizaron cámaras que contienen un volumen determinado entre una lámina y un cubreobjetos; la cámara de Neubauer (**Figura 4.2**); para el uso de esta herramienta y obtener una buena reproducibilidad es importante saber

el tamaño de muestra, la dilución, el objetivo del microscopio y la técnica de llenado de cámara (Arredondo and Voltolina, 2014)

Protocolo para el conteo celular por cámara de Neubauer:

- Agitar el medio (preinoculo) para permitir que las células tengan una distribución homogénea
- Tomar una muestra de 1 mL y colocarla en un microtubo y agitar nuevamente para realizar una dilución 1:100.
- Limpiar la cámara colocar el cubreobjeto y llenar la cámara, utilizando un volumen de 5  $\mu\text{L}$  (de la dilución 1:100 para preinoculo y 1:10 para muestras durante la realización de la fermentación), cuidando que el volumen depositado sea el suficiente para que una parte llegue hasta los canales laterales, pero sin inundarlos completamente.
- Utilizando el Microscopio enfocar la cámara con el objetivo 10X, una vez enfocado utilizar el objetivo 40X para realizar el conteo utilizando la rejilla central de la cámara.
- El número de células/mL se calcula siguiendo la ecuación (6).

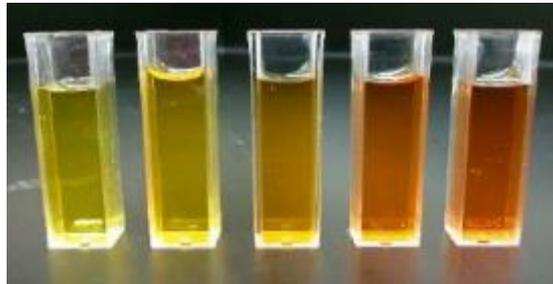
$$\neq \frac{\text{celulas}}{\text{mL}} = (\neq \text{celulas contadas}) * 100 * 1x10^4 \quad (6)$$



**Figura 4.2** Cámara de Neubauer a) cuadrícula Neubauer, b) forma de llenado de cámara y c) dirección del conteo en cámara de Neubauer.

#### 4.2.2. Azúcares Reductores Totales

El ensayo de azúcar reductor con ácido 3, 5- dinitrosalicílico (DNS) es el método más conveniente para la cuantificación del azúcar total en hidrolizado de biomasa, muestras de fermentación, industria azucarera y laboratorios de biotecnología (Zohri *et al.*, 2018). La preparación del reactivo DNS se describe en el Apéndice A (Reactivos y Equipos). Esta es una técnica colorimétrica (**Figura 4.3**) en la que la intensidad de color representa la presencia de azúcares reductores totales, la cuantificación de estos azúcares se lleva a cabo por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm.



**Figura 4.3** Colorimetría DNS.

#### 4.2.3. Cromatografía de Alta Eficiencia (HPLC).

Se utilizó el equipo HPLC Elite LaChrom (**Figura 4.4**) con automuestrador para medir muestras de etanol de fermentaciones alcohólicas; así como la medición de sacarosa, glucosa y fructosa. La columna utilizada fue CHO-782 Pb la cual es iónica altamente sulfonada, diseñada para la separación de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y azúcares alcohólicos, mediante intercambio de ligandos. Esta columna tiene iones de plomo unidos a los grupos sulfonato negativos. Por tanto, en el intercambio de ligandos, los grupos de hidroxilo negativamente cargados de las moléculas de carbohidratos interactúan con la carga positiva de los grupos metálicos de la columna. Posteriormente estos carbohidratos son eluidos por agua (fase móvil polar) la cual compete por los sitios

del ion metálico. En el apéndice A sección A.3. se presentan las principales características de la columna. El software utilizado fue EZChromElite.



**Figura 4.4** Equipo HPLC Elite LaChrom.

Para la evaluación de rendimientos de las fermentaciones a un alto volumen (1L) se calculó los rendimientos de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) y producto ( $Y_{p/s}$ ). Estos se calcularon según las siguientes ecuaciones (ONCL,2000) dónde la cantidad de levadura producida por cantidad de sustrato  $Y_{p/s}$  se calculó como la relación de las diferencia de producto generado y la diferencias de sustrato consumido (6), y la cantidad de producto sintetizado por cantidad de sustrato  $Y_{x/s}$  como la relación de la biomasa generada y el sustrato consumido (7).

$$Y_{\frac{p}{s}} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (6)$$

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (7)$$

### 4.3 Pervaporación (Membrana PDMS)

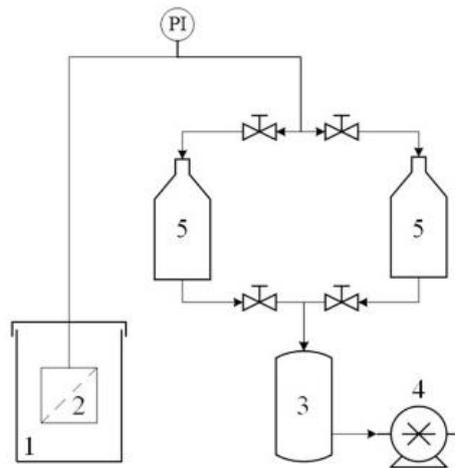
El proceso de PV se realizó en dos etapas: Pervaporación con solución ideal y PV con mostos de fermentación que se obtuvieron de las fermentaciones a nivel tanque agitado.

4.3.1 Pervaporación de solución ideal.

Se realizaron experimentos de PV con solución ideal de etanol con el objetivo de asimilar el proceso y evaluar los módulos de membrana proporcionados, para luego elegir el que presente mejor desempeño para posteriormente utilizarlo en los mostos de fermentación. La concentración de solución ideal utilizada fue de 80 g/L y los 4 módulos de membrana utilizados contenían las siguientes áreas efectivas: 0.0082, 0.0061, 0.0095 y 0.0095 m<sup>2</sup>.

El funcionamiento de un proceso de pervaporación se describe en las siguientes líneas:

Utilizando un sistema de pervaporación de membrana PDMS para la eliminación de alcohol en el caldo de fermentación o caldo ideal, la **(Figura 4.1)** muestra un esquema de la configuración del sistema de pervaporación, en la que se alimenta un volumen de solución de interés en el recipiente (1), donde la membrana (2) se encuentra sumergida completamente, aplicando una agitación vigorosa para proporcionar una concentración uniforme, con una temperatura controlada de 30 °C , se aplicó una presión de permeado de 0.001 bar y el uso de nitrógeno líquido para enfriar la corriente de permeado. El flujo de permeado se recuperó continuamente mediante la disposición de dos recipientes de permeado (5). Se tomó una muestra de permeado cada 1 h hasta que el flujo de membrana fuera relativamente constante.



**Figura 4.5** Configuración experimental de pervaporación. (1) Recipiente de Alimentación, (2) membrana de pervaporación, (3) trampa de nitrógeno líquido, (4) bomba de vacío y (5) trampa fría de nitrógeno de recuperación de permeado (León and Fontalvo, 2019)

#### 4.3.2. Pervaporación a mostos de fermentación.

Para realizar esta parte experimental se utilizaron los mostos provenientes de las fermentaciones a nivel tanque agitado utilizando altas concentraciones de sustrato. Previo al proceso de pervaporación, estos mostos se someten a centrifugación para separar los microorganismos y evitar la formación de productos secundarios.

El procedimiento experimental se realiza de la misma manera en como se describe en la figura 4.1.

#### 4.4. Medición de muestras y evaluación del proceso de PV

El experimento se desarrolló para medir el flux y los factores de separación; dicha medición se realizó pesando la masa que se recoge en el permeado en un determinado periodo de tiempo (1 h) y analizando la composición de permeado y retentato por medio de HPLC. Para establecer el desempeño de las membranas en la pervaporación son calculados el flux total, flux individual, factor de separación, selectividad y fuerza impulsora.

