



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

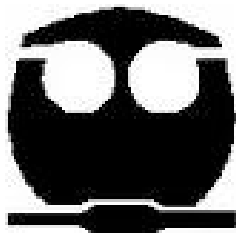
**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE  
BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE MALTA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A**

**KARLA SUÉ CABALLERO MARTÍNEZ**



**MÉXICO, D. F.**

**2010.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente:** Hermilo Leal Lara

**Vocal:** Jorge Arturo Aburto Anell

**Secretario:** Juan Carlos Ramírez Orejel

**1er. suplente:** José Mariano García Garibay

**2° suplente:** Karla Mercedes Díaz Gutiérrez

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

**INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO**

**ASESOR**

Jorge Arturo Aburto Anell

**SUPERVISOR**

Agustín Reyo Herrera

**SUSTENTANTE**

Karla Sué Caballero Martínez

# Í N D I C E

	Página
Resumen .....	1
Introducción .....	2
<b>1. Antecedentes</b>	
<b>1.1. Biocombustibles .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Bioetanol .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Bioetanol en México y el mundo .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Bioetanol a partir de materia lignocelulósica .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5. La cebada .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.1. El malteado .....</b>	<b>11</b>
<b>1.6. Obtención de etanol a partir de malta de cerveza .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Objetivos</b>	
<b>2.1. Objetivo general .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Objetivos particulares .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>22</b>
<b>4. Diseño experimental y metodología .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Condiciones experimentales de proceso .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2. Metodología descriptiva .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2.1. Lavado de la malta de cerveza .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2.2. Método de Fenol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.3. Método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.4. Método de Furfural .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.5. Determinación de etanol por cromatografía de gases .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3. Pre-tratamiento .....</b>	<b>33</b>

4.3.1. Pre-tratamiento ácido .....	34
4.3.2. Pre-tratamiento básico .....	35
4.3.3. Pre-tratamiento básico/oxidante .....	35
4.4. Sacarificación .....	36
4.5. Fermentación .....	38
5. Resultados y discusión .....	40
5.1. Lavado .....	40
5.2. Pre-tratamientos .....	41
5.3. Sacarificación .....	46
5.4. Fermentación .....	52
6. Conclusiones .....	57
7. Anexo .....	58
8. Bibliografía .....	69

*El éxito debe medirse, no por la posición a que una persona ha llegado, sino por su esfuerzo por triunfar.*

*Booker T. Washington*

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.*

*Mahatma Gandhi*

*Un experto es una persona que ha cometido todos los errores que se pueden cometer en un determinado campo.*

*Niels Bohr*

*No es necesario decir todo lo que se piensa, lo que si es necesario es pensar todo lo que se dice.*

*Quino*

## *AGRADECIMIENTOS*

### *A Dios*

Por darme la hermosa oportunidad de llegar a este momento, de que mis padres, mi hermana, familia, amigos pudieran acompañarme todos estos años. Gracias por darme la fuerza para seguir en este difícil pero no imposible camino.

### *A mis padres*

María Camelia Martínez Rodríguez y Mario Chavarín Díaz . Porque han estado conmigo durante todo este tiempo, por su apoyo, sus consejos, sus regaños, su guía, su cariño, su comprensión, por todo eso que fueron, son y van a seguir siendo para mí. Porque sin ustedes no sería la persona que soy ahora. Los amo.

### *A mi hermanita*

Mariana Chavarín Martínez porque siempre estás conmigo aunque nos enojemos. Tu me has escuchado, me has consolado, me has felicitado y hasta me has regañando. Gracias por creer en mí. Te amo manita soruya!!

### *A mi familia*

Mi tía Carmen Martínez, mi tío Arturo Martínez, mi tío Héctor Martínez, mi abuelita Margarita Rodríguez, mi abuelito Higinio Martínez, mis primos Marco Polo García y Arturo Esteban Martínez sino fuera por todos ustedes yo no estaría aquí, porque ustedes me apoyaron siempre y confiaron en mí. Papi, me hubiera gustado que estuviera aquí. Lo extraño mucho, me siento feliz y orgullosa de ser su nieta.

### *A mi asesor*

Dr. Jorge Arturo Aburto Anell por su tiempo, su paciencia y guía para concluir este objetivo. Por ser una persona agradable, dedicada y llena de virtudes. Le deseo muchas bendiciones.

### *A Agustín Reyó*

Reyito!! Muchas gracias por confiar en mí, por ayudarme y apoyarme. Gracias por tus consejos, por escucharme, gracias por ser mi profesor.

### *A mis amigos*

Alfredito, Saraí, Dian-ita. Mis amigos durante estos últimos años de la carrera, disfruté mucho los laboratorios con ustedes. Los quiero muchísimo. A Gaby por escucharme cuando lo necesité, por confiar en mí. Espero que te esté gustando la escuela!! A Ramplix

por ser tolerante conmigo. A José por ser mi amigo en estos 3 años, por comprenderme, escucharme, soportarme, ayudarme, alegrarme, ser todo lo que un amigo necesita, por estar en los momentos difíciles y agradables. Por muchas cosas más, te quiero chaparrito. A Román porque llegaste en el momento exacto, recordé lo hermoso que es sonreír, conocerte es una bendición. Eres un chico maravilloso!! Te quiero Man Ro.

### *A mi Universidad*

Universidad Nacional Autónoma de México. Es un privilegio y un orgullo haber formado parte de ella.

### *A mi Facultad*

Porque en sus laboratorios y salones, me formé como persona y como profesionalista. Porque entre esas paredes viví los momentos más hermosos, difíciles, agradables, maravillosos, vergonzosos, inigualables, en fin... Estar en la Facultad de Química, ha sido lo más bonito en mi vida de estudiante. Gracias a todos y cada uno de los maestros que me formaron, me enseñaron y me guiaron. Porque gracias a ellos, ahora estoy aquí.



## RESUMEN

En la actualidad, los combustibles fósiles se intentan reemplazar para que de esta manera se reduzcan las emisiones de gases y se ayude a disminuir el calentamiento global. Se considera al bioetanol como una alternativa nueva como oxigenante para gasolina, ya que la cantidad de oxígeno desprendido al medio ambiente es el mismo que el que producen el teramil metil éter (TAME), etil ter-butil éter (ETBE) y metil ter-butil éter (MTBE), pero producido a partir de fuentes renovables.

Sin embargo, se deben considerar ciertos factores que limitan el uso del etanol, tales como tener beneficios ambientales, proveer una ganancia de energía, que sea económicamente competitivo, que no se vea afectado el abastecimiento de alimentos, y que permita el uso de materias primas consideradas tradicionalmente como desechos.

En este trabajo, se evaluó la posibilidad de obtener etanol a partir del efecto de 3 tipos de pre-tratamientos químicos (ácido diluido, básico y básico/oxidante) en los residuos de malta de cerveza con el fin de aumentar la accesibilidad del material a una sacarificación ácida posterior. La factibilidad técnica del proceso se evaluó mediante su conversión de los azúcares fermentables a etanol.

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día los combustibles fósiles de fácil producción y procesamiento han comenzado a escasear, principalmente en México, por lo que se requiere de nuevas tecnologías más costosas para obtener energéticos limpios que cumplan con las restricciones ambientales. Esto ha provocado que se busquen otras alternativas energéticas para paliar el descenso de las reservas de hidrocarburos y combustibles alternos menos contaminantes. Una de ellas es el uso de biocombustibles, p. ej. biogás, bioetanol, biohidrógeno, biodiesel; los cuales pueden obtenerse de cereales, oleaginosas, gramíneas, desechos agrícolas, orgánicos o ganaderos.

El bioetanol es un recurso que nos puede ofrecer ventajas tanto económicas como ambientales, porque si se mezcla con la gasolina se produce un biocombustible con poder energético importante pero además, las emisiones contaminantes se reducen. Las mezclas que más se usan son:

- E5: mezcla de 5% de bioetanol y 95% de gasolina.
- E10: mezcla de 10% de bioetanol y 90% de gasolina.
- E20: mezcla de 20% de bioetanol y 80% de gasolina; y esta última es límite ya que se ha observado que los motores actuales pueden tolerar esta mezcla sin ningún problema.

En Brasil y E.E.U.U., los biocombustibles ya tienen muchos años que se han investigado, producido y usado a partir de azúcar de caña y maíz, respectivamente. México, en cambio, todavía se encuentra muy rezagado en su implementación, a pesar de la disminución de las reservas de combustibles fósiles, incremento del precio del petróleo y restricciones de emisiones automotores.

El bioetanol se obtiene comúnmente por la fermentación de azúcares que se encuentran en la materia orgánica como la remolacha, caña de azúcar, sorgo

dulce, maíz, yuca, trigo; pero es posible obtenerlo también a partir de materia prima no convencional como los desechos agrícolas y forestales.

La malta gastada y resultante del proceso de elaboración de cerveza es una materia prima interesante para la producción de bioetanol debido a que por cada kilogramo de cebada grano se obtienen 1.3 kilogramos de malta (Sagarpa, 2010). Así, la elaboración de cerveza a partir de cebada comprende de manera general los siguientes procesos: preparación de la cebada o malteado, cocción y fermentación para obtener la cerveza.

El malteado es un proceso de germinación controlada que libera una dotación de enzimas capaces de convertir el almidón del cereal en azúcares fermentables y asegura el suministro adecuado de aminoácidos y de otros nutrientes para las levaduras (Hough, 1990). El almidón está localizado en gránulos específicos que se encuentran en el endospermo del grano y una pequeña cantidad de éste se hidroliza durante el malteado. El contenido de amilosa se eleva ligeramente durante el malteado, desde el 22% (cebada) hasta el 26% (malta), debido a que durante este se degrada preferentemente la amilopectina (Hornsey, 2005).

Los aspectos prácticos más importantes del malteado son la degradación de los  $\beta$ -glucanos de la pared celular del endospermo y la exposición de las partes proteicas. La arabinosa y xilosa son los azúcares principales en la malta, seguidos de la glucosa, después manosa y galactosa (Hornsey, 2005).

Uno de los pre-tratamientos de la materia vegetal más empleado es con ácido diluido a una temperatura entre 90 y 130 °C y da como resultado la hidrólisis casi completa de hemicelulosa y la liberación de pentosas. Sin embargo, éste proceso también da productos no deseados como el furfural y el 5-hidroximetil furfural (HMF) lo que inhibe el proceso de fermentación (Teramoto *et al.*, 2009). Así, se han hecho estudios para poder disminuir su toxicidad, mediante mutaciones de cepas que crecen en presencia de furfural. Además, hay un alto uso del agua lo que afecta el impacto del medio ambiente del proceso.

Otro pre-tratamiento utilizado es el de peróxido alcalino, el cual se ha utilizado en la cascarilla de arroz y se demostró que se puede convertir en azúcares fermentables, usando también una sacarificación enzimática y llegar hasta etanol usando una bacteria recombinante (Saha y Cotta, 2007).

El organosolv es otro pre-tratamiento que permite la solubilización de oligosacáridos y lignina; p. ej.: se trató la madera de *P. radiata D. Don*, con una mezcla de acetona:agua y se comprobó que se obtenían buenos resultados de producción de bioetanol (Araque, et. al., 2007).

El presente proyecto propone la evaluación de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos, en particular, los residuos de malta de cerveza. Se analizarán el efecto de distintos pre-tratamientos químicos en la generación de azúcares reductores durante la sacarificación y así, permitir la obtención de etanol mediante fermentación.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. BIOCOMBUSTIBLES**

Antes de que las sociedades modernas tuvieran sistemas de energía basados en el uso del carbono, del petróleo y otros combustibles fósiles, la única forma de energía era el uso de energías renovables. A medida que se desarrollaron tecnologías para manejar el carbón, el petróleo, la electricidad y combustibles modernos, surgió la revolución industrial, el nacimiento de fábricas y el desarrollo de centros urbanos.

El primer motor construido por Henry Ford no operaba con gasolina, sino que utilizaba alcohol de caña. Cuando Rodolfo Diesel desarrolló el primer modelo de motor que lleva su nombre, utilizó un combustible derivado del aceite vegetal. Los combustibles de origen fósil han sido muy útiles, pero es necesario diversificar las fuentes de energía.

Un biocombustible es la materia de origen biológico que puede ser utilizada en la generación de calor y energía, por lo que se considera como energía renovable

(Camps y Marcos, 2008). Los biocombustibles se pueden clasificar según el tipo y la fuente. Se derivan de productos forestales, agrícolas y pesqueros; o de desechos municipales, así como de subproductos y desechos de la agroindustria, industria alimentaria y los servicios alimentarios (FAO, 2008).

También se hace distinción entre biocombustibles *primarios* (sin elaborar) y *secundarios* (elaborados): los biocombustibles primarios son aquellos en los que el material orgánico se usa en su forma natural. En general, se usa para satisfacer la demanda de combustible para cocinar, generar calefacción o electricidad. Los biocombustibles secundarios en forma sólida, líquida o gaseosa pueden usarse en el transporte y procesos industriales a altas temperaturas (FAO, 2008).

Los biocombustibles líquidos producidos actualmente a partir de cultivos de azúcar o almidón (en el caso del etanol) y de cultivos de semillas de oleaginosas (en el caso del biodiesel) se denominan combustibles de primera generación. El bioetanol de segunda generación será producido a partir de materias lignocelulósicas, como productos forestales y pastos (ADRS: FAO, 2007). La biomasa lignocelulósica es más resistente a la trituración que el almidón, el azúcar y los aceites. La conversión de la celulosa en etanol supone dos fases: la celulosa y hemicelulosa se descomponen en azúcares y luego éstos se fermentan para obtener etanol (FAO, 2008).

## **1.2. BIOETANOL**

Cualquier materia con un alto contenido de azúcares o que se componga de celulosa o almidón, se puede usar para producir etanol. El etanol que actualmente está disponible en el mercado de biocombustibles se produce a partir de almidón o sacarosa. La caña de azúcar, la remolacha y el sorgo, son la principal materia prima que se ha usado para producir etanol (FAO, 2008).

El bioetanol ha sido considerado como una alternativa a los combustibles fósiles, ya que ayuda a revitalizar las economías rurales, reducir las emisiones

contaminantes en los motores tradicionales de combustión pero sobre todo aliviar la presión sobre los suministros de petróleo. El bioetanol de segunda generación será producido a partir de materias lignocelulósicas, como productos forestales y pastos (ADRS: FAO, 2007).

El etanol puede mezclarse con gasolina o quemarse puro en motores de encendido por chispa ligeramente modificados. Un litro de etanol aproximadamente contiene el 66% de la energía suministrada por un litro de petróleo, pero posee un nivel más elevado de octano y, mezclado con gasolina mejora el rendimiento de ésta última (FAO, 2008).

### **1.3. BIOETANOL EN MÉXICO Y EL MUNDO**

La falta de estabilidad en los precios del petróleo ha venido a complicar la planeación energética, y con ella la planeación económica mundial. Es por esto que los gobiernos de muchos países procuran la diversificación de las fuentes de energía y buscan en los biocombustibles una fuente de energía local que no tenga que ser importada.

Brasil y Estados Unidos de América son los países que han tomado el liderazgo en la producción y uso de etanol dentro de la mezcla energética de sus combustibles para el transporte. La producción de biodiesel se concentró en países europeos, principalmente en Alemania durante la década pasada. En recientes años la mayor capacidad de producción se ha incorporado en Estados Unidos, Brasil, Canadá, Australia y el sur de Asia (Sener, 2008).

Durante el 2008, los países líderes en producción de etanol fueron Estados Unidos de América con 34 mil millones de litros, Brasil con 27 mil millones de litros, China con 1.9 mil millones de litros, Francia con 1.2 mil millones de litros, Canadá con 0.9 mil millones de litros y Alemania con 0.5 mil millones de litros (Sener, 2008).

Sin embargo, la situación de México es muy distinta. México es un gran productor de energía primaria y exportador de la misma. Además, somos un importador de

granos que son materia prima para la producción de biocombustibles en otros países.

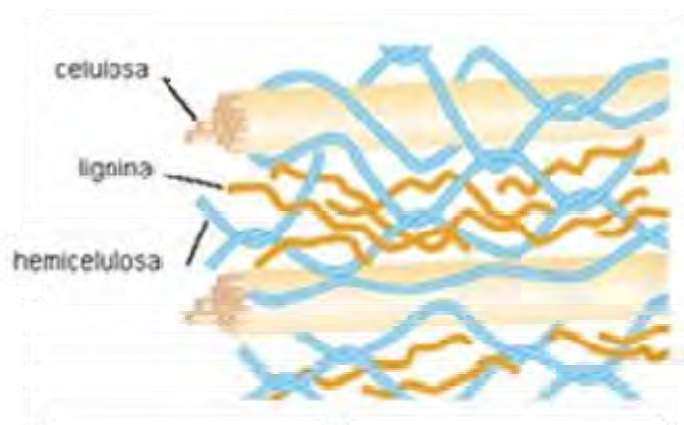
En México, el desarrollo de la industria de los bioenergéticos podría ampliar el acceso a los sistemas de energía, aumentar el ingreso en zonas rurales, conservación de recursos petrolíferos, motivación de la comunidad científica y tecnológica y con esto generar empleos.

Con el Programa de Introducción de Bioenergéticos se planteó como objetivo general “Brindar certidumbre para el desarrollo de la cadena de producción y consumo de Bioenergéticos, como una alternativa para su incorporación en la mezcla de combustibles para el transporte”, para ello se contempla para el 2012, una meta de 300 mil hectáreas como superficie de cultivos que sirvan insumos para bioenergéticos (Sener, 2008).

#### 1.4. BIOETANOL A PARTIR DE MATERIA LIGNOCELULÓSICA

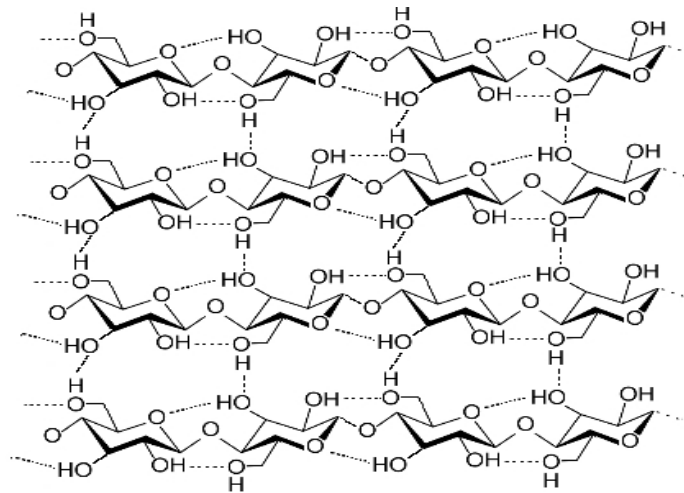
Una fuente de biomasa para la producción de etanol es la materia lignocelulósica, solo que su uso todavía requiere de avances en la tecnología y la ciencia.

Los materiales lignocelulósicos pueden presentar en su composición hasta 50% p/p de celulosa y debido a esto se han utilizado para la obtención de ese biopolímero y sus derivados.



**Figura 1.** Estructura de biomasa celulósica (ArgenBio, 2010).

En los materiales lignocelulósicos, la celulosa es el componente principal de las paredes de las células vegetales, donde se encuentra asociada a hemicelulosas y lignina (Figura 1). Así, la celulosa es un homopolímero de unidades de glucosa anhidra unidas mediante enlace  $\beta$  1-4, lo cual le da cierta conformación especial altamente cristalina (Figura 2). La hemicelulosa es un heteropolímero compuesto principalmente por xilosa y arabinosa, aunque también presenta glucosa, manosa, galactosa y algunos ácidos glucorónicos. En tanto que la lignina es una macromolécula polifenólica compuesta por diferentes unidades de compuestos fenólicos y aromáticos y que tiene como función proporcionar rigidez a la pared celular del material (Figura 3; Mussato, *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Estructura tridimensional de la celulosa (Diccionario Académico, 2010).



