



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**OPTIMIZACIÓN DEL PRETRATAMIENTO ÁCIDO DE RESIDUOS DE
MALTA PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

KARLA LIZBETH VERA TERRAZAS



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARIA DE LOS ANGELES VALDIVIA LOPEZ

VOCAL: JORGE ARTURO ABURTO ANELL

SECRETARIO: SANDRA PAOLA SANCHEZ RODRIGUEZ

1er. SUPLENTE: VERONICA HERNANDEZ BRIONES

2° SUPLENTE: AGUSTIN REYO HERRERA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO

ASESOR

Jorge Arturo Aburto Anell

SUPERVISOR TÉCNICO

Agustín Reyo Herrera

SUSTENTANTE

Karla Lizbeth Vera Terrazas

Lo que con mucho gusto se adquiere mas se ama.

ARISTOTELES

El trabajo del pensamiento se parece a la perforación de un pozo; el agua es turbia al principio más luego se clarifica.

PROVERBIO CHINO

Una persona no vale por sus éxitos, sino de las veces que se ha levantado de sus fracasos.

ANÓNIMO

Agradecimientos

Primero que nada quiero darle gracias a Dios por permitirme llegar a este momento a lado de mi familia, amigos y gente que me quiere; así como darme la paciencia para poder lograrlo.

A mis padres Guillermina Terrazas y Joaquín Vera, gracias por darme su apoyo incondicional en todos los aspectos para cumplir mi más grande sueño, por siempre creer en mí. Sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí.

A mis hermanos Gaby y Joaquín por apoyarme en todo momento, por ser mi ejemplo a seguir de conseguir siempre lo que se han propuesto y nunca darse por vencidos.

A mi sobrino Bruno por llegar a nuestras vidas por que cuando estoy contigo siempre me divierto y eres una personita que siempre nos da alegrías y todo lo malo se olvida.

Para ti Marcelo por ser mi más grande inspiración, apoyarme, quererme y estar siempre conmigo. Gracias por estar en mi vida. A tu familia en especial a tu mamá, tu hermana Sandra y tus sobrinos Marco y Mayte.

A mis tíos Griselda Terrazas y Víctor Paula, a mis primas Sara y Fernanda por estar conmigo y mi familia en todos los momentos importantes de nuestra vida, y siempre recibir su apoyo. Muchas Gracias.

A mi cuñado Roberto Méndez por siempre escucharme cuando lo necesitaba y contar con tu apoyo.

A mis amigas Fernanda Arroyo, Iveth Anais Jaramillo, Ana de Anda, Aliany Alpizar, Miriam Badillo, por pasar cosas increíbles tanto dentro como fuera de la facultad y brindarme siempre su apoyo.

A mi asesor Jorge Aburto, por darme la oportunidad de trabajar con usted, por su tiempo y guía para poder concluir este proyecto.

A los miembros del jurado por revisar mi trabajo y tomarse el tiempo para ello.

A todas y cada una de las personas que en algún momento me preguntaron por mi proyecto, me apoyaron y escucharon.

Al IMP por brindarme las herramientas para realizar este proyecto.

A la UNAM es un orgullo pertenecer a esta institución, y sobre todo a la Facultad de Química por todos los conocimientos adquiridos, no solo académicamente sino personalmente, gracias a todas estas experiencias ser la persona que soy, conocerme y saber que puedo llegar hasta donde yo lo quiera.

**No es fácil llegar se necesita empeño, lucha y deseo
pero sobre todo apoyo como el que he recibido durante este tiempo.
Gracias por lo que hemos logrado.**

ÍNDICE

Resumen	1
CAPÍTULO 1. Antecedentes	2
1.1. Biocombustibles	2
1.2. Bioetanol	3
1.3. Bioetanol en México.....	4
1.4. Bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos.....	5
1.4.1. Composición de materiales lignocelulósicos	5
1.4.2. Pretratamiento del material lignocelulósico.....	8
1.4.3. Hidrólisis	13
1.4.4. Fermentación.....	14
1.5. Procesos de conversión de etanol	16
1.6. Cebada.....	17
1.6.1. Proceso de malteado de cebada	21
CAPÍTULO 2. Objetivos e hipótesis	23
CAPÍTULO 3. Metodología	24
3.1. Diseño de experimentos.....	25
3.2. Materia prima	28
3.3. Lavado de la malta de cerveza	28
3.4. Determinación de azúcares totales (Fenol/H ₂ SO ₄)	29
3.5. Determinación de azúcares reductores (DNS).....	30
3.6. Grado de polimerización	31
3.7. Pretratamiento ácido residuos de malta	31
3.8. Determinación del contenido de Furfural y HMF	32
3.9. Hidrólisis enzimática	33
3.9.1. Determinación de unidades FPU de los cocteles enzimáticos.....	33
3.9.2. Hidrólisis del residuo de malta después del pretratamiento ácido	34
3.9.3. Hidrólisis del jarabe obtenido del pretratamiento ácido.....	35

CAPÍTULO 4. Resultados y análisis	36
4.1. Pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza	36
4.1.1. Azúcares totales, reductores y grado de polimerización en el jarabe proveniente del pretratamiento ácido.....	38
4.1.2. Determinación de Furfural y HMF en el jarabe proveniente del pretratamiento ácido	44
4.2. Hidrólisis enzimática	47
4.2.1. Determinación de unidades FPU de los cocteles enzimáticos.....	47
4.3. Sacarificación enzimática del residuo de malta después del pretratamiento ácido	50
4.3.1. Determinación de azúcares totales, reductores y grado de polimerización.....	51
4.4. Hidrólisis enzimática del jarabe obtenido en el pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza	55
4.4.1. Determinación de azúcares totales, reductores y grado de polimerización.....	56
CONCLUSIONES	60
Anexos	63
Bibliografía	88

RESUMEN

El aumento en el precio del petróleo debido a la condición de las reservas mundiales de este recurso está llevando a algunos países a desarrollar programas de producción de combustibles alternos al combustible fósil.

Los biocombustibles se identifican como aquellos obtenidos a partir de biomasa mediante su procesamiento químico o biotecnológico, entre ellos se pueden mencionar biodiesel, bioetanol, biogás y biohidrogeno. México, aunque tiene una ley de bioenergéticos, se ha rezagado en la implementación que considere la utilización de biocombustibles.

El etanol tiene diversas aplicaciones en la industria química, cosméticos, salud, alimentos, actualmente su aplicación más importante se halla en el sector energético como combustible y aditivo para gasolinas. El etanol al ser mezclado con la gasolina reduce las emisiones de CO₂ en los motores de los vehículos, además de que se disminuye el uso de agentes oxidantes como el MTBE (metil-terbutil-éter) que causan daño al ambiente.

La biomasa lignocelulósica puede ser aprovechada como materia prima para la obtención de bioetanol. La producción de etanol se divide en tres etapas básicas: Pretratamiento, hidrólisis y fermentación. El propósito del pretratamiento es principalmente reducir la cristalinidad a la celulosa, remover la lignina y hemicelulosa, así como hacer al material más disponible para permitir el acceso a las enzimas o agentes químicos.

El pretratamiento ácido tiene como ventaja que se hidrolizan la mayoría de los polisacáridos, y se obtienen altos rendimientos en la conversión de estos azúcares a etanol (alrededor del 82% en residuos de malta; Caballero, 2011). Sin embargo, se debe tener cuidado en la formación de compuestos de la deshidratación oxidativa de los carbohidratos que son catalizados por ácido y temperatura. Éstos compuestos como son el furfural, HMF y compuestos fenólicos son tóxicos para la levadura e inhiben la fermentación.

En este trabajo se realizó la optimización del pretratamiento ácido en residuos de malta, por medio de un diseño de experimentos (diseño factorial 2³) y en donde se evaluó la generación de azúcares reductores, totales y derivados del furfural.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 BIOCOMBUSTIBLES

Los biocombustibles son aquellos obtenidos a partir de biomasa mediante su procesamiento químico o biotecnológico, entre ellos se pueden mencionar biodiesel, bioetanol, biogás y biohidrógeno (Aburto *et al.*, 2008).

Debido a los altos precios en el petróleo y que las reservas de este recurso cada vez son menores, los biocombustibles se pueden considerar como una alternativa para disminuir o eliminar la dependencia a los combustibles fósiles, además de ayudar a disminuir los efectos en el cambio climático.

El mercado de los biocombustibles se ha ido incrementando debido a que su utilización reúne aspectos positivos en las siguientes áreas: medio ambiente, seguridad energética y desarrollo económico (Tapia Peña, 2010).

Los biocombustibles pueden clasificarse en generaciones considerando tanto a la materia prima como a la tecnología de conversión de biocombustibles como se muestra a continuación (ARPEL- IICA, 2005):

- **Biocombustibles de primera generación:** Utilizan materias primas que también tienen usos alimenticios (maíz, caña de azúcar, remolacha azucarera, soja, palma etc.), y utilizan tecnologías sencillas de fermentación (bioetanol) y transterificación (biodiesel).
- **Biocombustibles de segunda generación:** Utilizan como materia prima residuos agrícolas y forestales, es decir, diversas formas de biomasa lignocelulósica (bagazo de la caña, paja de trigo, hojas y ramas secas de árboles etc.).
- **Biocombustibles de tercera generación:** Utilizan cultivos energéticos especialmente diseñados a través de técnicas avanzadas de genética molecular y el diseño tradicional de cultivos transgénicos, con el fin de obtener materias primas más eficientes para la conversión de biocombustibles.

- **Biocombustibles de cuarta generación:** Son producidos a partir de bacterias genéticamente modificadas, las cuales emplean anhídrido carbónico (CO₂) o alguna otra fuente de carbono para la obtención de los biocombustibles (Alvarez, 2009).

Los biocombustibles de segunda generación ha sido objeto de estudio, debido a que los desechos se pueden utilizar como materia prima para su obtención, y así dejar atrás el dilema biocombustibles contra alimentos. Sin embargo, estas tecnologías no han alcanzado su punto de madurez a gran escala y de acuerdo al censo científico, las primeras plantas de biocombustibles lignocelulósicos no estarán disponibles antes del 2012 (ARPEL- IICA, 2005).

La producción de biocombustibles debe considerar su impacto ambiental, y ayudar a disminuir los efectos en el cambio climático si su producción es sustentable y si se desarrollan con respeto al medio ambiente (Castello, 2008).

1.2 BIOETANOL

El etanol tiene múltiples aplicaciones en la industria química, cosméticos, salud, alimentos, aunque actualmente su aplicación más importante se halla en el sector energético ya que puede ser utilizado directamente como combustible o como un aditivo a la gasolina en distintas concentraciones. La mezcla más común es para oxigenar a la gasolina en una concentración de alrededor de 5%, reemplazando al oxigenante metil-terbutil-eter (MTBE) que es dañino para el ambiente. Sin embargo, de acuerdo a estudios realizados en el IMP la mezcla que ofrece mejores resultados en cuanto a la reducción de emisiones de CO₂ es incorporando el 6% de etanol (Aburto, 2005).

El etanol puede producirse a partir del etileno, que es un derivado del petróleo, o del procesamiento de materia orgánica. Al etanol producido de materia orgánica se le conoce como bioetanol. (SENER, 2011a). El bioetanol se puede obtener mediante la fermentación de toda materia prima que contengan azúcares fermentables o constituyentes como almidón o celulosa que pueden ser convertidos en azúcares (Lee, 2002).

Las materias primas pueden clasificarse en tres grupos principales:

1. Materiales con alto contenido de sacarosa como la caña de azúcar, la remolacha azucarera, las melazas y los zumos de fruta.
2. Materiales amiláceos como cereales, papas, maíz, etc.
3. Materiales lignocelulósicos como madera residuos agrícolas, etc.

La elección de la materia prima determina el proceso de la obtención de etanol y el precio de venta para el producto final.

Las principales materias primas que se utilizan para su obtención son la remolacha, caña de azúcar, sorgo, trigo, cebada y maíz. Estados Unidos y Brasil son los dos mayores productores de etanol en el continente americano y el mundo con 34 y 27 mil millones de litros en 2008, respectivamente. Brasil obtiene el etanol a partir de la fermentación de la caña de azúcar mientras que Estados Unidos utiliza el grano de maíz como materia prima.

1.3 BIOETANOL EN MÉXICO

El uso de biocombustibles en México es casi inexistente aún, no obstante, el país produce etanol para su uso en bebidas alcohólicas, productos farmacéuticos, así como disolventes y reactivos industriales. Actualmente, el etanol se produce del jugo de la caña de azúcar en los diferentes ingenios azucareros del país que cuentan con destilerías. En México, existe un área agrícola para la producción de insumos para la elaboración de bioetanol, especialmente con base en caña de azúcar, sorgo dulce y remolacha, sin que ello ponga en riesgo la seguridad alimentaria del país (SENER, 2011a).

En 2008 se aprobó la ley de promoción y desarrollo de los bioenergéticos. En ella se pretende, entre otras cosas, normar y sustituir el MTBE por etanol o ETBE (sustituto del MTBE) como oxigenante de la gasolina en las grandes ciudades, normar la utilización del etanol como combustible en el sector de transporte, así como impulsar la investigación y desarrollo tecnológico en fuentes renovables.

La SENER emitió un programa de introducción de los bioenergéticos en el que se anuncia la oxigenación de gasolina con etanol al 6% mediante el cuál se pretende sustituir el MTBE en zonas metropolitanas de Guadalajara, Monterrey y valle de México, En Guadalajara se tiene prevista para el cuarto trimestre del 2011, y en Monterrey y el Valle de México para el cuarto trimestre del 2012, esto equivale a utilizar alrededor de 800 millones de litros anuales de etanol (Tabla 1.1; SENER, 2011b)

Ciudad	Etanol (Litros) /año
Guadalajara	176 millones
Monterrey	133 millones
Valle de México	493 millones

Tabla 1.1. Litros de etanol que se necesitan para sustituir etanol por MTBE en zonas metropolitanas de Guadalajara, Monterrey y Valle de México. (SENER, 2011b)

1.4 BIOETANOL A PARTIR DE MATERIALES LIGNOCELULOSICOS

La biomasa celulósica es una materia prima muy interesante para ser aprovechada en la obtención de bioetanol debido a su abundancia, disponibilidad, bajo precio y a que no compite con productos de alimentación humana.

1.4.1 Composición de materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos están compuestos principalmente de tres diferentes tipos de polímeros, la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, envueltos en una compleja estructura (Fig. 1.1; Sánchez *et al.*, 2010). La composición y porcentaje de los polímeros varía entre las especies de planta (Tabla 1.2).

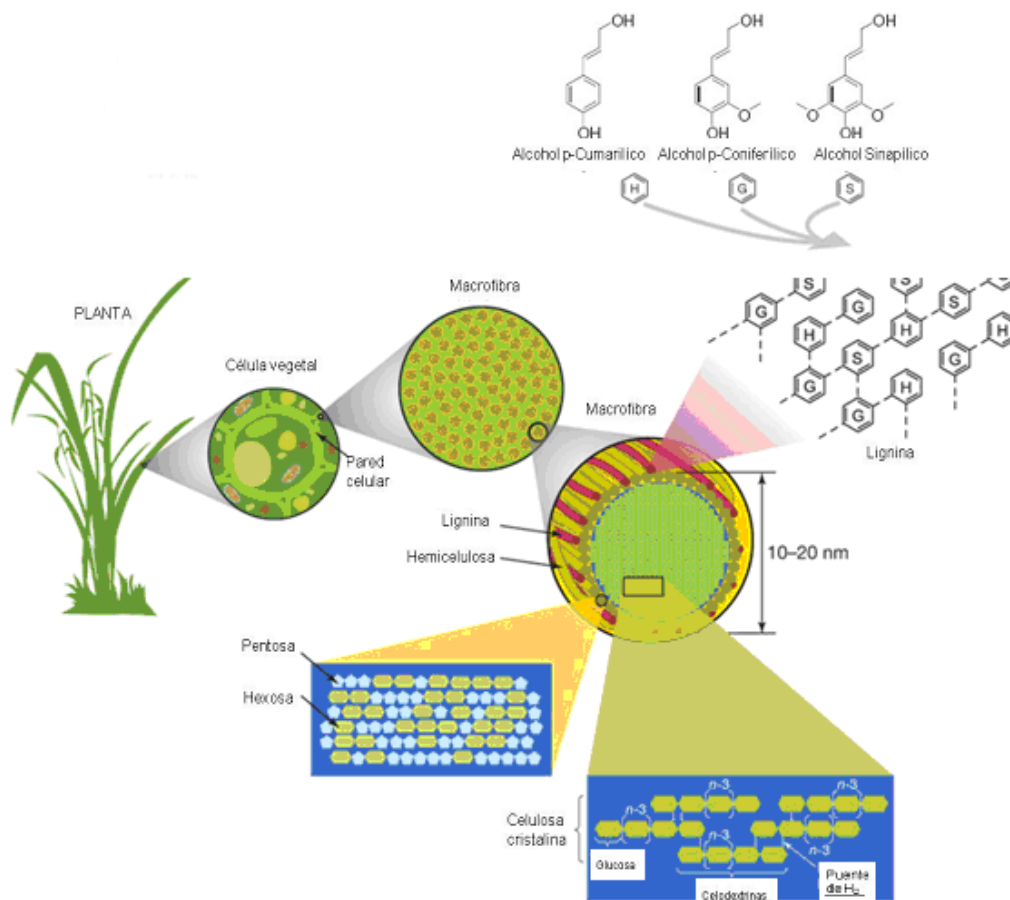


Figura 1.1. Estructura de la lignocelulosa (Edward, 2008).

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Desecho de papel de pulpeos químicos	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos de aguas residuales	8-15	ND ^b	24-29
Desechos animales (cerdos)	6	28	ND ^b
Desechos sólidos de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Hierba Bermuda	25	35.7	64
Pastos de crecimiento rápido	45	31.4	12

^aSung & Chen, 2002, ^bND-No disponible

Tabla 1.2. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos (Cuervo, 2009).

Celulosa

La celulosa es un polímero de unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces glicosídicos β 1-4' (Fig. 1.2). Este ordenamiento de enlace es muy rígido y muy estable, dando lugar a las propiedades estructurales que tiene la celulosa. Las cadenas lineales uniformes son capaces de unirse entre sí mediante puentes de hidrógeno, de manera que se forman zonas cristalinas, separadas por regiones amorfas (Fenema, 1995).