Los coeficientes de actividad para las mezclas agua-etanol fueron evaluados con el modelo NRTL (León and Fontalvo, 2019), y las presiones de vapor fueron calculadas usando la ecuación de Antoine. El flujo total se calculó como la relación de masa permeada recogida en un periodo de tiempo con un área efectiva de membrana **(1)**, el flujo por cada componente permeable fue calculado como el producto del flujo total y la fracción masa del permeado **(2)**, la selectividad de membrana se calculó como la relación de las fracciones molares en el permeado a sus fracciones molares en el retenido **(3)**, se calcularon las fuerzas motrices para el etanol **(4)** donde los coeficientes de actividad y la presión de vapor son evaluados por la temperatura del retenido. (Fontalvo, 2012) y finalmente se calculó el factor de separación como la relación de las fracciones molares del componente i en los lados del retenido y permeado.

$$J_t = \frac{m}{A * \Delta t} \quad (1)$$

$$J_i = J_t * y_e \quad (2)$$

$$\alpha = \frac{\frac{y_e}{1 - y_e}}{\frac{x_i^R}{1 - x_i^R}} \quad (3)$$

$$\Delta P_i = x_i^R P_i^o \gamma_i \quad (4)$$

$$SF = \frac{y_i/x_i}{y_j/x_j} \quad (5)$$

Donde la masa total de permeado en g ( $m$ ), el flujo total en Kg/m<sup>2</sup>h ( $J_t$ ), flujo individual de etanol en Kg/m<sup>2</sup>h ( $J_i$ ), el área efectiva de membrana en m<sup>2</sup> (A) y el tiempo de recolección en h ( $\Delta t$ ). La selectividad ( $\alpha$ ), fracción masa de etanol en el permeado ( $y_e$ ), fracción mol de etanol en el retentato ( $x_i^R$ ), fuerza impulsora del componente i a través de la membrana en bar ( $\Delta P_i$ ), presión de vapor del componente puro y en bar ( $P_i^o$ ), el factor de separación ( $SF$ ) donde, ( $x_i$ ,  $y_i$ ) son las fracciones molares del componente i en los lados del retenido y permeado, respectivamente.

Para los experimentos de pervaporación con etanol- agua- glucosa ( correspondientes a la remoción de etanol de los mostos fermentativos) se utilizaron las ecuaciones de Henry y Maxwell- Stefan para el equilibrio y transporte de masa, respectivamente con el modelo de solución- difusión, este se ha utilizado para predecir el comportamiento de las membranas de pervaporación PDMS en caldos de fermentación en presencia de glucosa y CO<sub>2</sub> (Fontalvo, 2012), estas fueron proporcionadas por el Dr. Javier Fontalvo Alzate de la Universidad Nacional de Colombia.

# Capítulo 5

## 5. Resultados

### 5.1. Fermentaciones.

Se realizaron fermentaciones para soluciones de glucosa a nivel matraz con lo cual se desea comparar el desempeño de las variables de respuesta (pH, temperatura y concentración celular) y fermentaciones de soluciones con sustrato de miel tipo B, en base a altas concentraciones de azúcar.

#### 5.1.1. Fermentaciones de Soluciones de Glucosa (nivel matraz)

Se evaluó el desempeño del proceso utilizando un diseño de experimentos tipo BBD con metodología de superficie de respuesta apoyados del software MiniTab.

Se obtiene una tabla aleatorizada con un total de 30 experimentos por duplicado para evaluar las variables de interés (pH, temperatura y concentración celular); aplicando la metodología propuesta se obtienen las siguientes superficies en las que se observan los puntos máximos en los que se obtiene un mayor rendimiento de producción de etanol (**Figura 5.1**).

Visualizando las superficies de respuesta obtenidas se observa un rendimiento teórico del 40%, encontrando que hay mejor respuesta a altas concentraciones de microorganismos, a un pH y temperatura intermedias según el intervalo propuesto para ambas variables. Para tener cifras exactas de las variables se recurre a la herramienta de optimización de MiniTab, en donde se obtienen los mejores valores para estas condiciones de fermentación.

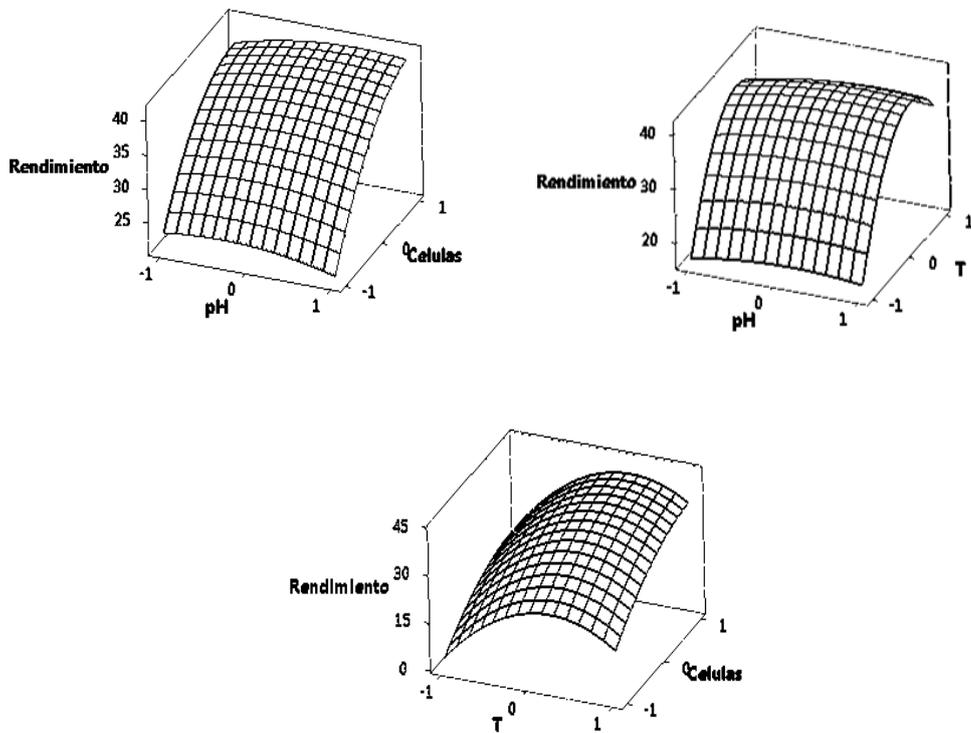
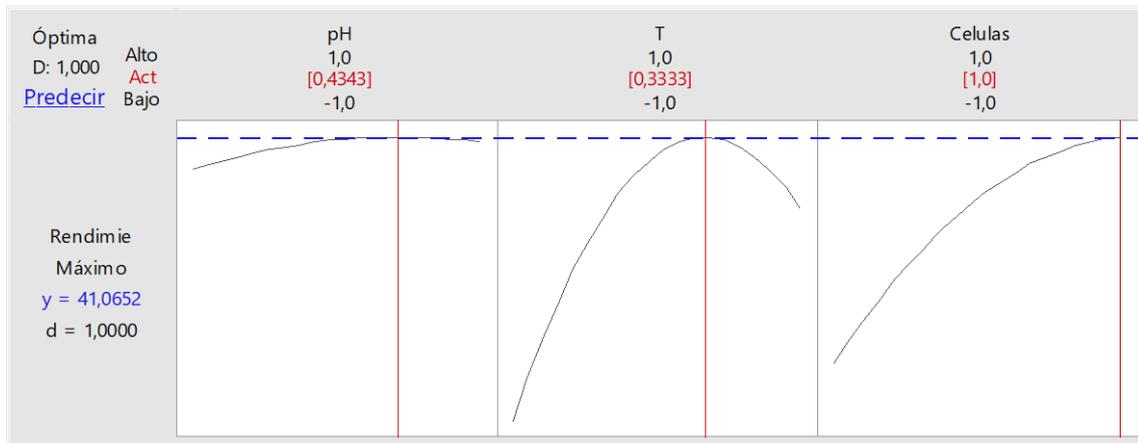


Figura 5.1 Superficies de Respuesta.

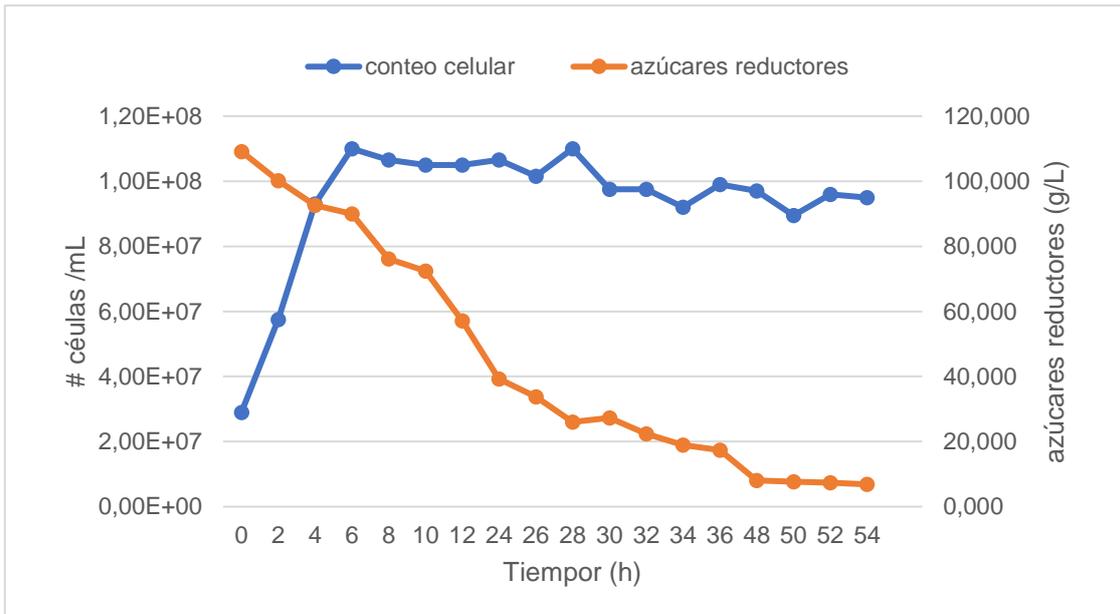
En la **(Figura 5.2)** se muestra las gráficas de optimización que representan los valores predominantes de los parámetros con los cuales se tiene un mejor aprovechamiento en el proceso de fermentación.