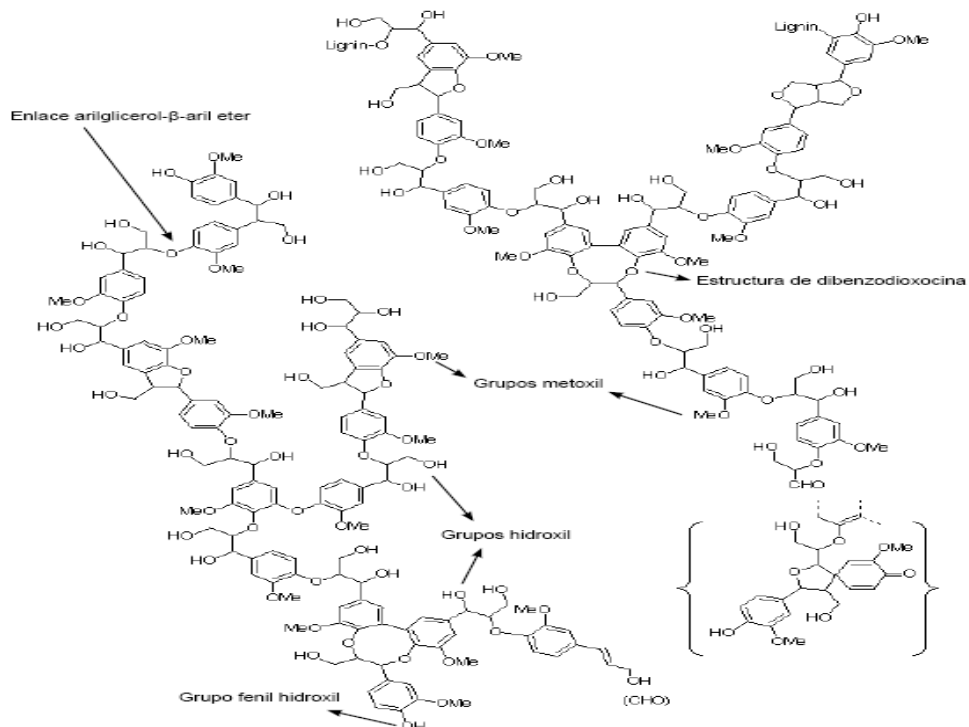


Figura 4 : Modelo de la molécula de la lignina con sus grupos funcionales (35).

**Figura 3.** Molécula de la lignina con sus grupos funcionales (Química orgánica ambiental, 2010).

La celulosa (Figura 2) es un componente abundante en el material lignocelulósico pero debido a su conformación estructural, resulta difícil su hidrólisis y conversión a azúcares fermentables. Sin embargo, la celulosa puede ser hidrolizada a etanol mediante procesos ácidos o enzimáticos (Cardona y Sánchez, 2007). Así, un gran número de tratamientos han sido propuestos para promover una separación selectiva de la fracción celulósica, los cuales incluyen: molienda, pirólisis, vapor de alta presión, hidrólisis ácida o alcalina, tratamiento con gases, tratamiento con peróxido de hidrógeno, explosión con vapor, oxidación húmeda y tratamiento biológico (Mussato, *et al.*, 2006).

Si bien se requiere de tecnología incipiente y compleja de alto costo para la producción de etanol celulósico a gran escala, la oferta de desechos lignocelulósicos, como la malta de cerveza gastada, las ventajas ambientales, la disminución de la dependencia de petróleo son factores que contribuyen su desarrollo y estudio.

## 1.5. LA CEBADA

La cebada es un cultivo de gran importancia económica y social en la zona de los Valles Altos de México, ya que los agricultores lo prefieren a otros granos porque su ciclo vegetativo es corto, así como por su resistencia a la sequía, a las bajas temperaturas y a la salinidad. Las variedades de cebada que se cultivan en México son las especies *Hordeum vulgare* de seis hileras de granos o hexística y *Hordeum distichum* de dos hileras de granos o dística.

El grano de cebada está compuesto por la cascarilla, la raquilla y el fruto, que a su vez, está formado por: el pericarpio que es la envoltura de la semilla, el endospermo que es la parte con alto contenido de almidón y el embrión a partir del cual se desarrolla la nueva planta en la germinación (Figura 4).



**Figura 4.** Estructura del grano de cebada (Cerveza de Argentina, 2010).

La cascarilla adherida al pericarpio, está formada por la lemma y la palea. La lemma cubre el lado dorsal del grano y la palea el ventral. La raquilla es una pequeña estructura, parecida a un tallo con vellos que está adherida a la base en el exterior del grano, por el lado ventral. Por el tipo de espiga, la cebada se clasifica como hemos dicho en: hexística o de 6 hileras, y dística o de 2 hileras. Las diferencias más importantes entre los 2 tipos de cebada se muestran en la Tabla 1:

<b>Variedad</b>	Hexística	Dística
<b>Nombre</b>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Hordeum disticum</i>
<b>Granos: Tamaño</b>	Diferente	Uniforme
<b>Forma</b>	Ahusados, aproximadamente 2/3 de los granos torcidos	No ahusados, son rectos y uniformes
<b>Granos / espiga</b>	25 a 60	15 a 20
<b>Cascarilla</b>	+	-
<b>Nitrógeno</b>	+	-
<b>Extracto</b>	-	+
<b>Poder diastásico</b>	+	-
<b>Polifenoles</b>	+	-

**Tabla 1.** Diferencias entre variedades de cebada. Los signos + y – indican alto y bajo nivel. (Camacho de la Rosa *et al*, 2007).

### 1.5.1. EL MALTEADO

A partir de finales del siglo XVI, la cebada se convirtió generalmente en el grano preferido para el malteado. Esto por distintas razones:

- La semilla tiene 3 capas protectoras externas que le confieren una protección vital, especialmente durante el almacenamiento.
- Cada grano contiene hasta el 90% de carbohidratos, un 80-85% del cual se encuentra en forma de gránulos de almidón, localizados en el endospermo.

- El almidón es solubilizado e hidrolizado durante la operación de malteado debido a las grandes cantidades de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas presentes en los granos.
- La temperatura de gelatinización del almidón de cebada es baja (52-59°C). Este rango de temperatura está por debajo de la temperatura de desnaturalización de ambas amilasas.
- Las raicillas y el brote del embrión son muy robustos y no se desprenden fácilmente. Esto es importante durante el malteado, cuando se necesita el volteado mecánico de los granos germinados con sus brotes (Hornsey, 2005).

La mejor malta se obtiene con el grano de variedad maltera, es decir, está entero, seco, sano, bien desarrollado, de tamaño uniforme, es pesado y germina vigorosamente. Si el grano no es viable, puede absorber agua igualmente, pero no germina. Los granos viables son aquellos maduros e inmaduros que pueden germinar, que pueden maltearse. Los inmaduros requieren un tiempo para que termine el periodo de inactividad o latencia de manera natural, o bien puede terminarse mediante un tratamiento físico o químico. Dicho estado, es una defensa natural del grano para evitar una germinación extemporánea y para que su duración sea menor, es importante secar adecuadamente el grano y almacenarlo en lugar seco. Los factores que vencen el estado de latencia y permiten el inicio de la germinación son la entrada de oxígeno, ya sea por aireado o por adición de oxidantes como  $H_2O_2$  y el contacto con el agua. De manera natural, esto sucede entre 6 y 8 semanas después de la cosecha. Al contacto con agua y oxígeno, el embrión activa la formación de ácido giberélico, fito-hormona que a su vez activa la producción de  $\alpha$ -amilasa, que no existe en el grano. Las amilasas  $\alpha$  y  $\beta$  producen azúcares para que el embrión se alimente. Durante el malteo se presenta también una intensa actividad enzimática sobre la pared celular, en donde las proteasas transforman proteínas insolubles en aminoácidos solubles y las  $\beta$ -glucanasas liberan glucosa; por ello el grano se vuelve suave y harinoso.

Antes del malteado, al recibir la cebada, se deben realizar las siguientes operaciones:

- Análisis físico del lote: determinar sanidad, humedad y calidad del grano.
- Limpieza por medio de cribas, imanes, corrientes de aire y/o bandas vibratorias.
- Calibración, es decir, separación del grano en grande, regular y delgado.
- Finalmente, se almacena con una humedad de 13.5% como máximo.

Las etapas del malteo son: remojo, germinación y secado.

### Remojo

Para iniciar la germinación, la cebada requiere una humedad de 40%, lo cual se logra en uno o dos días. En la industria se alternan periodos con y sin agua, pero es indispensable airear para que el grano no se ahogue. El grano que flota se elimina. El remojo se detiene cuando el grano ha comenzado a puntear (las raicillas empiezan a aparecer).

### Germinación

Esta debe ser rápida, vigorosa y uniforme. La humedad ambiental debe ser de 92% y es necesario mover el grano del fondo a la superficie, esto para oxigenarlo. En esta etapa, la humedad sube a 45% en unos 4 días. Por el extremo opuesto a las raicillas (lado dorsal), sale la plúmula; cuando ha alcanzado el largo del grano se ha obtenido la “malta verde” y es el momento de detener la germinación.

### Secado

Para detener el crecimiento de la plántula y conservar la actividad enzimática, la germinación se interrumpe mediante el secado, en el cual se reduce la humedad del grano de 45% hasta 4 o 5% en 24 horas, mediante un proceso de 2 etapas: la primera se lleva a cabo a temperaturas de 55 a 60°C, hasta llegar a 12% de

humedad; en la segunda etapa, se utilizan temperaturas de entre 65 y 75% para así alcanzar la humedad de 4 o 5%. Este control de la temperatura es muy importante para poder conservar la actividad enzimática. Después del secado se hace una limpieza para eliminar raicillas, plúmulas y fragmentos. Finalmente, la malta se somete a una maduración que consiste en almacenarla a temperatura ambiente durante 4 a 6 semanas (Camacho de la Rosa *et al*, 2007).

Los principales países productores de cebada son Europa, Rusia, Canadá, Ucrania y Estados Unidos. La producción de cebada en México se encuentra principalmente en los estados de Guanajuato, Michoacán, Puebla, Hidalgo y Querétaro (Tabla 2).

SITUACION AL 31 DE MAYO DE 2010

**CEBADA GRANO**

	Superficie (ha)			Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)
	sembrada	cosechada	siniestrada	obtenida	obtenido
<b>BAJA CALIFORNIA</b>	105	20		42	2.098
<b>GUANAJUATO</b>	36,979	36,065	205	205,273	5.692
<b>HIDALGO</b>	11,645				
<b>JALISCO</b>	886	215		1,383	6.433
<b>MEXICO</b>	162	82		189	2.300
<b>MICHOACAN</b>	2,647	1,306	31	6,515	4.990
<b>OAXACA</b>	54				
<b>PUEBLA</b>	13,766	30		16	0.550
<b>QUERETARO</b>	3,879	3,710		23,719	6.393
<b>TLAXCALA</b>	321				
<b>VERACRUZ</b>	745				
<b>ZACATECAS</b>	50				
<b>TOTAL</b>	<b>71,239</b>	<b>41,428</b>	<b>236</b>	<b>237,138</b>	<b>5.724</b>

**Tabla 2.** Avances de siembras y cosechas, año agrícola 2010 (SIAP, 2010).

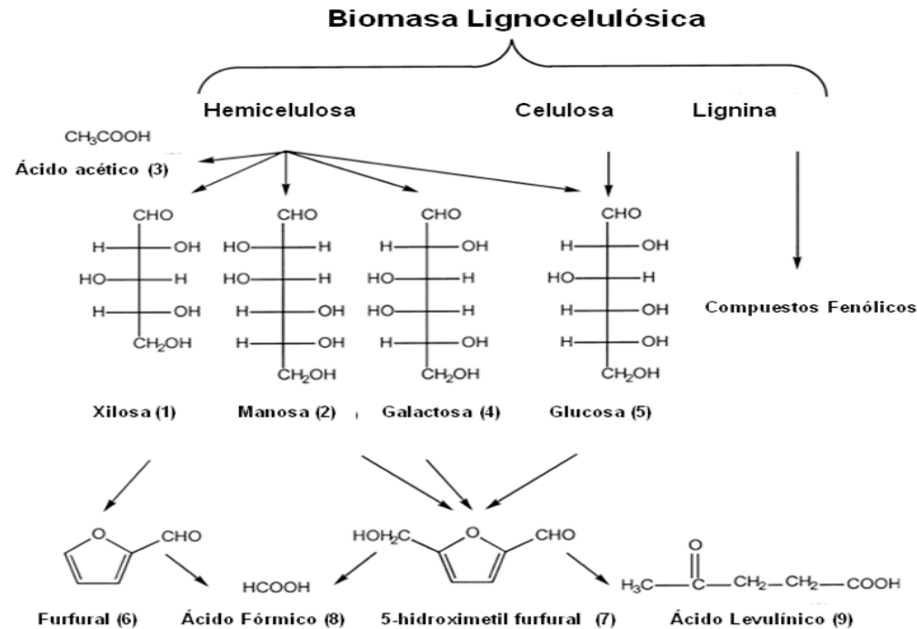
## 1.6. OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE MALTA DE CERVEZA

El principal uso de la cebada es para la producción de cerveza, pero constituye además una fuente importante de lignocelulósicos una vez que ha pasado por el proceso de malteado y que puede ser aprovechado para obtener etanol.

La composición de la malta de cerveza es 16.8-21.9% de celulosa, 28.4-29.6% de hemicelulosa y 21.7-23% es lignina. La celulosa y la hemicelulosa pueden ser convertidas a monosacáridos mediante un pre-tratamiento y sacarificación. Una vez que se obtienen los monosacáridos se puede producir etanol mediante fermentación (White, 2008), pero no es tan fácil, ya que la materia lignocelulósica es difícil de hidrolizar por lo que se han implantado métodos en los que la hidrólisis y la degradación parcial de los polisacáridos se aumenta. Sin embargo, la sacarificación ácida presenta el problema de generación de subproductos como el furfural (principal producto de degradación de las pentosas) y el 5-hidroxi-2-metil furfural (o conocido como HMF, producto de degradación de las hexosas).

El pre-tratamiento con ácido diluido genera compuestos inhibitorios, los cuales se puede agrupar en 3: el primero serían derivados del furano (furfural y HMF), ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos (Almeida, 2009).

El furfural puede degradarse a ácido fórmico o polimerizarse. El HMF da lugar a cantidades equimoleculares de ácido fórmico y levulínico. Además, de estos dos se origina ácido acético que proviene de la hidrólisis de los restos acetilos de la hemicelulosa (Figura 5; Oliva, 2003).



**Figura 5.** Reacciones producidas durante la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos (Medrano, 2010).

Miller *et al* (2009) en su artículo que habla sobre la inhibición del furfural, describe que por medio de un análisis de transcripción global se puede identificar como una enzima a ADH6, en *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de reducir el 5-hidroximetilfurfural a un producto menos tóxico como el alcohol 5-hidroximetilfurfural.

Los efectos producidos por el furfural sobre los microorganismos son: reducción de la tasa específica de crecimiento, disminución de la productividad volumétrica de etanol, descenso de la productividad específica de etanol y disminución de la producción de biomasa. Los efectos producidos por el HMF son menores, comparada su toxicidad con la del furfural.

El efecto tóxico que ocasionan los furanos puede deberse a que son compuestos químicamente reactivos que pueden formar compuestos con determinadas moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos o producir daños en la membrana plasmática (Oliva, 2003).



Se han reportado métodos para remover furaldehídos como la evaporación, absorción con carbón activado, resinas de intercambio iónico, tratamiento alcalino o tratamiento con enzimas. Los métodos más eficientes han sido el tratamiento alcalino o por intercambio iónico. Se han comparado tratamientos alcalinos con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{NaOH}$  y  $\text{NH}_4\text{OH}$  y se encontró que este último es el mejor en términos de remoción de furaldehídos (Almeida, 2009).

La evaporación persigue la eliminación de compuestos volátiles como el furfural, ácido acético y fórmico. Sin embargo, el ácido levulínico, el HMF y compuestos fenólicos no son eliminados. Las resinas de intercambio iónico persiguen la eliminación de compuestos fenólicos, debido a la formación de fuertes enlaces entre los grupos amonio cuaternarios de las resinas (cargados positivamente) y los fenoles, cargados negativamente (Oliva, 2003).

Así, el objetivo del pre-tratamiento es reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo celulosa-lignina, aumentar el área superficial del material y disminuir la presencia de sustancias que dificulten la hidrólisis (Oliva, 2003). Por lo tanto, el pre-tratamiento es el conjunto de acciones para mejorar el rendimiento en la obtención de azúcares fermentables desde la biomasa inicial. Por su naturaleza, los pre-tratamientos se pueden dividir en 4 grupos: físicos, físico-químicos, químicos y biológicos (Tabla 3; Sun y Cheng, 2002).

### Físico

<b>Método</b>	<b>Procedimiento</b>
<b>Trituración mecánica</b>	El material se puede triturar, moler y/o prensar para disminuir la cristalinidad de la celulosa. El tamaño es de 10-30 mm triturado y 0.2-2 mm después de molido (Martínez, 2009).
<b>Pirólisis</b>	Temperaturas superiores a 300°C provoca que la celulosa se descomponga, produzca

	gas y se carbonice (Martínez, 2009). Se produce de 80-85% de conversión de celulosa a azúcares (Martínez, 2009)
--	---

**Tabla 3.** Tipos de pre-tratamiento de materiales lignocelulósicos.

Físico-químico

<b>Método</b>	<b>Procedimiento</b>
<b>Explosión por vapor</b>	Se trata al material a alta presión y después esta presión se reduce rápidamente lo que provoca que el material sufra una descompresión explosiva (Martínez, 2009). Se inicia a 160-260°C por varios segundos. Hidrólisis de 80-100% de hemicelulosa pero debe haber un lavado posterior para remover material inhibitorio.
<b>Explosión por vapor con amoníaco</b>	Material expuesto a líquido de amonía 1-2 kg amonía/kg de biomasa seca, 90°C/30 minutos (Martínez, 2009). No produce inhibidores.
<b>Explosión con CO<sub>2</sub></b>	Caro, menos efectivo pero no produce inhibidores. 4kg CO <sub>2</sub> /kg de fibra (Martínez, 2009).

**Tabla 3.** Tipos de pre-tratamiento de materiales lignocelulósicos.

Químico

<b>Método</b>	<b>Procedimiento</b>
<b>Ozonólisis</b>	El ozono se utiliza para la degradación de la lignina y hemicelulosa y la celulosa no se ve

	afectada, no produce inhibidores pero es caro (Martínez, 2009).
<b>Hidrólisis ácida</b>	Los ácidos como el sulfúrico y el clorhídrico son agentes poderosos para la hidrólisis de la celulosa. Hay 2 tipos de tratamiento: alta temperatura con flujo continuo y baja temperatura por lote. Hay que neutralizar después de la hidrólisis, despolimerización de celulosa y la lignina no se solubiliza (Martínez, 2009).
<b>Hidrólisis alcalina</b>	Saponificación de esteres intermoleculares que unen a la lignina con el resto del material lignocelulósico. Hinchazón del material, aumento de área superficial, disminución de GP, de cristalinidad, ruptura de la estructura de la lignina. Eficiencia de 60-80% (Martínez, 2009).
<b>Deslignificación oxidativa</b>	Biodegradación de lignina por peroxidasa en presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Solubilización de 50% y casi el total de hemicelulosa (Sun y Cheng, 2002).
<b>Organosolv</b>	Ruptura de estructura interna de lignina y hemicelulosa usando disolventes orgánicos (metanol, etanol, etilenglicol, acetona, etc.). Temperatura cercana a 185°C (Martínez, 2009). Solubilización casi total de lignina, hidrólisis casi total de hemicelulosa.

**Tabla 3.** Tipos de pre-tratamiento de materiales lignocelulósicos.

## Biológico

Método	Procedimiento
<b>Pre-tratamiento con hongos</b>	Uso de hongos de pudrición blanca y café, suaves para degradar lignina y hemicelulosa. Los cafés atacan a la hemicelulosa y los blancos y suaves a la celulosa y lignina. Hidrólisis baja (Martínez, 2009).

**Tabla 3.** Tipos de pre-tratamiento de materiales lignocelulósicos.

Posterior al pre-tratamiento, se efectúa la sacarificación en donde la celulosa y hemicelulosa son hidrolizadas a glucosa y xilosa, respectivamente, mediante catalizadores ácidos o enzimas denominadas celulasas que son una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa. En este último caso, se emplean condiciones de reacción con un pH de 4.8 aproximadamente y temperaturas entre 45-50°C, en este proceso se obtienen monómeros de glucosa y xilosa (Zhang *et al*, 1995).

Las etapas de sacarificación y fermentación se pueden realizar conjuntamente (SSF, por sus siglas en inglés), o bien de manera separada (SHF). La ventaja de este último proceso, es que al estar separadas las etapas de hidrólisis y fermentación, ambas se pueden realizar en sus condiciones óptimas. La hidrólisis se realiza a temperatura óptima de la enzima (alrededor de 50°C) y la fermentación a partir de la temperatura óptima del microorganismo productor de etanol (alrededor de los 37°C).

En la fermentación, se lleva a cabo la conversión de azúcares fermentables producidos durante el pre-tratamiento y sacarificación a etanol y CO<sub>2</sub> por medio de microorganismos, como *Saccharomyces cerevisiae* la cual fermenta glucosa,

aunque también se obtienen pentosas provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa que resulta principalmente en xilosa (Ho *et al*, 1998).