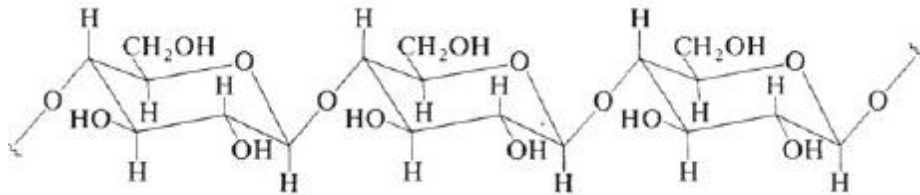


Figura. 1.2 Estructura celulosa. (Wade, 2003)

Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas, y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico. Los azúcares están unidos mediante enlaces β -1,4 (Sánchez Riaño, 2010).

Lignina

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos (p-cumarílico, p-conoferílico, sinapílico) que da soporte estructural, rigidez impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Fig. 1.3; Cuervo *et al.*, 2009).

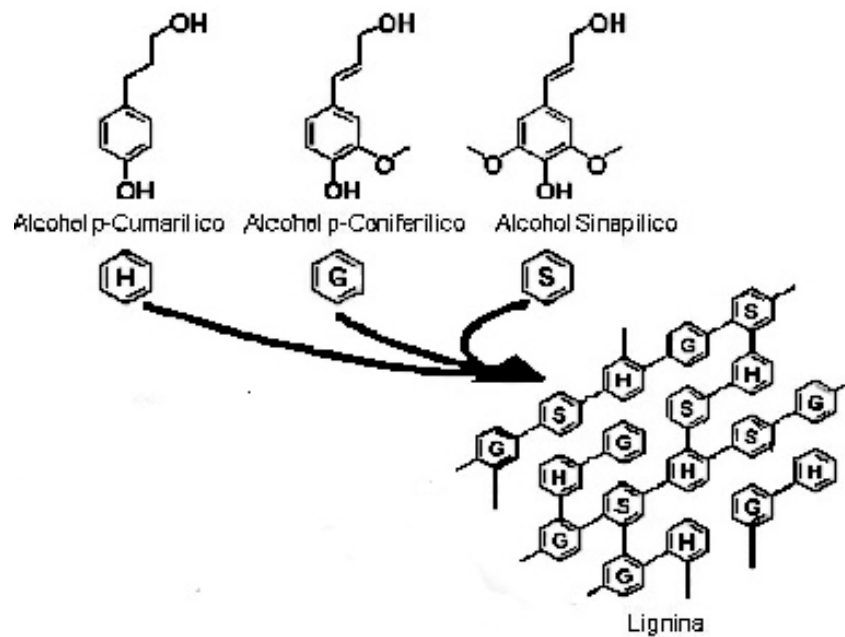


Figura 1.3 Estructura de la lignina (Edward, 2008).

El método general para la obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica consiste en los siguientes pasos: pretratamiento de la biomasa, hidrólisis, fermentación, purificación.

1.4.2 Pretratamiento del material lignocelulósico

La biomasa lignocelulósica tiene una estructura molecular compleja donde la fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa, algunas partes tienen zonas cristalinas que es la que dificulta la hidrólisis a glucosa. Además, la lignina forma barreras contra el ataque químico y enzimático, es por esto que se le da un pretratamiento al material lignocelulósico.

El propósito del pretratamiento es remover la lignina y la hemicelulosa así como reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad de los materiales y que de esta forma permita el acceso de las enzimas o del agente de sacarificación a la fracción celulósica (Aburto, 2005).

Existen diferentes tipos de pretratamiento y de acuerdo a la manera en que operan y los recursos que se necesitan se pueden dividir en físicos, físico-químico, químicos y biológicos (tablas 1.3-1.6).

Método	Descripción
Trituración mecánica.	Trituración de los materiales lignocelulósicos mediante la combinación astillado y molienda, reduce la cristalinidad de la celulosa aumenta la superficie, facilitando la hidrólisis posterior (Oliva, 2010). Tiene como inconveniente su alto consumo energético, por lo que no es económicamente viable, tiene efectos mínimos en los rendimientos de la hidrólisis (Sánchez 2010).
Pirolisis.	Temperaturas superiores a 300°C provoca que la celulosa se descomponga, produzca gas y se carbonice. Se produce de 80-85% de conversión de celulosa a azúcares fermentables (Martínez, 2009).

Tabla 1.3 Métodos físicos para el pretratamiento del material lignocelulósico.

Método	Descripción
Explosión de vapor.	La materia se somete a temperaturas entre 160- 260°C mediante la inyección directa de vapor saturado en un intervalo de tiempo entre 1 y 10 min., ayudando a se despolimerizar y romper los enlaces, por lo que se obtiene una celulosa más accesible a la hidrólisis enzimática. Hidrólisis de 80-100% hemicelulosa. (Oliva, 2010).
Explosión CO₂.	Se lleva a cabo con alta presión y altas temperaturas de hasta 200 °C, con una duración de varios minutos, (4kg CO ₂ /kg de fibra). Este pretratamiento produce líquidos que pueden ser ácidos, estos ácidos hidrolizan especialmente a la hemicelulosa. (Sánchez, 2010)
Explosión de vapor con amoníaco (AFEX).	El material es impregnado con amoníaco líquido (1-2 kg amoníaco/kg biomasa seca) a una temperatura alrededor de los 90 °C, y un tiempo aproximado de 30 minutos. Los rendimientos de hidrólisis han sido inferiores al 50%. No se producen inhibidores que afecten a las posteriores etapas del proceso de producción de etanol, y no requiere pequeños tamaños de partícula para aumentar su eficiencia. (Sun Cheng, 2002)

Tabla 1.4 Métodos físico-químicos para el pretratamiento del material lignocelulósico.

Método	Descripción
Tratamiento con organodisolventes	Se emplea una mezcla de disolventes orgánicos junto con un catalizador ácido (clorhídrico o sulfúrico) para romper los enlaces internos de la lignina y la hemicelulosa. Entre los disolventes orgánicos se encuentran: metanol, etanol, acetona y etilenglicol. A temperaturas altas (por encima de 185 °C), no es necesario el uso de catalizadores.
Ozonólisis	El ozono ha sido utilizado para degradar la lignina y la hemicelulosa de numerosos materiales lignocelulósicos, la degradación se limita fundamentalmente a la lignina ya que la hemicelulosa es atacada ligeramente y la celulosa apenas si se ve afectada. No origina productos inhibidores; sin embargo, la gran cantidad de ozono empleado hace de este proceso un método caro (Oliva, 2010).
Hidrólisis alcalina	Saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares de la lignina, u otros componentes de la hemicelulosa. Produce un hinchamiento de la biomasa, aumento del área superficial interna, un descenso de la cristalinidad y una ruptura de la estructura de la lignina (Sun Cheng, 2002).
Hidrólisis ácida	<p>Se emplean catalizadores ácidos para transformar las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales.</p> <p>Se utilizan diferentes clases de ácidos: sulfuroso, clorhídrico, nítrico, fórmico, sulfúrico, fosfórico, siendo los dos últimos utilizados a escala industrial. Se utilizan soluciones de ácido diluido (1-5%) a temperaturas altas (160-240°C), o concentrado (10-30%) a temperaturas menores (190 - 170°C). (Sánchez 2010)</p> <p>El tratamiento con ácido diluido favorece la hidrólisis de la celulosa y se hidroliza cerca del 80% de la hemicelulosa. Se debe neutralizar el pH para la posterior hidrólisis enzimática o la fermentación.</p> <p>Las variables comúnmente estudiadas en la hidrólisis ácida son la temperatura, la concentración del ácido y la razón sólido/líquido (Cortínez, 2010).</p> <p>Durante la hidrólisis ácida se pueden llevar a cabo reacciones de condensación y eliminación que llevan a la formación de sustancias tóxicas para la levadura como el Hidroximetilfurfural y furfural (Guarnizo <i>et al</i> 2009).</p>

Tabla 1.5 Métodos químicos para el pretratamiento del material lignocelulósico.

Método	Descripción
<p style="text-align: center;">Pretratamiento con hongos</p>	<p>En este tratamiento el material lignocelulósico se somete a la acción de determinados microorganismos, como los hongos de pudrición. El objetivo es degradar la lignina y hemicelulosa. Los cafés atacan a la hemicelulosa y los blancos y suaves a la celulosa y lignina. Las ventajas son el bajo requerimiento energético y las suaves condiciones ambientales en la que se produce el proceso, pero la hidrólisis es demasiado lenta. Entre todos los hongos estudiados destaca el de la podredumbre blanca <i>Phanerochaete chrysosporium</i>, que durante el metabolismo secundario, produce enzimas como la lignina peroxidasa y la peroxidasa dependiente de magnesio que degradan la lignina</p>

Tabla 1.6 Métodos biológicos para el pretratamiento del material lignocelulósico.

Durante el pretratamiento, además de transformar las cadenas de los polisacáridos en monosacáridos fermentables, también se busca evitar la formación de productos inhibitorios para los microorganismos encargados de la fermentación (Aburto, 2005).

Los productos de degradación que pueden inhibir la etapa de fermentación pueden dividirse en tres grupos: derivados del furano (HMF y furfural), ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos (Larsson, 2001).

Debido a las altas temperaturas y las condiciones ácidas empleadas durante algunos pretratamientos, los azúcares originados en la hidrólisis, principalmente de la hemicelulosa, se degradan originando dos compuestos derivados del furano: el 2-furfuraldehído, formado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroxi-2-furfuraldehido (HMF), formado como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). El furfural puede degradarse a ácido fórmico o polimerizarse. El HMF también puede descomponerse en ácidos levulinico y fórmico, además se pueden liberar ácido acético de los grupos acetilo contenidos en la hemicelulosa (Palmqvist, et al, 2000; Figura 1.4).

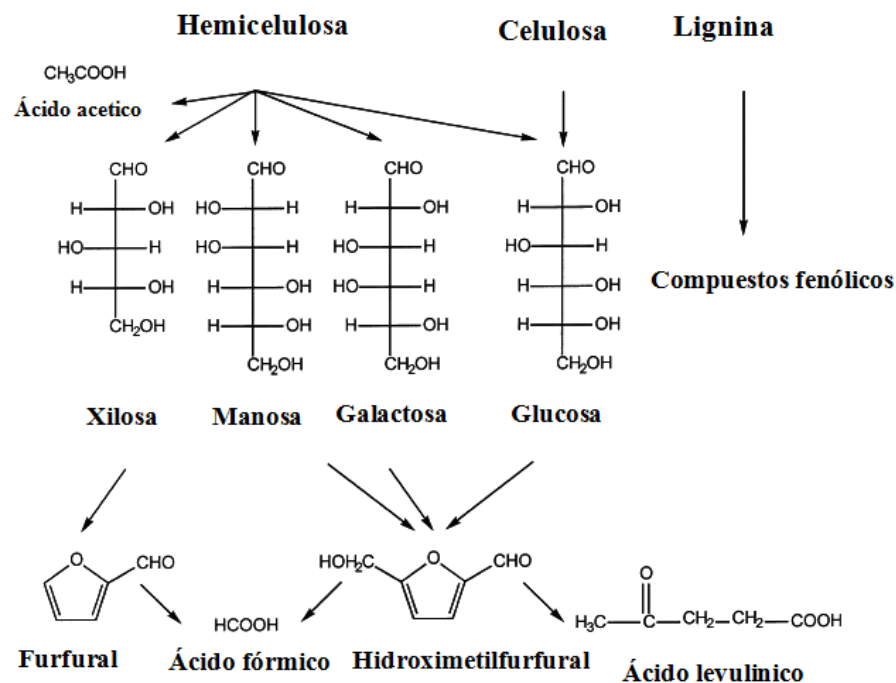


Figura 1.4. Productos de degradación durante la hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos (Palmqvist, *et al*, 2000).

Una parte de la lignina también se degrada originando una gran variedad de compuestos fenólicos. Los fenoles originados en el pretratamiento varían según el tipo de biomasa (Oliva, 2010).

Dentro de las consecuencias originadas por la presencia del 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. Se ha observado que los efectos producidos por el HMF son menores que los mostrados por el furfural.

En estudios previos se ha encontrado que una concentración de furfural de 0.5-2 g/L, puede reducir hasta en un 89% la eficiencia de la fermentación de *S. cerevisiae* y que una concentración de 3.7 g/L de HMF provoca una inhibición inferior al 50% (Caballero, 2010).

El efecto tóxico ocasionado por los furanos parece deberse a que, al ser aldehídos, son compuestos químicamente reactivos que pueden formar compuestos con determinadas moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos o bien producir daños sobre la membrana plasmática. Además, el

furfural produce la inhibición de enzimas glicolíticas y fermentativas (Singh Khan, 1995). Los productos inhibitorios se pueden disminuir o eliminar a través de diferentes métodos, estos se pueden agrupar en métodos físico-químicos y biológicos.

Los métodos biológicos consisten en utilizar microorganismos capaces de metabolizar algunos de los compuestos tóxicos presentes. Dentro de los métodos físico-químicos se encuentran: tratamiento con hidróxido, evaporación, el uso de carbón activado, resinas de intercambio iónico, entre otros. La elección del tipo de destoxificación depende de la composición del hidrolizado, del tipo de materia prima a pretratar y del microorganismo utilizado en la fermentación (Larsson, 2001).

1.4.3 Hidrólisis

Una vez que se realiza el pretratamiento del material lignocelulósico, la celulosa es recuperada y preparada para su hidrólisis, es decir la división de la molécula en sus unidades estructurales por adición de agua. La reacción es catalizada ya sea por la adición de un ácido diluido o concentrado o por enzimas (celulasas), siendo estas últimas las más utilizadas debido a las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción (pH=4.8, 45-50°C (Aburto, 2005).

Las celulasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en el polímero de celulosa. Es una mezcla de distintas actividades enzimáticas, cuya acción conjunta produce la hidrólisis total de la celulosa. Estas enzimas son producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias.

Las endo- β -1,4-glucanasas rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres. Las exo- β -1,4-glucanasas remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. Finalmente la β -glucosidasa hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa (Ponce, 2002).

1.4.4 Fermentación

La etapa de fermentación corresponde a la conversión de azúcares en etanol y dióxido de carbono por medio de microorganismos como hongos, levaduras y bacterias (Figura 1.5).



Figura 1.5. Esquema de la fermentación alcohólica (Mousdale, 2010).

Por cada molécula de glucosa consumida, dos moléculas de etanol son formadas. Así, por cada 180 g de glucosa consumida se forman 92g de etanol, que corresponde al máximo rendimiento teórico (0.51g etanol/ g glucosa consumida). La formación de productos secundarios (ejemplo: glicerol) y la reproducción de la levadura reduce la eficiencia de conversión de glucosa a partir de este máximo teórico (Mousdale, 2010).

Algunas bacterias utilizadas en la producción de etanol son *Escherichia coli*, *Klebsiella Oxytoca*, *Zimomonas mobilis*. Sin embargo, las levaduras son las que más se han utilizado en la fermentación de azúcares debido a su alta producción de etanol, baja producción de inhibidores y fácil separación después de la fermentación (Sánchez, 2010).

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más utilizada en la producción de etanol, algunas cepas son relativamente tolerantes con los inhibidores de crecimiento que se encuentran en el hidrolizado de la biomasa lignocelulósica. Sus limitaciones biotecnológicas por el contrario se derivan de su gama relativamente estrecha de sustratos fermentables como se muestra a continuación:

- La glucosa, fructosa y sacarosa son metabolizadas rápidamente al igual que la galactosa y manosa (hexosas componentes de la hemicelulosa y celulosa de la planta) y la maltosa (un disacárido producto de la degradación de almidón).
- Los disacáridos trehalosa e isomaltosa son lentamente utilizados al igual que trisacáridos como rafinosa y maltotriosa (otro producto de la descomposición del almidón), y pentosas como ribosa y ácido glucurónico (se encuentra en la hemicelulosa de la planta).

- Celobiosa, lactosa, xilosa, y ramnosa, no son utilizados (Mousdale, 2010).

En la tabla 1.7 se muestra la producción máxima de etanol de diferentes levaduras utilizando diferentes fuentes de carbono.

Levadura	Fuente de carbono	Temperatura (°C)	Fermentación Tiempo (hr)	Producción máxima etanol (g/L)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa 200 g/L	30	94	91.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sacarosa 220 g/L	28	96	96.7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Galactosa 20-150 g/L	30	60	40.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Melaza 1.6-5 g/L	30	24	18.4
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Glucosa 50 g/L	30	30	21.7
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Glucosa 50 g/L	30	60	23.0
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Glucosa 120 g/L	30	192	49.0
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Glucosa 50 g/L	30	40	24.2
<i>Candida utilis</i>	Glucosa 50g/L	30	80	22.7

Tabla 1.7 Producción máxima de etanol de diferentes levaduras con diferentes fuentes de carbono. (Mousdale 2010).

Debido a que no todos los microorganismos, entre ellos *S. cerevisiae*, pueden utilizar pentosas como xilosa y arabinosa (componentes de la hemicelulosa) para su transformación a etanol, se pueden utilizar microorganismos genéticamente modificados, es decir, dotar a las levaduras tradicionales con nuevas características incluyendo la capacidad de utilizar pentosas, así como reformar otras levaduras para hacer más eficiente la conversión de pentosas y hexosas a etanol (Mousdale, 2010). Otra opción es la elaboración de cultivos mixtos, es decir, complementar la acción de los microorganismos para obtener mayores rendimientos. Una muestra de ello es el uso de 2 levaduras que fermentan hexosas como *S. cerevisiae* y otra que fermenta pentosas como *Pichia stipitis* (Sánchez, 2010).

1.5 PROCESOS DE CONVERSIÓN DE ETANOL

Los procesos de la conversión de celulosa a etanol se pueden dividir en 2 grupos:

- Procesos en dos etapas o hidrólisis y fermentación separada (SHF)
- Procesos en una etapa o sacarificación y fermentación simultánea (SSF)

En el proceso en 2 etapas (SHF por sus siglas en inglés), la hidrólisis (ácida o enzimática) y fermentación se realizan por separado. La ventaja de éste proceso es que al estar separadas ambas etapas pueden realizarse en condiciones óptimas (Oliva, 2010). Si en lugar de enzimas durante la hidrólisis se emplea una hidrólisis ácida, es necesario neutralizar los hidrolizados antes de la fermentación.

En el proceso en una sola etapa (SSF), la hidrólisis y la fermentación se realizan en un mismo reactor al mismo tiempo. La principal desventaja de este proceso son las diferentes condiciones óptimas de pH y temperatura durante cada una de las etapas (T° óptima hidrólisis alrededor de 50°C, T° óptima fermentación 37°C). Aquí es necesario la utilización de microorganismos termotolerantes cuándo se quiera realizar el proceso en una sola etapa (Oliva, 2010). Sin embargo, estas bacterias termófilas sufren toxicidad por etanol y fenómenos de inestabilidad de las cepas con altos rendimientos. (Lee, 2002).