**Figura 5.2** Gráficas de optimización para las variables de diseño

Los parámetros con los cuales ocurre un mayor aprovechamiento de los microorganismos para la producción de etanol utilizando la gráfica de optimización son un pH de 4,7, temperatura de 33°C y  $3 \times 10^7$  células, estos valores encontrados mediante el diseño de experimentos se usaron para una fermentación a nivel tanque agitado de 0.5 L en la cual se evaluó el desempeño con las trayectorias de conteo celular y reducción de azúcares reductores.

La fermentación fue monitoreada durante 54 h tratando de hacer la toma de muestra cada 2 h; a continuación, en la **(Figura 5.3)** se observan las trayectorias de consumo de sustrato y crecimiento celular.



**Figura 5.3** Trayectorias de consumo de sustrato y crecimiento celular de una fermentación alcohólica de 1G utilizando glucosa nivel reactivo

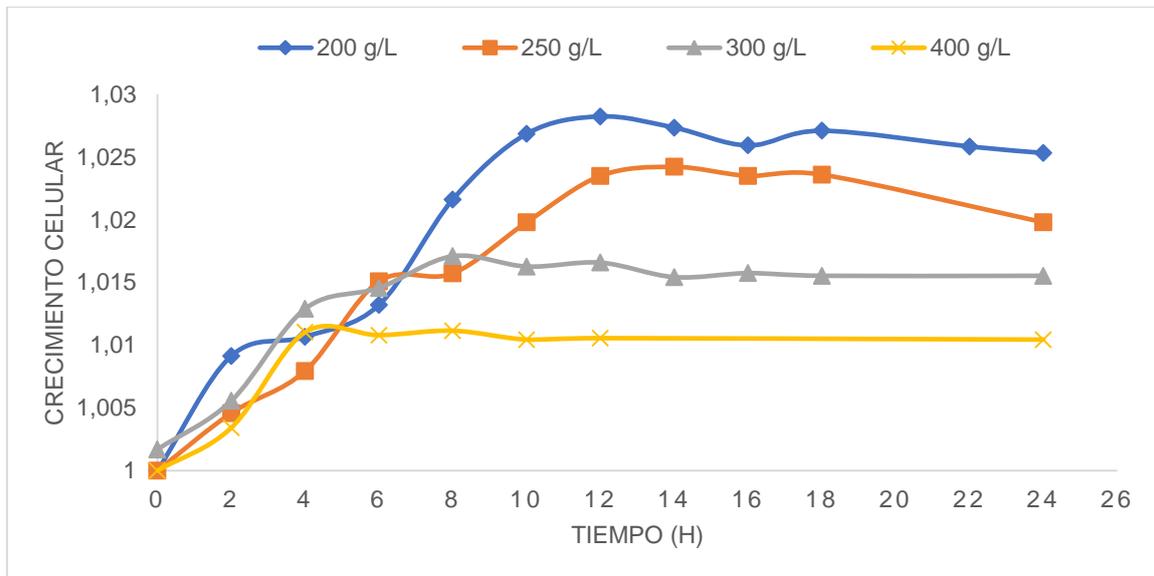
Se consumieron en su totalidad los azúcares reductores a las 32 h y se obtuvo un crecimiento de  $1,10E+08$  aproximadamente a las 6 h.

La fermentación pudo haberse detenido entre las 24 y 30 h ya que el consumo de sustrato ya no es significativo lo cual atribuye a la terminación del proceso; sin embargo, se mantuvo durante un mayor tiempo por lo que seguramente en el mosto se pudieron haber formado inhibidores como el ácido acético.

## 5.2. Fermentación Alcohólica (Altas concentraciones de sustrato, miel B)

Las fermentaciones con alta concentración de sustrato realizadas a nivel tanque agitado muestran los siguientes resultados.

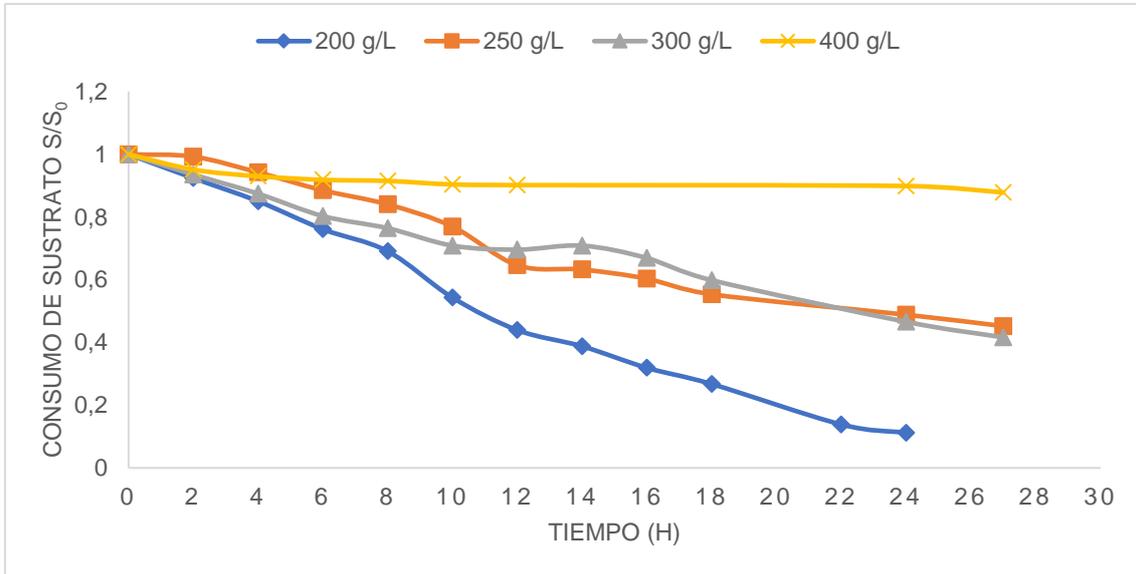
El proceso de fermentación alcohólica se desarrolló con aproximadamente una concentración inicial de 25.12 células/L, correspondientes a la unidad en las trayectorias normalizadas (**Figura 5.4**)



**Figura 5.4** Trayectorias normalizadas de biomasa durante la fermentación alcohólica utilizando como sustrato miel tipo B

De acuerdo a las trayectorias se tiene un mayor crecimiento celular a una menor concentración de azúcar (200 g/L) a diferencia de la más alta concentración de sustrato la cual presenta el mínimo crecimiento comparado con el resto de las trayectorias; esto puede deberse a la capacidad de la cepa para metabolizar tan altas concentraciones de azúcares, lo cual es un efecto limitante en las fermentaciones y condiciona la velocidad de reproducción y el crecimiento de los microorganismos (Inei *et al.*, 1996; Jos and Paz, 2016).

Las trayectorias normalizadas de consumo de sustrato se observan en la **(Figura 5.5)**



**Figura 5.5** Trayectorias normalizadas de consumo de sustrato durante la fermentación alcohólica utilizando miel tipo B.

Donde se muestra el comportamiento e influencia de la concentración de azúcares, es decir, entre mayor sea la concentración de estos, se tiene un menor consumo de sustrato de tal manera que se encontró que a 400 g/L no hay actividad metabólica y a concentraciones de 250 y 300 g/L se tienen trayectorias muy similares de consumo de sustrato

La formación de etanol a lo largo del tiempo **(Figura 5.6)** muestra que a las 6 h se tiene presente la formación del producto de interés con 200 g/L de sustrato, la cual destaca por tener la mayor producción de etanol de aproximadamente 90 g/L; este valor está muy cerca de los valores reportados industrialmente seguido de 70 y 50 g/L para las siguientes dos trayectorias. Para la fermentación con mayor concentración de sustrato no se tuvo formación de alcohol, debido a las altas concentraciones de azúcar presentes en el medio es posible que la producción de etanol se vea perjudicada por la limitación de la levadura al metabolizar los azúcares ya que se observa que a mayor concentración de sustrato

menor es la producción del bioetanol, hasta llegar a un máximo de concentración en la que hay actividad nula en el proceso.