Uno de los mayores retos para poder aumentar el rendimiento del proceso de transformación de la biomasa lignocelulósica en etanol es la fermentación de todos los azúcares presentes en la biomasa. Se trabaja en la obtención de microorganismos modificados genéticamente para que puedan transformar la xilosa y la arabinosa en etanol (Oliva, 2003).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el efecto de diversos pre-tratamientos en el residuo de malta de cerveza para la generación de azúcares solubles fermentables a etanol.

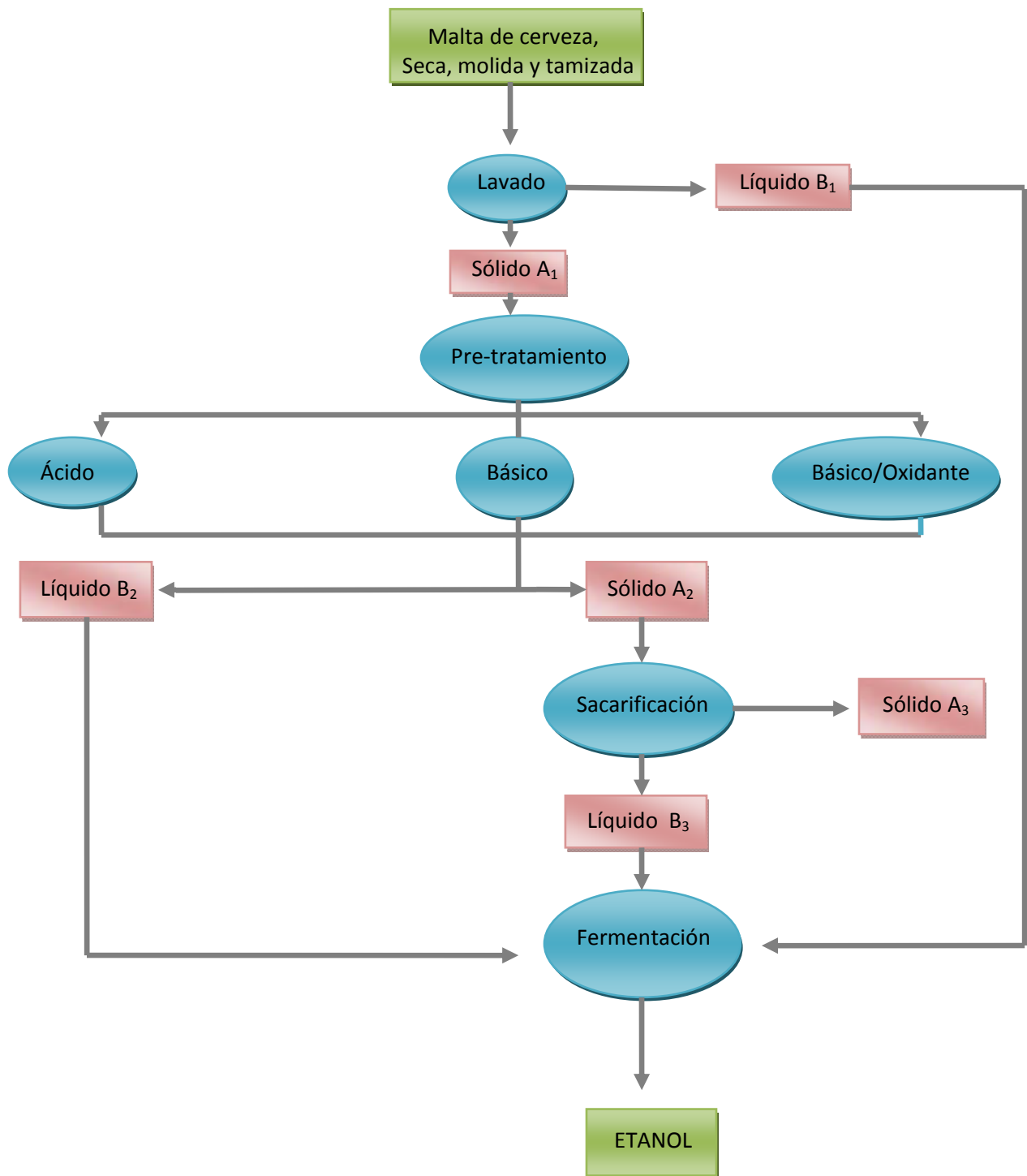
### **2.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar azúcares totales y reductores de los jarabes del lavado, pre-tratamiento y sacarificación, mediante los métodos de Fenol-sulfúrico y DNS, con el propósito de establecer un estimado de los azúcares presentes en cada una de estos procesos.
- Comparar la producción de bioetanol a partir de residuos de malta con distintos pre-tratamientos químicos.
- Determinar la formación de furfural y HMF de los jarabes obtenidos de los procesos de pre-tratamiento y sacarificación mediante la técnica de HPLC, ya que éstos compuestos son los que intervienen en la producción de etanol.
- Evaluar la factibilidad técnica de la producción biotecnológica de etanol a partir de residuos de malta.

## **3. HIPÓTESIS**

Los residuos de malta de cerveza pueden ser una fuente de azúcares solubles fermentables para la producción de bioetanol mediante el incremento de la accesibilidad del material a través de un pre-tratamiento que permita una mayor sacarificación y producción de etanol por fermentación.

#### 4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA



**Figura 6.** Esquema general de las actividades experimentales.

## Condiciones experimentales de proceso

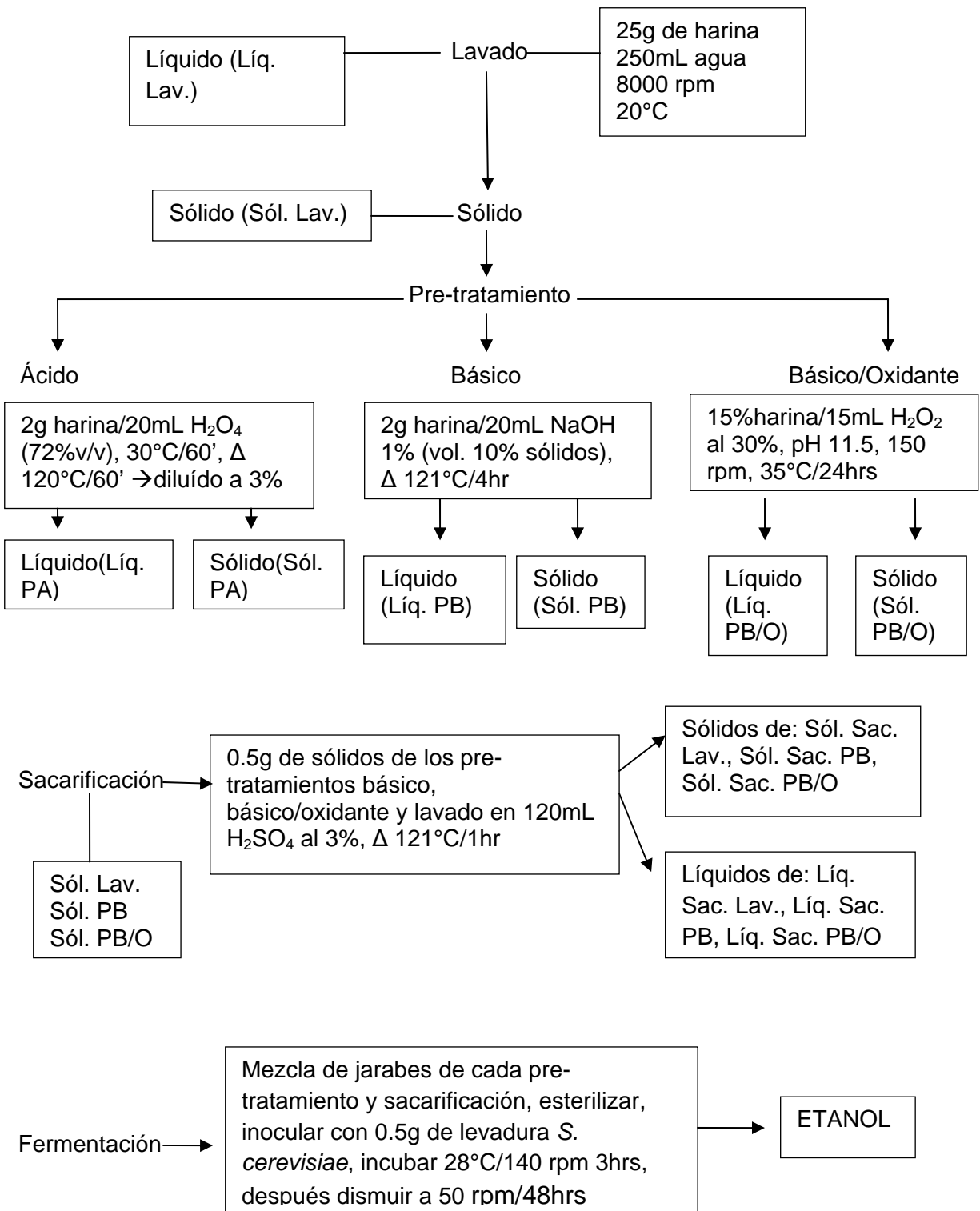


Figura 7. Diagrama de flujo detallado de las condiciones de operación.



## 4.2. Metodología descriptiva

Se utilizaron los residuos de malta de cerveza de la planta piloto de la Facultad de Química, ubicada en el Laboratorio de Ingeniería Química de la Facultad y amablemente suministrados por el Prof. Agustín Reyo Herrera. El residuo de malta se secó, molió, se hizo pasar por un tamiz de malla 100, del cual se obtuvo una muestra de 301.7g. Al residuo de malta original se le determinó el % Humedad por triplicado usando una Termobalanza MB 35 Halogen marca OHAUS (Tabla 4) obteniéndose un promedio de humedad de 5.16%.

Muestra	Peso inicial (g)	% Humedad	Peso final (g)
1	5.001	5.18	4.472
2	5.001	5.18	4.741
3	5.001	5.12	4.745

**Tabla 4.** Resultados de humedad de la malta molida.

### 4.2.1. Lavado de la malta de cerveza

#### *Material y Reactivos*

- Centrífuga Marca: Beckman. Modelo: J2-21M/E
- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Thermo Spectronic. Software: Vision 32.
- Ácido sulfúrico concentrado Marca: J.T.Baker.
- Solución de fenol al 5%. Marca: Sigma-Aldrich.
- Reactivo DNS.
- Refractómetro de bolsillo Modelo: Pal-1. Marca: Atago.

Conforme al diagrama global para el lavado de la malta molida y tamizada, se deben pesar 25g en 250mL de H<sub>2</sub>O. Se dividieron los 25g en 2 tubos para efectuar la centrifugación. En un tubo se pesaron: 12.5018g y en otro: 12.5130g,

lo que da un total de 25.0148g. Una vez centrifugado, se midieron sólidos totales al líquido usando el refractómetro de bolsillo, los cuales fueron de 4.6%.

Se tomó una muestra del jarabe para determinar azúcares reductores y totales, se estimó el grado de polimerización (GP), se midió el volumen restante el cual fue de 214mL, después se congeló para utilizarlo posteriormente.

La parte sólida (residuos de malta de cerveza) se sometió a un secado de 60°C por un periodo de 24 horas.

#### 4.2.2. Método de FENOL/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Este método se fundamenta en que los carbohidratos son sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones, una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida, se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo que se realiza una curva patrón (Nielsen, 2003).  
Hexosas: 490nm

#### Reacción

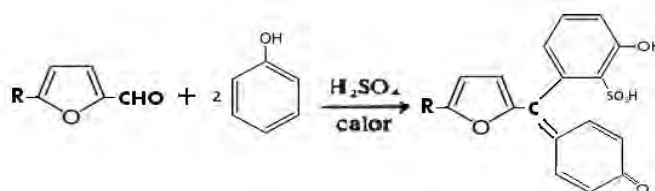


Figura 8. Reacción de fenol-sulfúrico (Medrano, 2010).

#### Técnica

##### *Reactivos y Materiales*

- Tubos de ensaye con tapón de rosca 15\*180mm
- Vasos de precipitados de 100 y 1000 mL

- Micropipetas 10, 100 y 1000  $\mu$ L. Pipetas graduadas 5 y 10 mL.
- Gradilla.
- Celdas de cuarzo.
- Vortex marca Fisher.
- Ácido sulfúrico concentrado (96.6% pureza).
- Solución de fenol al 5% (pesar 5g de fenol y aforar a 100 ml).
- Agua destilada.
- Espátula.

Las condiciones del Espectrofotómetro UV-VIS fueron:

Espectrofotómetro UV-VIS marca Thermo Spectronic de doble haz. Software:  
Vision 32  
Absorbancia: 490nm.

Se ajustó la solución de la muestra en agua, procurando que los carbohidratos se encuentren en el intervalo de sensibilidad del método (10-100 $\mu$ g/mL). En tubos de ensaye etiquetados, colocar 1mL de la solución acuosa de la muestra. Para cada tubo adicionar 1mL de una solución de fenol 5%. Mezclar perfectamente. Adicionar con cuidado 5mL de ácido sulfúrico concentrado y homogeneizar.

NOTA: Realizar el procedimiento primero para un tubo antes de continuar con el otro. Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos) y determinar la intensidad del color naranja obtenido en un espectrofotómetro UV-VIS a 490nm, frente a un blanco preparado de la misma manera solo que en lugar de la muestra utilizar agua.

Se preparó una disolución de glucosa para llevar a 100mL de H<sub>2</sub>O. Para que de esta manera estuviera en un intervalo del método (10-100 $\mu$ g de glucosa/mL). Y para preparar la solución de fenol se pesaron 5.0111g (ver Anexo A).

### 4.2.3. Método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)

El grupo aldehído que está presente en la glucosa se reduce a grupo 3-nitro del ácido 3,5-dinitrosalicílico para producir el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que al reaccionar con la fenilhidrazina presente en el reactivo de DNS produce una ozazona, la cual es colorida, y puede ser cuantificada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540nm (Nielsen,2003).

#### Técnica

##### *Reactivos y Materiales*

- Tubos de ensaye con tapón de rosca 15\*180 mm.
- Vasos de precipitados de 100 y 1000mL.
- Micropipetas 10, 100 y 1000  $\mu$ L. Pipetas graduadas 5 y 10 mL.
- Gradilla.
- Celdas de cuarzo.
- Vortex marca Fisher.
- Reactivos DNS (disolver en caliente 6.3g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 200mL de agua destilada donde previamente se disolvieron 21.4g de NaOH. En otro vaso de precipitados, adicionar 140g de tartrato de sodio y potasio a 250mL de agua destilada y calentar hasta disolución. Adicionar 5g de fenol y 5g de bisulfito de sodio. Mezclar las dos soluciones y ajustar el volumen final a 1000mL con agua destilada).
- Recipiente para baño María.
- Agua destilada.
- Espátula.

Las condiciones del Espectrofotómetro UV-VIS fueron:

Espectrofotómetro UV-VIS marca Thermo Spectronic de doble haz. Software:  
Vision 32

Absorbancia: 540nm.

El procedimiento es: tomar 1mL de la solución acuosa de la muestra y adicionar 1mL del reactivo de DNS. Someter a calentamiento durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, enfriar y diluir con 8mL de agua destilada. Leer la absorbancia del color producido a 540nm frente a un blanco.

Se preparó una disolución de glucosa para llevar a 10mL de H<sub>2</sub>O.

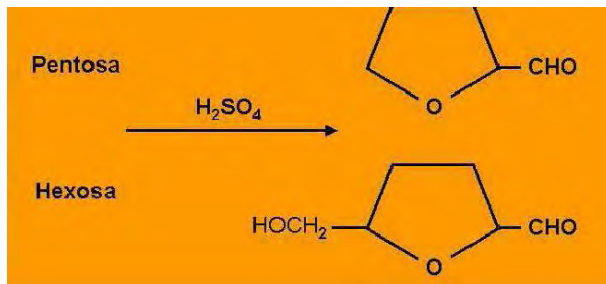
$$1000\mu\text{g/mL} = (1 \cdot 10^6 \text{g/mL}) (10\text{mL}) = 1 \cdot 10^7 \text{g} = 0.01\text{g C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 / 10 \text{ mL de H}_2\text{O}$$

NOTA: Se realizaron 2 curvas de calibración de DNS, esto porque se contaminó el primer reactivo por lo que se tuvo que preparar de nuevo la solución. Entonces, para los resultados, hasta antes de la sacarificación se trabajó con la primera curva, de la sacarificación en adelante se trabajó con la segunda curva (ver Anexo B). El peso de glucosa (para la primera curva) fue de: 0.0118g y la para la segunda: 0.0100g .

#### **4.2.4. Método de Furfural**

Durante el proceso de las muestras, como el ácido que se genera durante los pre-tratamientos, una parte llega a generar carbohidratos que pueden contener productos como: HMF, furfural, ácidos orgánicos y alcoholes de azúcar. Estos compuestos se analizan por HPLC con un detector de arreglo de diodos UV-VIS, para determinar los parámetros óptimos del proceso de producción. Varios de estos compuestos que se miden, inhiben el proceso, por lo que su monitoreo es importante (Li, *et. al.*, 2009).

## Reacción



**Figura 9.** Obtención de HMF a partir de una hexosa y furfural a partir de una pentosa (Prácticas de Química Orgánica III, 2010).

## Técnica

### *Reactivos y Materiales*

- Solución Furfural 99%
- Solución Hidroximetilfurfural 99%
- $H_2O$  destilada
- Acetonitrilo
- Vaso de precipitados 100mL
- Vial 1.5mL
- Matraz aforado 10mL
- Espátula
- Micropipetas 100 $\mu$ L y 1000 $\mu$ L

Las características del equipo que se utilizó son:

HPLC

Equipo (Hewlett Packard Serie 1100)

Tipo de columna: SUPERCOSIL™ LC-18-DB

(longitud 15cm\*4.6mm\*3 $\mu$ m).

T columna: 30°C  
Flujo: 1mL/min  
Absorbancia: 277±10  
Referencia: 600±25  
Inyección: 20µL  
Tiempo de inyección: 8 minutos  
Concentración proporción de disolventes: 70% H<sub>2</sub>O y 30% ACN

Se preparó una solución de furfuraldehído al 0.04% en un volumen final de 10mL de H<sub>2</sub>O/EtOH (1:1). Para poder preparar esta solución se realizaron los siguientes cálculos:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_1 = 99\%$$

$$C_2 = 0.04$$

$$V_2 = 10\text{mL}$$

$$V_1 = \frac{0.04\%(10\text{mL})}{99\%} = 0.004\text{mL Furfural}$$

$$V_1 = \frac{0.002\%(1\text{mL})}{0.04\%} = 0.05\text{mL Furfural (1er punto en la curva, ver Anexo C)}$$

Para poder tener una solución al 0.04% primero se preparó una solución de Hidroximetilfurfural al 1% en un volumen final de 10mL de H<sub>2</sub>O/EtOH (1:1). Los cálculos son los siguientes:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_1 = 0.1\%$$

$$C_2 = 0.04$$

$$V_2 = 1\text{mL}$$

$$V_1 = \frac{0.04\%(1\text{mL})}{0.1\%} = 0.4\text{mL Hidroximetilfurfural}$$

$$V_1 = \frac{0.03\%(1\text{mL})}{0.1\%} = 0.3\text{mL (2do punto en la curva, ver Anexo D)}$$

#### **4.2.5. Determinación de etanol por cromatografía de gases**

Se basa en los principios de la cromatografía de gases y consiste en la inyección de una pequeña cantidad de muestra (mezcla de sustancias volátiles) en el inyector de un cromatógrafo de gases en el que son vaporizadas y transportadas por un gas inerte a través de una columna empacada o capilar con un líquido de partición que presenta solubilidad selectiva con los componentes de la muestra, ocasionando de esta manera su separación. Los componentes que eluyen de la columna pasan uno a uno por el “detector”, el cual genera una señal eléctrica proporcional a su concentración, la que es transformada por el registrador en una gráfica de concentración contra tiempo llamada cromatograma.

La identificación de cada componente registrado como un pico en el cromatograma, se realiza por inyección del o los componentes que se sospecha la muestra contiene de forma pura y mismas condiciones de la muestra, midiendo el tiempo de retención en esas condiciones.

Se deberán obtener cromatogramas con soluciones de concentración conocida tanto del estándar interno como del componente a cuantificar, así de esta manera, se traza la curva de calibración que tenga por ordenadas la relación de concentraciones correspondientes al componente a cuantificar y al estándar interno.