Los procesos en una sola etapa se dividen en 2 grupos: El primero corresponde a los procesos en los que el mismo microorganismo produce las enzimas y realiza la fermentación, este proceso se conoce como conversión directa por el microorganismo y generalmente corresponde a bacterias del género *clostridium*; el segundo corresponde a los procesos en los que se emplean celulasas provenientes de un microorganismo, junto con la presencia de un microorganismo productor de etanol. *K. marxianus* ha sido una levadura muy utilizada en los procesos de sacarificación y fermentación simultánea (Oliva, 2010).

1.6 CEBADA

La cebada es originaria de medio oriente y el norte de África. Éste cereal se produce en casi todo el mundo, crece en climas templados y moderadamente secos. En México es el quinto cereal en producción nacional, después del maíz, sorgo, frijol y trigo (Tabla 1.8.; INEGI, 2010). Las principales zonas productoras se encuentran en el centro del país, principalmente en los estados de Guanajuato, Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México, Puebla y Zacatecas. (Tabla 1.9; INEGI, 2010). La producción de este cereal se destina principalmente a dos tipos de mercado: como alimento para ganado y para producción de malta. Particularmente en México aproximadamente 70% de la cebada que se produce es específica para ser utilizada por la industria maltera y el 30% se utilizan fundamentalmente para la alimentación de ganado (Figura 1.6.; SNITT, 2002).

Cultivo	Superficie (ha)	
	Sembrada	Cosechada
Total	21 832 754	18 688 835
Cíclicos	15 635 929	12 885 400
Ajonjolí	65 065	51 878
Arroz	60 772	54 230
Cártamo	81 710	65 344
Cebada	329 853	239 058
Fresa	5 164	5 164
Frijol	1 676 882	1 205 310
Maiz	7 726 110	6 223 047
Sorgo	1 955 207	1 690 518
Soya	92 600	64 740
Trigo	866 023	828 408
Chile verde	144 110	140 440
Jitomate	53 573	52 384
Papa	54 141	54 097
Otros	2 524 920	2 210 788

Tabla 1.8 Superficie sembrada y cosechada nacional por cultivo en México en el 2009 (INEGI, 2010).

Entidad federativa	Producción (t)
	2 0 0 9
Estados Unidos Mexicanos	518 850
Baja California	1 761
Coahuila de Zaragoza	160
Durango	9 601
Guanajuato	217 726
Hidalgo	98 267
Jalisco	2 882
México	15 619
Michoacán de Ocampo	12 561
Oaxaca	129
Puebla	51 461
Querétaro	8 726
San Luis Potosí	1 200
Tlaxcala	74 974
Veracruz de Ignacio de la Llave	779
Zacatecas	23 003

Tabla 1.9 Producción de cebada por entidad federativa en México en el 2009 (INEGI, 2010).

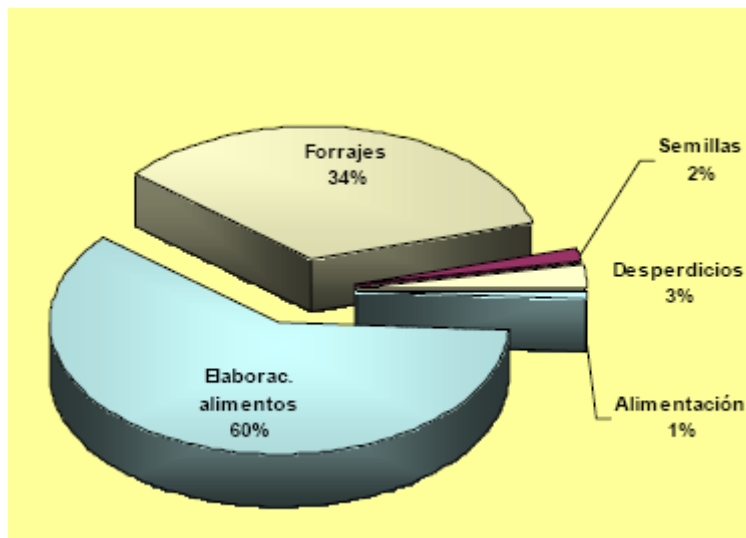


Figura 1.6 Consumo de cebada en México. Fuente: elaborado con información de SIACON, SIAP, FAO. 2003 (SNITT, 2002).

Existen numerosas variedades de cebada, que difieren no sólo en la forma de la planta o en el aspecto de la espiga si no en sus características fisiológicas. De acuerdo al aspecto de la espiga la cebada clasifica en *Hordeum vulgare* que presenta seis hileras de grano, con una mayor cantidad de cáscara y produce mayores niveles de enzima; y *Hordeum distichum* que consta de dos hileras de grano, tiene un mayor tamaño, uniformidad y mayor cantidad de almidón. La cebada que se utiliza comúnmente para el malteado es la de dos hileras de grano. El grano de cebada tiene forma fusiforme, grueso en el centro y va disminuyendo hacia cada extremo, está formado por una cubierta del fruto o pericarpio que rodea a la semilla y se adhiere fuertemente a la cubierta de la semilla. La semilla está constituida a su vez por el embrión o germen y endospermo encerrados dentro de una epidermis nucelar y de la cubierta de la semilla (Hoseney, 1995; Figuras 1.7, 1.8).

El pericarpio está constituido por varias capas, comprende alrededor del 5% del grano y está formado aproximadamente por un 6% de proteína, 2% de cenizas, 20% de celulosa y 0.5% de grasa, completando el resto por pentosanas (Hoseney, 1995).

La testa o cubierta de la semilla es una capa fina generalmente pigmentada y que le da el color característico al grano.

El endospermo consiste principalmente de almidón y proteína, las paredes celulares del endospermo, están formadas por pentosanas, hemicelulosa y β - glucanas pero no por celulosa. El espesor de las paredes celulares varía con la posición del grano. La aleurona forma parte del endospermo, rodea generalmente sólo la parte almidonosa de éste, en la cebada comprende de dos a cuatro capas celulares gruesas (Kent, 1988).

El embrión o germen es relativamente rico en proteína 25%, azúcar 18% (principalmente sacarosa y rafinosa), aceite 48% y cenizas 5% y es rico en vitaminas B y vitamina E. Asociados con el embrión se encuentra el espútelo, un órgano que forma de escudo situado entre el embrión y el endospermo, moviliza las reservas alimenticias almacenadas en el endospermo y las envía al embrión cuando el grano germina.

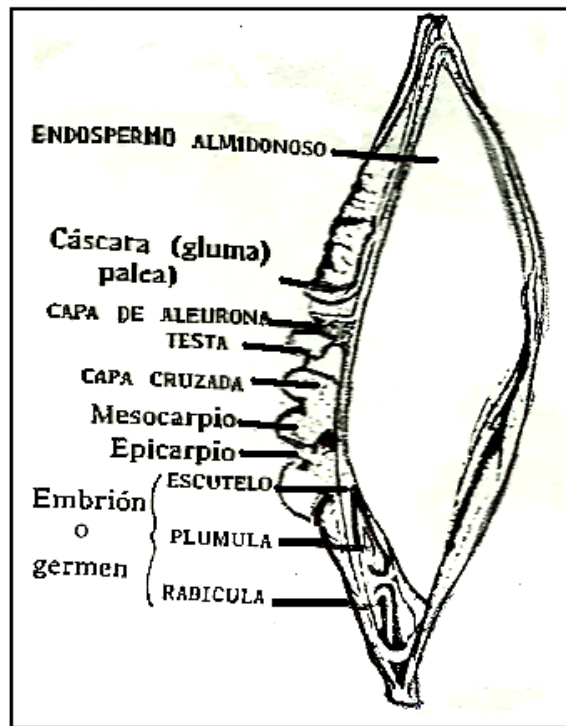


Figura 1.7. Estructura grano de cebada (Kent, 1988).

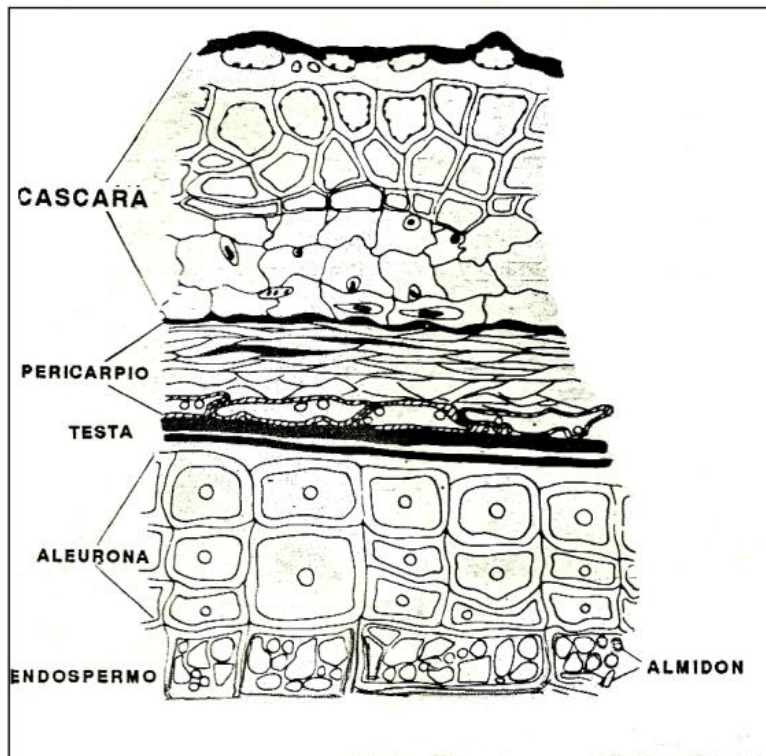


Figura 1.8. Capas exteriores del grano de cebada (Hoseney, 1995).

1.6.1 Proceso de malteado de cebada

La cebada se clasifica en tres categorías, fina, gruesa y muy gruesa. La fina se vende como pienso y tanto la gruesa como la muy gruesa, se maltean pero por separado. Antes del malteado es necesario realizar la limpieza rigurosa de la cebada, eliminando todas las semillas extrañas, granos rotos, etc. Las etapas en las que se lleva a cabo el malteado son: Maceración, germinación y tueste.

Maceración. Es el proceso en el cuál se pone al grano en remojo, el objetivo fundamental es introducir agua dentro del grano, el contenido de humedad del grano llega a 42-44%. Es importante que la humedad penetre hasta el centro del grano, ya que se puede presentar el problema de submaceración, es decir, que el agua absorbida haya sido insuficiente generando malta de mala calidad. También se puede presentar la supermaceración que se relaciona con el tiempo de más que el grano está sumergido, lo que provoca un retraso en el comienzo de la germinación, el crecimiento de hongos y bacterias así como la producción de olores indeseables (Hoseney, 1995). Debido a que el agua penetra en el grano a través de difusión, es un proceso lento que puede durar alrededor de 2 días.

Germinación. Es el proceso por el cuál se empieza a formar una nueva planta. Se forman raicillas y una acrospira. La germinación se lleva a cabo generalmente en un tiempo de 4-5 días, durante los cuales se hace atravesar por la cama de germinación una corriente de aire húmedo que puede ser continua o intermitente. La temperatura a la que se lleva a cabo es de 12°C, en esta etapa la cebada se suele remojar dos veces y también debe controlarse la humedad, temperatura y la cantidad de aire forzado a través de la cama de germinación. Durante la germinación se producen una serie de enzimas, principalmente α y β amilasas. El objetivo es conseguir la mínima cantidad de crecimiento que produzca el máximo rendimiento de alta actividad enzimática, como regla aproximada, el proceso de germinación termina cuándo la acrospira alcanza 1/3 de la longitud del grano (Hoseney, 1995).

Tueste. Terminada la germinación, los granos tienen un 45% de humedad, por lo que es necesario secarlos (4-5%) para así obtener un producto que se pueda conservar y desarrollar el sabor característico de malta. Se debe secar de tal manera que se elimine el agua sin perder el poder enzimático. Después de reducir el contenido de humedad en un valor relativamente bajo (55-60°C, 12% humedad) se puede elevar la temperatura (65-75°C, Caballero 2010) para conseguir la reacción de tueste que produce en la malta su sabor característico.

La composición de la malta de cerveza es de 16.8-21.9% de celulosa, 21.7 - 23% de lignina y 28.4-29.6% de hemicelulosa. La composición puede variar en función de la variedad de cebada, las condiciones de malteado y la naturaleza de los complementos añadidos al proceso de elaboración de cerveza (White, 2008).

El principal uso de la malta en México es para la producción de cerveza, ya que se encuentra en el séptimo lugar en la producción de cerveza y primer exportador a Estados Unidos (SNITT, 2010); también se utiliza en la fabricación de productos alcohólicos destilados como el whisky, jarabes, en sustitutos de café y algunos alimentos a base de cereales. (ASERCA, 2010).

Capítulo 2. Objetivos e hipótesis

Objetivo general

- Evaluar el pretratamiento ácido de residuo de malta para la generación de azúcares fermentables a etanol mediante un diseño de experimentos.

Objetivos particulares

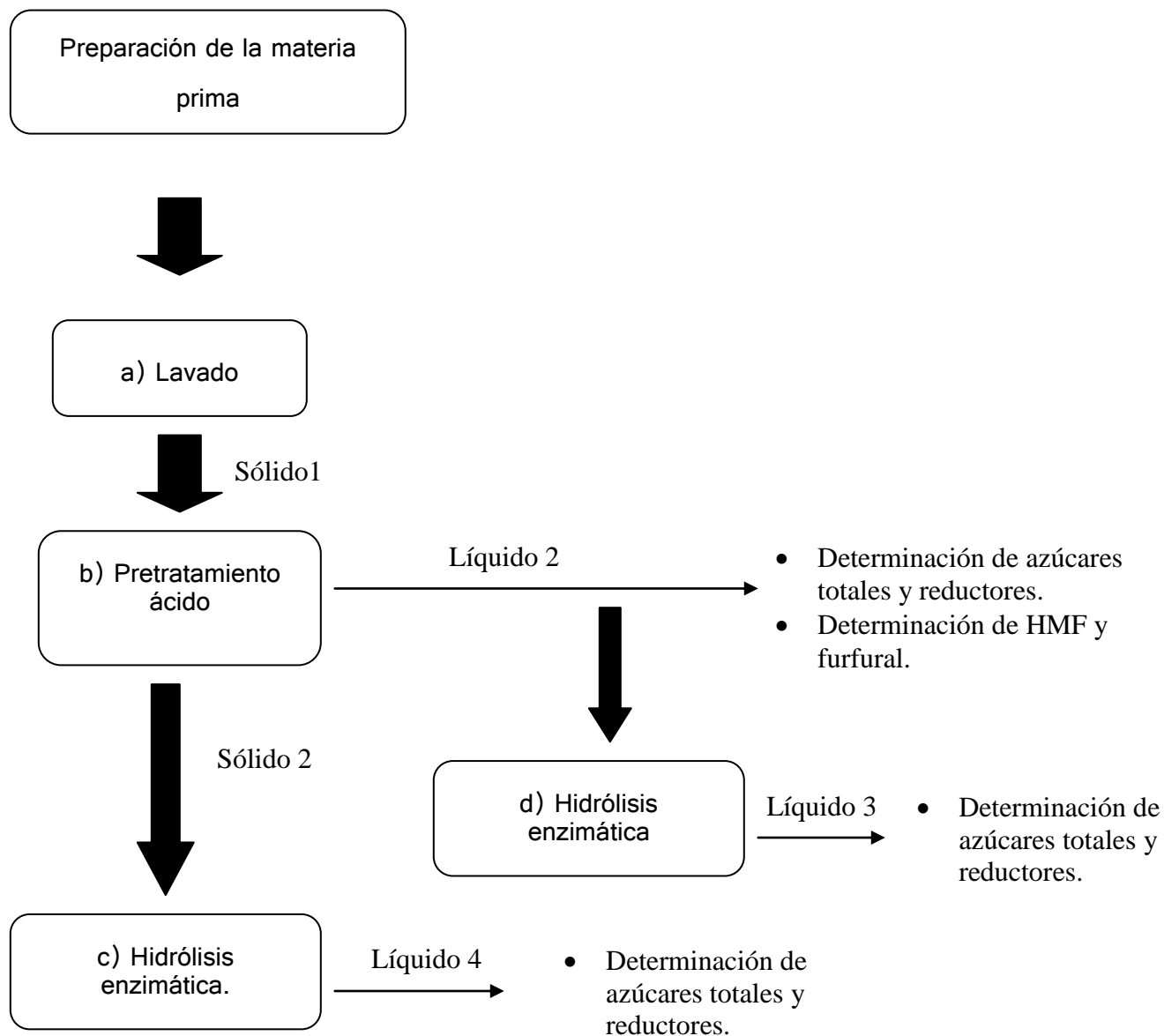
- Realizar la optimización del pretratamiento ácido de residuo de malta por medio de un diseño de experimentos.
- Valorar la sacarificación enzimática del jarabe y sólido resultante del pretratamiento ácido.
- Caracterizar el jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta en términos de azúcares reductores, totales y derivados del furfural.

Hipótesis

El tratamiento estadístico mediante un diseño de experimentos del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza permitirá conocer las mejores condiciones dentro del dominio experimental que permitan maximizar la generación de azúcares fermentables y minimizar la generación de derivados de furfural, inhibitorios del proceso de fermentación alcohólica.

Capítulo 3. Metodología

Diagrama de flujo general de la experimentación propuesta.



Condiciones experimentales del procesamiento de la materia vegetal:

a) Lavado: 25g malta/150 mL agua. Agitar 30min. a 30°C. Centrifugar a 10000 rpm 10 min.

b) Pretratamiento: 2g malta lavada/10 mL H₂SO₄ (0.5%, 1%, 1.5%). Temperatura (85°C, 105°C, 120°C). 1h.

c) Hidrólisis enzimática del sólido pretratado: 50mg malta pretratada /1.4 mL buffer de citrato/0.1 mL coctel enzimático E2. Agitar a 180 rpm a 50°C por 1h.

d) Hidrólisis enzimática del jarabe obtenido en el pretratamiento: 1mL jarabe proveniente pretratamiento ácido/0.9 mL buffer de citrato y 0.1 mL coctel enzimático E2. Agitar a 180 rpm a 50°C por 1h.

3.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Estudios previos han demostrado que las variables que influyen durante el pretratamiento ácido son la temperatura y la concentración de ácido. Otra variable que puede ser importante es el tamaño de partícula.