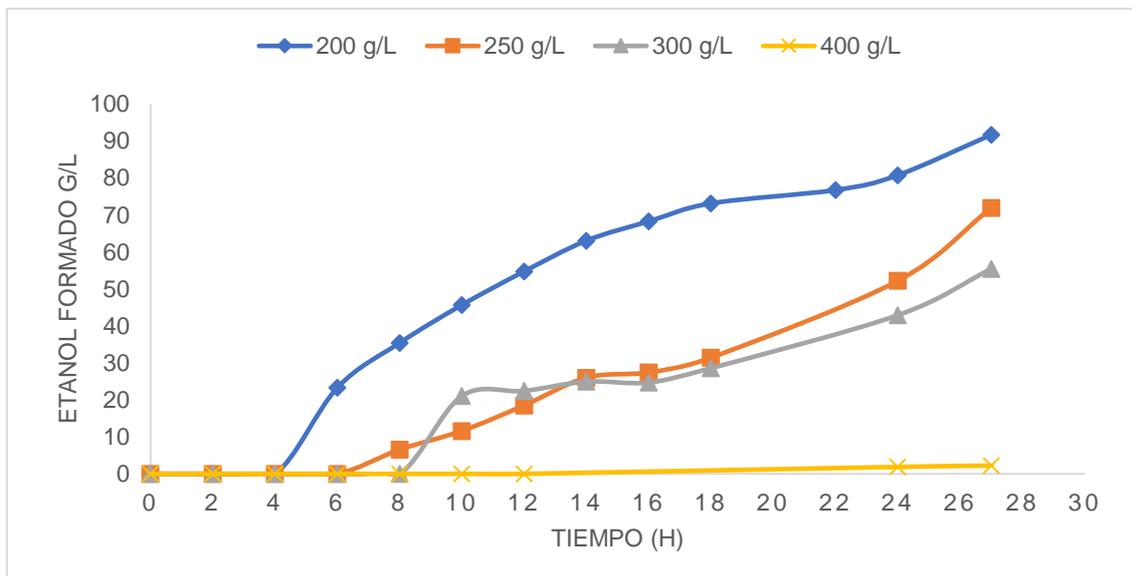


Figura 5.6 Trayectorias de formación de producto (etanol) durante la fermentación utilizando sustrato miel tipo B.

En la (Tabla 5.1) se muestran los rendimientos de las fermentaciones a altas concentraciones de sustrato y se encuentra que a 200 g/L se tienen mayores rendimientos de producto sintetizado y de biomasa por cantidad de sustrato consumido, esto corresponde a los resultados mostrados anteriormente.

Tabla 5.1 Rendimientos de biomasa y producto a partir del sustrato de las fermentaciones a altas concentraciones

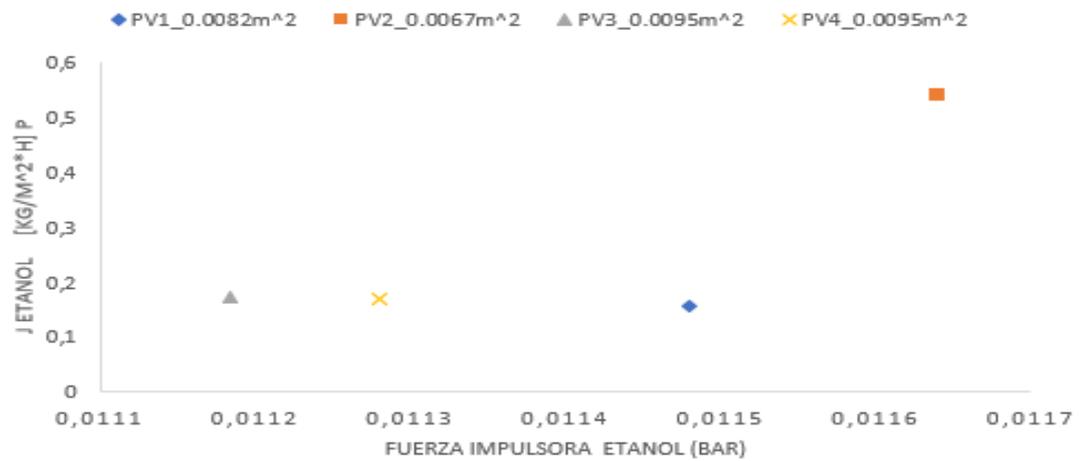
Sustrato (miel B)	200 g/L	250 g/L	300 g/L	400 g/L
$Y_{\frac{P}{S}}$	0.439	0.349	0.22	0.046
$Y_{\frac{X}{S}}$	0.002	0.001	0.009	0.0007

5.3. Pervaporaciones.

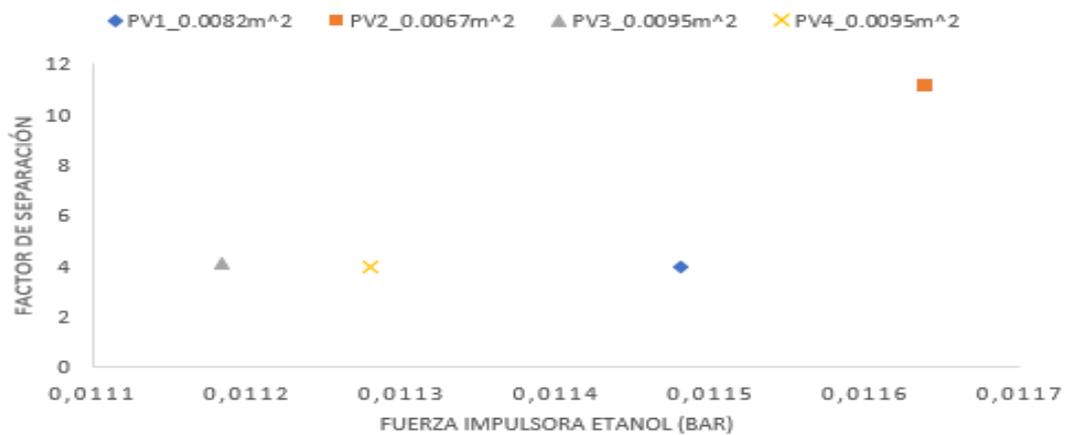
5.3.1. Pervaporaciones con soluciones ideales.

Para evaluar el desempeño se tomaron muestras cada 1 h evaluando el flujo de etanol y el factor de separación de cada módulo.

En la (Figura 5.7) se visualiza el comportamiento y desempeño de cada módulo de membrana utilizados; estos solo varían en su área de contacto efectiva (0.0082, 0.0067, 0.0095 y 0.0095 m<sup>2</sup>).



a)



b)

Figura 5.7 Desempeño de PV utilizando solución ideal de etanol/agua a) Flujo de etanol en función de la fuerza impulsora y b) Factor de separación en función de la fuerza impulsora.

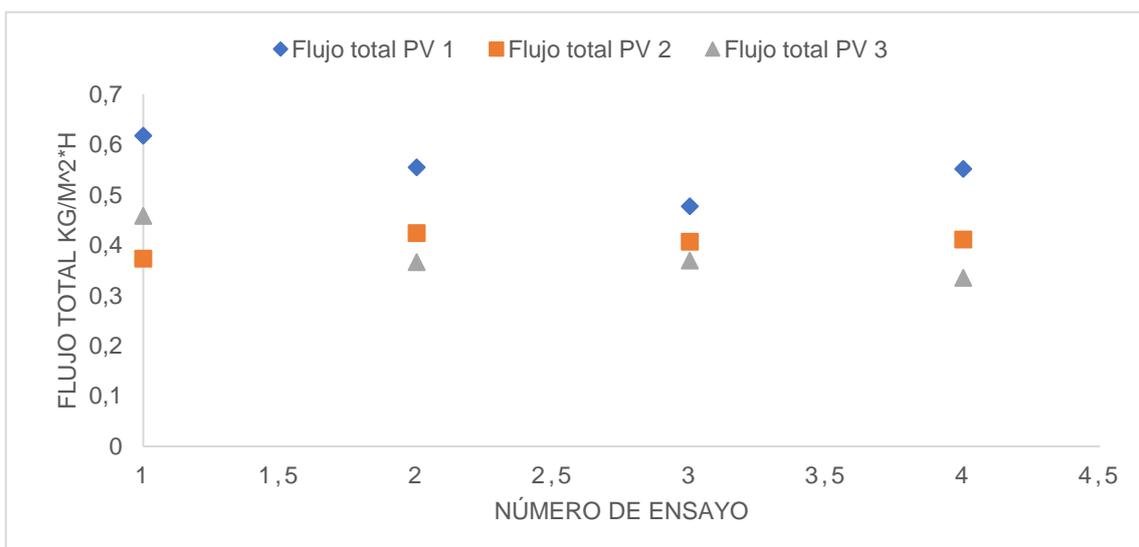
El módulo con mayor desempeño de acuerdo con los resultados encontrados en flujo y factor de separación de etanol fue el correspondiente a un área de 0.067 m<sup>2</sup> el cual fue elegido para realizar los próximos experimentos de pervaporación utilizando los mostos obtenidos de las fermentaciones realizadas.