#### **Técnica**

##### *Reactivos y Materiales*

- Solución Etanol 99.74%



- H<sub>2</sub>O destilada
- Vaso de precipitados 100mL
- Vial 1.5mL
- Matraz aforado 10mL
- Micropipetas 100µL y 1000µL

Cromatógrafo de gases

HP Modelo 6890 CG System

Temperatura del inyector: 250°C

FID (Detector Universal de ionización de flama) a 250°C,

Temperatura inicial del horno estaba a 50°C, subiendo 15°C por minuto hasta llegar a una temperatura final de 120°C.

Se realizó la curva de calibración de etanol de 0.1-1%. Por lo tanto, se tomó 0.1mL de EtOH y se aforó a 10mL. De esta solución, 0.1mL, 0.2mL, etc., y llevando a un volumen final de 1mL para poder tener las concentraciones deseadas (ver Anexo E).

#### **4.3. PRE-TRATAMIENTO**

Es la siguiente operación del proceso. Se van a realizar 3 pre-tratamientos al residuo sólido del lavado. Los pre-tratamientos son los siguientes:

- a) Pre-tratamiento ácido diluido.
- b) Pre-tratamiento básico.
- c) Pre-tratamiento básico/oxidante.

#### **4.3.1. PRE-TRATAMIENTO ÁCIDO**

##### *Fundamento*

El objetivo es hacer más accesible el material para la etapa de sacarificación, la lignina se hidroliza al 50% y la hemicelulosa casi en su totalidad; sólo que tiene como desventaja la producción de compuestos no deseables como el furfural. No se usa ácido concentrado ya que sería muy agresivo para material lignocelulósico, es por eso que se diluye.

##### *Técnica*

El ácido es al 72% pero se tiene que diluir hasta el 3% por lo que se hizo el siguiente cálculo:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \qquad V_2 = [72\%(20\text{mL})] / 3\% = 480\text{mL}$$

Pero como ya se usaron 20mL, entonces se agregan 460mL de agua.

NOTA: Se debe considerar que el ácido es concentrado, es decir, la concentración inicial es de 96.6%.

Se dividió en 2 matraces de 500mL con tapón de rosca; 230mL en cada matraz.

Se pesaron 2.0015g del sólido seco del lavado para este pre-tratamiento y se adicionaron a los matraces.

Una vez realizado el pre-tratamiento, se neutralizó con NaOH. Teniendo como pH inicial 0.70 y final 7.20. Se tomó una muestra del jarabe para hacer la determinación de azúcares totales y reductores; se midió el volumen restante el cual fue de 500mL, después se congeló para utilizarlo posteriormente. También se pesó el sólido secado en la estufa, el cual fue de 0.2393g.

### **4.3.2. PRE-TRATAMIENTO BÁSICO**

#### *Fundamento*

El mayor efecto de este pre-tratamiento depende de la cantidad de lignina presente, porque se rompen los enlaces con el resto del material lignocelulósico, lo que lo hace más poroso, aumenta el área de superficie desde el interior, disminuye cristalinidad y así la hidrólisis es más efectiva. (Martínez Tabata, 2009).

#### *Técnica*

Para este pre-tratamiento se pesaron 2.004g del sólido A. Se preparó una solución de NaOH 1%/20mL; para que de esta manera se obtengan 10% de sólidos. Las condiciones eran 121°C/4 hrs (en autoclave).

Para preparar la solución de NaOH 1%, se pesaron 0.2119g, por lo que la concentración real sería de 1.06%. Una vez realizado el pre-tratamiento, se neutralizó con ácido cítrico 2M, solo que como no se podía neutralizar al vacío se agregó un poco más de agua y se centrifugo en una centrífuga 5810 R Eppendorf durante 10 minutos a 8000 rpm/20°C. Después de esto, se pudo filtrar al vacío. El pH inicial fue de 9.07 y el final 7.04. Se tomó una muestra del jarabe para hacer la determinación de azúcares totales y reductores; se midió el volumen restante el cual fue de 27mL, después se congeló para utilizarlo posteriormente. También se pesó el sólido secado en la estufa, el cual fue de 0.9992g.

### **4.3.3. PRE-TRATAMIENTO BÁSICO/OXIDANTE**

#### *Fundamento*

Este pre-tratamiento se basa en el uso de soluciones alcalinas diluidas de peróxido de hidrógeno donde se solubiliza la lignina presente.

#### *Técnica (Saha y Cotta, 2007)*

En este pre-tratamiento, para poder tener el 15% de harina se realizaron los siguientes cálculos:

30mL H<sub>2</sub>O 10%  
15mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en total

45 --- 100%

X ---- 15% x = 6.75g de harina del sólido A debo pesar

El pH debe llegar a 11.5, por lo que se ajustó con NaOH 0.1M. Se mantuvo en incubación por 24hrs a 35°C. Una vez terminado este tiempo, se neutralizó con ácido cítrico 2M. Se tomó el pH inicial que fue de 8.12 y el final de 6.03. El peso del sólido secado en la estufa fue de 3.0620g.

Había demasiados sólidos solubles en suspensión y en el fondo del frasco, por lo que se utilizaron filtros de 0.45 micras para jeringa y de esta manera no interfirieran en la medición.

Nuevamente se determinaron azúcares totales y reductores, se midió el volumen del jarabe que fue de 93mL, después se congeló para utilizarlo más adelante.

#### 4.4. SACARIFICACIÓN

##### *Fundamento*

Este punto es importante porque, las cadenas de celulosa y hemicelulosa son hidrolizadas para generar azúcares fermentables, mediante el ataque a los enlaces glucosídicos.

Hay 2 alternativas para llevar a cabo la sacarificación, una de ellas es el uso de soluciones ácidas en la materia prima y un calentamiento a 121°C/1hr.

Se evaluó la capacidad de sacarificación mediante el uso de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 3%, con el propósito de aumentar la cantidad de azúcares totales a las muestras del residuo de malta de cerveza de los 3 pre-tratamientos.

### *Material y Reactivos*

- Celdas de cuarzo
- Autoclave Marca: Yamato. Modelo: SE510.
- Estufa de convección. Marca: Felisa.
- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Termo Spectronic. Software: Vision 32
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) Marca: HP Modelo.1100. Software: HP ChemStation.
- Solución de NaOH 6M
- Solución de Fenol al 5%
- Reactivo DNS
- Ácido sulfúrico concentrado. Marca: J.T. Baker.
- Acetonitrilo grado HPLC.

### *Procedimiento*

Se pesó aproximadamente 0.5g de los sólidos resultantes del lavado y de cada pre-tratamiento (excepto el pre-tratamiento ácido), se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250mL con una adición de 120mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 3%. Los matraces se taparon y metieron a la autoclave por 1 hora a 121°C. Después de este tiempo, la fase acuosa y la fracción sólida se separaron por filtración al vacío; se neutralizaron las soluciones con NaOH y se cuantificaron AR y AT y derivados de furfural. Se midió a cada jarabe el volumen total para su uso posterior en la fermentación.

El residuo sólido se secó en estufa a 60°C hasta peso constante. Una vez seco y a peso constante, se determinó el porcentaje de pérdida en función de la cantidad de sólidos totales inicial y la fracción sólida que no fue sacarificada.

#### 4.5. FERMENTACIÓN

##### *Fundamento*

En esta etapa se lleva a cabo la conversión de azúcares fermentables a etanol y dióxido de carbono usando microorganismos. *Saccharomyces cerevisiae*, es la levadura más comúnmente empleada para fermentar glucosa y obtener etanol.

La hemicelulosa y la celulosa, cuando se hidrolizan generan xilosa y glucosa respectivamente; estas últimas pueden ser fermentadas por las levaduras en condiciones anaerobias y producir etanol.

##### *Procedimiento*

Se hicieron las mezclas de los jarabes generados en el lavado y pre-tratamientos según los valores calculados para conocer aproximadamente los azúcares que se podrían obtener en g/L. La mezcla de jarabes era hasta un volumen de 50 mL (ver Anexo F).

##### *Material y Reactivos*

- Filtros de membrana 0.2µm
- Tubos de centrifuga Falcon 50mL
- Celdas de cuarzo.
- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Thermo Spectronic. Software: Vision 32.
- Cromatógrafo de gases Marca: HP. Modelo: 6890. Software: HP
- ChemStation.
- Autoclave Marca: Yamato. Modelo: SE510.
- Centrifuga Marca: Eppendorf A-35. Modelo: 5810R.
- Agitadora Mecánica. Marca: Brunswicks.

- Solución de fenol 5%
- Reactivo DNS
- Ácido Sulfúrico concentrado Marca: J.T.Baker.
- Extracto de levadura Ultrapuro. Marca: USB.
- Levadura liofilizada casera (*S. cerevisiae*).
- Dextrosa, monohidrato polvo PM. 198.17
- Contenido 500g J.T. Baker  $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$

La propagación de la levadura fue de la siguiente manera:

*Solución 100mL con 1%Gluc + 1% extracto de levadura*

Peso levadura: 1.0105g    Peso Glucosa: 1.0095g

Este matraz con el medio para la levadura se esterilizó. Una vez frío, en condiciones asépticas se inoculó con 0.5018g de levadura en polvo; después se incubó a 30°C con una agitación de 20 ciclos/24hrs.

Para poder conocer la concentración de etanol en la biomasa, se determinó masa húmeda, para lo cual se realizó la centrifugación del inóculo (100mL), 8000 rpm/10 min. Se dividió la masa entre 4 tubos, se pesó antes y después de centrifugar (Tabla 5).

<b>Tubo</b>	<b>Peso inicio(g)</b>	<b>Peso final(g)</b>	<b>Masa húmeda(g)</b>
1	21.8	39.1	9.1
2	21.7	39.4	9.4
3	21.1	38.7	8.7
4	21.1	39	9

**Tabla 5.** Peso de masa húmeda

Sumando los pesos de los 4 tubos tenemos en total: 36.2g de masa húmeda. El peso del tubo solo fue de 30g.

Los jarabes también se esterilizaron, se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y se inocularon con la levadura en condiciones estériles. Se determinaron azúcares reductores y totales antes y después de la esterilización. También se cuantificó el etanol producido y se llevó a cabo filtrando aproximadamente 1mL de cada jarabe y depositándolo en un frasco vial se colocó en el cromatógrafo de gases. El equipo se programó para que inyectara dos veces cada una de las muestras.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

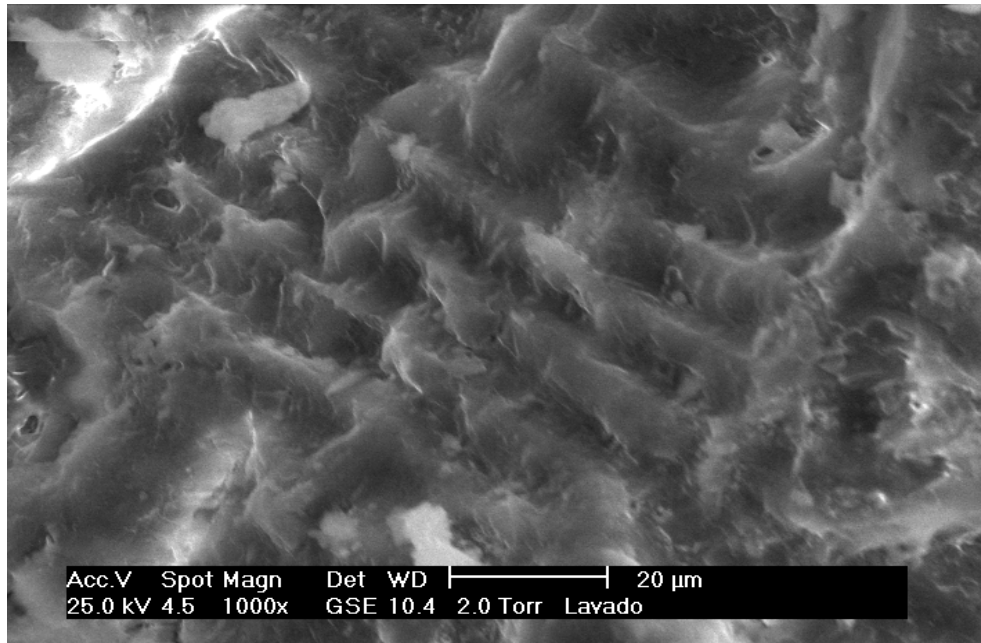
### **5.1. LAVADO**

En el jarabe obtenido a partir del lavado del residuo de malta se obtuvieron 18.32 y 62.04 g/L de azúcares reductores y totales, respectivamente. Debido a que el grano de cebada contiene en su mayoría carbohidratos (72.8-82.8%), se esperaba que en la determinación de azúcares totales y reductores del proceso de lavado se obtuvieran una cantidad importante.

Se determinó el grado de polimerización (GP) del jarabe y que consiste en el número de monómeros de azúcar que conforman al polisacárido u oligosacárido. Así, el GP de los oligómeros presentes en el jarabe es de 3.38 y el porcentaje de sólidos retenidos fue de 61.36%. El lavado permitió la solubilización del 38.64% de la muestra inicial.



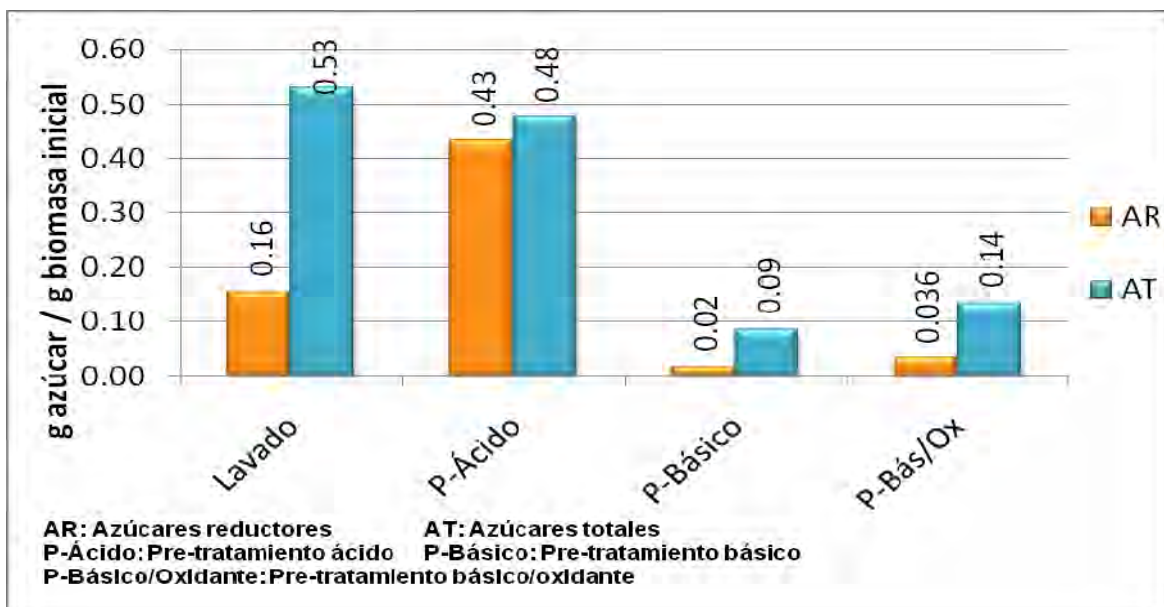
Se realizó un análisis de morfología mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ASEM) a la muestra inicial de malta de cerveza con el objetivo de comprender el efecto de los distintos pre-tratamientos empleados y hacer una comparación entre los mismos. En la figura 9, se muestra el residuo de malta original, en el cual se observan fibras rectas con superficie lisa y suave, también se llegan a apreciar unos pequeños gránulos que podrían ser almidón.



**Figura 10.** Fotografía de ASEM del residuo de malta de cerveza inicial. Aumento 1000X.

## **5.2. PRE-TRATAMIENTOS**

En la figura 10, se muestra el rendimiento de los azúcares que se generaron después de cada pre-tratamiento, para poder aumentar la disponibilidad de la materia lignocelulósica y que con la sacarificación, la fermentación se pueda llevar a cabo de una manera efectiva.



**Figura 11.** Contenido de azúcares en lavado y pre-tratamientos (g azúcar / g muestra inicial).

Se repitieron 2 veces cada una de las pruebas para la determinación de azúcares reductores (AR) y azúcares totales (AT), donde la biomasa inicial fue de 25.0148g para el lavado, 2.0015g para el pre-tratamiento ácido, 2.0049g para el pre-tratamiento básico y 6.75g para el pre-tratamiento básico/oxidante. Se observa que para los azúcares reductores (AR), el pre-tratamiento ácido permitió obtener la mayor parte de estos azúcares (Figura 10). Lo que reportan algunos autores es que el pre-tratamiento ácido promueve altos rendimientos, baja formación de productos de degradación (siempre y cuando se controle el pH debido a la formación de hidroximetilfurfural), además de que es más económico que otras técnicas (Mussatto y Roberto, 2006). También se calculó el GP, el cual resultó de 1.10 y los sólidos solubilizados fueron de 88.64%. A pesar de que no se obtuvieron rendimientos como los reportados del 67-76.2% bajo condiciones similares (Mussatto y Roberto, 2006), fue el mejor pre-tratamiento de los 3 porque logró solubilizar el material y obtener azúcares simples.

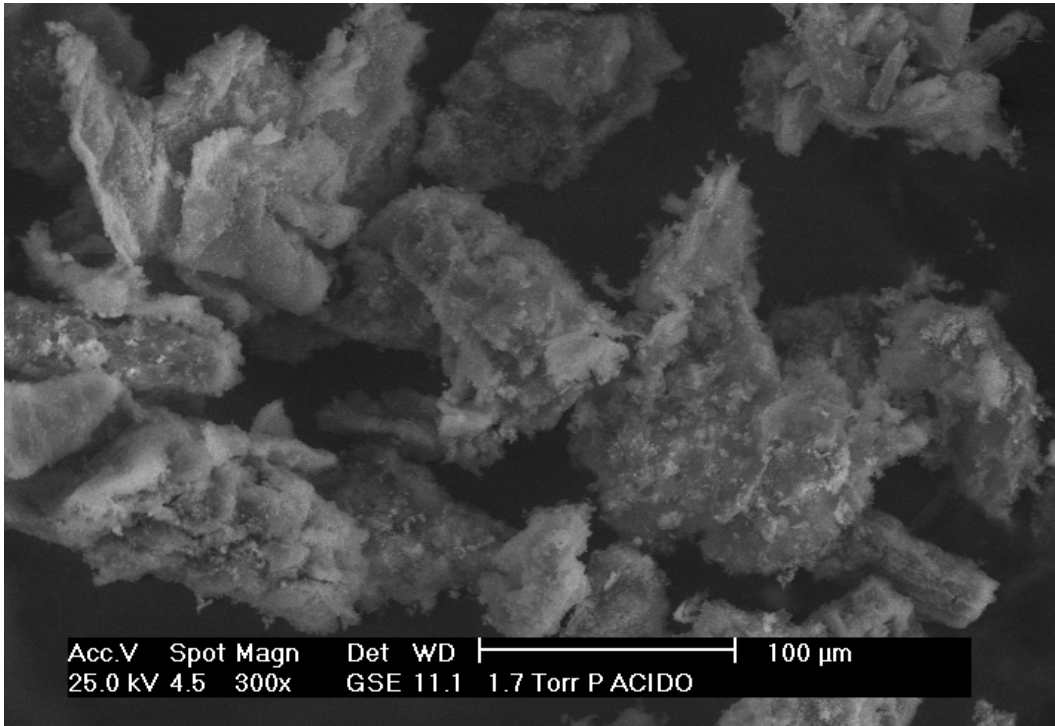
La generación de derivados de furfural promueven el estado de latencia de la levadura lo que provoca una reducción en la tasa de fermentación (Almeida, *et al*, 2009). Por eso se realizó un análisis por HPLC a los jarabes de los pre-

tratamientos básico/oxidante y ácido, ya que fueron de los únicos que todavía quedó muestra. Pero de ninguno de los dos se obtuvo derivados de furfural.