Se realizó un diseño factorial 2³, es decir, 3 factores con dos niveles de cada factor con 2 tratamientos centrales para la estimación del error experimental. Se estudiaron los efectos del tamaño de partícula, concentración de ácido sulfúrico y la temperatura sobre la generación de azúcares solubles totales, azúcares reductores, grado de polimerización, furfural e hidroximetilfurfural. Los factores así como los niveles de cada factor se muestran en la Tabla 3.1.

Factor	Valor central (X=0)	Intervalo (ΔX)	Nivel de los factores	
			- (X= -1)	+ (X= +1)
Tamaño de partícula (malla)	20	10	10	30
Concentración de ácido (%)	1.5	1	0.5	2.5
Temperatura (°C)	105	15	85	120

Tabla 3.1. Datos base del dominio experimental del efecto de tres factores sobre la sacarificación del residuo de malta mediante un diseño factorial 2^3 .

Las variables que permanecen constantes son:

*Cantidad de material: 2g

*Volumen de ácido agregado: 10 mL

*Tiempo: 1 hora

En la figura 3.1 se muestra gráficamente el dominio experimental en estudio con los factores así como sus posibles combinaciones.

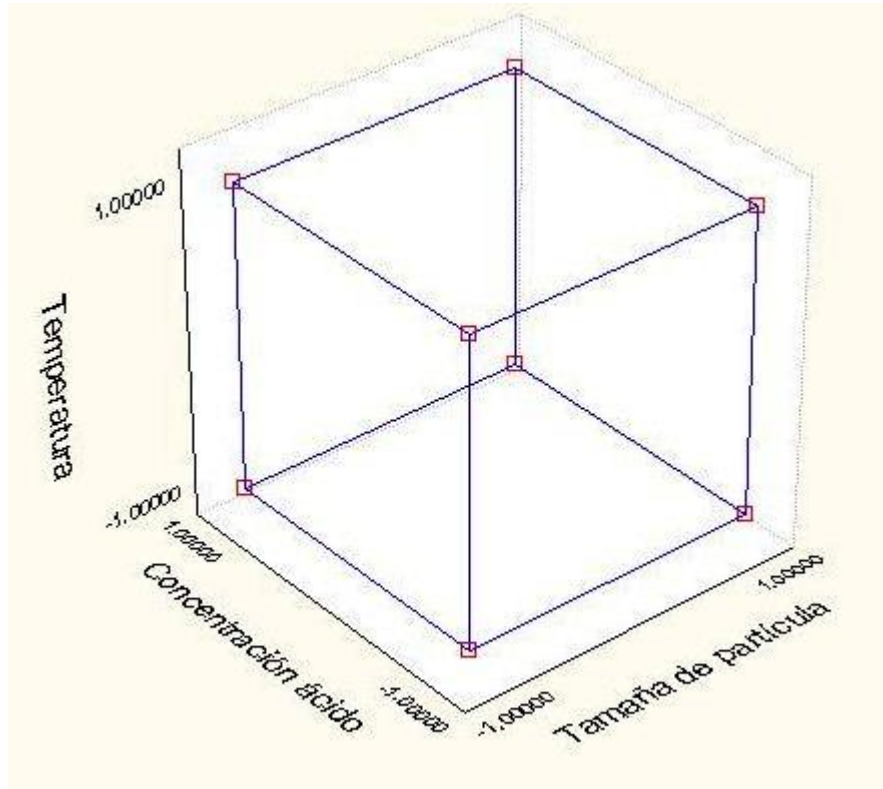


Figura 3.1. Representación gráfica del dominio experimental del diseño factorial 2^3 .

Se aleatorizaron los datos con ayuda del Software STATISTICA versión 8 (Tabla 3.2), en dónde se muestran las combinaciones posibles de los diferentes factores, así como el número de corridas y el orden en que se realizaron las corridas.

Número de corrida	Tamaño de partícula (mesh)	Concentración de ácido (% v/v)	Temperatura (°C)
3	10	2.5	85
4	30	2.5	85
9 (C)	20	1.5	105
5	10	0.5	120
2	30	0.5	85
7	10	2.5	120
8	30	2.5	120
1	10	0.5	85
10 (C)	20	1.5	105
6	30	0.5	120

Tabla 3.2. Aleatorización del diseño de experimentos.

Una vez que se realizaron las corridas de los experimentos, se procedió a obtener las curvas de respuesta con el software STATISTICA versión 8. Se observa entonces el efecto de cada factor (tamaño de partícula, concentración de ácido y temperatura) en la variable de respuesta correspondiente (azúcares totales, azúcares reductores, HMF, furfural y grado de polimerización). El análisis de varianza así como los estimados de los coeficientes de cada factor (β) para cada una de las respuestas se determinaron mediante el software Statistica v. 8 y se encuentran en el Anexo A y la discusión de resultados, respectivamente.

3.2 MATERIA PRIMA

Se utilizaron los residuos de malta de la planta piloto de producción de cerveza, ubicada en el laboratorio de Ingeniería Química de la Facultad de Química. El residuo de malta se secó, molió. Con el fin de obtener diferentes tamaños de partícula, se pasó por 3 diferentes tamices, malla 10, 20 y 30. El número de tamiz se refiere al número de orificios por pulgada lineal, por lo que el tamiz 30 es el tamaño de partícula más pequeño. A los 3 tamaños de partícula se le determinó el % de humedad por medio de una termobalanza MB 35 Halogen marca OHAUS (Tabla 3.1).

Tamaño de Tamiz	% Humedad
10	2.55
20	2.45
30 (finos)	2.36

Tabla 3.3 Humedad del residuo de malta

3.3 LAVADO DE LA MALTA DE CERVEZA

Al residuo de la malta de cerveza tamizada se le realizó el lavado; para ello se pesaron 25g de cada tamaño de tamiz y se le agregaron 150 mL de agua destilada, se colocó en agitación en un baño de agua durante 30 min. a 30 °C, posteriormente en una centrifuga marca Beckman modelo J2-21M/E se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min., el sobrenadante se separó por decantación y se

midió el volumen del sobrenadante (Tabla 3.2). La parte sólida (residuos de malta de cerveza) se sometió a un secado en estufa a 50°C durante un periodo de 24 h.

Muestra	mL sobrenadante (jarabe)
Tamiz 10	102
Tamiz 20	61
Tamiz 30	79

Tabla 3.4 Sobrenadante después centrifugación

3.4 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES (FENOL/ H₂SO₄)

Para la determinación de azúcares totales se utilizó el método FENOL/H₂SO₄. Este método se fundamenta en que los carbohidratos son hidrolizados por calor y por ácido, 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 mismo y con otros subproductos para producir compuestos coloridos, producto de la condensación de compuestos fenólicos. La condensación más común es con el fenol (Nielsen, 2007).

- En tubos de ensayo etiquetados, se coloca 1 mL de la solución acuosa de la muestra, adicionar 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. Mezclar perfectamente y adicionar 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado, y homogeneizar. Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente y determinar la intensidad del color naranja en un espectrofotómetro UV-VIS a 480 nm, frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua destilada.

Las condiciones del espectro UV/VIS fueron:

- Marca: Termo Spectronic
- Software: Vision 32
- Absorbancia: 480 nm

Se determinaron los carbohidratos presentes en la muestra, a partir de una curva patrón (Anexo B) preparada con el carbohidrato de interés, en este caso glucosa, en el intervalo del método (10-100 μg /mL).

- Para la curva patrón se pesaron 0.01g de glucosa marca J. T. Baker se diluyó en 10 mL de agua destilada para obtener una solución con una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de ésta solución se tomó 1 mL y se aforó con 10mL con agua destilada para obtener una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De esta solución se tomaron los diferentes volúmenes para obtener las diferentes concentraciones de la curva.

3.5 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (DNS)

El fundamento de éste método es que el grupo aldehído presente en la glucosa, reduce al grupo 3-nitro del ácido 3,5-dinitrosalicílico para producir el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico en baño maría, que al reaccionar con la fenilhidrazina presente en el reactivo DNS produce una ozazona (compuesto colorido) que puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm (Nielsen, 2007).

- Se realizó una curva patrón (Anexo C), para ello se pesaron 0.01g de glucosa marca J. T. Baker, se disolvieron en 10 mL de agua destilada, para obtener una solución con una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De esta solución se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 100 - 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Para la determinación de azúcares reductores se ajustó la solución de la muestra con agua, procurando que los carbohidratos se encuentren en el intervalo de sensibilidad del método (100 -1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En tubos de ensayo etiquetados, se coloca 1 mL de la solución acuosa de la muestra, adicionar 1mL del reactivo DNS. Someter a calentamiento durante 5 min. en un baño de agua hirviendo, enfriar y diluir con 8 mL de agua destilada. Leer la absorbancia del color producido con un espectrofotómetro, frente a un blanco preparado de la misma manera sólo que en lugar de la muestra utilizar agua destilada.

Las condiciones del espectro UV-VIS se muestran a continuación:

- Marca: Thermo Spectronic de doble haz.
- Software: Vision 32.
- Absorbancia: 540 nm.

3.6 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE POLIMERIZACIÓN

El grado de polimerización indica el número de veces que se repite la unidad monomérica se determinó dividiendo la cantidad de azúcares totales entre azúcares reductores.

$$GP = \frac{\text{azúcares totales}}{\text{azúcares reductores}}$$

3.7 PRETRATAMIENTO ÁCIDO RESIDUO DE MALTA

El pretratamiento es principalmente para remover la lignina, solubilizar la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa, incrementar la porosidad de los materiales, y así permitir el acceso a las enzimas para la etapa de la sacarificación.

Durante el pretratamiento ácido, favorece la hidrólisis de la celulosa, la lignina se hidroliza al 50% y la hemicelulosa casi en su totalidad (Caballero, 2010); pero tiene como desventaja la producción de compuestos no deseables como el furfuraldehído, HMF y otros compuestos como ácido levulinico y fórmico (Palmqvist, *et al*, 2000).

- Para realizar el pretratamiento ácido se trabajó con 20% de sólidos; se pesaron 2 g de los 3 diferentes tamaños de partícula (Malla 10, 20, y 30), se le agregó 10 mL de una solución de ácido sulfúrico (0.5%, 1.5%, y 2.5 %), se dejó durante 1h a diferentes temperaturas (85°C, 105°C y 120°C). Posteriormente, se separó el sólido y el jarabe por filtración al vacío, se realizó un lavado al material sólido con 10 mL de agua destilada y se midió el volumen final del jarabe. Se determinó posteriormente la cantidad de azúcares totales, azúcares reductores, furfuraldehído y HMF.

3.8 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FURFURAL Y HMF

La degradación térmica y la deshidratación de los azúcares son catalizados por ácidos o bases. Las pentosas dan lugar a 2-furfuraldehído como producto principal y las hexosas dan lugar a 5-hidroximetil-2-furfuraldehído (HMF), estos compuestos son indeseables ya que inhiben el metabolismo normal de levaduras como *Saccaromyces cerevisiae*.

- Para determinar si durante el pretratamiento se formó alguno de estos compuestos, se analizó por HPLC con un detector de arreglo de diodos UV-VIS. Primero se realizó una curva patrón para cada uno de estos compuestos; para ello se preparó una solución al 0.04%. Se hicieron diluciones para obtener diferentes concentraciones, y se determinó por duplicado el área de cada solución, así como el tiempo de retención (Anexo D).

Las características del equipo y las condiciones en que se realizó la determinación son las siguientes:

- Equipo: Hewlett Packard Serie 1100
- Tipo de columna: SUPERCOSIL™ LC-18-DB (longitud 15 cm*4.6mm*3μL)
- Flujo: 0.5 mL/min
- Absorbancia: 277 ± 10
- Referencia: 600 ± 25
- Inyección: 20 μL
- Temperatura: 29°C
- Tiempo de retención: 5 min.
- Concentración proporción de disolventes: 30% H₂O / 70% ACN.

Después del pretratamiento ácido, a cada una de las muestras se le determinó la cantidad de HMF y furfural, en las condiciones del equipo ya mencionadas con ayuda de las curvas de calibración.

3.9 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

3.9.1 Determinación de unidades FPU de los cocteles enzimáticos

Este método describe el procedimiento para la medida de la actividad de la celulasa que utiliza la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). La medida ha sido designada para la medida de la actividad de la celulasa, en términos de las “unidades de papel filtro” (FPU) por mililitro de la enzima original. La obtención de 2 mg de azúcares reductores como la glucosa, a partir de 50 mg de papel filtro (conversión 4%) en 60 min., ha sido designado como la medida de la actividad de la celulasa (FPU).

El procedimiento envuelve encontrar una dilución de la enzima original, la cuál a 0.5mL de la alícuota de la dilución cataliza el 4%, en 60 min. (Adney *et al.*, 1996).

- Se utilizó 50 mg de papel filtro de poro N°1 (tira de 1x5cm); la tira de papel se dobló en forma de escalones y se colocó en un tubo, se adicionó 1 mL de buffer de citrato 0.05M, pH 4.8. Se atemperó a 50°C y posteriormente se agregó 0.5 mL de coctel enzimático; se colocó durante 1 hora en agitación a 180 rpm a 50°C. Al final de la reacción se inactivó la enzima sumergiendo los tubos en agua a temperatura de ebullición y posteriormente se filtró. Se determinó la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. Se realizó lo mismo para un tubo testigo que no tenía papel filtro.

Los cocteles enzimáticos que se utilizaron fueron:

- E2
- E6
- E7

Estos cocteles comerciales presentan múltiples actividades enzimáticas; principalmente exoglucanasa, endoglucanasa, hemicelulasa y beta-glucosidasa. Se probaron diferentes diluciones de la enzima y se determinó la cantidad de azúcares reductores obtenidos después del tratamiento enzimático. Posteriormente, se realizó una gráfica de dilución de la enzima vs mg azúcares reductores / 0.5mL enzima, para cada coctel enzimático, y con ésta se determinó

la dilución que se le tiene que realizar a cada coctel enzimático para la obtención de 2 mg de azúcar a partir de 50mg de sustrato durante 1 hora. (Anexo E). En la siguiente tabla se muestra la dilución de la enzima calculada con la curva patrón para cada coctel enzimático.

Coctel enzimático	Dilución
E2	1/12.5
E6	1/9.1
E7	1/14.9

Tabla 3.5 Coctel enzimático y dilución unidades “FPU”

Posteriormente se determinaron las unidades FPU (Anexo F).

El coctel enzimático que se utilizó para la hidrólisis enzimática del sólido después del pretratamiento, así como del jarabe obtenido después de cada pretratamiento, fue el coctel enzimático E2. Para determinar el tiempo de reacción que se iba a dejar la muestra con la enzima, se realizó una gráfica de azúcares reductores vs diferentes tiempos de reacción.

- Se pesó 0.5 g de papel filtro de poro N°1 (tira de 1x5 cm); la tira de papel se dobló en forma de escalones y se colocó en un tubo, se adicionó 1 mL de buffer de citrato 0.05M pH 4.8. Se atemperó a 50°C y posteriormente se agregó 0.5 mL de coctel enzimático; se colocó durante diferentes tiempos (10min., 20min., 40min., 1h. y 2h.) en agitación a 180 rpm a 50°C. Al final de la reacción se inactivó la enzima sumergiendo los tubos en agua a temperatura de ebullición durante 5 min. Posteriormente se filtró; y se determinó la cantidad de azucares reductores presentes en la muestra. Se realizó lo mismo para un tubo testigo que no contenía enzima.

3.9.2 Hidrólisis del residuo de malta después del pretratamiento ácido

- Se pesaron 50 mg de material pretratado y se agregaron 1.4mL de buffer de citratos 0.05M pH 4.8., se atemperó a 50°C, y posteriormente se agregó 0.1mL de coctel enzimático E2 (0.457 FPU), se colocó en agitación durante 2h a 180rpm. Se inactivó la enzima colocando los tubos a temperatura de

ebullición durante 5 min. Posteriormente se filtró y al jarabe se le determinó la cantidad de azúcares totales y reductores presentes.

3.9.3 Hidrólisis del jarabe obtenido del pretratamiento ácido

Los jarabes de los diferentes tratamientos se ajustaron a un pH de 4.8; se tomó 1mL de jarabe, se le agregó 0.9 mL de buffer de citratos 0.05M pH 4.8 y se atemperó a 50°C. Posteriormente se agregó 0.1mL de coctel enzimático E2, se colocó en agitación durante 2h a 180 rpm. Se inactivó la enzima sumergiendo los tubos en agua a temperatura de ebullición durante 5 min., posteriormente se filtró el jarabe y se le determinó la cantidad de azúcares totales y reductores presentes.

Capítulo 4. Resultados y análisis

4.1 PRETRATAMIENTO ÁCIDO DEL RESIDUO DE MALTA DE CERVEZA

El efecto estimado de los factores en el pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza está dado por el modelo de regresión del diseño de experimentos:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_{12} + \beta_{13} X_{13} + \beta_{23} X_{23} + \beta_{123} X_{123} + \varepsilon$$

donde:

y es la variable de respuesta correspondiente,

los β 's son coeficientes de cada factor cuyos valores serán estimados en el modelo,

x_1 es la variable que representa al tamaño de partícula (mesh),

x_2 es la variable que representa a la concentración de ácido (% v/v),

x_3 es la variable que representa a la temperatura del pretratamiento (°C) y,

ε es el término del error al azar.

En la tabla 4.1 se muestran los valores de coeficientes de las variables de respuesta de la etapa de pretratamiento ácido.

Coefficiente	Azúcares totales (g/g)	Azúcares reductores (g/g)	Grado de polimerización (GP)	Furfural (%)	HMF (%)
β_0	0.2498	0.1242	3.2223	0.0368	0.0192
β_1	8.3e-4	0.0075	0.4724	0.0093	-0.0050
β_2	-0.0073	-0.0143	0.2879	0.0367	-0.0034
β_3	0.0652	0.0742	-1.5402	0.0367	0.0192
β_{12}	0.0412	0.0094	0.8746	0.0093	-0.0106
β_{13}	-0.0062	0.0223	-0.7992	0.0093	-0.0051
β_{23}	-0.0298	-0.0268	-0.0597	0.0367	-0.0034
β_{123}	0.04988	0.0318	-0.8670	NA	NA

Tabla 4.1. Coeficientes de los modelos de regresión de las diferentes variables de respuesta en el pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza. NA: No aplica.

4.1.1 Azúcares totales, reductores y grado de polimerización en el jarabe proveniente del pretratamiento ácido.

El pretratamiento ácido ayuda al material a ser más disponible, así como remover la lignina, hemicelulosa además de reducir la cristalinidad de la celulosa. Si bien se ha observado que en otros pretratamientos como el básico/oxidante se reduce un poco más la cristalinidad de la celulosa (Caballero, 2011), éste pretratamiento favorece la hidrólisis de la celulosa y se hidroliza cerca del 80% de la hemicelulosa (Cortínez, 2010). Algunos autores reportan que la cebada malteada contiene alrededor de 28% de hemicelulosa, 16% de celulosa y un 27% de lignina; sin embargo, la composición puede variar en función de la variedad de cebada condiciones de malteado y la naturaleza de los complementos añadidos al proceso de la elaboración de cerveza (Mussato *et al.*, 2006).