### 5.3.2. Pervaporaciones con mostos de fermentación.

Para las pervaporaciones con mostos de fermentación solo se realizaron con tres de los mostos obtenidos debido a que a una concentración de 400 g/L no se obtuvo producción de etanol.

Se uso un módulo membrana de PDMS con área efectiva de 0.0067 m<sup>2</sup>, temperatura 31°C y 0.01bar. Las pervaporaciones se realizaron durante un periodo de tiempo de 4 h en las cuales se obtuvo una composición de permeado de etanol de 260 g/L esto fue medido por HPLC.

De acuerdo con los resultados (**Figura 5.8**) presentados se observa como el flux de cada PV se mantiene aproximadamente constante, sugiriendo que la membrana no presenta un deterioro durante la pervaporación del mosto. Se obtiene un flujo total promedio de aproximadamente de 0.45 kg/m<sup>2</sup>h.



**Figura 5.8** Flujos totales de PV a distintas concentraciones de etanol, PV1 90 g/L etanol, PV2 70 g/L de etanol y PV3 a 50 g/L.

En la (Figura 5.9) se muestran los flujos individuales de etanol (a) y agua (b) para los mostos de fermentación obtenidos, estas graficas presentan un comportamiento lineal en que se observa que el flujo de etanol es mayor a una alta concentración lo cual según (Khalid *et al.*, 2019) una concentración alta de producto favorece a la hinchazón de la membrana debido al aumento de la absorción del alcohol y como resultado la membrana tiende a inflarse, lo cual disminuye la selectividad a etanol y aumenta la difusión de agua en la membrana (Mohammadi *et al.*, 2005) esto puede verificarse de acuerdo en lo encontrado en la grafica de flujo de agua lo que afirma que a mayores concentraciones de etanol la membrana tiende a dejar pasar al agua o bien tiende a ser hidrofílica.

Por lo tanto, menores concentraciones de etanol favorecen la selectividad de la membrana

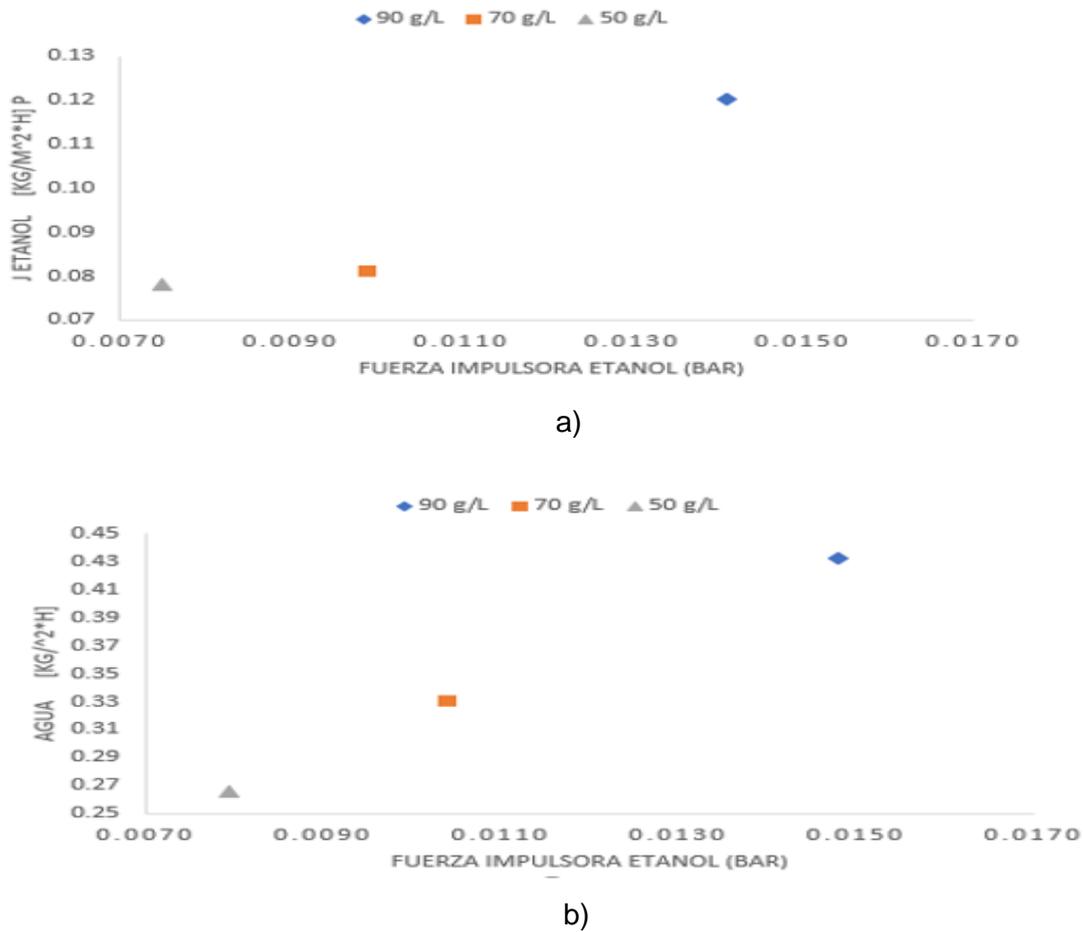
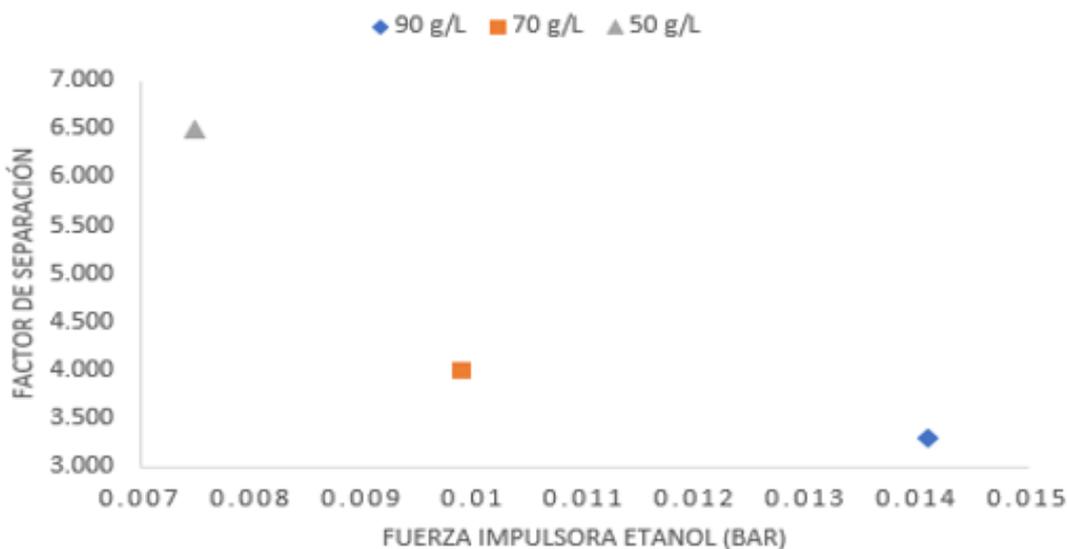


Figura 5.9 Flujos de etanol (a) y agua (b) en función de la fuerza impulsora del etanol con diferentes concentraciones de alcohol provenientes de mostos de fermentación.

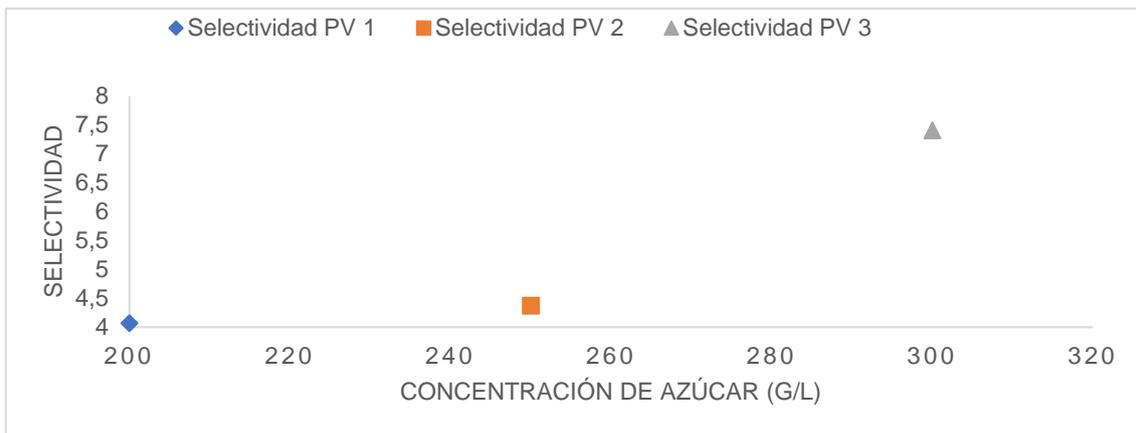
En las gráficas de flujo de etanol y agua, se observa que a pesar de que a menores concentraciones de etanol el flujo de agua es menor; este sigue siendo ligeramente mayor al de etanol; en conclusión, las membranas no son 100 % selectivas o bien ya que el mismo módulo de membrana fue utilizado para cada PV a este se le pudieron haber incrustado algunas sales o suciedad lo cual limitó el aprovechamiento del módulo.