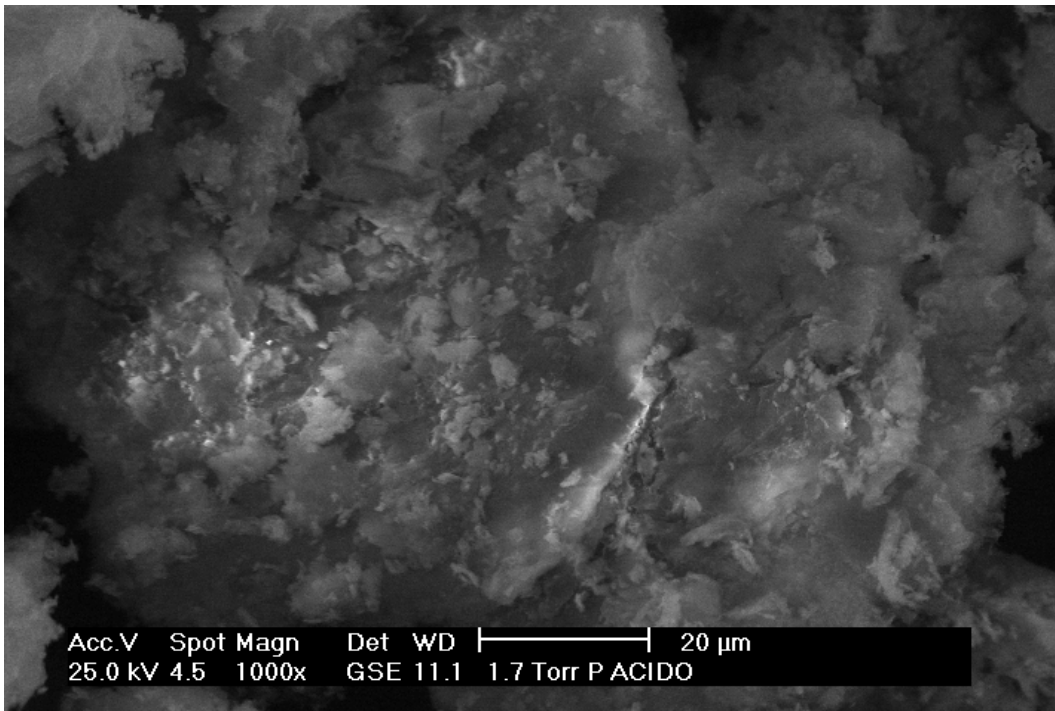
El siguiente pre-tratamiento fue el básico/oxidante, del cual se obtuvieron 0.0358g de azúcares totales/g biomasa inicial, el GP fue de 3.81 y sólidos que se solubilizaron fueron 85.2%. En estudios con paja de arroz, se obtiene un rendimiento de hasta el 97% de azúcares fermentables con este pre-tratamiento; por lo que para los residuos de malta no resultó ser tan eficaz (Saha y Cotta, 2007).

Los sólidos que no se lograron solubilizar en el pre-tratamiento básico fueron del 49.84% por lo que solo la mitad se solubilizó. Además se obtuvo un GP de 4.57; por lo tanto este pre-tratamiento fue del que menos se obtuvo una hidrólisis del material lignocelulósico.

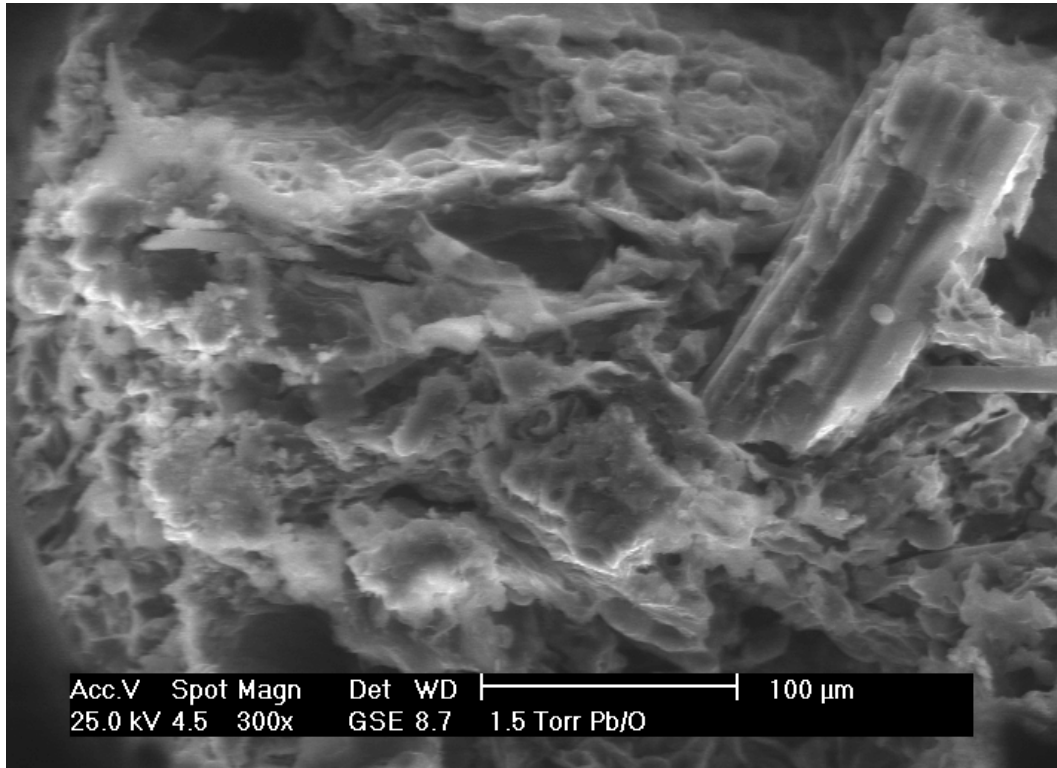
El análisis por ASEM sólo se pudo realizar a los sólidos que resultaron de los pre-tratamientos ácido y básico/oxidante, pero se pudo observar el efecto que tuvieron sobre la morfología del material lignocelulósico original (Figura 12 a 15). El pre-tratamiento ácido diluido provocó un efecto mayor en las fibras del material, el cual se aprecia rugoso, la estructura no es clara como en el material original, por lo que es notoria la degradación que sufrió (Figura 12 y 13). En la estructura del sólido resultante del pre-tratamiento básico/oxidante, se puede observar un menor deterioro, todavía se alcanzan a apreciar fibras y se observa hinchamiento provocado por el disolvente (Figura 14 y 15). Así, haciendo una comparación entre estos pre-tratamientos, el ácido diluido atacó más fuertemente la estructura de la malta de cerveza ya que hidrolizó mejor las fibras de celulosa.



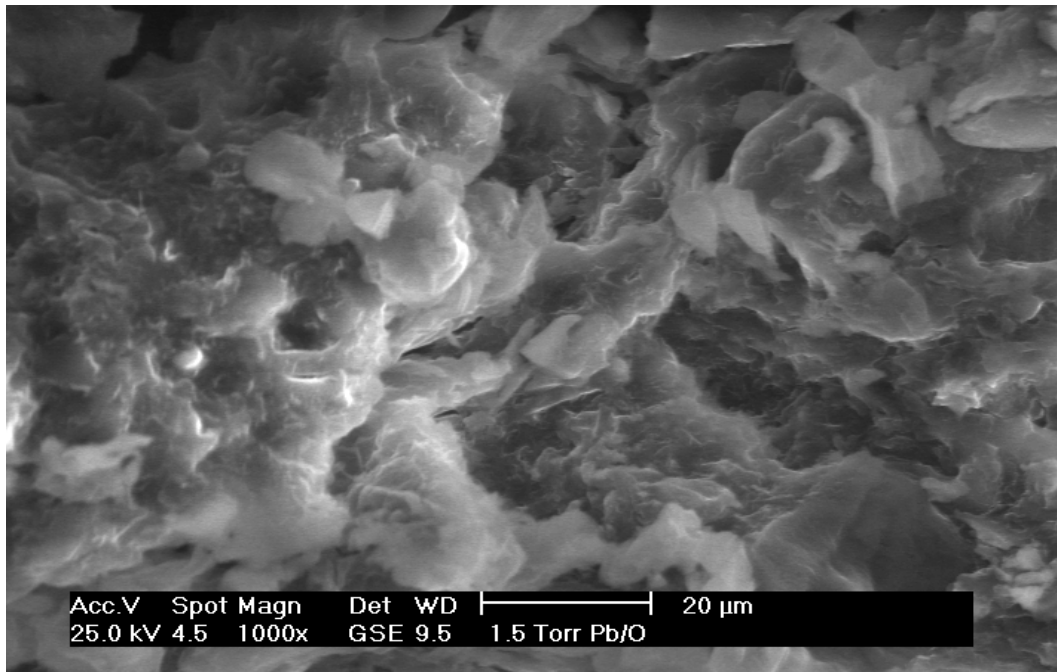
**Figura 12.** Foto de ASEM del sólido resultante del pre-tratamiento ácido diluido (3%).  
Aumento 300X.



**Figura 13.** Foto de ASEM del sólido resultante del pre-tratamiento ácido diluido (3%).  
Aumento 1000X.



**Figura 14.** Foto de ASEM del sólido resultante del pre-tratamiento básico/oxidante.  
Aumento 300X.

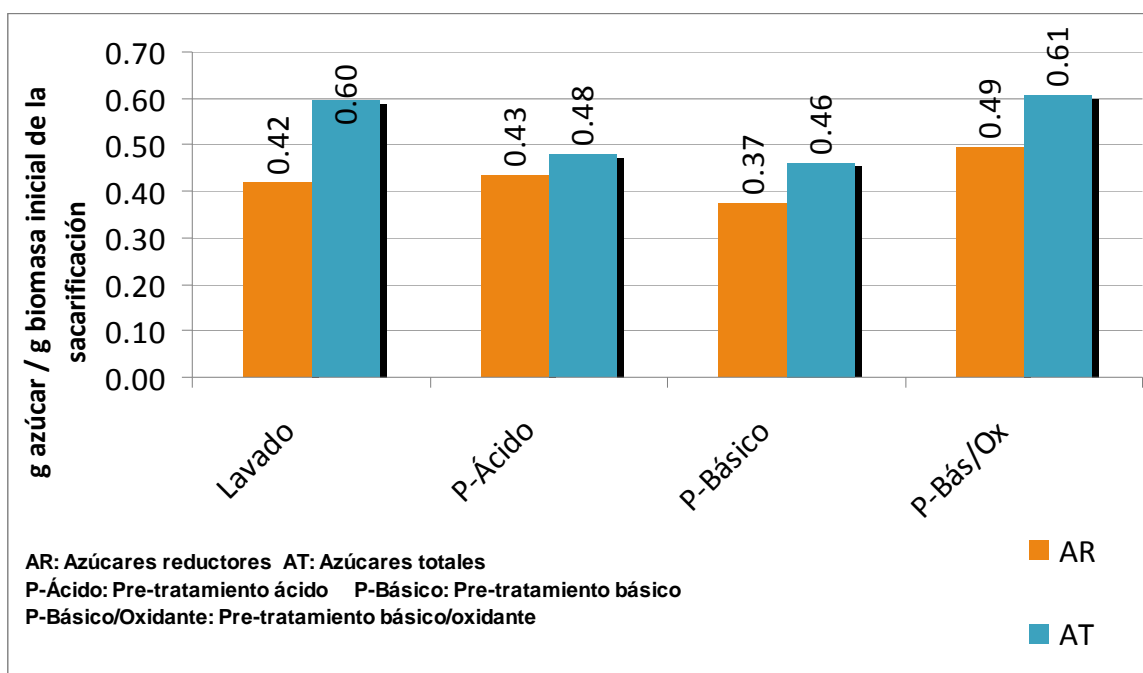


**Figura 15.** Foto de ASEM del sólido resultante del pre-tratamiento básico/oxidante.  
Aumento 1000X.

### 5.3. SACARIFICACIÓN

La sacarificación se realizó a los sólidos de los pre-tratamientos para evaluar el efecto de cada uno en la generación de azúcares solubles. Los sólidos fueron sometidos a una hidrólisis ácida, donde el ácido rompe los enlaces éter entre los monómeros de azúcar en las cadenas poliméricas formadas por celulosa y hemicelulosa. Este rompimiento libera azúcares como xilosa, arabinosa y glucosa (Mussato y Roberto, 2006).

Así, se muestran los rendimientos en cuanto a azúcares reductores y totales después de la sacarificación del sólido obtenido después del lavado y de cada pre-tratamiento (Figura 16):

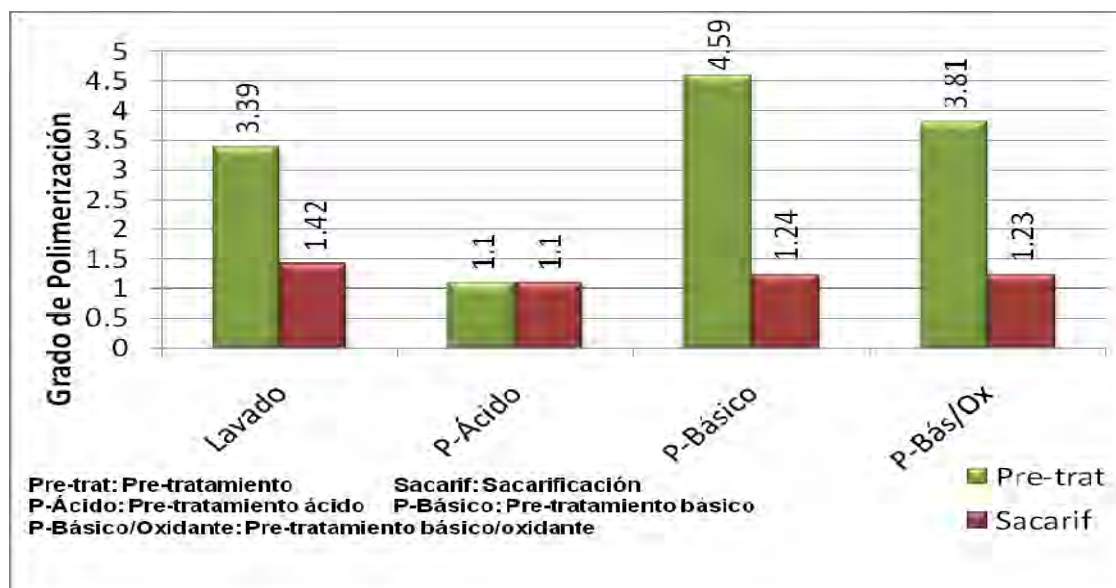


**Figura 16.** Contenido de azúcares obtenidos en la sacarificación de los sólidos provenientes del lavado y de los distintos pre-tratamientos (g azúcar / g biomasa inicial de la sacarificación).

Se realizó solo una vez cada una de las pruebas para la determinación de AR y AT pero se realizaron distintos factores de dilución que confirman la concentración determinada. La biomasa inicial utilizada en la sacarificación fue de aproximadamente 0.5g pero para el pre-tratamiento básico se emplearon 0.4899g. Se aprecia que el contenido de AT y AR es muy similar en los 4 jarabes, lo que

nos indica que el proceso de sacarificación fue muy eficiente, sin incluir el pre-tratamiento/sacarificación con ácido diluido. Esto puede deberse al contenido de celulosa y hemicelulosa, que según un estudio reporta que están entre 17 y 28%, respectivamente, en la malta de cerveza (Mussato y Roberto, 2006). Asimismo, el GP en los jarabes disminuyó en comparación con los valores obtenidos antes de la sacarificación (Figura 17). Lo anterior debido a que el proceso redujo el tamaño de los oligómeros presentes, dando así un resultado eficiente ya que se logró solubilizar casi todo el material, quedando solo unos cuantos sólidos en el papel filtro (aproximadamente 0.1g).

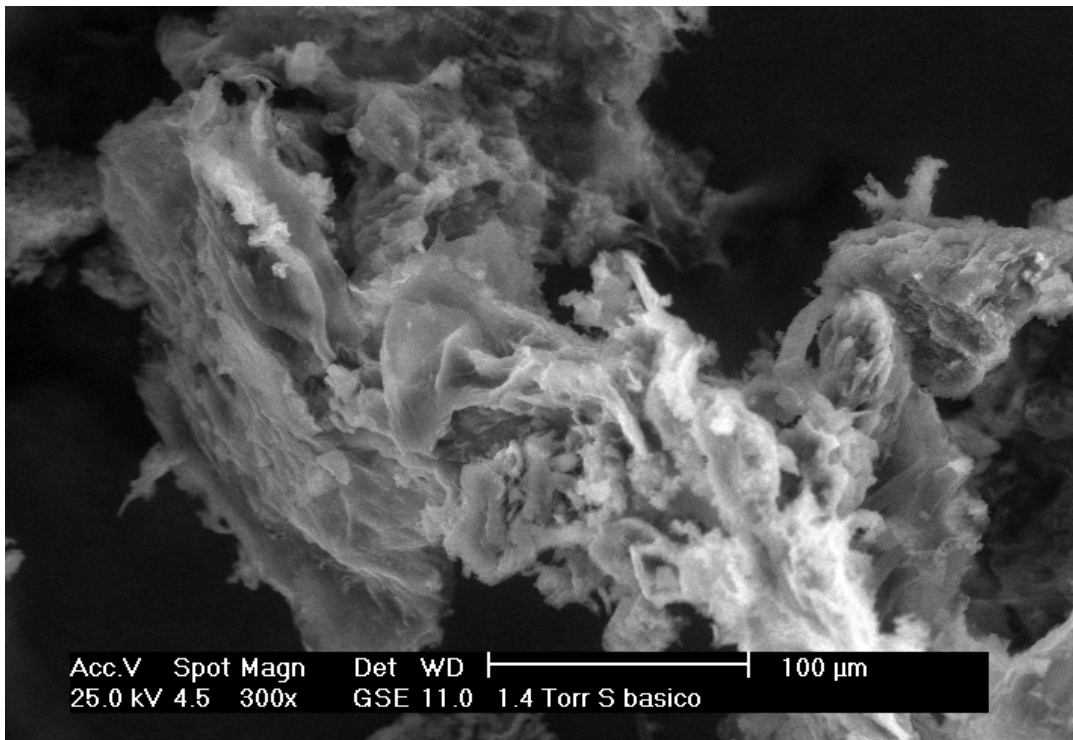
Se puede observar mejor la disminución del GP de cada jarabe antes y después de la sacarificación, sobre todo la del pre-tratamiento ácido, ya que transformó la mayoría de los polisacáridos en azúcares simples. Para los jarabes de los pre-tratamientos básico y básico/oxidante fue prácticamente el mismo GP, muy cercano al valor del ácido.



**Figura 17.** Grado de Polimerización de los jarabes obtenidos en los pre-tratamientos y sacarificación.

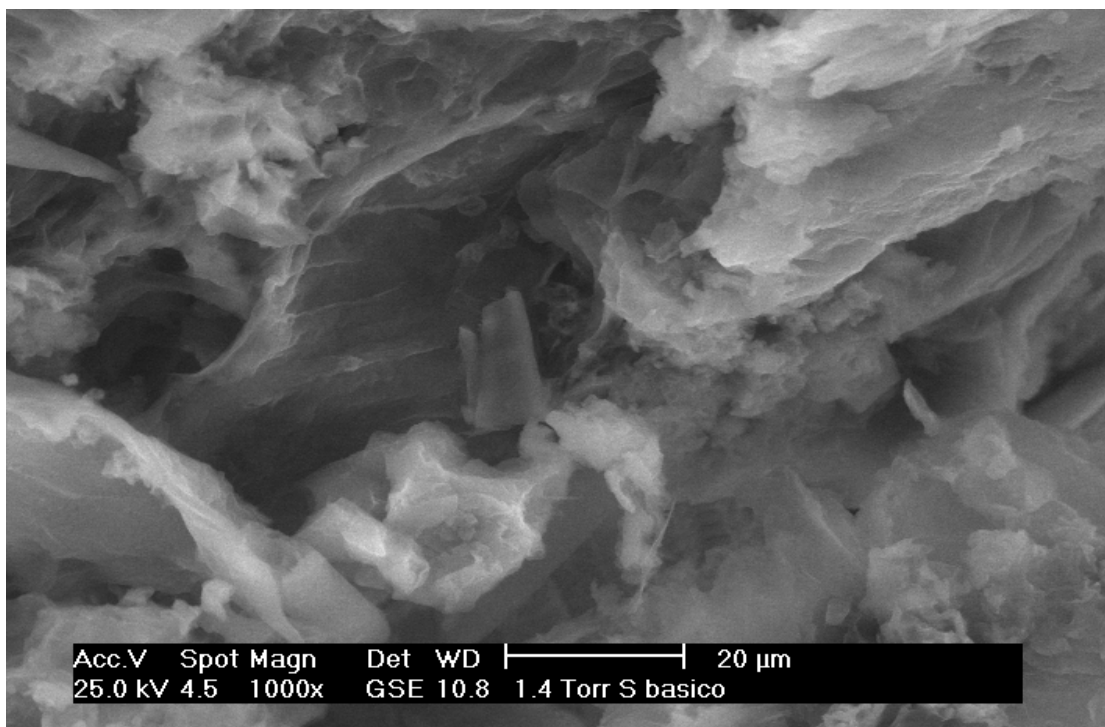
A los sólidos que resultaron de la sacarificación de los pre-tratamientos básico y básico/oxidante, también se les hizo un análisis por ASEM para observar el deterioro que sufrió el material lignocelulósico (Figuras 18 a 21). En la figura 18 se

observa el material degradado, poco definido, rugoso y con algunos surcos. En la figura 19 solo es un acercamiento de 1000x donde se observa que las fibras están desgastadas y se aprecian mejor los surcos. En cuanto al sólido sacarificado del pre-tratamiento básico/oxidante, es notoria la degradación porque se aprecian las fibras muy desgastadas, la estructura es poco definida, se notan surcos; esto nos indica que la sacarificación de este pre-tratamiento logró una mejor penetración en las paredes del material lignocelulósico, por lo que la deslignificación puede ser mayor (Figura 20 y 21).