En esta etapa se determinó la cantidad de azúcares totales y reductores en el jarabe proveniente del pretratamiento ácido, para que a través de un diseño de experimentos, determinar de que manera los factores estudiados (temperatura, concentración de ácido y tamaño de partícula), influyen en la obtención de éstos, y como conocer las mejores condiciones de pretratamiento.

El análisis de los coeficientes de la variable de respuesta indica que la temperatura de tratamiento (X_3) así como las interacciones entre el tamaño partícula y concentración de ácido (X_{12}) y los tres factores (X_{123}) tienen un mayor efecto en la obtención de azúcares totales (Tabla 4.1). El análisis de varianza muestra que el efecto de la temperatura (X_3) y de las interacciones de factores (X_{12}) y (X_{123}) en la respuesta de azúcares totales son significativos para una confianza del 90% (Anexo A1; $F_{0.1, 1, 1} = 39.86$); sin embargo el efecto de los factores (X_{12}) y (X_{123}) en la generación de azúcares totales no es tan grande como el efecto de la temperatura (X_3 ; Tabla 4.1; Anexo A1). Este comportamiento se observa en la curva de respuesta (Fig. 1a), donde aumenta la cantidad de azúcares totales en el sólido con un tamaño de partícula menor ($X= 1$), conforme aumenta la temperatura ($x= 1$), así como la concentración de ácido ($X= 1$).

Con respecto a azúcares reductores, el análisis de los coeficientes de la variable de respuesta, se observa que la temperatura (X_3) tiene un efecto positivo en la obtención de azúcares reductores, así como las interacciones entre el tamaño de partícula y temperatura (X_{13}) y de los tres factores (X_{123} ; Tabla 4.1). El análisis de varianza muestra que solamente el efecto de la temperatura (X_3) es significativa en la respuesta de azúcares reductores para una confianza del 90% (Anexo A1; $F_{0.1, 1, 1} = 39.86$). Esto se muestra en la curva de respuesta (Fig. 2a), en donde la cantidad de azúcares reductores presentes en el sólido con un tamaño de partícula menor ($X = 1$) aumenta de manera significativa conforme se va aumentando la temperatura ($x = 1$), y no influye la concentración de ácido ya que su valor permanece constante en el intervalo de concentraciones (0.5 – 2.5 % v/v). Es decir, la disminución del tamaño de partícula permite contar con una mayor área superficial del sólido y junto con el incremento de la temperatura tiene un efecto significativo en remover la lignina permitiendo la hidrólisis de los polisacáridos presentes en el sólido. Así, se obtuvo alrededor de 0.25, 0.26 y 0.30 g AR/ g_{biomasa} a un tamaño de partícula tamiz 30, 20 y 10, respectivamente (Fig. 2a; Anexo B1).

La hidrólisis de los polisacáridos presentes en los residuos de malta de cerveza (celulosa, hemicelulosa) está influenciada por numerosos factores entre los que destacan el pH y la temperatura, esta última incrementa en gran medida la velocidad de hidrólisis (Fenema, 1995). Es por ello que la cantidad tanto de azúcares totales como de azúcares reductores aumenta con la temperatura del pretratamiento aplicado, y en menor medida cuando aumenta la concentración de ácido.

Si el residuo de malta de cerveza se trata a una temperatura de 120°C, un tamaño de partícula menor (malla 30), y una concentración de ácido de 2.5%; se obtiene una cantidad significativa de azúcares totales y reductores con alrededor de 0.40 g AT/ g biomasa y 0.25 g AR/g biomasa, lo que indica que más de la mitad de los azúcares presentes son azúcares reductores, que pueden ser fermentados a etanol. Estos valores representan el 90% de rendimiento de azúcares provenientes de celulosa y hemicelulosa, tomando como referencia el valor teórico de la cantidad de cada uno de ellos presente en la cebada malteada (16 y 18%) respectivamente.

Cabe mencionar que se genera una menor cantidad de azúcares totales y azúcares reductores en el pretratamiento ácido en residuos de malta de cerveza comparado a lo que se obtiene con salvado de trigo y olote de maíz y bagazo de caña en condiciones similares pero con una concentración de ácido al 3% y 10% de sólidos, con valores de 0.77 g AT/ g_{biomasa}, y 0.67g AR/ g_{biomasa} para salvado de trigo, 0.78 g AT /g_{biomasa} 0.58g AR/g_{biomasa} para el olote de maíz y 0.55 g AT /g_{biomasa} 0.29g AR/g_{biomasa} para el bagazo de caña (Medrano, 2010; Villaseñor 2010; Hernández, 2010). La composición de cada uno de estos materiales lignocelulósicos es diferente (Tabla 4.1.1). La lignina imparte fuerza y resistencia a la interacción celulosa-hemicelulosa por lo que su presencia impide la hidrólisis sencilla de los polisacáridos (Mosier y col, 2005). El rendimiento de los azúcares provenientes de celulosa y hemicelulosa, es de 99, 91 y 76.6% para el salvado de trigo, olote de maíz y bagazo de caña respectivamente, con respecto a los valores teóricos de la cantidad de celulosa y hemicelulosa, presente en cada uno de estos materiales. Estos valores se pueden deber principalmente a la cantidad de lignina presente ya que como se mencionó el material que contiene una menor cantidad de lignina es el salvado de trigo y es en ese material donde se encuentra un mayor rendimiento. A pesar de que el residuo de malta contiene un 23% de lignina, las condiciones de pretratamiento mencionadas ayudan a removerla y obtener una cantidad importante de azúcares provenientes de la celulosa y hemicelulosa. Los valores en el rendimiento de la cantidad de azúcares provenientes de la celulosa y hemicelulosa de los residuos de malta de cerveza son muy cercanos al olote de maíz, y se obtiene un mayor rendimiento en residuos de malta de cerveza comparado con bagazo de caña.

Cabe mencionar que los rendimientos se determinaron con respecto a valores teóricos, sería importante determinar experimentalmente la cantidad de celulosa, y hemicelulosa presente en los residuos de malta antes y después del pretratamiento ácido para saber cuanto de esos polisacáridos se hidrolizaron.

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Cebada malteada	16	28	23
Olote de Maíz	45	35	15
Salvado de trigo	37	41	4
Bagazo de caña	46	25	20

Tabla 4.1.1 Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de diferentes materiales lignocelulósicos.

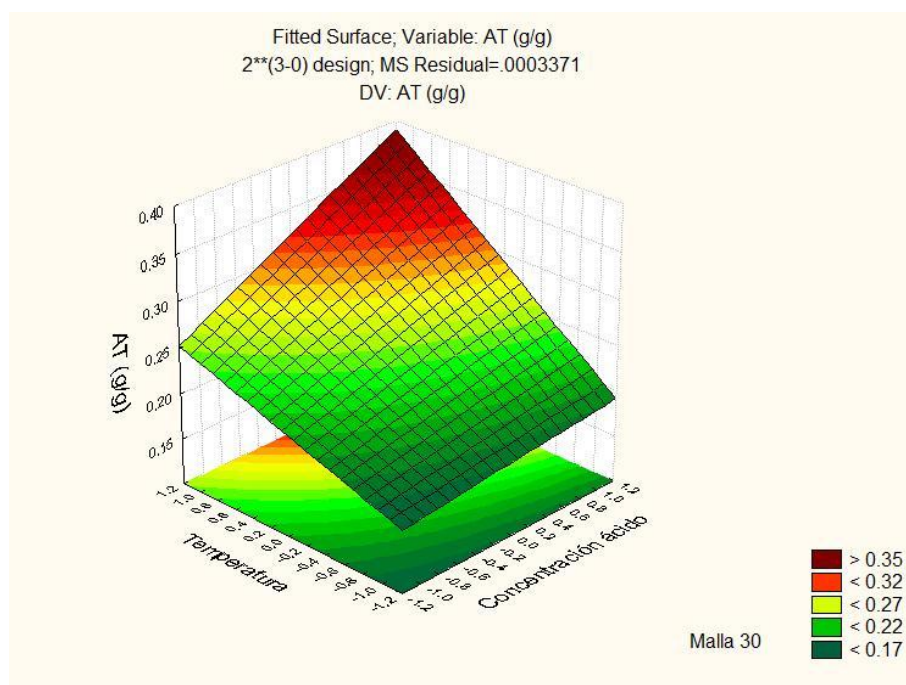


Figura 1a. Generación de azúcares solubles totales en residuos de malta de cerveza malla 30 en el pretratamiento ácido.

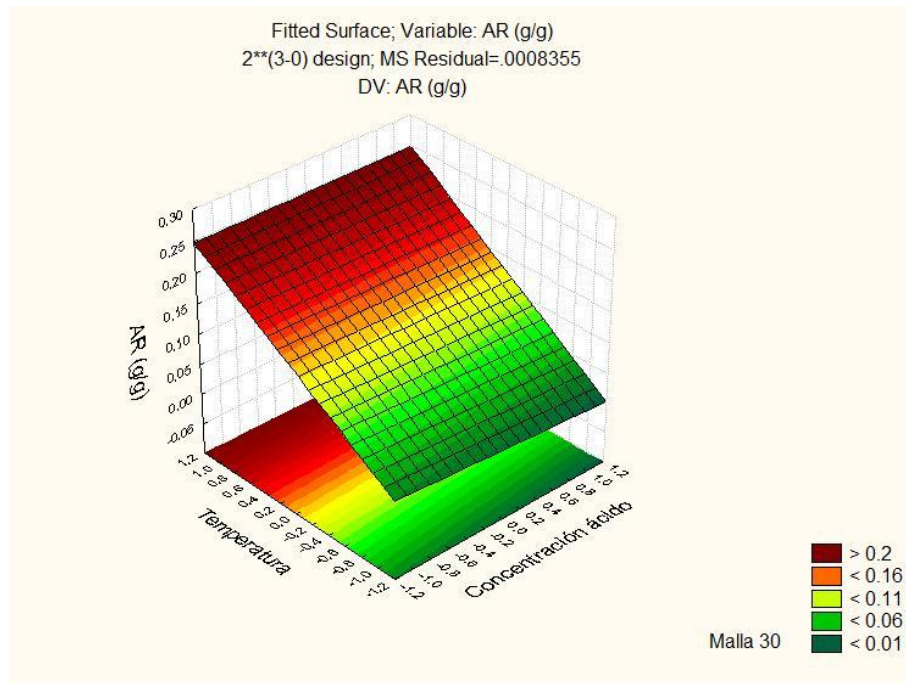


Figura 2a. Generación de azúcares reductores en residuos de malta de cerveza malla 30 en pretratamiento ácido.

Por otra parte, se determinó el grado de polimerización (GP) del jarabe obtenido del pretratamiento ácido. Este valor indica el número de monómeros de azúcar que conforman al polisacárido u oligosacárido, por lo que se busca un grado de polimerización pequeño, para que los azúcares obtenidos durante esta etapa puedan ser mejor aprovechados por el microorganismo que se utilice para la fermentación de los azúcares a etanol. Es importante mencionar que este valor es un estimado, y que se determinó obteniendo la relación de la cantidad de azúcares totales entre azúcares reductores presentes. Si se requiere saber con más exactitud el tamaño de los polímeros presentes se pueden utilizar técnicas como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o cromatografía de permeación en gel (GPC; López, 2004).

De acuerdo a los coeficientes de variables de respuesta (Tabla 4.1), el mayor efecto sobre la disminución del GP se atribuye a la temperatura (X_3), seguido de las interacciones de los tres factores en estudio (X_{123}). El análisis de varianza muestra que el efecto de la temperatura (X_3) y de las interacciones de factores (X_{123}) son significativos en la respuesta de GP para una confianza del 95% (Anexo

A1; $F_{0.05, 1, 1} = 161.4$). Los efectos del tamaño de partícula (X_1) y la interacción X_{13} son significativos para una confianza del 90% ($F_{.1, 1, 1} = 39.86$).

De acuerdo a las curvas de superficie de respuesta el GP disminuye su valor con el incremento de la temperatura y es más marcada con la disminución del tamaño de partícula (Fig. 3a – anexo B1). Al sólido con un tamaño de partícula menor (malla 30; Fig. 3a), la concentración de ácido no presenta efecto significativo en el valor del GP. Es decir si se tiene una mayor superficie que este en contacto con el ácido en el rango de concentraciones (0.5- 2.5%) y se incrementa la temperatura ($X=1$), se hidrolizan los polímeros y se obtienen monómeros ($GP=1$).

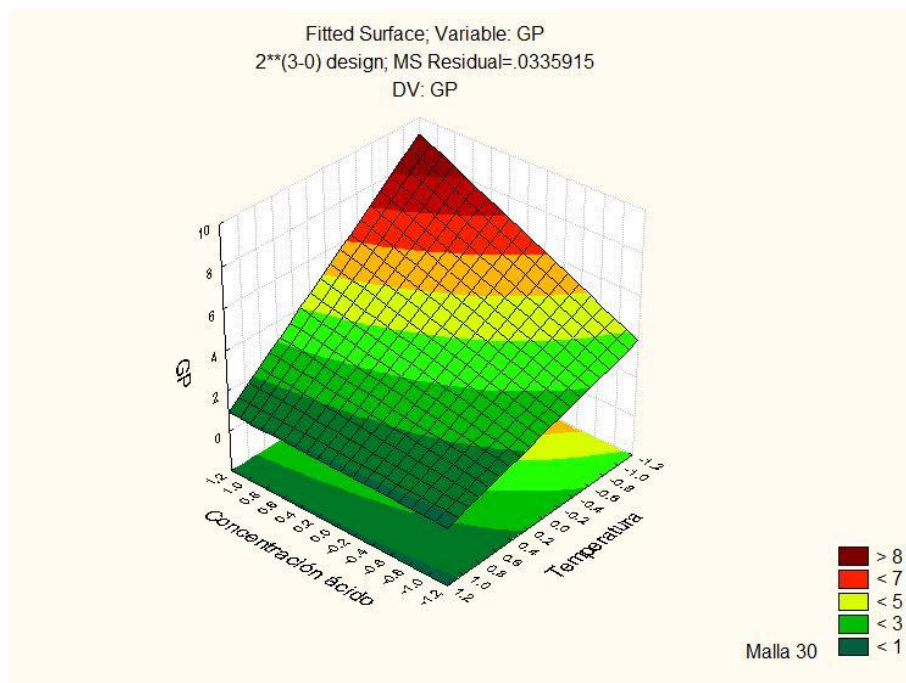


Figura 3a. Grado de Polimerización de los azúcares presentes en el jarabe proveniente del pretratamiento ácido. Residuos de malta de cerveza malla 30.

4.1.2 Determinación de Furfural y HMF en el jarabe proveniente del pretratamiento ácido

Debido a las altas temperaturas y las condiciones ácidas empleadas durante el pretratamiento ácido, los azúcares originados en la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa se pueden degradar originando compuestos que son inhibitorios para los microorganismos encargados de la fermentación. El 2-furfuraldehído se forma a partir de la degradación de las pentosas (xilosa, arabinosa) y el 5-hidroxi-2-furfuraldehído (HMF) a partir de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). Estos compuestos primarios pueden fragmentarse y formar algunos ácidos como son ácido levulinico, fórmico, acético y láctico. Además, una parte de la lignina se degrada originando una gran variedad de compuestos fenólicos. Durante el pretratamiento ácido se busca evitar la formación de estos productos inhibitorios, por lo que se determinaron los factores de estudio que influyen en la formación de HMF y furfural.

De acuerdo a los valores de los coeficientes de la variable de respuesta, la concentración de ácido (X_2), la temperatura (X_3) así como la interacción entre ellos (X_{23}) tienen un mayor efecto en la generación de furfural. El análisis de varianza muestra que el efecto de la concentración de ácido (X_2), de la temperatura (X_3) y de la interacción de factores X_{23} son significativos en la respuesta de furfural para una confianza del 95% (Anexo A1; $F_{0.05, 1, 2} = 18.51$). Este comportamiento se observa en la figura 4a, en donde la formación de este compuesto es influenciada y de manera significativa por la temperatura y la concentración de ácido. De acuerdo a las curvas de superficie de respuesta (Fig. 4a; anexo B1), la cantidad de furfural aumenta conforme disminuye el tamaño de partícula ($X=1$). Así se obtiene alrededor de 0.14 y 0.21% a malla 10 y 30, respectivamente. Se obtiene una menor cantidad de furfural cuando se le aplica un pretratamiento ácido a una menor concentración ($X= -1$) y menor temperatura ($X= -1$) a los tres tamaños de partícula (Figura 4a- Anexo B1).

En la formación de HMF de acuerdo a los coeficientes de respuesta indican que la temperatura (X_3) tiene un efecto positivo en la formación de este compuesto, aunque el análisis de varianza indica no existe efecto significativo de ninguna de

las variables en estudio sobre la respuesta de generación de hidroximetilfurfural (Anexo A1; $F_{0.05, 1, 2} = 18.51$).

Las curvas de superficie de respuesta muestra que aumenta la concentración de HMF cuando se tiene un tamaño de partícula menor ($X = 1$), a una menor concentración de ácido ($x = -1$) y si se incrementa la temperatura ($x = 1$; Fig. 5a). Lo anterior se atribuye a la mayor área superficial que no solo favorece la formación de azúcares solubles, sino la deshidratación de estos a HMF y otros derivados que no fueron determinados, ya que las altas temperaturas promueven la formación de estos compuestos. Se forma una menor cantidad de HMF si se mantiene una menor temperatura de pretratamiento ($X = -1$) y de esta manera no influye la concentración de ácido, este comportamiento se observa en los tres tamaños de partícula; Es importante notar que se formó casi la misma cantidad (0.05%) para los tres distintos tamaños de partícula (Fig. 5a – Anexo B1).

Debido a que el ordenamiento de enlaces de celulosa es muy rígido, no se hidroliza tanto como la hemicelulosa por lo que se obtiene una mayor cantidad de 2-furfuraldehído, ya que este compuesto se forma a partir la deshidratación de las pentosas (xilosa, arabinosa) componentes de la hemicelulosa, aunque sería importante determinar si no se formaron compuestos de fragmentación que no fueron determinados en este estudio.