El factor de separación se muestra (**Figura 5.10**), dónde se consigue un alto valor de separación a una baja concentración de etanol en el retenido; esto coincide con otros trabajos (Mohammadi *et al.*, 2005; Fontalvo, 2012) , al aumentar la concentración de etanol la membrana tiene un bajo desempeño de separación esto puede ser debido al hinchamiento por el aumento de absorción del alcohol; aumentando el paso de agua a través de la membrana y disminuyendo el factor de separación. La mejor separación se obtuvo a 50 g/L de alcohol con un valor de 6.5 el cual se encuentra en el rango de membranas de PDMS reportadas por la literatura (Bello *et al.*, 2014; Zhuang *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2018).

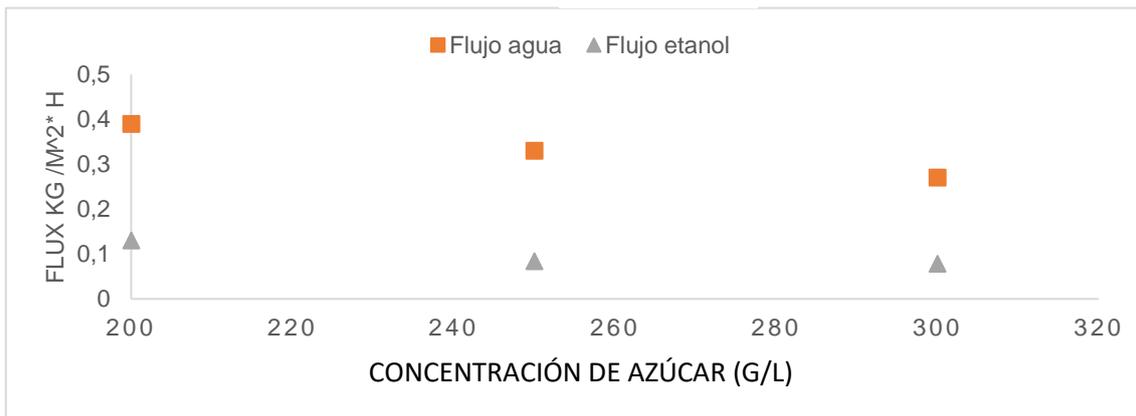


**Figura 5.10** Factor de separación del módulo de membrana de PDMS utilizando diferentes concentraciones de etanol.

Lo reportado en la literatura por (Aroujalian *et al.*, 2006; Aguilar, 2011; Chovau *et al.*, 2011) en los que comparten que la presencia de azúcares disminuye la presión de vapor del agua, es decir, disminuyendo su flux y aumenta la presión de vapor del etanol aumentando su flux; se representa en la (**Figura 5.11**), en la que el azúcar contenida en el mosto tiene un efecto favorecedor en la selectividad a etanol en la membrana (**a**); este comportamiento también ha sido reportado por (Fontalvo, 2012) en el que en la literatura reporta concentraciones de glucosa presentes en el proceso de PV de 50, 100, 200 y 400 g/L en el cual encuentra que a concentraciones por encima de 400 g/L de glucosa ocurre un taponamiento de membrana el cual no permite el paso de flujo de etanol ni de agua, haciendo con esto que la selectividad disminuya.



a)



b)

**Figura 5.11** Influencia de la concentración de azúcar en la(a) selectividad y (b) Influencia de los flujos individuales a diferentes concentraciones de azúcar

Sin embargo, en el presente estudio se observa que a una concentración de azúcar de 300 g/L la membrana es resistente y aún tiene un alto desempeño en selectividad, con el cual presenta un intervalo pequeño de estudio para encontrar el nivel máximo de concentración de azúcares de taponamiento de membrana.

Realizando una representación gráfica de flux vs concentración de azúcar **(b)** se aprecia ligeramente la disminución del flux de agua en presencia de azúcar a una alta concentración, lo cual está en lo ya mencionado en otras investigaciones reportado por la literatura; esta disminución de flux se aprecia de manera más representativa en la gráfica de selectividad en la que es evidente que la concentración de azúcar favorece la selectividad.

# Capítulo 6

## 6. Conclusiones

En la fermentación alcohólica para la producción de BioEtOH-1G asistida por pervaporación para obtener un caldo con alto contenido de EtOH se puede ver que es favorecida por un pH ligeramente ácido y una alta concentración celular

La aplicación de una estrategia de construcción de superficie de respuesta fue una metodología efectiva de tal manera que los valores de las variables que tienen un mejor aprovechamiento son un pH de 3.5,  $3.0 \times 10^7$  células/mL y 33 °C con un rendimiento del 40 %.

Para fermentaciones con alto contenido en glucosa se puede obtener hasta 50 g/L en 24 h. teniendo un rendimiento  $Y_{p/s}$  de 0.22; 70 g/L de etanol con un rendimiento  $Y_{p/s}$  de 0.349 y 90 g/L con un rendimiento de  $Y_{p/s}$  0.439

A una concentración de 400 g/L de azúcar no hay actividad metabólica por parte de la levadura y por lo tanto tampoco hay producción de etanol.

La separación asistida por membrana se estabiliza a las 4 h; y se tiene un mayor desempeño a altas concentraciones de azúcar

En el proceso de separación con membrana se obtiene un factor de separación de 6.5 con la mínima concentración en el retentato de 50 g/L de etanol.

Con este proceso de PV se obtiene un permeado de 260 g/L de etanol en 4 h.

# Apéndice A

## Reactivos y Equipos

### A.1. Fermentación alcohólica

**Tabla A.1** Reactivos y materiales utilizados en la experimentación de Fermentación

Reactivos	Materiales
Dextrosa	Matraces Erlenmeyer 500 y 125 mL
Peptona Caseína	Autoclave ESA CV300
Extracto de Levadura	Microscopio Star Zeiss Primo
	Balanza Analítica Mettler Toledo PL403
	Cámara de Neubauer
	Microcentrífuga Corning LSE 6765-HS
	Campana de bioseguridad UV-BIOBASE
	Micropipetas
	Microtubos 1.5 mL
	Centrífuga para tubos 50 mL CS6R
	Baño de agua con agitación Julabo SW22
	Parrilla de calentamiento con agitación Corning® PC-420D
	Bioreactor Applikon BioBundle 1 L
	Reactor Corning 0.5 L

Nutrientes utilizados

Por cada 267.9 g de miel tipo B se tiene la siguiente relación de nutrientes.

**Tabla A.3** Nutrientes utilizados en Fermentación Alcohólica

<b>REACTIVOS</b>	<b>Concentración [M]</b>	<b>Volumen utilizado (mL)</b>
Sulfato de magnesio hepta hidratado (MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	0.1	0.081
Fosfato Trisódico (Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	0.4	2.8
Urea (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O)	1	6.43
Cloruro Ferrico (FeCl <sub>3</sub> )	0.1	0.158

Por lo tanto, según sea la cantidad de miel utilizada se hace el calculo correspondiente para obtener el volumen a utilizar de nutrientes.

**A.2. Método DNS- Miller (Zohri, Abdelazim and Ibrahim, 2018).**

Se necesitan los siguientes reactivos:

Ácido 3, 5 dinitrosalicílico, Hidróxido de sodio, Fenol, Sal de Rochelle, Tartato de sodio y potasio, Bisulfito de sodio.

Un baño de agua y Espectrofotómetro.

Procedimiento:

Para 100 mL de solución en agua destilada se disuelve DNS (0.7486 g) con hidróxido de sodio (1.3983 g), una vez que la mezcla esta disuelve se adiciona Tarta de Sodio y Potasio (21.610 g), Fenol (0.536 mL) y Bisulfito de Sodio (0.596 g). La mezcla debe de estar completamente disuelta. La absorbancia se mide a 540 nm. Se utilizó el Espectrofotómetro GENESYS10S UV-VIS.

### A.3. Características de la columna CHO782pb

**Tabla A.4** Características y condiciones de funcionamiento de la columna CHO782Pb

Marca de la columna	Transgenomic
Tipo de columna	CHO782Pb
Presión máxima (psi)	1000
Velocidad de flujo estándar (mL/min)	0.5
Velocidad máxima de flujo (mL/min)	0.7
Temperatura estándar (°C)	70
Temperatura máxima (°C)	95
Material de empacado	Polímero sulfonado
Cross linkage (reticulado)	7%
Forma iónica	Plomo
Tamaño de partícula (mm)	7
Rango de pH	0-14

## Apéndice B

### Diseño de Experimentos Box- Behnken

#### B.1. El Diseño de Experimentos Box-Behnken (BBD)

El diseño BBD tiene como objetivo establecer las mejores condiciones de un proceso de fermentación alcohólica con las que se obtenga un alto desempeño de producción de etanol.