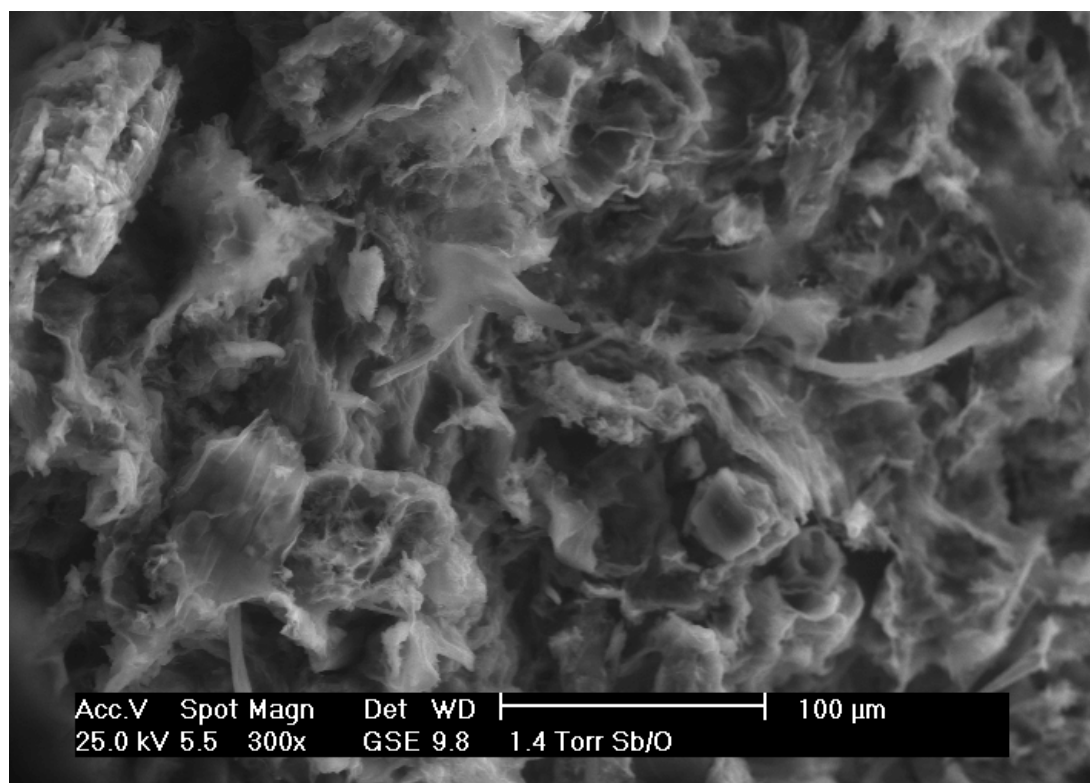


**Figura 18.** Foto de ASEM del sólido resultante de la sacarificación del pre-tratamiento básico. Aumento 300X.

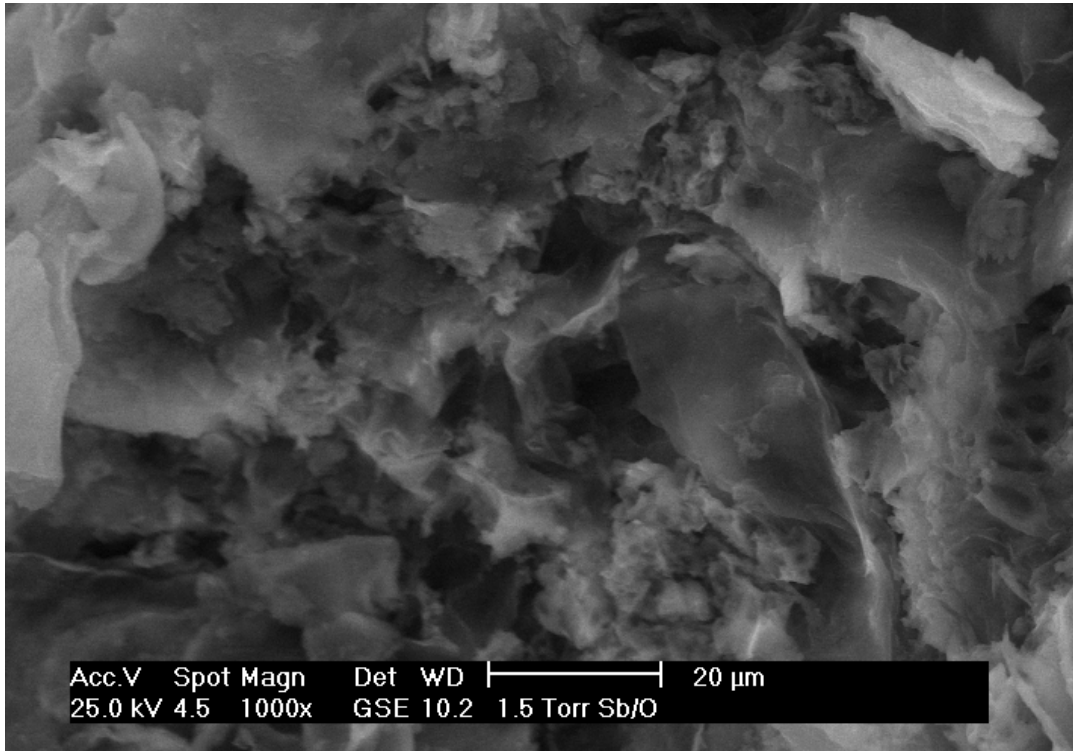




**Figura 19.** Foto de ASEM del sólido resultante de la sacarificación del pre-tratamiento básico. Aumento 1000X.

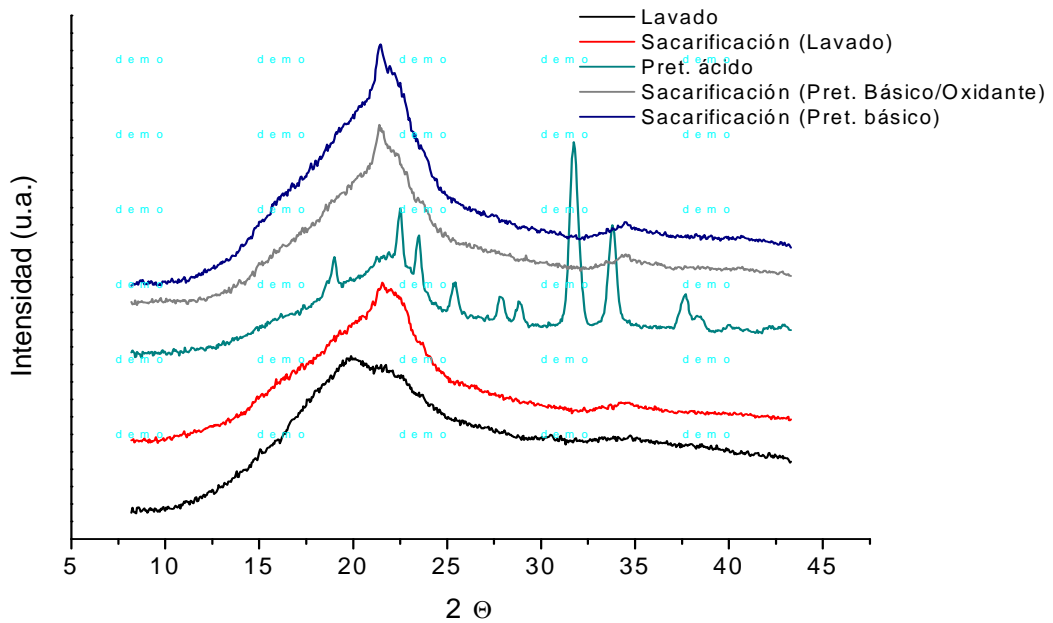


**Figura 20.** Foto de ASEM del sólido resultante de la sacarificación del pre-tratamiento básico/oxidante. Aumento 300X.



**Figura 21.** Foto de ASEM del sólido resultante de la sacarificación del pre-tratamiento básico/oxidante. Aumento 1000X.

El índice de cristalinidad (IC) de la celulosa se suele utilizar como parámetro para valorar o interpretar las estructuras celulósicas de la biomasa vegetal, después de ser sometida a tratamientos químicos, biológicos o enzimáticos. Así, se evaluaron los índices de cristalinidad de los sólidos mediante los patrones de difracción de rayos x (DRX). De esta manera, se puede evaluar el cambio que hay entre la cristalinidad/amorfa de la estructura celulósica de la malta de cerveza. En la Figura 22, se observa la celulosa de la malta de cerveza inicial (negro) y como se modifica con el pret-tratamiento ácido (azul claro) y con la sacarificación del pre-tratamiento básico-oxidante (gris) y la sacarificación del pre-tratamiento básico (azul oscuro). La Figura 22 solo es una gráfica cualitativa.

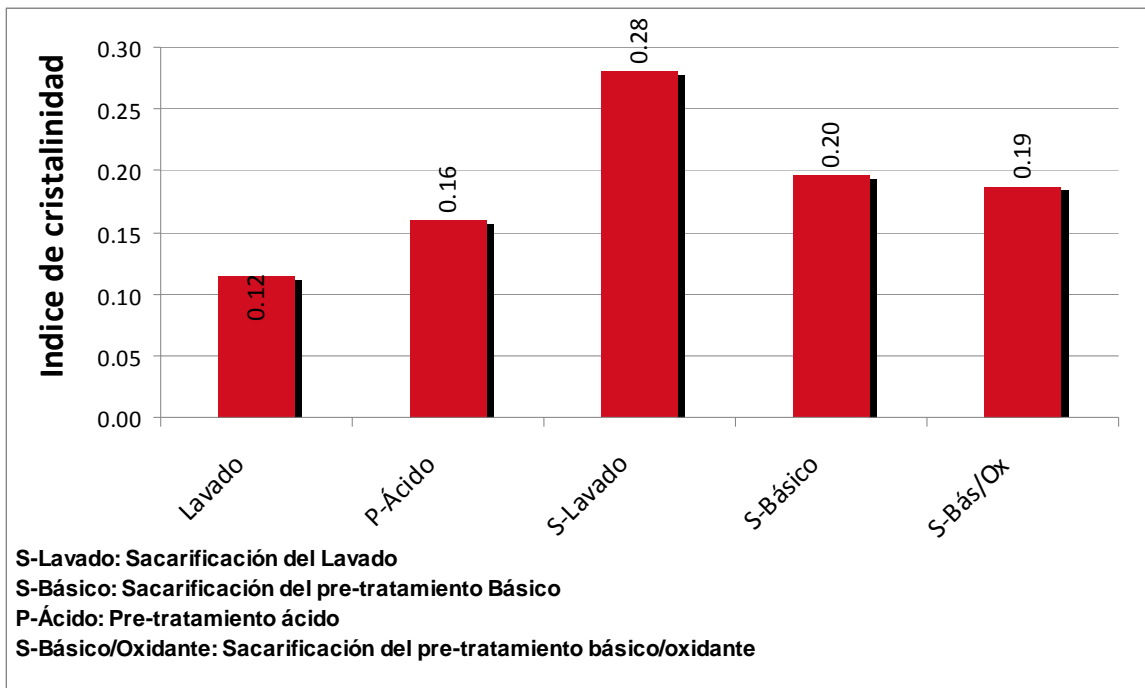


**Figura 22.** Patrones de dispersión de rayos X de la malta de cerveza.

Con esta información, se puede determinar el valor de  $I_c$  utilizando la ecuación (1), donde  $I_{\min}$  es la mínima intensidad a  $2\theta$  entre  $18$  y  $19^\circ$  (que es la región amorfa de la celulosa nativa) e  $I_{\max}$  es la intensidad máxima a  $2\theta$  entre  $22$  y  $23^\circ$  (que es la región cristalina de la muestra) (Ludmila *et al*, 2005).

$$I_c = 1 - (I_{\min}/I_{\max}) \quad (1)$$

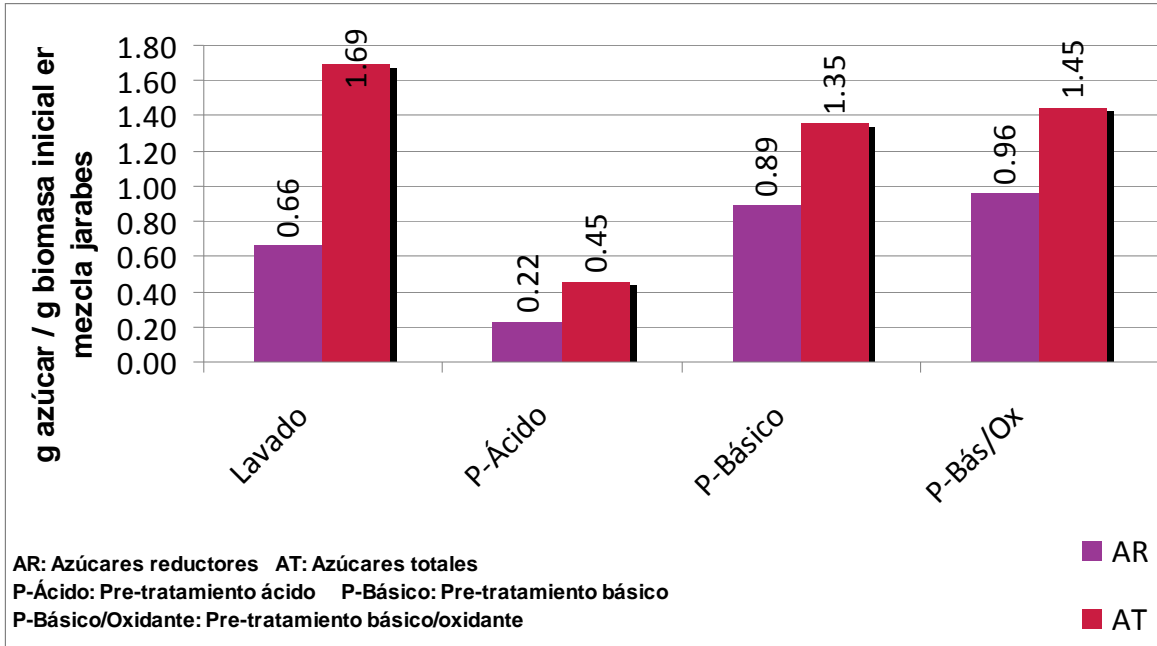
Al ser comparados los valores de  $I_c$  de los sólidos que fueron sometidos al pre-tratamiento y sacarificación, se aprecia que el valor de  $I_c$  es menor en el caso del sólido lavado, por lo tanto la estructura es amorfa antes de que se sometiera a alguno de los pre-tratamientos. El  $I_c$  aumenta después del pre-tratamiento ácido y sacarificación de todos los sólidos pretratados. El ligero aumento del valor del  $I_c$  después del pre-tratamiento ácido y sacarificación ácida de los sólidos pretratados se atribuye a la presencia de una mayor zona cristalina en el material y a que la zona amorfa debe ser más susceptible a la hidrólisis ácida (Figura 23).



**Figura 23.** Valores de Índice de cristalinidad (Ic) de los sólidos sujetos a pre-tratamiento y sacarificación. P: pre-tratamiento; S: sacarificación.

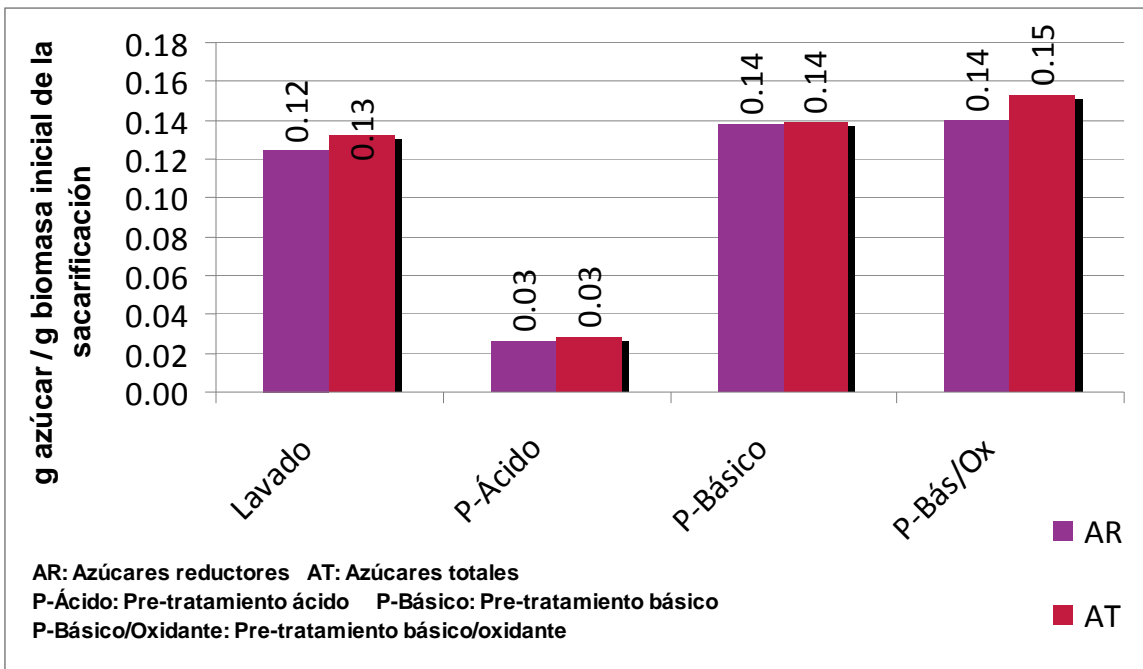
#### 5.4. FERMENTACIÓN

Como ya se había mencionado en la metodología descriptiva, se realizó un mezclado de los distintos jarabes para que el contenido de azúcares reductores y totales fuera similar y pudieran ser comparados. Se realizó solo una vez cada una de las pruebas para la determinación de AR y AT pero se realizaron distintos factores de dilución que comprobaron el contenido de AR y AT en las muestras analizadas (ver Anexo F). En la Figura 24, se muestran los resultados de los azúcares antes de la fermentación en unidades de g de azúcar/g de biomasa inicial. Podemos ver que el incremento de azúcares reductores sigue el orden P-Bás/Ox>P-Básico>Lavado>P-Ácido, por lo que los primeros pre-tratamientos permiten aumentar la generación de azúcares solubles, incluso más que el ácido diluido.



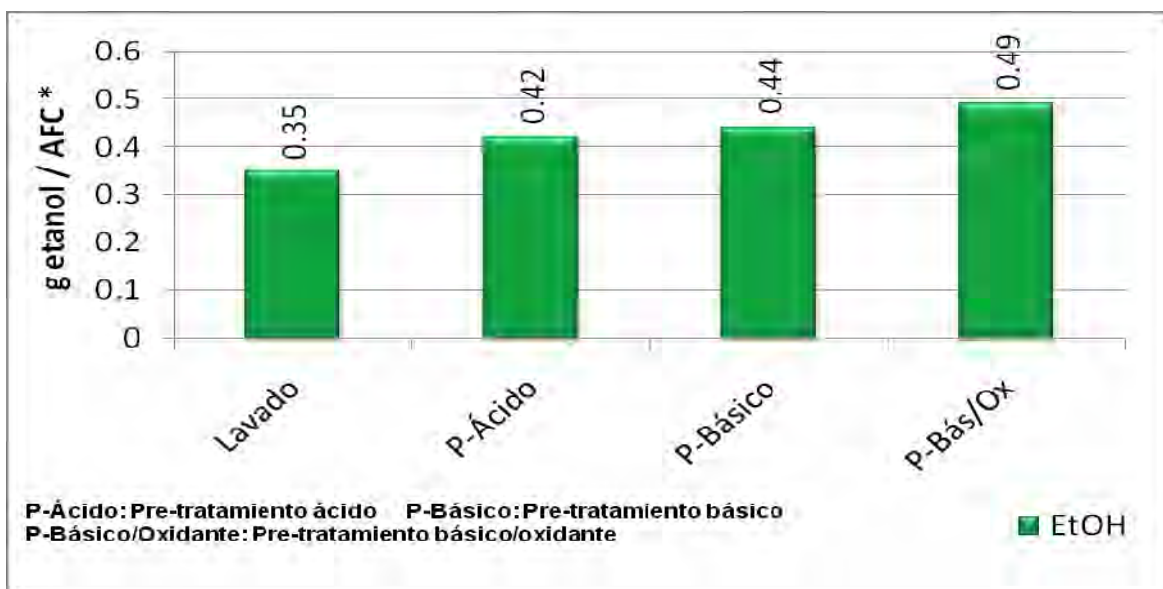
**Figura 24.** Contenido de AR y AT presentes (g azúcar/g biomasa inicial) en la mezcla de jarabes (pre-tratamiento-sacarificación-lavado) antes de la fermentación.