En estudios previos, se ha encontrado que la concentración de furfural de 0.05 a 0.2% puede reducir de un 43-89 % la eficiencia de la fermentación de *S. cerevisiae* (Delgenes *et. al.*, 1996). Una concentración de 0.4% de HMF disminuye en un 40% la producción de etanol y hasta 70% la tasa específica de crecimiento (Cortínez, 2010). De acuerdo a los resultados obtenidos, en las condiciones en las que se genera una mayor concentración estos compuestos (0.21 y 0.05% furfural y HMF respectivamente), se esperaría reducir la eficiencia de la fermentación con respecto a la formación de furfural, y con respecto al HMF no se esperaría un efecto en la fermentación de los azúcares ya que se forma una menor cantidad de este compuesto comparado con lo que algunos autores reportan que se necesita para reducir la producción de etanol. Sin embargo, se sugiere hacer la fermentación de los jarabes obtenidos del pretratamiento ácido para determinar si las concentraciones obtenidas de estos compuestos influyen en inhibir la etapa de fermentación.

Cabe señalar que se pueden utilizar diferentes métodos físico-químicos y biológicos para disminuir o eliminar los productos inhibitorios (Larsson, 2001), los cuáles se podrían probar para saber cual de ellos es el mejor para eliminar estos compuestos en residuos de malta de cerveza.

En un estudio realizado a residuos de malta se obtiene un rendimiento en la producción de etanol del 82% (Caballero, 2011), en un jarabe proveniente de pretratamiento ácido que no contenía derivados de furfural.

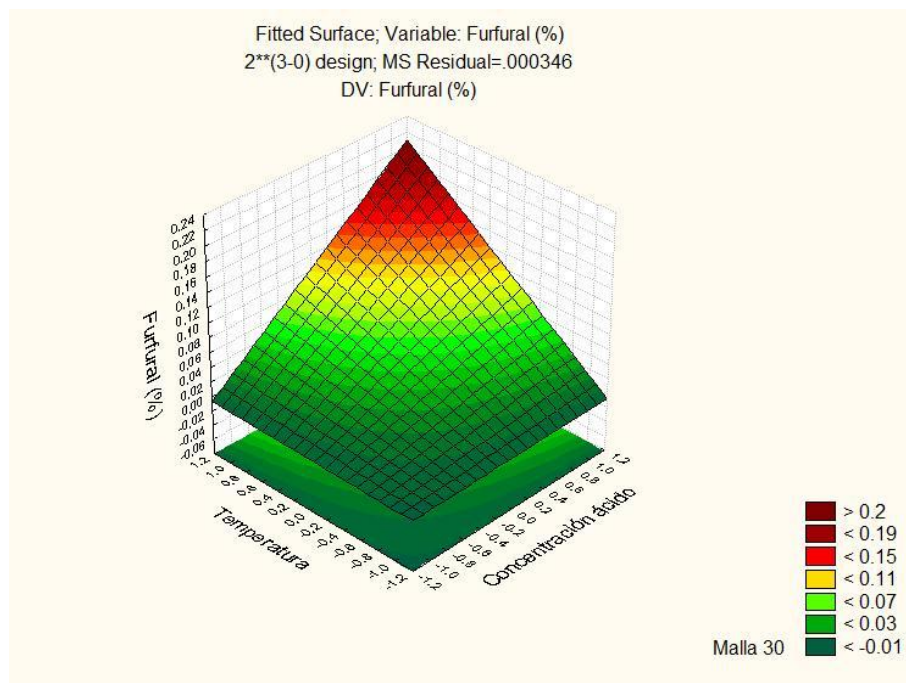


Figura 4a. Generación de furfural en el pretratamiento ácido de residuo de malta de cerveza malla 30.

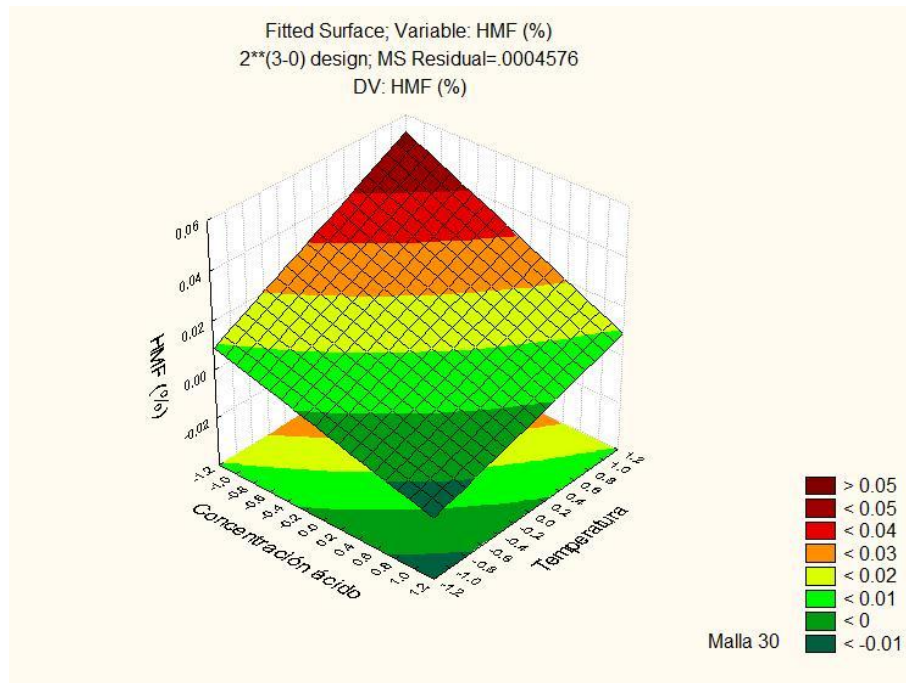


Figura 5 a. Generación de HMF en el pretratamiento ácido de residuo de malta de cerveza malla 30.

4.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

4.2.1 Determinación de unidades FPU de los cocteles enzimáticos

Se determinó la actividad de la celulasa en términos de las “unidades de papel filtro” (FPU), que utiliza la International Unión of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), para tres cocteles enzimáticos (E2, E6 y E7). Se encontró la dilución de la enzima original que se le tiene que hacer al coctel enzimático para obtener 2 mg de azúcares reductores a partir de 50 mg de papel filtro en 60 min. (Tabla 4.2).

El coctel enzimático E7 se tiene que diluir más para obtener 2 mg de azúcares reductores, lo que indica una mayor actividad de la celulasa en este coctel enzimático, seguido del coctel enzimático E2 y el coctel que presentó una menor actividad fue el E6. Se puede decir entonces que los tres cocteles utilizados contienen celulasas y hemicelulasas en diferentes cantidades y/o actividades. Se ha reportado que estos cocteles enzimáticos tienen una actividad enzimática mayor a una temperatura de 50°C, sin embargo con el coctel enzimático E7 se genera una mayor cantidad de azúcares reductores a 30°C (Tapia Peña, 2010).

Coctel enzimático	Dilución
E2	0.08
E6	0.10
E7	0.06

Tabla 4.2 Coctel enzimático y dilución para determinación unidades “FPU”.

Enzima	unidades/mL
E2	4.57
E6	3.63
E7	5.51

Tabla 4.3 Unidades “FPU” para cada coctel enzimático.

A pesar de que se determinó que el coctel enzimático E7 contiene una celulasa con una mayor actividad, para la posterior etapa de hidrólisis enzimática del sólido y del jarabe obtenido del pretratamiento ácido, se utilizó el coctel enzimático E2, ya que es con el que se contaba en mayor cantidad. Sin embargo, en posteriores estudios se podría probar el coctel enzimático E7 para determinar si es más eficiente comparado con el coctel enzimático utilizado en este estudio.

Para determinar el tiempo de reacción que utilizaríamos durante la posterior etapa de hidrólisis enzimática, se realizó una gráfica de azúcares reductores contra diferentes tiempos de reacción (Figura 6), el sustrato en este caso al igual que en la determinación de unidades FPU fue papel filtro (celulosa).

Se observó un incremento de azúcares reductores al aumentar el tiempo de hidrólisis pero fue más significativo hasta las 2 horas con alrededor de 3mg/mL, es por eso que el tiempo establecido para hacer la hidrólisis fue de 2 h. Únicamente se realizó la cinética de la obtención de azúcares reductores con respecto al tiempo por el coctel enzimático E2, para determinar el tiempo en que se realizaría la hidrólisis enzimática, por lo que no se determinó orden y velocidad de reacción, parámetros cinéticos que nos darían información específica sobre este coctel enzimático.

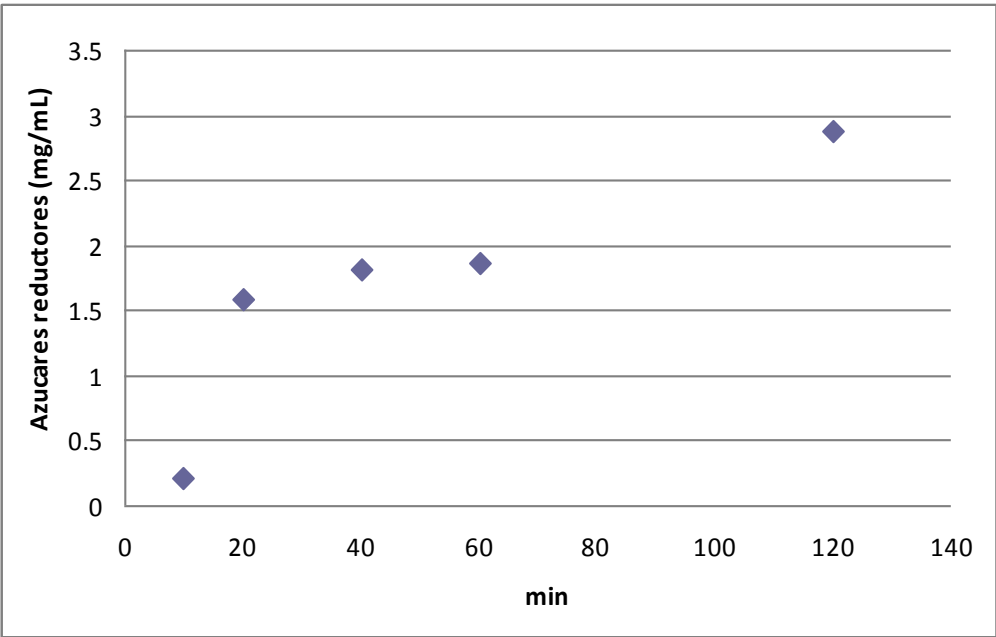


Figura 6. Cinética de obtención de azúcares reductores con respecto al tiempo por el coctel enzimático E2.

|

4.3 SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL RESIDUO DE MALTA DESPUÉS DEL PRETRATAMIENTO ÁCIDO

El efecto estimado de los factores en la sacarificación enzimática del residuo sólido proveniente del pretratamiento ácido de la malta de cerveza está dado por el modelo de regresión del diseño de experimentos mostrado en la sección 4.1. Los valores de los coeficientes de las variables de respuesta se muestran en la Tabla 4.2.

Coefficiente	Azúcares totales (g/g)	Azúcares reductores (g/g)	Grado de polimerización (GP)
β_0	0.1606	0.0436	4.3713
β_1	0.0005	0.0016	0.6296
β_2	-0.0028	-0.0776	1.0092
β_3	-0.0541	-0.0087	0.2599
β_{12}	0.0106	-0.0057	1.1641
β_{13}	0.0106	0.0048	0.6173
β_{23}	-0.0295	-0.0140	0.9701
β_{123}	-0.0054	-0.0046	0.7683

Tabla 4.2. Coeficientes de los modelos de regresión de las diferentes variables de respuesta en la sacarificación enzimática del residuo sólido de malta de cerveza pretratado por vía ácida.

4.3.1. Determinación de azúcares totales, reductores y grado de polimerización.

Se realizó la sacarificación enzimática al sólido obtenido del pretratamiento ácido, para hidrolizar a aquellos polisacáridos que no se hidrolizaron durante el pretratamiento ácido, como ya se mencionó se utilizó el coctel enzimático E2. Este coctel enzimático presenta múltiples actividades enzimáticas exo-glucanasas, endo-glucanasas, beta-glucosidasa y hemicelulasas, esto permite hidrolizar totalmente la celulosa y hemicelulosa a sus monómeros elementales. La Tabla 4.2 muestra los valores de los coeficientes de las variables de respuesta en la sacarificación enzimática del sólido obtenido en el pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza. La concentración de ácido (X_2), la temperatura del pretratamiento (X_3) y la interacción entre éstos dos factores (X_{23}) tienen un efecto negativo sobre la generación de azúcares totales (AT) y azúcares reductores (AR) en la sacarificación enzimática utilizando la enzima E2. El análisis de varianza indica que no existe efecto significativo de ninguna de las variables en estudio sobre la respuesta de generación de azúcares totales y azúcares reductores en la sacarificación enzimática del sólido resultante del pretratamiento ácido (Anexo A2; $F_{0.1, 1, 1} = 39.86$).

Las gráficas de superficie de respuesta muestran que la generación de azúcares totales (AT) y azúcares reductores (AR), aumenta en el sólido pretratado temperatura menor ($X = -1$), mayor concentración de ácido ($X = 1$), en los tres tamaños de partícula (Fig. 7a - 8a Anexo B2). Así se obtuvo alrededor de 0.26 AT/ $g_{biomasa}$ y 0.08 AR/ $g_{biomasa}$, en los tres tamaños de partícula. Lo anterior puede explicarse en función del efecto previo del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza. Es decir la temperatura influye de manera significativa en la obtención de azúcares totales y reductores durante el pretratamiento ácido, lo que genera un sólido con menor contenido de oligo y polisacáridos que puedan ser hidrolizados posteriormente en la sacarificación enzimática.

Se obtuvo una mayor cantidad de azúcares totales comparado con los azúcares reductores, esto puede indicar que en este coctel enzimático tuvo una mayor actividad de la endo- glucanasa ya que esta rompe al azar los enlaces internos de la celulosa en las zonas amorfas y decrementa la longitud de la cadena es lento el

incremento de los grupos reductores (Ponce, 2002), aunque en este estudio no se determinó el tipo de monómero presente (glucosa, manosa, galactosa, arabinosa y xilosa), por lo que no se sabe si la celulosa o hemicelulosa se hidrolizó en mayor cantidad.

En un estudio previo se observó mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ASEM) que el pretratamiento ácido ataca más la estructura e hidroliza mejor las fibras de celulosa y hemicelulosa de la malta de cerveza comparado con otro pretratamiento como el básico/oxidante (Caballero, 2010), esto puede ser una razón por la cuál no se genera una cantidad significativa de azúcares totales solubles y reductores.

Este mismo comportamiento se ha observado en diferentes materiales lignocelulósicos, que cuándo se realiza un pretratamiento ácido y posteriormente la sacarificación enzimática se obtiene un menor rendimiento de azúcares totales y reductores, por lo que no contribuye de manera significativa en la obtención de azúcares fermentables (Hernández, 2010; Tapia, 2010). Un trabajo realizado anteriormente mostró que la sacarificación enzimática del residuo de malta de cerveza sin pretratamiento previo permitió obtener 0.9 y 0.25 g de AT y AR/g de biomasa, respectivamente.

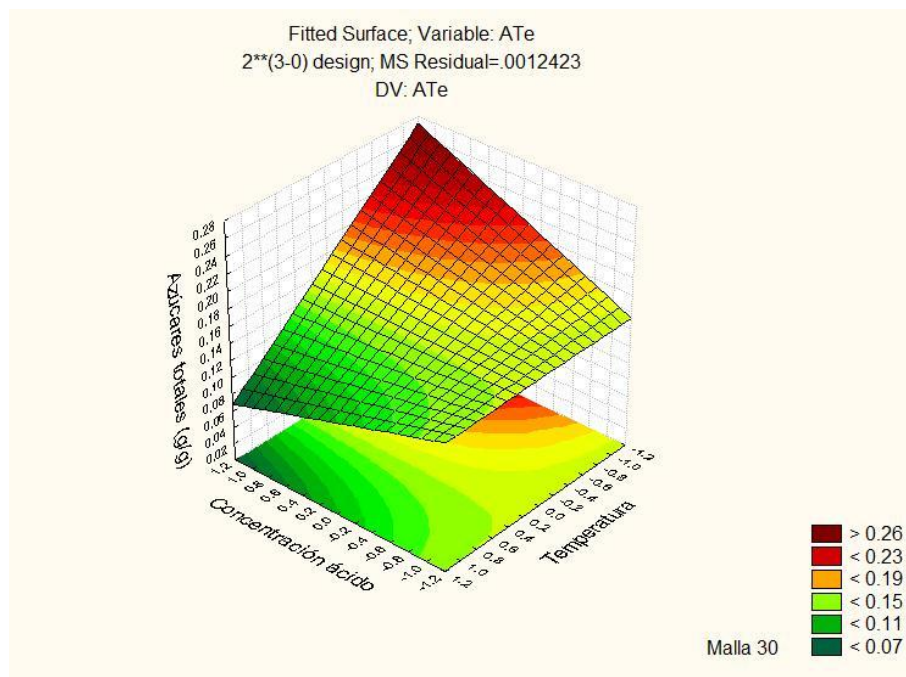


Figura 7a. Azúcares solubles totales generados por el coctel enzimático E2 en la sacarificación del sólido resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta malla 30.

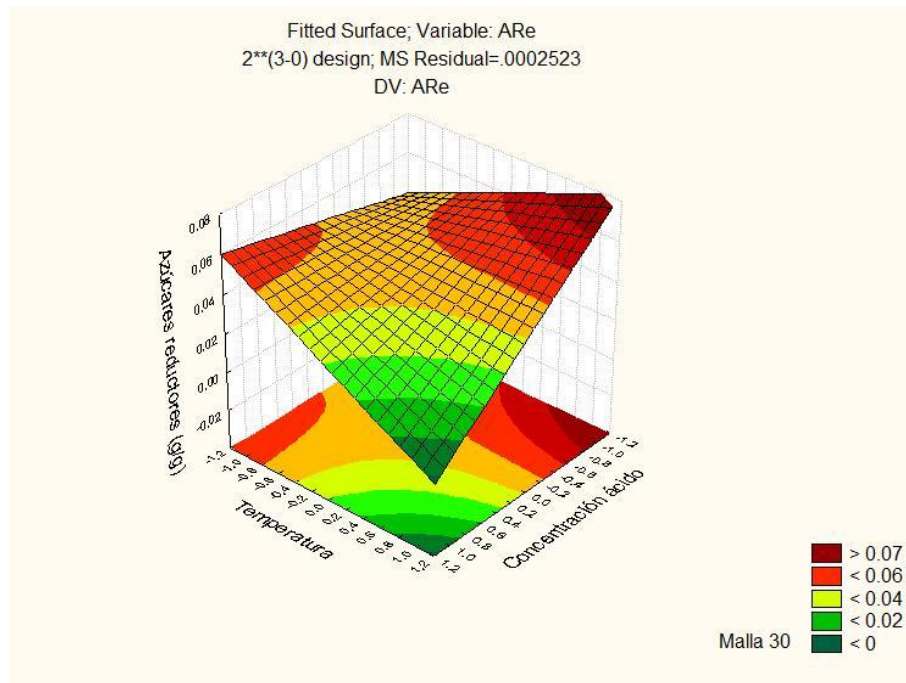


Figura 8a. Azúcares reductores generados por el coctel enzimático E2 en la sacarificación del sólido resultante del pretratamiento del residuo de malta malla 30.