La Metodología de Superficie de Respuesta (RMS) es una colección de métodos estadísticos y matemáticos que es útil para desarrollar, mejorar y optimizar procesos. La BBD requiere menos combinaciones de tratamientos que el diseño central compuesto, especialmente en casos con tres o cuatro factores, este permite estimaciones eficientes de los coeficientes de primer y segundo orden y no dispone de puntos auxiliares, por lo tanto todos los puntos de diseño caen en una zona de operación segura (Agbovi and Wilson, 2017).

El diseño de experimentos obtenido por Minitab es el siguiente:

**Tabla B.1** Diseño de Experimentos MiniTab

Factores	3
Corridas base	15
Bloques de base	2
Réplicas	2
Total, de corridas	30
Total, de bloques	1

<b>Corrida</b>	<b>Blq</b>	<b>T</b>	<b>pH</b>	<b>C</b>
1	1	1	1	0
2	1	1	-1	0
3	1	1	0	1
4	1	-1	-1	0
5	1	1	1	0
6	1	-1	0	-1
7	1	0	0	0
8	1	1	0	1
9	1	-1	1	0
10	1	1	-1	0
11	1	1	0	-1
12	1	0	-1	-1
13	1	0	1	-1
14	1	0	-1	1
15	1	1	0	-1
16	1	0	1	1
17	1	0	1	1
18	1	0	-1	1
19	1	-1	0	-1
20	1	0	-1	-1
21	1	-1	-1	0
22	1	-1	1	0
23	1	0	0	0
24	1	0	0	0
25	1	-1	0	1

<b>26</b>	1	-1	0	1
<b>27</b>	1	0	1	-1
<b>28</b>	1	0	0	0
<b>29</b>	1	0	0	0
<b>30</b>	1	0	0	0

Tabla de diseño (aleatorizada)

T= temperatura (°C)

C= células *S. Cerevisiae*

R= rendimiento

	<b>T</b> (°C)	<b>pH</b>	<b>C (x10<sup>7</sup>)</b>
<b>-1</b>	28	4	1
<b>0</b>	33	4,5	2
<b>1</b>	35	5	3

Ecuación de regresión en unidades no codificadas:

$$R = 35,34 - 0,44pH + 7,082T + 8,234C - 1,28pH^2 - 12,85T^2 - 4,10C^2 + 0,51pHT + 0,99pHC + 1,24TC$$

Análisis:

Determinación de puntos máximos con el mejor aprovechamiento.

$$\frac{\partial R}{\partial T} = 7.082 + 2(12.85)T - 0.55pH + 1.24C$$

$$\frac{\partial R}{\partial pH} = -0.44 - 2(1.28)pH + 0.51T + 0.99C$$

$$\frac{\partial R}{\partial C} = 8.234 - 2(4.10)C + 0.99pH + 1.24T$$

$$25T - 0.51pH + 1.24C + 7.082 = 0$$

$$0.51T - 2.56pH + 0.99C - 0.44 = 0$$

$$1.24T + 0.99pH - 8.10C + 8.10 = 0$$

## Bibliografía

Abud, A.K., Silva., C. E. (2019). Chapter 2- Bioethanol in Brazil: Status, Challenges and Perspectives to Improve the Production. *Bioethanol Production from Food Crops*. 417-443.

Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, Hadi., y Sebayang, H. A. (2016). Second Generation Bioethanol Production: A Critical Review. *Renewable and sustainable Energy Reviews*. Elsevier, Vol. (66), 631-653.

Agbovi, H. K., Wilson, L. D. (2017). Flocculation Optimization of Orthophosphate with FeCl<sub>3</sub> and Alginate Using the Box-Behnken Response Surface Methodology. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, Vol. (56), 3145-3155.

Aguilar, D. (2011). Producción de Etanol a Partir de Bagazo de Caña Panelera Mediante un Sistema Híbrido de Fermentación y Pervaporación. Tesis de Posgrado. Universidad Nacional de Colombia.

Aguilar, N., Lagunes, R., Cuello, C. M., y Mata, A. T. (2019). Chapter 20- Upgrading Comparative and Competitive Advantages for Ethanol Fuel Production From Agroindustrial Crops in Developing Countries: Mexico as a Case Study. *Bioethanol Production from Food Crops*. 401-415.

Antunes, F. A. F., Chandel, A. K., Brumano, L. P., Hilares, R. T., Peres, G. F. D., Ayabe, L. E. S. Sorato, V. S., Santos, J. R., Santos, J. C., y Da Silva, S. S. (2018). A Novel Process Intensification Strategy for Second Generation Ethanol Production from Sugarcane Bagasse in Fluidized Bed Reactor. *Renewable Energy*, Vol. (124), 189-196.

Aroujalian, A., Belkacemi, K., Davids, S. J., Turcoe, G., y Pouliot, Y. (2006). Effect of Residual Sugars in Fermentation Broth on Pervaporation Flux and Selectivity for Ethanol. *Desalination*, Vol. (193), 103-108.

Arredondo, B. O. A., Voltolina, D. (2014). Capítulo 2. Concentración, Recuento Celular y Tasa de Crecimiento. Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa. 21-29.

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*, Vol. (47), 60-88.

Baker, R. W. (2010) Membrane Technology and Applications. Membrane Technology and Research, Inc. Mento, Park Californi, Second Edition, 23-41.

Balat, M., Balat, H., Oz, C. (2008). Progress in Bioethanol Processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, Vol. (34), 551-573.

Basso, L. C., Amorim, H. V., Oliveira, A. J., Lopes, M. L. (2008). Yeast Selection for Fuel Ethanol Production in Brazil. Research Article. FEMS, Vol. (10), 4-18.

Behera, S., Kar, B., Mohanty, R. C., Ray, R. C. (2010). Comparative Study of Bio-Etanol Production from Mahula ( *Madhuca Latifolia* L.) Flowers by *Saccharomyces Cerevisiae* Cells Imbolized in agar and Ca-alginate Matrices. *Applied Energy*, Vol. (2010), 96-100

Bello, R. H., Linzmeyer, P., Franco, C. M. B., Souza, O., Sellin, N., Medeiros, S. H. E., y Marangoni, C. (2014). Pervaporation of Ethanol Produced from Banana Waste. *Waste Management*, Vol. (34), 1501.1509.

Brexó, R. P., Ana, A. S. S. (2017). Impact and Significance of Microbial Contamination During Fermentation for Bioethanol Production. *Renewable ans Sustainable Energy Reviews*, Vol. (73), 423-434.

Calinescu, I., Vlaicu, A., Chipurici, P., Aighigeanu, D., y Lavric, V. (2018). Alcoholic Fermentation in the Presence of Microwaves. *Chemical Engineering and Processing Process Intensification*, Vol. (126), 16-22.

Carrillo, C. N., Alanís, M. J. R., Quiroz, R. C., Ruiz, H. A., Iqbal, H. M. N., y Saldivar, R. P. (2019). Current Status and Future Trends of Bioethanol Production from Agro-Industrial Wastes in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol (102), 63-74.

- 
- Carstensen, F., Apel, A., Wessling. (2012). In Situ Product Recovery: Submerged Membranes vs, External Loop Membranes. *Journal of Membranes Science*, Vol. (394), 1-36.
- Cheng, X., Pan, F., Wang, M., Li, W., Song, Y., Liu, G., Yang, H., Gao, B., Wu, H., y Jiang, Z. (2017). Hybrid Membranes for Pervaporation Separations. *Journal Membrane Science*, Vol. (541), 329-346.
- Chovau, S., Gaykawad, S., Straathof, A. J. J., Van der Bruggen, B. (2011). Influence of Fermentation by Products on the Purification of Ethanol from Water Using Pervaporation. *Bioresource Technology*, Vol. (102), 1669-1674.
- Demirbas, A. (2005). Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources*, Vol. (27), 327-227.
- Dogan, Aysegu., Demirci, S., Aytekin, A. O., y Sahin, F. (2014). Improvements of Tolerance to Stress Conditions by Genetic Engineering in *Saccharomyces Cerevisiae* During Ethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol*, Vol. (174), 28-42.
- Fan, S., Liu, J. Tang, X. (2018). Process Operation Performance of PDMS Membrane Pervaporation Coupled with Fermentation for Efficient Bioethanol Production. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, Vol. (12), 1- 5.
- Fontalvo, J., Aguilar, M. A., García, M. A. G. (2012). Effect of pH, CO<sub>2</sub>, and High Glucose Concentration on Polydimethylsiloxane Pervaporation Membrane for Ethanol Removal. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, Vol. (51), 9328-9334.
- Fontalvo, J., Keurentjes, J. T. F. (2015). A Hybrid Distillation-Pervaporation System in a Single Unit for Breaking Distillation Boundaries in Multicomponent Mixtures, *Chemical Engineering Research and Design*, Vol. (99), 158-164.
- Fu, Y. J., Lai, C. L., Chen, J. T., Liu, C. T., Huang, S. H., Hung, W. S., Hu, C. C., y Lee, K. R. (2014). Hydrophobic Composite Membranes for Separating of Water-Alcohol Mixture by Pervaporations at High Temperature. *Chemical Engineering Science*, Vol. (111), 203-210.
- Haerlssig, J. B., Tremblay, A. Y., Thibault, J. (2012). A New Hybrid Membrane Separation Process for Enhanced Ethanol Recovery: Process Description and Numerical Studies. *Chemical Engineering Science*, Vol. (68), 492-505.