Después de la fermentación, nuevamente se determinaron AR y AT a la mezcla de jarabes para evaluar los azúcares fermentables que fueron consumidos por la levadura. En la Figura 25 se observa el descenso en la cantidad de AR y AT, tanto el pre-tratamiento básico/oxidante y básico como el lavado muestran una gran reducción en la cantidad de ambos azúcares. El pre-tratamiento ácido desde antes de la fermentación ya mostraba una baja cantidad. El contenido de AR y AT después de la fermentación es muy parecido por lo que el GP es prácticamente uno. Esto significa que los azúcares residuales pueden ser pentosas no metabolizadas por la levadura utilizada. Se observa también que el contenido de AT se reduce después de la fermentación, y que puede deberse a que el proceso de esterilización ayuda a hidrolizar los oligosacáridos presentes y por lo tanto hay una mayor cantidad de azúcares para la fermentación o bien la levadura los puede metabolizar. Se realizó solo una vez cada una de las pruebas para la determinación de AR y AT pero se realizaron distintos factores de dilución que confirmaron la concentración de azúcares.



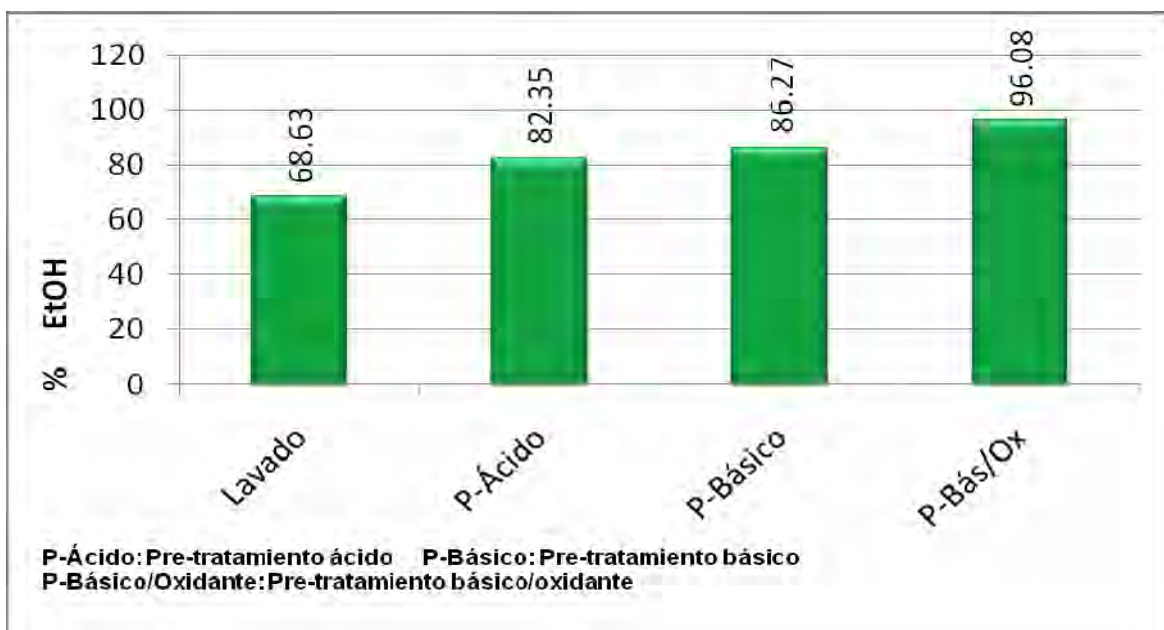
**Figura 25.** Contenido de azúcares residuales presentes en la mezcla de jarabes (pre-tratamiento-sacarificación-lavado) después de la fermentación.

Posteriormente, se determinó el contenido de etanol que produjo *S. cerevisiae* mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama (Figura 26). La levadura permitió la generación de etanol a partir de la fermentación de los azúcares que fueron generados en los distintos procesos que se llevaron a cabo.

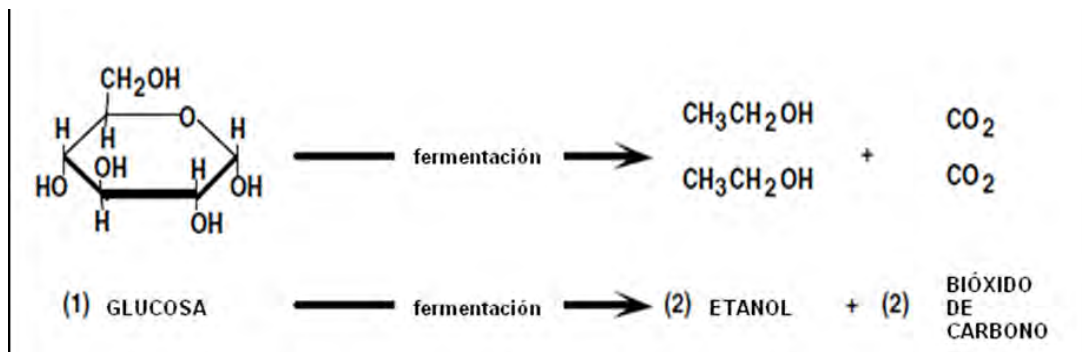


**Figura 26.** Producción de etanol a partir de azúcares fermentables consumibles (AFC)\* generados para cada proceso (pre-tratamiento-sacarificación-fermentación).

El orden de rendimiento de producción de etanol quedaría de la siguiente manera: P-básico/oxidante>P-básico>P-ácido>Lavado (Figura 27). Aunque el pre-tratamiento ácido diluido haya generado la mayor cantidad de azúcares solo se obtuvo el 82.35% de rendimiento. Para poder realizar esta determinación se tomó en cuenta los azúcares que se generaron en los procesos de pre-tratamiento-sacarificación y también el rendimiento teórico de etanol a partir de glucosa. El rendimiento se toma en cuenta que una molécula de glucosa produce 2 moléculas de etanol y 2 de dióxido de carbono, entonces el rendimiento máximo teórico es de 0.51g EtOH/g glucosa (Figura 28; Murphy, 2005). De acuerdo con algunos autores, *S. cerevisiae* produce 8.9 g/L de etanol después de 48 horas de fermentación (White, 2008). Con los resultados mostrados en la Figura 26, tomando como referencia el pre-tratamiento básico/oxidante, en 48 horas se obtendrían 7.84 g/L de etanol, lo que nos lleva a un 88.10% de rendimiento. Esto nos indica que se obtienen óptimos rendimientos de etanol con malta de cerveza, usando este pre-tratamiento.



**Figura 27.** Rendimiento de EtOH para cada proceso (pre-tratamiento-sacarificación-fermentación).



**Figura 28.** Estequiometría de la fermentación de glucosa a etanol (Prácticas de Química Orgánica III, 2010).

En los sólidos de la sacarificación de los pre-tratamientos básico y básico/oxidante se encontró que contenían 0.71g/L y 1.30g/L de HMF. El HMF provoca que el crecimiento de la levadura se retrase (Larsson *et al.*, 1998), ocasionando que la producción de etanol disminuya hasta un 90%. A pesar de la presencia de HMF en estas muestras, no influyó en los rendimientos porque se utilizó carbón activado para eliminarlo. En los otros jarabes no fue posible hacer esta determinación porque no había suficiente muestra. Estudios reportan que con concentración alrededor de 0.5-0.2 g/L de furfural se puede reducir hasta en un 89% la eficiencia de la fermentación de *S. cerevisiae* (Delgenes *et al.*, 1996). Otros estudios reportan que para una concentración de 3.7 g/L del HMF produce una inhibición inferior al 50%, tanto en la producción de etanol como de biomasa, necesiándose una concentración superior a 7 g/L para inhibir totalmente la fermentación (Oliva, 2003). Debido a que se usó carbón activado antes de la fermentación, la remoción de furfural fue efectiva y no afectó el proceso y a pesar de que hubo producción de HMF, este no interfirió en esta etapa.



## 6. CONCLUSIONES

- La utilización de 3 distintos pre-tratamientos en los residuos de malta de cerveza, permitió la producción de azúcares reductores en la etapa de sacarificación que servirían posteriormente para obtener etanol.
- La obtención de azúcares reductores se observó mejor en el pre-tratamiento ácido, del cual se obtuvieron 0.4335 g azúcar/g biomasa inicial y el lavado, del cual se obtuvieron 0.1567 g azúcar/g biomasa inicial.
- La sacarificación ácida que fue aplicada a la mezcla de jarabes fue eficiente, lo que indica que la mayoría de polisacáridos fueron transformados a azúcares simples.
- Los rendimientos de la sacarificación y de la fermentación fueron mejores en los pre-tratamientos básico/oxidante y básico, por lo tanto son eficaces para la obtención de bioetanol.
- Se detectó la presencia de derivados de furfural (Furfural y HMF) que fueron eliminados mediante carbón activado, por lo que la inhibición de la levadura por éstos metabolitos no afectó el proceso de obtención de etanol.
- Los residuos de malta de cerveza pueden ser un material lignocelulósico útil para la producción de etanol ya que tienen una gran cantidad de azúcares fermentables.

## 7. ANEXOS

### 7.1. ANEXO A

#### Curvas de calibración

FENOL/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Concentración Glucosa (µg/mL)	Absorbancia 490 nm
10	0.086
20	0.167
30	0.253
40	0.352
50	0.447
60	0.572
70	0.711
80	0.825
90	0.959
100	1.081

Figura 7.1.1. Curva de calibración de Fenol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

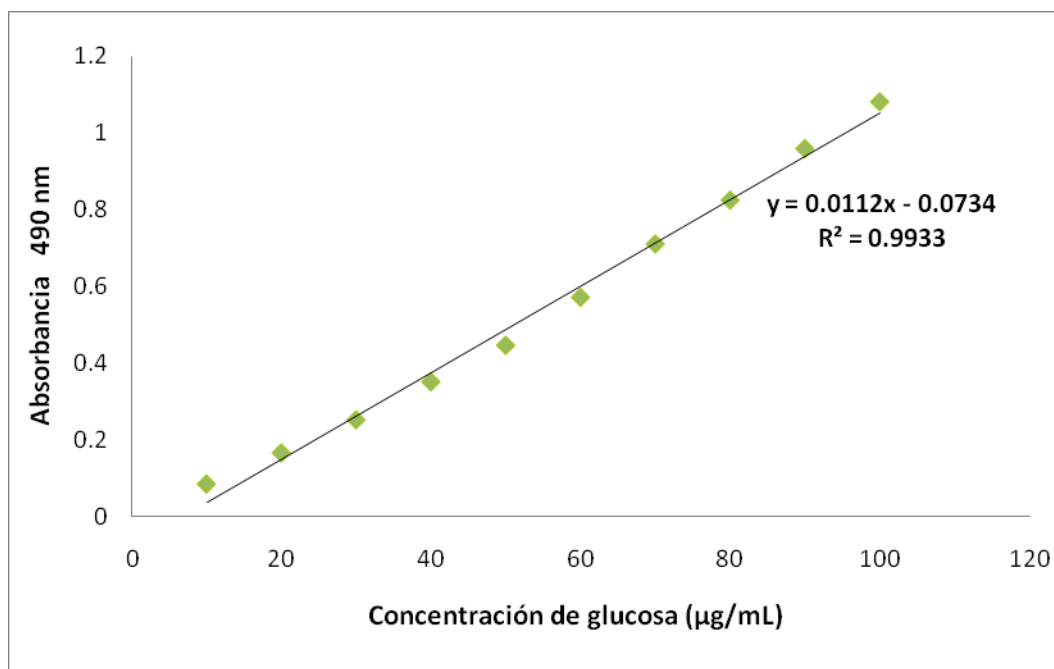


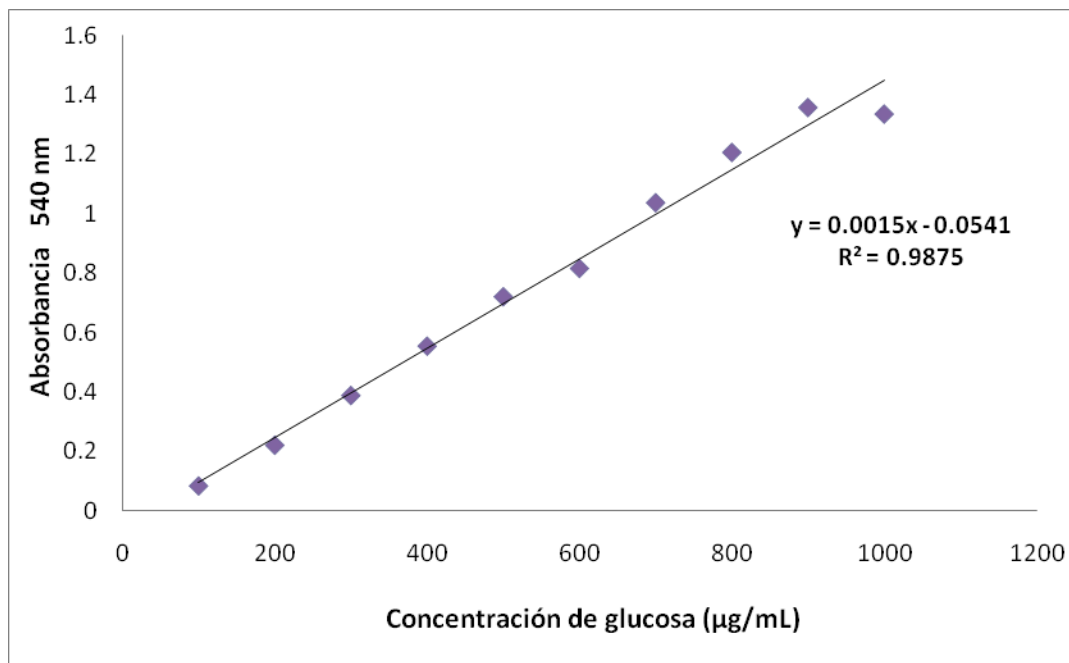
Figura 7.1.2. Curva de calibración para la determinación de azúcares totales.

## 7.2. ANEXO B

### MÉTODO DE DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)

Concentración Glucosa (µg/mL)	Absorbancia 540 nm
100	0.086
200	0.223
300	0.39
400	0.556
500	0.722
600	0.817
700	1.038
800	1.207
900	1.358
1000	1.336

**Figura 7.2.1.** Primera curva de calibración para azúcares reductores mediante el método de DNS.



**Figura 7.2.2.** Primera curva de calibración para la determinación de azúcares reductores.

Los resultados de la segunda curva de calibración se presentan a continuación:

Concentración Glucosa (µg/mL)	Absorbancia 540 nm
100	0.104
200	0.227
300	0.377
400	0.495
500	0.62
600	0.75
700	0.881
800	1.039
900	1.214
1000	1.321

Figura 7.2.3. Segunda curva de calibración de DNS.

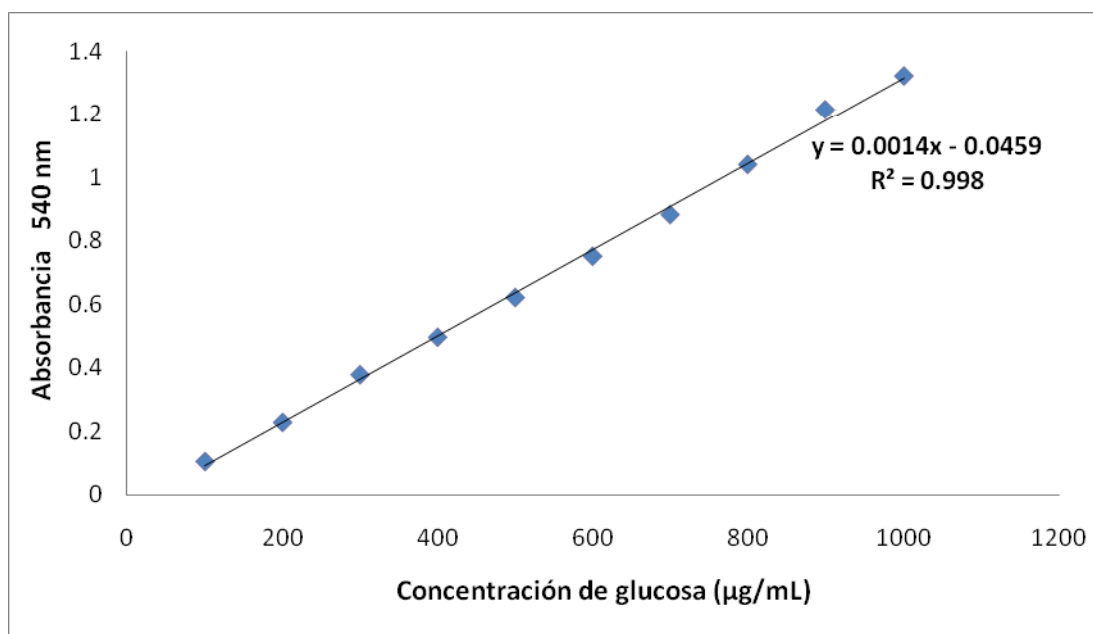


Figura 7.2.4. Segunda curva de calibración para la determinación de azúcares reductores.

### 7.3. ANEXO C

FURFURAL  
0.04%  
Vol. Total 1mL

%Furfural ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Área
0.002	2702.4
0.004	5501.8
0.006	8187.1
0.008	11154.4
0.01	13835.1
0.02	27922
0.03	37916.6
0.04	45507.4

Figura 7.3.1. Curva de calibración Furfural.

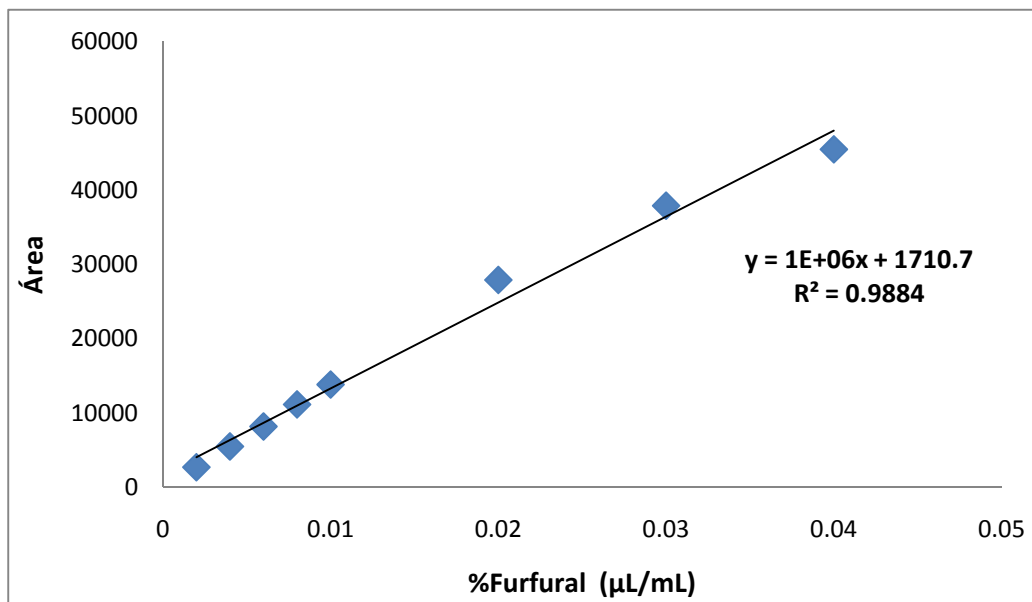


Figura 7.3.2. Curva de calibración de furfural mediante HPLC.

## 7.4. ANEXO D

HIDROXIMETILFURFURAL

0.04%

Vol. Total 1 mL

%HMF ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Área
0.002	2163.1
0.004	4128.1
0.006	6453.5
0.008	8263.4
0.01	10701.3
0.02	21076.7
0.03	30923.5
0.04	38937.8

Figura 7.4.1. Curva de calibración HMF.