En cuanto al grado de polimerización (GP), los valores de los coeficientes de la variable de respuesta indican que todas las variables independientes así como sus interacciones tienen un efecto positivo; por lo que será necesario utilizar las condiciones del pretratamiento en el nivel $X = -1$ para cada factor de manera a disminuir el valor del GP. Es decir, será necesario contar principalmente con un sólido pretratado a una baja concentración de ácido y temperatura en función de alcanzar un GP de los azúcares cercano a uno. El análisis de varianza indica que existe efecto significativo de la interacción X_{12} sobre la respuesta del GP con una confianza del 95% (Anexo A1; $F_{0.05, 1, 1} = 161.4$); así como del tamaño de partícula (X_1), concentración de ácido (X_2) y todas las interacciones con una confianza del 90% ($F_{0.1, 1, 1} = 39.86$).

Las graficas de superficie de respuesta (Fig. 9a – Anexo B2) muestra que el valor del GP es de alrededor de 3 en las condiciones es las que se obtiene una mayor cantidad de azúcares totales como de azúcares reductores, (Fig. 7a -8a, Anexo B2), es decir, de acuerdo a este estimado se tienen polímeros de 3 unidades de azúcar, por lo que el coctel enzimático no permite obtener monómeros ya que se

obtiene una cantidad mayor de azúcares totales comparado a los azúcares reductores (alrededor de 0.26 y 0.08 AT/ g_{biomasa} y AR/ g_{biomasa} respectivamente).

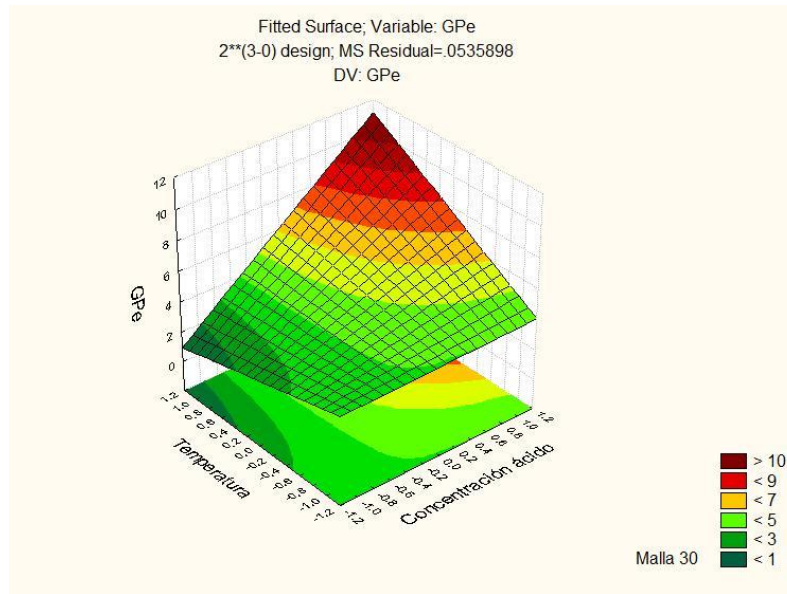


Figura 9a. Grado de polimerización de los azúcares obtenidos mediante la sacarificación enzimática del sólido resultante del pretratamiento ácido y malla 30.

4.4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL JARABE OBTENIDO EN EL PRETRATAMIENTO ÁCIDO DEL RESIDUO DE MALTA DE CERVEZA

El efecto estimado de los factores en la sacarificación enzimática del jarabe procedente del pretratamiento de malta de cerveza está dado por el modelo de regresión del diseño de experimentos mostrado en la sección 4.1. Los valores de los coeficientes de las variables de respuesta se muestran la Tabla 4.3.

	Azúcares totales	Azúcares reductores	Grado de polimerización
β_0	0.3157	0.1834	2.1791
β_1	-0.0031	0.0088	-0.0208
β_2	-0.0041	-0.0113	-0.1009
β_3	0.0977	0.1070	-0.7820
β_{12}	0.0667	0.0317	0.1069
β_{13}	-0.0090	-0.0016	0.1388
β_{23}	-0.0333	-0.0279	0.1728
β_{123}	0.0771	NA	NA

Tabla 4.3. Coeficientes de los modelos de regresión de las diferentes variables de respuesta en la sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza. NA: No aplica.

4.4.1 Determinación de Azúcares totales, reductores y grado de polimerización

Se realizó la hidrólisis enzimática con el coctel enzimático E2 a los jarabes obtenidos del pretratamiento ácido, esto con el fin de hidrolizar los polisacáridos solubles presentes y obtener una mayor cantidad de azúcares reductores (AR) que pudiesen ser utilizados en la producción fermentativa de etanol.

El análisis de los coeficientes de la variable de respuesta indica que la temperatura de tratamiento (X_3) así como las interacciones entre el tamaño partícula y concentración de ácido (X_{12}) y los tres factores (X_{123}) tienen un mayor efecto en la obtención de azúcares totales (Tabla 4.3). El análisis de varianza indica que existe efecto significativo de la temperatura (X_3) sobre la respuesta de azúcares totales con una confianza del 95% (Anexo A1; $F_{0.05, 1, 2} = 18.51$). En el caso de los azúcares reductores, los coeficientes de la variable de respuesta indican que temperatura de tratamiento (X_3) así como las interacciones entre el tamaño partícula y concentración de ácido (X_{12}) el análisis de varianza indica el efecto significativo de la temperatura (X_3) y de las interacciones X_{12} y con una confianza del 90% (Anexo A1; $F_{0.1, 1, 1} = 39.86$).

Estos mismos factores influyen en la obtención de azúcares totales y reductores antes de la hidrólisis enzimática del jarabe, debido a que todos los jarabes obtenidos del pretratamiento ácido se les realizó la hidrólisis enzimática en todos ellos hubo un incremento en la cantidad de azúcares reductores (alrededor de 0.1g AR/ g biomasa), en las condiciones utilizadas en este estudio (1mL jarabe, 0.1mL de coctel enzimático E2, 0.9 mL de buffer de citratos 0.05M pH 4.8). Esto se puede observar en las gráficas de superficie de respuesta en donde la obtención de azúcares totales así como de azúcares reductores, aumentan a las mismas condiciones de tamaño de partícula, temperatura y concentración de ácido, que los obtenidos durante el pretratamiento ácido, (Fig. 10a – Anexo B3; 11a – Anexo B3);

Este aumento en la cantidad de azúcares reductores se debe a que el coctel enzimático tiene celulasas y hemicelulasas, las cuáles se encargan de romper los enlaces de los polisacáridos presentes en los jarabes obtenidos del pretratamiento ácido (celulosa y hemicelulosa), cabe señalar que cuándo se realizó la

determinación de las unidades FPU se determinó la cantidad de azúcares reductores con sustrato y sin sustrato es decir únicamente la enzima con buffer y se observó que el coctel enzimático E2 contenía aunque en pequeña cantidad azúcares reductores (menos 10%), esto también puede contribuir aunque no significativamente en el aumento de los azúcares reductores.

Con respecto al grado de polimerización GP del jarabe hidrolizado enzimáticamente, se observa que el incremento de la temperatura (X_3) durante el pretratamiento ácido del residuo de malta permite disminuir el valor del GP, seguido de la concentración de ácido (X_2) y el menor tamaño de partícula (X_1) (Tabla 4.3). El análisis de varianza indica que existe efecto significativo solamente de la temperatura (X_3) sobre la respuesta del GP con una confianza del 95% (Anexo A1; $F_{0.05, 1, 2} = 18.51$). El GP disminuye con la temperatura ($X=1$) y un menor tamaño de partícula ($X=1$) (Fig. 12a- Anexo 3B).

Este mismo comportamiento se observa en los jarabes obtenidos del pretratamiento ácido sin hidrolizar enzimáticamente, ya que como se ha mencionado en todos los jarabes hubo un incremento en la cantidad de azúcares reductores (0.1g AR/ g biomasa). En las graficas de superficie de respuesta (Fig.12a – Anexo B3) se puede observar que el valor del GP disminuye de 2 a 3 unidades, en donde antes de la hidrólisis enzimática del jarabe se obtenían los mayores valores del GP. Es decir se podrían encontrar polímeros de menor tamaño, que puedan ser utilizados por la el microorganismo que lleve a cabo la fermentación.

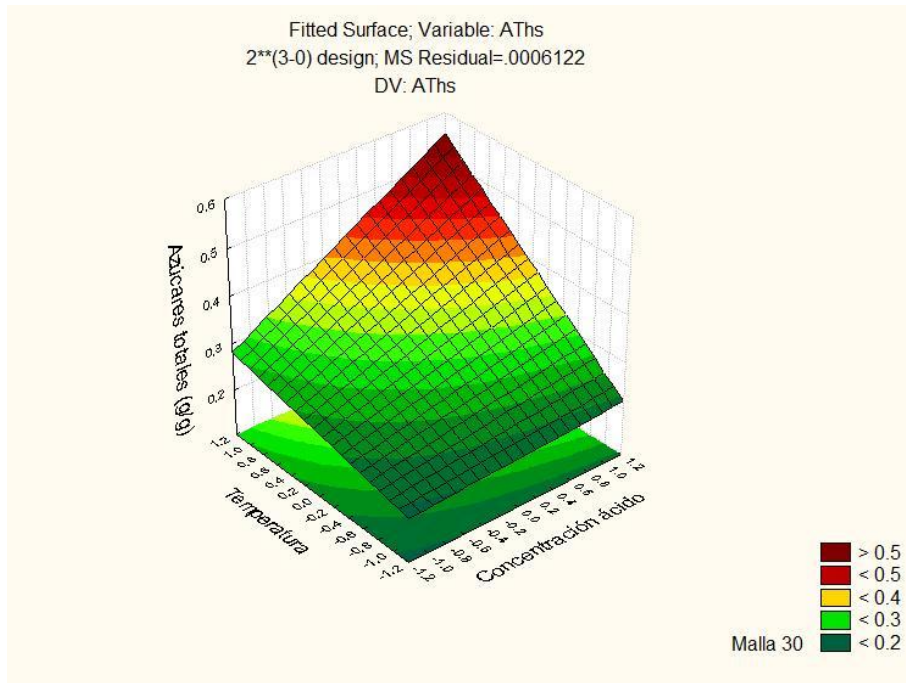


Figura 10a. Azúcares solubles totales obtenidos mediante la sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza malla 30.

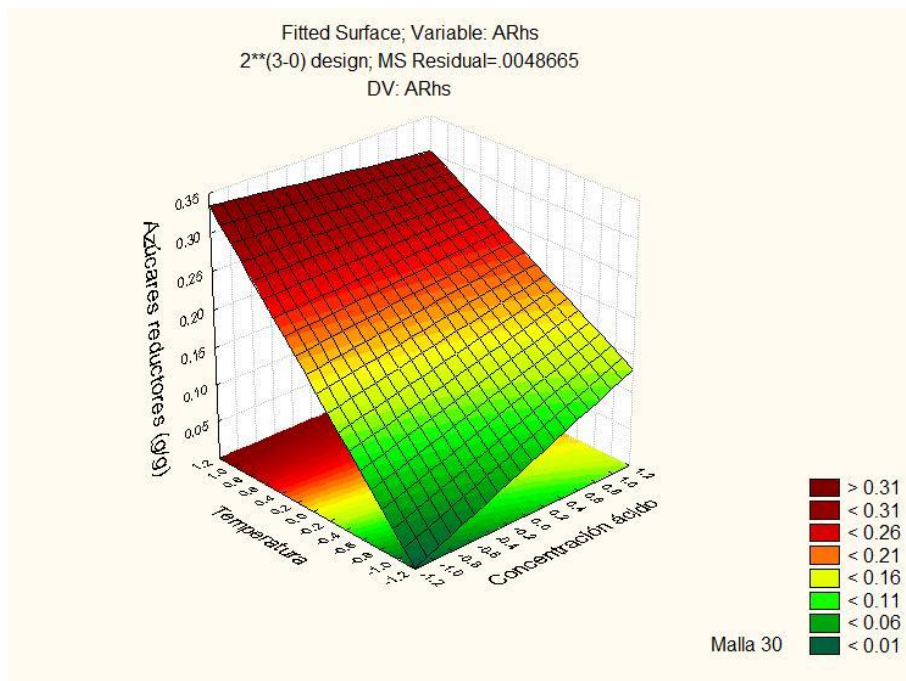


Figura 11a. Azúcares reductores obtenidos mediante la sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza malla 30.

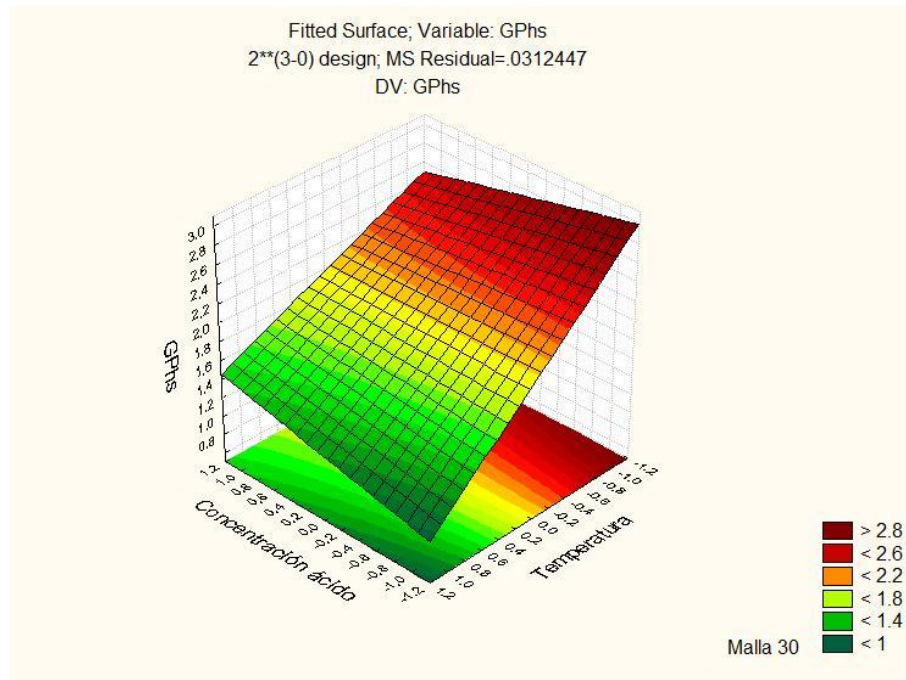


Fig. 12a. Grado de polimerización de los azúcares obtenidos mediante la sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza malla 30.

Conclusiones

- Durante la etapa de pretratamiento ácido en los residuos de malta de cerveza, se obtiene una cantidad importante de azúcares totales y reductores, la generación de azúcares totales (AT), y azúcares reductores (AR) se ve influenciado y de manera significativa con el aumento de la temperatura (120°C), seguido de la interacción de los tres factores en estudio tamaño de partícula (tamiz 30), Concentración de ácido (2.5%) y Temperatura (120°C) aunque para el caso de azúcares reductores la interacción de estos no influyen de manera significativa. En estas condiciones se obtiene 0.40 y 0.25 AT/g biomasa y AR/ g de biomasa respectivamente.
- Se obtiene un rendimiento de extracción de celulosa y hemicelulosa del 90%, de acuerdo a los datos teóricos de cada uno de estos polímeros presentes. Este rendimiento es mayor comparado al bagazo de caña, y menor respecto al salvado de trigo.
- Durante el pretratamiento ácido, se observa la formación de furfural y HMF. La formación de furfural se ve influenciado de manera significativa con el aumento de la temperatura (120°C) así como la concentración de ácido (2.5%). Se encuentra una mayor cantidad de Furfural conforme aumenta la temperatura (120°C), la concentración de ácido (2.5%) y disminuye el tamaño de partícula (tamiz 30), se obtiene alrededor de 0.21%. La formación de HMF se incrementa en gran medida con la temperatura (120°C) aunque no de manera significativa. Se forma casi la misma cantidad de HMF en los tres tamaños de partícula, se obtiene alrededor de 0.05%. Se tiene que evaluar el efecto de la formación de estos compuestos en una etapa de fermentación posterior.
- En la etapa de sacarificación enzimática del sólido resultante del pretratamiento ácido, se obtiene en general muy poca cantidad de azúcares totales y reductores con respecto a la etapa de pretratamiento, 0.25g AT/g_{biomasa} y 0.08g AR/g_{biomasa}, respectivamente. Así, la sacarificación enzimática no contribuye de manera significativa en la obtención de azúcares a partir del sólido pretratado por vía ácida. Sin embargo, es

importante mencionar que fue mayor la generación de azúcares totales y azúcares reductores en el sólido recibió el pretratamiento a una temperatura menor (85°C).

- En la sacarificación enzimática del jarabe obtenido del pretratamiento ácido, se obtienen tanto de azúcares totales como de reductores en las mismas condiciones de temperatura tamaño de partícula y concentración de ácido que en el pretratamiento ácido. Se observa un incremento en la obtención de azúcares reductores, de alrededor de 0.10 g AR/g_{biomasa}.

Recomendaciones.

- Determinar la cantidad y tipo de monosacáridos (glucosa, manosa, galactosa, arabinosa y xilosa) presente en el jarabe proveniente del pretratamiento ácido, para así determinar cual microorganismo es más adecuado utilizar para la etapa de fermentación.
- Determinar si durante el pretratamiento ácido se forman otros compuestos de degradación térmica y de fragmentación que no fueron determinados en este estudio. Así como probar diferentes métodos físico-químicos para determinar cuál es el mejor para disminuir o eliminar su presencia.
- Realizar la fermentación de los jarabes obtenidos del pretratamiento ácido, así como determinar que tanto influye en esta etapa la formación de compuestos de deshidratación térmica (HMF y furfural) debido a que se determinó la presencia de estos compuestos.