Hamelinck, C. N., Hooijdonk, G. V., Faaij, A. PC. (2005). Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Techno-economic Performance in Short-Middle-and Long-term. *Biomass and Bioenergy*, Vol. (28), 384-410.

He, Y., DM, B., Leung, KT., SN, L., BQ, Lia. (2012). Recent Advances in Membrane Technologies for Biorefinery and Bioenergy Production. *Biotechnology Advances*, Vol. (30), 817-858.

Inei G., Velasco, S. H. B., Diaz, M., Tobon, C. G., (1996). Influencia de la Concentración de Sustrato Inicial en la Fase Lag de la Fermentación Alcohólica, en Cultivo por Lote. Departamento de Ingeniería Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 1992.

Jos, A., Paz, B. (2016). Modelamiento Cinético de la Fermentación Alcohólica de Miel de Abejas a Diferentes Escalas de Producción. Tesis de Posgrado. Universidad Nacional de Colombia.

Kar, Y., Deveci, H. (2006). Importance of P- Series Fuels for Flexible- Fuel Vehicles (FFVs) and Alternative Fuels. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, Vol (28), 909-921.

Khalid, A., Aslam, M., Qyyum, M. A., Faisal, A., Khan, A. L., Ahmed, F., Lee, M., Kim, J., Jang, N., Chang. I. S., Ahmed, A., Yasin, M. (2019). Membrane Separation Processes for Dehydration of Bioethanol from Fermentation Broths: Recent Developments, Challenges, and Prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. (105), 427-443.

Khan, A., Ali, M., Ilyas, A., Naik, P., Vankelecom, I. F. J., Gilani, M. A., Bilad, M. R., Sajjad, Z. (2018). ZIF-67 Filled PDMS Mixed Matrix Membranes for Recovery of Ethanol Via Pervaporation. *Separation and Purification Technology*, Vol. (206), 50-58.

Leon, A., and Fontalvo, J. (2019). PDMS Modified Membranes by 1- dodecanol and its Effect on Ethanol Removal by Pervaporation. *Separation and Purification Technology*, Vol. (210), 364-370.

León, J. A., Bereche, R. P., Nebra, S. A. (2016). Batch Pervaporative Fermentation with Coupled Membrane and its Influence on Energy Consumption in Permeate Recovery and Distillation Stage. *Energy*, Vol. (109), 77-91.

Luis, P. (2018a) Chapter 3 - Pervaporation, Fundamental Modelling of Membrane

Systems. *Fundamental Modelling of Membrane Systems*. 71- 101.

Luis, P. (2018b). Chapter 8. Hybrid Processes Based on Membrane Technology. *Fundamental Modelling of Membrane Systems*. 302- 340.

Maryana, R., Ma'rifatun, D., Wheni, A. I., Satriyo, K. W., y Rizal, W. A. (2014). Alkaline Pretreatment on Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. *Energy Procedia*, Vol. (47), 250-254.

Maya, Naurú. (2012). Obtención y Caracterización de una Cepa Sobreexpresante del Gen YLR177W de *Saccharomyces Cerevisiae* y Localización de los Productos de los Genes YNR034W-A, YGR146C y YLR177W. Tesis de Posgrado. Universidad de Guanajuato.

Mohammadi, T., Aroujalian, A., Bakhshi, A. (2005). Pervaporation of Dilute Alcoholic Mixtures Using PDMS Membrane. *Chemical Engineering Science*, Vol. (60), 1875-1880.

Mohapatra, S., Ray, R. C., Ramachandran, S. (2019). Chapter 1- Bioethanol From Biorenewable Feedstocks: Technology, Economics, and Challenges. *Bioethanol Production from Food Crops*. 3-27.

Mohd, A. H. A., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, a. A. M., y Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in Sustainable Bioethanol Production: A Review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, Vol. (10) 52-61.

Moulin, P., Pérez, G. R., Carretier, E. (2010). Aplicaciones de la Permeación de Vapor: El Tratamiento de Compuestos Orgánicos Volátiles de Origen Antropogénico. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. (9), 67-77.

OCDE/FAO. (2017). OCDE/FAO Perspectivas Agrícolas 2009-2026. OECD Publishing, 132- 149.

O. NCL. (2000). Capítulo 10 Termodinámica y Crecimiento Microbiano. *Termodinámica Biológica*, 185-205.

Pal, P., Kumar, R., Ghosh, A. K. (2018). Analysis of Process Intensification and Performance Assessment for Fermentative Continuous Production of Bioethanol in a multi-staged membrane-integrated Bioreactor System. *Energy Conversion and Management*, Vol. (171), 371-383.

- Pal, P., Kumar, R., Nayak, J., Banerjee, S. (2017). Fermentative Production of Gluconic Acid in Membrane-Integrated Hybrid Reactor System: Analysis of Process Intensification. *Chemical Engineering and Processing Process Intensification*, Vol. (122), 258-268.
- Paz, A. J. B. (2016). Modelamiento Cinético de la Fermentación Alcohólica de Miel de Abejas a Diferentes Escalas de Producción. Tesis de Posgrado. Universidad Nacional de Colombia.
- Qiu, B., Wang, Y., Fan, S., Liu, J., Jian, S., Qin, Y., Xia, Z., Tang, X., y Wang, W. (2019). Ethanol Mass Transfer During Pervaporation with PDMS Membrane Based on Solution-Diffusion Model Considering Concentration Polarization. *Separation and Purification Technology*, Vol. (220), 276-282.
- Ruiz, H. A., Martínez, A., Vermerris, W. (2016). Bioenergy Potential, Energy Crops, and Biofuel Production in Mexico. *Bioenergy Research*, Vol. (9) 981-984.
- Santos, E. L. I., Alanís, M. R., Saldívar, R. P., y Alvarez, A.J. (2018). A Novel Method for Bioethanol Production Using Immobilized Yeast Cells in Calcium-Alginate films and Hybrid Composite Pervaporation Membrane. *Bioresource Technology*, Vol. (247), 165-173.
- Si, Z., Shan, H., HU, S., Cai, D., Qin, P. (2018). Recovery of Ethanol Via Vapor Phase by Polydimethylsiloxane Membrane with Excellent Performance. *Chemical Engineering Research and Design*, Vol. (136), 324-333.
- Sun, D., Li, B. B., Xu, Z. L. (2013). Pervaporation of Ethanol/Water Mixture by Organophilic Nano-Silica Filled PDMS Composite Membranes. *Desalination*, Vol. (322), 159-166.
- Tofighi, Azadeh., Assadi, M. M., Asadirad, M. H. A., y Karizi, S. Z. (2014). Bio-ethanol Production by a Novel Autochthonous Thermo-Tolerant Yeast Isolated from Wastewater. *Journal Environmental Health Science and Engineering*, Vol. (1), 1-107.
- Vane, L. M. (2005). A Review of Pervaporation for Product Recovery from Biomass Fermentation Processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. (80), 603-629.

Vane, L. M., Namboodiri, V. V., Bowen, T. (2008). Hydrophobic Zeolite-Silicone Rubber Mixed Matrix Membranes for Ethanol-Water Separation: Effect of Zeolite and Silicone Component Selection on Pervaporation Performance. *Journal of Membrane Science*, Vol. (308), 230-241.

Wei, P., Cheng, L. H., Zhang, L., Xu, X. H., Chen, H., y Gao, C. (2014). A Review of Membrane Technology for Bioethanol Production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. (30), 388-400.

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*, Vol. (71), 475-55.

Zhuang, X., Chen, X., Su, Y., Luo, J., Feng, S., Zhou, H., y Wan, Y. (2016). Surface Modification of Silicalite-1 with Alkoxysilanes to Improve the Performance of PDMS/Silicalite-1 Pervaporation Membranes: Pervaporation, Characterization and Modeling. *Journal of Membrane Science*, Vol. (499), 386-395.

Zohri, A. N., Abdelazim, M., Ibrahim, S. (2018). 2-Aminoethanaminium 2-(Ethoxycarbonyl)- 4,6-Dinitrophenolate as a Greener Route in Reducing Sugar Quantification. *MethodsX*, Vol. (5), 609-612.