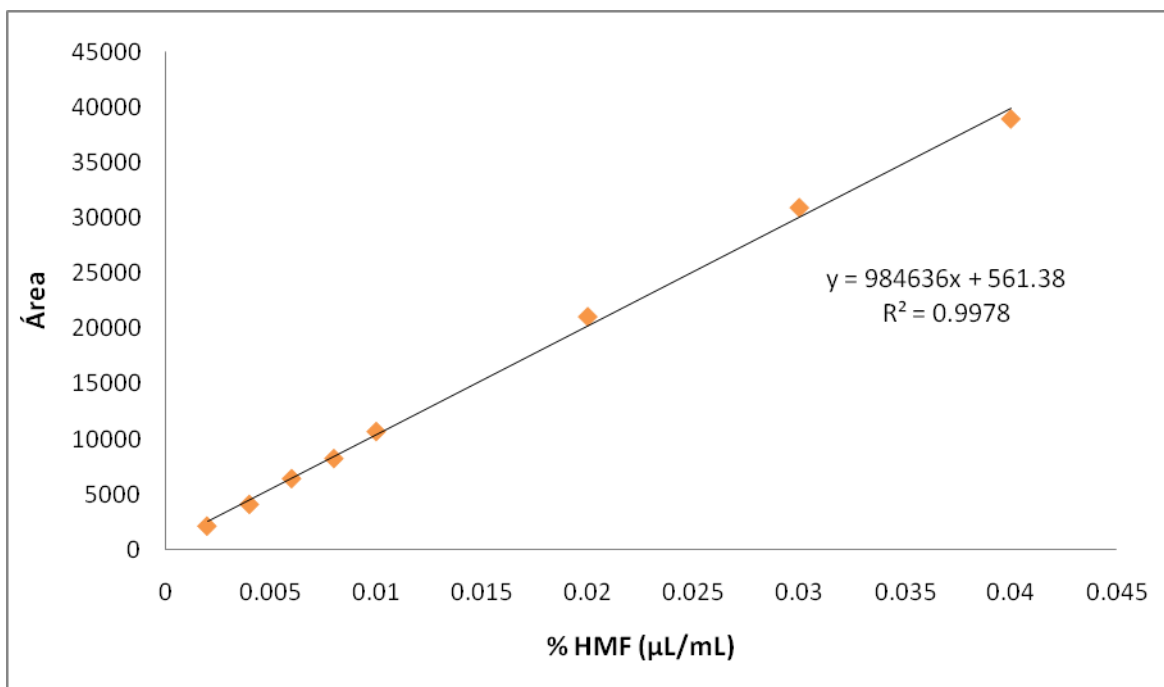


Figura 7.4.2. Curva de calibración de HMF mediante HPLC.

## 7.5. ANEXO E

ETANOL 0.1-1%  
Vol. Total 1mL

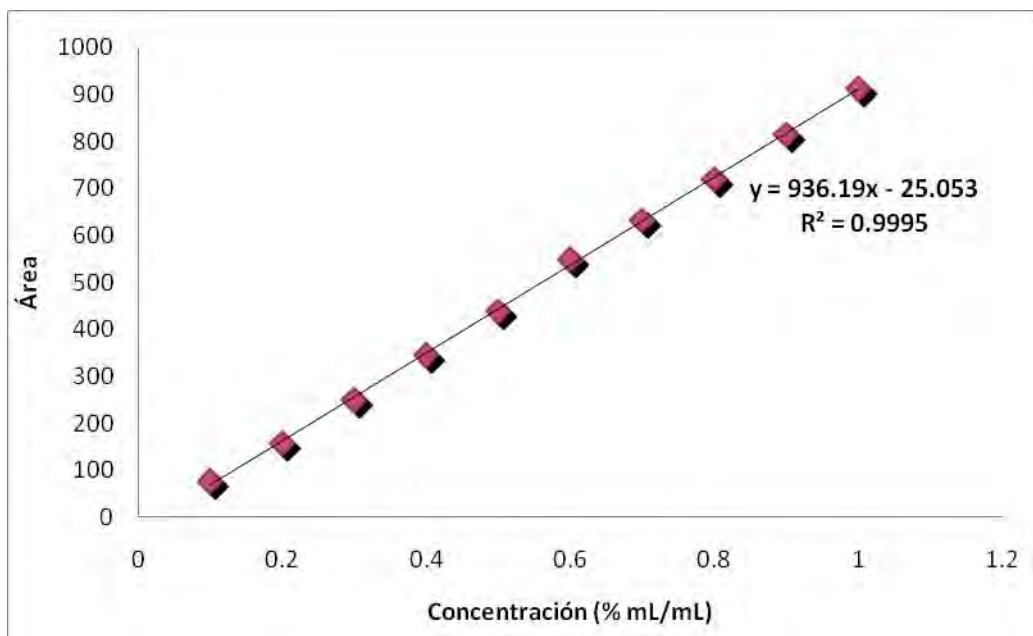
[EtOH] % (v/v)	mL EtOH	mL agua
0.1	0.1	0.9
0.2	0.2	0.8
0.3	0.3	0.7
0.4	0.4	0.6
0.5	0.5	0.5
0.6	0.6	0.4
0.7	0.7	0.3
0.8	0.8	0.2
0.9	0.9	0.1
1	1	0

**Figura 7.5.1.** Curva de calibración de EtOH

Se colocó en un frasco vial de 1mL de capacidad cada una de estas muestras, a continuación los resultados:

Concentración (% v/v)	Área
0.1	76.8
0.2	158.1
0.3	249.9
0.4	345.4
0.5	438.5
0.6	548.8
0.7	633
0.8	720
0.9	815.3
1	912.7

**Figura 7.5.2.** Resultados de las áreas de la curva de calibración de EtOH 0.1-1-%



**Figura 7.5.3.** Curva de calibración de etanol mediante cromatografía de gases y detector de ionización de flama.

## 7.6. ANEXO F

### FERMENTACIÓN

En los cuadros a continuación, se muestran los resultados calculados para efectuar las mezclas de jarabes para cada línea de procesamiento de la biomasa, lavado, pretratamiento y sacarificación. Esto se realizó con el propósito de normalizar, en la medida de lo posible, la misma cantidad de AR y AT en los jarabes y que pudieran ser comparables.



<b>Lavado</b>						
	<b>Volumen total del jarabe (L)</b>	<b>Volumen de muestra tomado (L)</b>	<b>AR en la muestra(g)</b>	<b>AT en la muestra (g)</b>	<b>AR en el volumen total de muestra (g/L)</b>	<b>AT en el volumen total de muestra (g/L)</b>
Lavado	0.101	0.0115	0.2107	0.7135	4.2136	14.2692
Pretratamiento						
Sacarificación	0.045	0.0385	0.0662	0.0942	1.3238	1.8849
<b>Totales</b>		<b>0.050</b>	<b>5.5374</b>	<b>16.154</b>		

<b>Ácido</b>						
	<b>Volumen total del jarabe (L)</b>	<b>Volumen de muestra tomado (L)</b>	<b>AR en la muestra (g)</b>	<b>AT en la muestra (g)</b>	<b>AR en el volumen total de muestra (g/L)</b>	<b>AT en el volumen total de muestra (g/L)</b>
Lavado	0.101	0.015	0.2748	0.9306	5.4960	18.6120
Pretratamiento	0.43	0.035	0.0607	0.0669	1.2148	1.3382
Sacarificación						
<b>Totales</b>		<b>0.050</b>	<b>6.7108</b>	<b>19.950</b>		

<b>Básico</b>						
	<b>Volumen total del jarabe (L)</b>	<b>Volumen de muestra tomado (L)</b>	<b>AR en la muestra (g)</b>	<b>AT en la muestra (g)</b>	<b>AR en el volumen total de muestra(g/L)</b>	<b>AT en el volumen total de muestra (g/L)</b>
Lavado	0.101	0.015	0.2748	0.9306	5.4960	18.6120
Pretatamiento	0.007	0.007	0.0099	0.0455	0.1988	0.9103
Sacarificación	0.078	0.025	0.0356	0.0440	0.7128	0.8800
<b>Totales</b>		<b>0.047</b>	<b>6.4077</b>	<b>20.402</b>		

Básico/oxidante 15% w/v						
	Volumen total del jarabe (L)	Volumen de muestra tomado(L)	AR en la muestra (g)	AT en la muestra (g)	AR en el volumen total de muestra (g/L)	AT en el volumen total de muestra (g/L)
Lavado	0.101	0.015	0.2748	0.9306	5.4960	18.6120
Pretratamiento	0.063	0.015	0.0389	0.1485	0.7788	2.9700
Sacarificación	0.106	0.02	0.0337	0.0416	0.6747	0.8325
Totales		<b>0.05</b>	<b>6.9495</b>	<b>22.4145</b>		

**Figura 7.14.** Resultados de las mezclas de jarabes para cada pre-tratamiento.

## 7.7. ANEXO G

A continuación se presenta un ejemplo de los cálculos realizados para la determinación de los AR y AT (g azúcar/g biomasa inicial) para cada una de las etapas de lavado, pre-tratamiento, sacarificación y fermentación, así como para la determinación de la concentración de etanol producido (g etanol/AFC) y el rendimiento de etanol.

### Lavado

	JARABE						
	Abs	( $\mu\text{g/mL}$ )*	Factor dilución	Volumen total jarabe (mL)	azúcar en jarabe (g)	gr azúcar/gr biomasa inicial	gr azúcar/L
<b>AR</b>	0.217	183.20	100	214	3.9205	0.1567	18.3200
<b>AT</b>	0.265	31.02	100	214	13.2766	0.5307	62.0400
			20				

**Figura 7.7.1.** Tabla de resultados del jarabe de lavado. (\*) Concentración de la curva patrón.

Donde la biomasa inicial es de 25.0148g

Azúcar en jarabe (g)=  $(183.20\mu\text{g}/\text{mL}/1000000\text{g}/\mu\text{g})= (1.832\times 10^{-4}\text{g}/\text{mL})\times 100=$   
 $(0.01832\text{g}/\text{mL}) \times 214\text{mL}= \underline{3.9205 \text{ g}}$

g azúcar/g biomasa inicial=  $3.9205\text{g}/25.0148\text{g}= \underline{0.1567}$

g azúcar/L=  $3.9205\text{g}/0.214\text{L}= \underline{18.32}$

### **Sacarificación del sólido lavado**

	JARABE		Biomasa inicial	0.5004 g			
	Abs	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )*	Factor dilución	Volumen jarabe (mL)	azúcar en jarabe (gr)	gr azúcar/gr biomasa inicial	gr azúcar/L
<b>AR</b>	0.127	128.98	13.33	122	0.2097	0.4192	1.7192
<b>AT</b>	0.612	61.20	40	122	0.2986	0.5968	2.4479

**Figura 7.7.2.** Tabla de resultados del jarabe de sacarificación de lavado. (\*) Concentración de la curva patrón.

Azúcar en jarabe (g)=  $(128.98\mu\text{g}/\text{mL}/1000000\text{g}/\mu\text{g})= (1.2898\times 10^{-4}\text{g}/\text{mL})\times 13.33=$   
 $(1.7193\times 10^{-3}\text{g}/\text{mL}) \times 122\text{mL}= \underline{0.2097\text{g}}$

g azúcar/g biomasa inicial=  $0.2097\text{g}/0.5004\text{g}= \underline{0.4192}$

g azúcar/L=  $0.2097\text{g}/0.122\text{L}= \underline{1.7192}$

### **Contenido de AR y AT en la mezcla de jarabe antes de la fermentación**

	JARABE						
	Abs	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )*	Factor dilución	Volumen jarabe (mL)	azúcar en jarabe (gr)	gr azúcar/gr biomasa inicial	gr azúcar/L
<b>AR</b>	0.396	329.67	20	50	0.3297	0.6588	6.5935
<b>AT</b>	0.876	84.77	5	50	0.8477	1.6940	16.9536
			40				

**Figura 7.7.3.** Tabla de resultados del jarabe antes de fermentación. (\*) Concentración de la curva patrón.

Donde la biomasa inicial empleada es de 0.5004g, que es de la sacarificación.

$$\text{Azúcar en jarabe (g)} = (329.67 \mu\text{g/mL} / 1000000 \text{g}/\mu\text{g}) = (3.9767 \times 10^{-4} \text{g/mL}) * 20 = 7.9534 \times 10^{-3} \text{g/mL} * 50 \text{ mL} = \underline{0.3297 \text{ g}}$$

$$\text{g azúcar/g biomasa inicial} = 0.3297 \text{g} / 0.5004 \text{g} = \underline{0.6588}$$

$$\text{g azúcar/L} = 0.3297 \text{g} / 0.050 \text{L} = \underline{6.5935}$$

Se realizan los mismos cálculos para después de la fermentación, usando la misma cantidad de biomasa inicial.

***Determinación de etanol en la mezcla de jarabe fermentado***

	Área	[%] (*)	(g/L)
etanol	196.95	0.2371	1.871

**Figura 7.7.5.** Tabla de resultados de producción de etanol en la mezcla total de jarabes.

(\*) Concentración de la curva patrón.

$$\text{g/L de etanol en muestra} = (0.2371 \text{ mL}/100\text{mL}) * (1000 \text{ mL/L}) = 2.371 \text{ mL/L} * (0.789 \text{ g/mL}) = \underline{1.871 \text{g/L}}$$

Donde 0.789 g/L es la densidad del etanol.

$$\text{g etanol/g biomasa} = 1.871 \text{g/L} * 0.05 \text{L} = 0.09355 \text{g} / (0.362 \text{g}) = \underline{0.2584}$$

Donde 0.05 L corresponde al volumen de jarabe fermentado y 0.362 g corresponde al peso del inóculo de la biomasa húmeda (levadura) que se utilizó para iniciar la fermentación,

$$\text{g etanol/g AFC} = 1.871 \text{g/L} * 0.05 \text{ L} = 0.09355 \text{ g} / 0.2674 \text{g} = 0.3499,$$

donde AFC son los azúcares fermentables consumidos (0.2674 g) durante la fermentación.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ALMEIDA R.M., João, BERTILSSON, Mangus, *et al.*, Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes, Applied Microbiology Biotechnology, 2009. pp. 625-638.
- ARAQUE, Edgardo, PARRA, Carolina, FREER, Juanita, *et al.*, Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol, Enzyme and Microbial Technology, 2007. pp. 214-219.
- ARGENBIO *POR QUÉ BIOTECNOLOGÍA*, en línea, internet 4 de julio del 2010, disponible en [http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/img\\_c97/imag02.jpg](http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/img_c97/imag02.jpg)
- BIOTECHNOLOGY POR BIOFUELS, Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulose performance, en línea, internet 10 de julio del 2010, disponible en <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/pdf/1754-6834-3-10.pdf>
- CAMACHO DE LA ROSA, Norma Angélica, DÍAZ GUTIERRÉZ, Karla Mercedes, *et al.*, Productos de Cereales y Leguminosas. Manual de prácticas, 4ta. edición, Editora O.C. Velázquez Madrazo, 2007. pp. 187-190.
- CAMPS, M. y M.F., Marcos, Los biocombustibles, 2da. edición, Editorial Mundi Prensa, Madrid, España. pp.124-145.
- CERVEZA DE ARGENTINA, artículos, en línea, internet 4 de julio de 2010, disponible en <http://www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/imagenes/grano2.jpg>

- DICCIONARIO ACADÉMICO, en línea, internet 4 de julio de 2010, disponible en [http://www.esacademic.com/pictures/eswiki/67/Cellulose\\_strand.jpg](http://www.esacademic.com/pictures/eswiki/67/Cellulose_strand.jpg)
- DELGENES, J. P., MOLETTA R., NAVARRO, J. M., Effects of lignocelluloses degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis, Pichia stipitis and Candida shehatae, Enz Microb Technol. pp. 220-225.
- DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Analytical Chemistry. pp. 350-356.
- FAO, ADRS, en línea, internet 27 de junio del 2010, disponible en <ftp://ftp.fao.org/SD/SDA/SDAR/sard/SARD-bioenergy%20-%20spanish.pdf>
- FAO, Biocombustibles y agricultura: panorama técnico, en línea, internet 26 de junio del 2010, disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100s/i0100s02.pdf>
- FAO, Biocombustibles: Perspectiva, riesgos y oportunidades, en línea, internet 27 de junio del 2010, disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100s/i0100s02.pdf>
- FAO, Oferta y demanda de energía, en línea, internet 27 de junio del 2010, disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0139s/i0139s03.pdf>
- FAN, L.T., LEE, Y.H. and GHARPURAY, M.M., The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis, Adv. Biochem. Eng, 1987.
- HORNSEY, Ian S., Elaboración de cerveza. Microbiología, bioquímica y tecnología, Ed. Acribia, S. A., Zaragoza, España, 2005. pp. 22-30
- HOUGH, J. S., Bioteología de la cerveza y de la malta, Ed. Acribia, S. A., Zaragoza, España, 1990. pp. 29-38.

- LARSSON S., PALMQVIST E., HAHN-HÄGERDAL B., *et al.*, The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of sotwood, *Enzyme and Microbial Technology*. pp. 151-159.
- LI, Mei, YANG, Zhaoxia, YANG, Mei, *et al.*, Determination of Furfural in Beer by High-Performance Liquid Chromatography with Solid-Phase Extraction, *Journal of the Institute of Brewing*, 2009. (El método presentado en este trabajo se adaptó a partir del presentado por los autores antes mencionados). pp. 226-230.
- MARTÍNEZ CISNEROS, Tabata Jahel, TESIS: Evaluación técnica-económica de la producción biotecnológica a partir de bagazo de caña de azúcar mediante la utilización del software Superpro Designer, 2009.
- MEDRANO BUENROSTRO, Brenda Yazmín, TESIS: Evaluación de la producción de etanol a partir de salvado de trigo. Efecto de diferentes pre-tratamientos químicos, 2009. pp. 24, 31.
- MILLER N., Elliot, JARBOE R., Laura, TURNER C., Peter, *et al.*, Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180<sup>+</sup>, *Applied and Environmental Microbiology*, 2009. pp. 6132-6141.
- MURPHY, J., McCARTHY K., Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland, *Applied Energy*. pp. 148-166.
- MUSSATTO, I. Solange, ROBERTO, C. Inês, Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2006. pp.268-273.
- MUSSATO I., Solagne, DRAGONE, Giuliano, FERNANDES, Marcela, *et al.*, Efecto de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de malta para la liberación de fibras de celulosa, en línea, internet 4 de julio del 2010, disponible en <http://biblioteca.idictvillaclara.cu/UserFiles/adhesivos%20para%20tableros%20de%20madera/21.pdf>

- NIELSEN, S., Food Analysis, ed. 2da., Ed. Springer Science+Business Media Inc., New York, 2003. pp. 143-174.
- OLIVA DOMÍNGUEZ, José Miguel, Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*, en línea, internet 23 de agosto del 2010, disponible en <http://eprints.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26833.pdf>
- PRÁCTICAS DE QUÍMICA ORGÁNICA III, Obtención de furfural, en línea, internet 4 de julio del 2010, disponible en <http://www.organicafesc.netfirms.com/datos/practicas/Cannizzaro.gif>
- Química Orgánica Ambiental, Estructura de lignina, en línea, internet 4 de julio del 2010, disponible en <http://www.ugr.es/~quiorred/goamb/Lignina.gif>
- Sagarpa, Notas Metodológicas, en línea, internet 13 de mayo del 2010, disponible en [http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Agricola/Normatividad/anexo2N](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Agricola/Normatividad/anexo2N)
- SAHA, Badal C., COTTA, Michael A., Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol, Enzyme and Microbial Technology, 2007. pp. 528-532.
- SENER, Programa de Introducción de Bioenergéticos, en línea, internet 5 de julio del 2010, disponible en <http://www.sener.gob.mx/webSener/res/0/Prog%20Introd%20Bioen.pdf>
- SENER, Prospectiva de Petrolíferos 2008-2017, en línea, internet 4 de julio del 2010, disponible en [http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE\\_yDT/pub/Prospectiva%20Pet%202008-2017.pdf](http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE_yDT/pub/Prospectiva%20Pet%202008-2017.pdf)
- SUN, Y. y CHENG, J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, Bioresource Technology, 2002.



- TERAMOTO, Yoshikuni, LEE, Seung-Hwan, ENDO, Takashi, Cost reduction and feedstock diversity for sulfuric acid-free ethanol cooking of lignocellulosic biomass as a pretreatment to enzymatic saccharification, Bioresource Technology, 2009. pp. 4783-4789.
- WHITE S.,Jane, YOHANNAN K., Biju y WALKER M., Graeme, Bioconversion of brewer's spent grain to bioethanol, FEMS, 2008. pp. 1175-1183.