ANEXOS

Anexo A. ANOVAs del diseño de experimentos

A.1 Pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0.053121	1	0.053121	157.5999	0.050604
(1)Tamaño de partícula	0.000006	1	0.000006	0.0166	0.918317
(2)Concentración ácido	0.000429	1	0.000429	1.2736	0.461600
(3)Temperatura	0.034037	1	0.034037	100.9811	0.063144
1 by 2	0.013574	1	0.013574	40.2719	0.099500
1 by 3	0.000309	1	0.000309	0.9166	0.513847
2 by 3	0.007132	1	0.007132	21.1596	0.136277
1*2*3	0.019902	1	0.019902	59.0441	0.082387
Error	0.000337	1	0.000337		
Total SS	0.128847	9			

Tabla A.1.1. ANOVA del modelo 2^3 para la respuesta de azúcares totales (AT)

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0.013613	1	0.013613	16.29226	0.154608
(1)Tamaño de partícula	0.000461	1	0.000461	0.55200	0.593209
(2)Concentración ácido	0.001650	1	0.001650	1.97430	0.393769
(3)Temperatura	0.044146	1	0.044146	52.83589	0.087036
1 by 2	0.000709	1	0.000709	0.84861	0.526097
1 by 3	0.004008	1	0.004008	4.79730	0.272664
2 by 3	0.005754	1	0.005754	6.88667	0.231777
1*2*3	0.008072	1	0.008072	9.66057	0.198165
Error	0.000836	1	0.000836		
Total SS	0.079248	9			

Tabla A.1.2. ANOVA del modelo 2^3 para la respuesta de azúcares reductores (AR)

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	2.35951	1	2.35951	70.2412	0.075602
(1)Tamaño de partícula	1.78577	1	1.78577	53.1612	0.086772
(2)Concentración ácido	0.66329	1	0.66329	19.7457	0.140919
(3)Temperatura	18.97853	1	18.97853	564.9802	0.026767
1 by 2	6.11968	1	6.11968	182.1793	0.047080
1 by 3	5.11043	1	5.11043	152.1347	0.051501
2 by 3	0.02855	1	0.02855	0.8498	0.525867
1*2*3	6.01402	1	6.01402	179.0339	0.047490
Error	0.03359	1	0.03359		
Total SS	41.09336	9			

Tabla A.1.3. ANOVA del modelo 2³ para la respuesta del grado de polimerización (GP)

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0.002165	1	0.002165	6.25691	0.129495
(1)Tamaño de partícula	0.000692	1	0.000692	2.00000	0.292893
(2)Concentración ácido	0.010825	1	0.010825	31.28456	0.030509
(3)Temperatura	0.010825	1	0.010825	31.28456	0.030509
1 by 2	0.000692	1	0.000692	2.00000	0.292893
1 by 3	0.000692	1	0.000692	2.00000	0.292893
2 by 3	0.010825	1	0.010825	31.28456	0.030509
Error	0.000692	2	0.000346		
Total SS	0.037406	9			

Tabla A.1.4. ANOVA del modelo 2³ para la respuesta de furfural

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0.000589	1	0.000589	1.287512	0.374191
(1)Tamaño de partícula	0.000206	1	0.000206	0.449218	0.571733
(2)Concentración ácido	0.000094	1	0.000094	0.205013	0.695081
(3)Temperatura	0.002946	1	0.002946	6.437559	0.126522
1 by 2	0.000915	1	0.000915	2.000000	0.292893
1 by 3	0.000206	1	0.000206	0.449218	0.571733
2 by 3	0.000094	1	0.000094	0.205013	0.695081
Error	0.000915	2	0.000458		
Total SS	0.005964	9			

Tabla A.1.5. ANOVA del modelo 2³ para la respuesta de hidroximetilfurfural (HMF)

A.2 Sacarificación enzimática del residuo sólido resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0.002681	1	0.002681	2.15771	0.380512
(1)Tamaño de partícula	0.000003	1	0.000003	0.00216	0.970444
(2)Concentración ácido	0.000063	1	0.000063	0.05105	0.858530
(3)Temperatura	0.023452	1	0.023452	18.87744	0.144016
1 by 2	0.000914	1	0.000914	0.73586	0.548625
1 by 3	0.000911	1	0.000911	0.73291	0.549257
2 by 3	0.006976	1	0.006976	5.61552	0.254216
1*2*3	0.000234	1	0.000234	0.18863	0.739158
Error	0.001242	1	0.001242		
Total SS	0.036477	9			

Tabla A.2.1. ANOVA del modelo 2³ para la respuesta de azúcares totales (AT)

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0.000694	1	0.000694	2.750538	0.345427
(1)Tamaño de partícula	0.000023	1	0.000023	0.089838	0.814611
(2)Concentración ácido	0.000482	1	0.000482	1.912204	0.398587
(3)Temperatura	0.000607	1	0.000607	2.406840	0.364500
1 by 2	0.000262	1	0.000262	1.037404	0.494156
1 by 3	0.000191	1	0.000191	0.758576	0.543837
2 by 3	0.001586	1	0.001586	6.285396	0.241619
1*2*3	0.000170	1	0.000170	0.675323	0.562081
Error	0.000252	1	0.000252		
Total SS	0.004267	9			

Tabla A.2.2. ANOVA del modelo 2³ para la respuesta de azúcares reductores (AR)

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	2.35600	1	2.35600	43.9635	0.095296
(1)Tamaño de partícula	3.17120	1	3.17120	59.1756	0.082296
(2)Concentración ácido	8.14749	1	8.14749	152.0345	0.051518
(3)Temperatura	0.54051	1	0.54051	10.0860	0.194200
1 by 2	10.84070	1	10.84070	202.2906	0.044687
1 by 3	3.04853	1	3.04853	56.8865	0.083917
2 by 3	7.52878	1	7.52878	140.4892	0.053584
1*2*3	4.72237	1	4.72237	88.1207	0.067563
Error	0.05359	1	0.05359		
Total SS	40.40918	9			

Tabla A.2.3. ANOVA del modelo 2³ para la respuesta del grado de polimerización (GP)

A.3 Sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0.053949	1	0.053949	11.08576	0.079586
(1)Tamaño de partícula	0.000626	1	0.000626	0.12856	0.754243
(2)Concentración ácido	0.001038	1	0.001038	0.21326	0.689586
(3)Temperatura	0.091596	1	0.091596	18.82158	0.049239
1 by 2	0.008074	1	0.008074	1.65913	0.326634
1 by 3	0.000022	1	0.000022	0.00461	0.952068
2 by 3	0.006258	1	0.006258	1.28593	0.374424
Error	0.009733	2	0.004867		
Total SS	0.171296	9			

Tabla A.3.1. ANOVA del modelo 2³ para la respuesta de azúcares totales (AT)

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0.064981	1	0.064981	106.1465	0.061598
(1)Tamaño de partícula	0.000081	1	0.000081	0.1330	0.777389
(2)Concentración ácido	0.000135	1	0.000135	0.2200	0.720768
(3)Temperatura	0.076490	1	0.076490	124.9459	0.056802
1 by 2	0.035653	1	0.035653	58.2386	0.082948
1 by 3	0.000648	1	0.000648	1.0588	0.490908
2 by 3	0.008888	1	0.008888	14.5183	0.163394
1*2*3	0.047606	1	0.047606	77.7641	0.071885
Error	0.000612	1	0.000612		
Total SS	0.235094	9			

Tabla A.3.2. ANOVA del modelo 2³ para la respuesta de azúcares reductores (AR)

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0.932050	1	0.932050	29.8307	0.031926
(1)Tamaño de partícula	0.347336	1	0.347336	11.1166	0.079391
(2)Concentración ácido	0.081588	1	0.081588	2.6113	0.247484
(3)Temperatura	4.892593	1	4.892593	156.5895	0.006326
1 by 2	0.091563	1	0.091563	2.9305	0.229051
1 by 3	0.154222	1	0.154222	4.9359	0.156408
2 by 3	0.239002	1	0.239002	7.6494	0.109645
Error	0.062489	2	0.031245		
Total SS	6.800844	9			

Tabla A.3.3. ANOVA del modelo 2³ para la respuesta del grado de polimerización (GP)

Anexo B. Curvas de superficie de respuesta del diseño de experimentos

B.1 Pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza

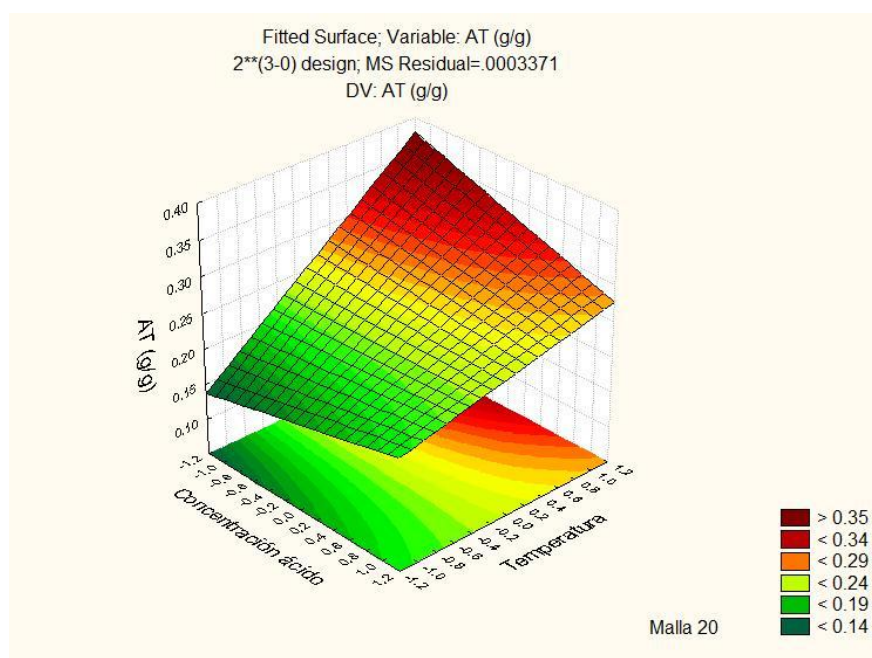


Figura B.1.1. Generación de azúcares totales en residuos de malta de cerveza malla 20 en el pretratamiento ácido.

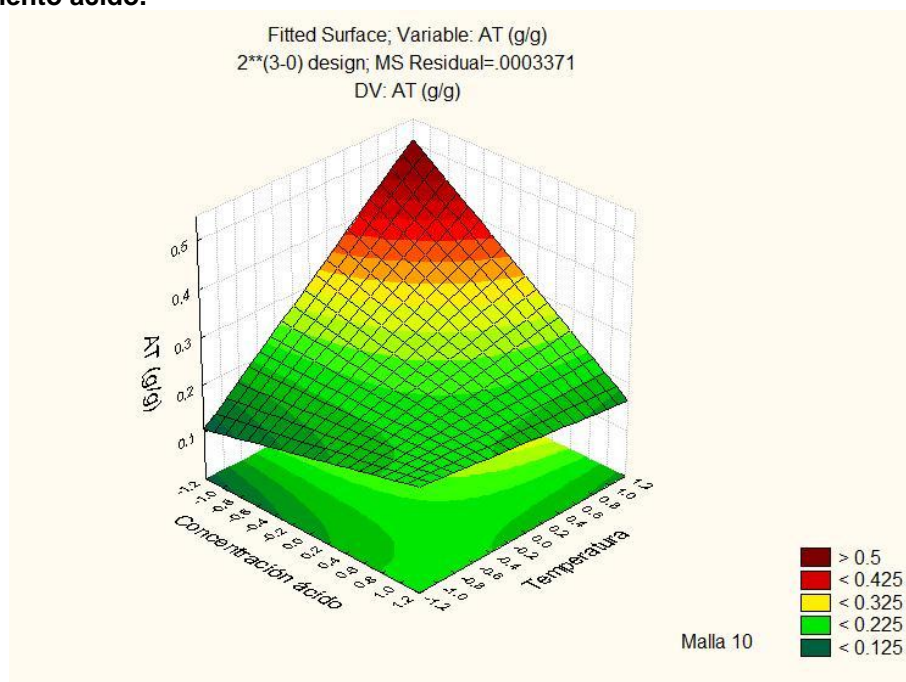


Figura B.1.2 Generación de azúcares totales en residuos de malta de cerveza malla 10 en el pretratamiento ácido.

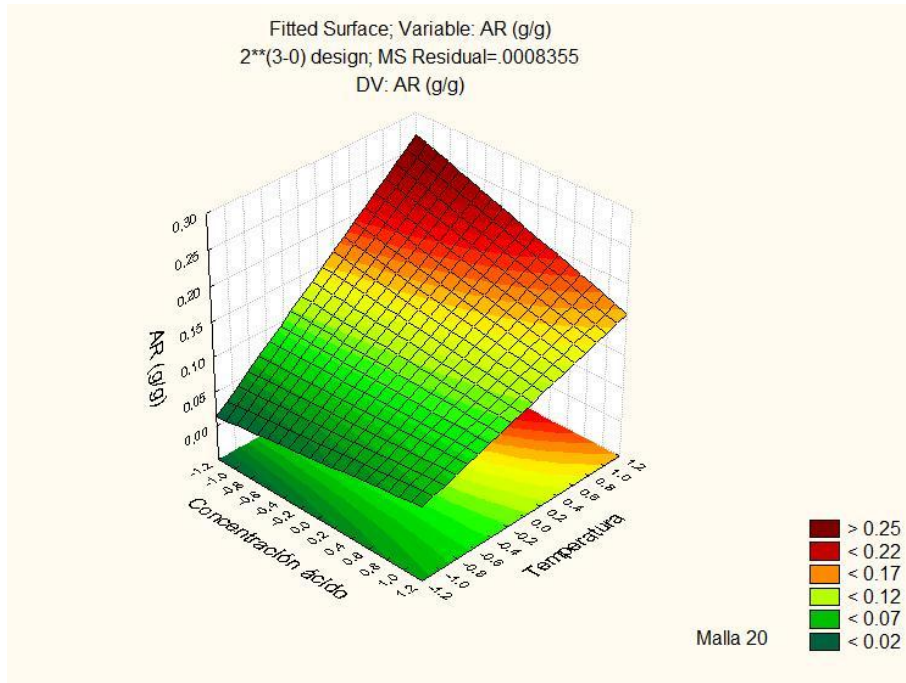


Figura B.1.3 Generación de azúcares reductores en residuos de malta de cerveza malla 20 en el pretratamiento ácido.

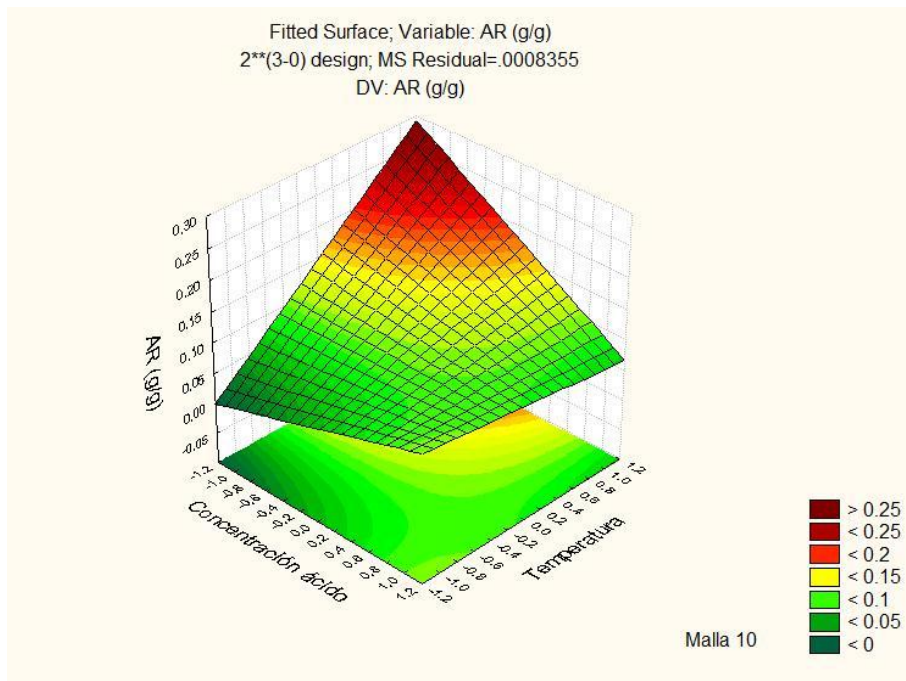


Figura B.1.4 Generación de azúcares reductores en residuos de malta malla 10 en el pretratamiento ácido.

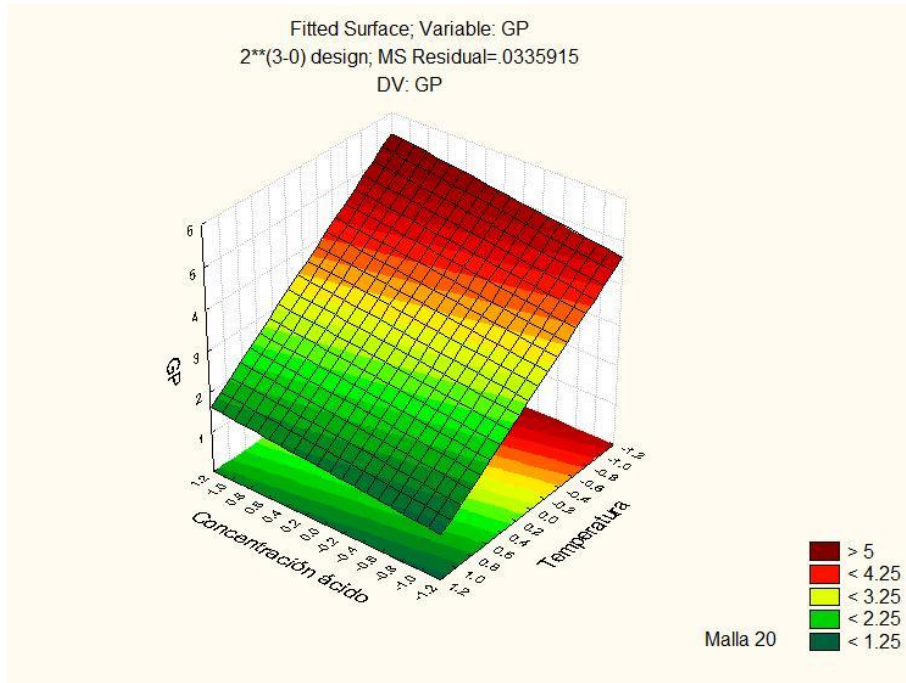


Figura B.1.5 Grado de Polimerización de los azúcares presentes en el jarabe proveniente del pretratamiento ácido. Residuos de malta de cerveza malla 20.

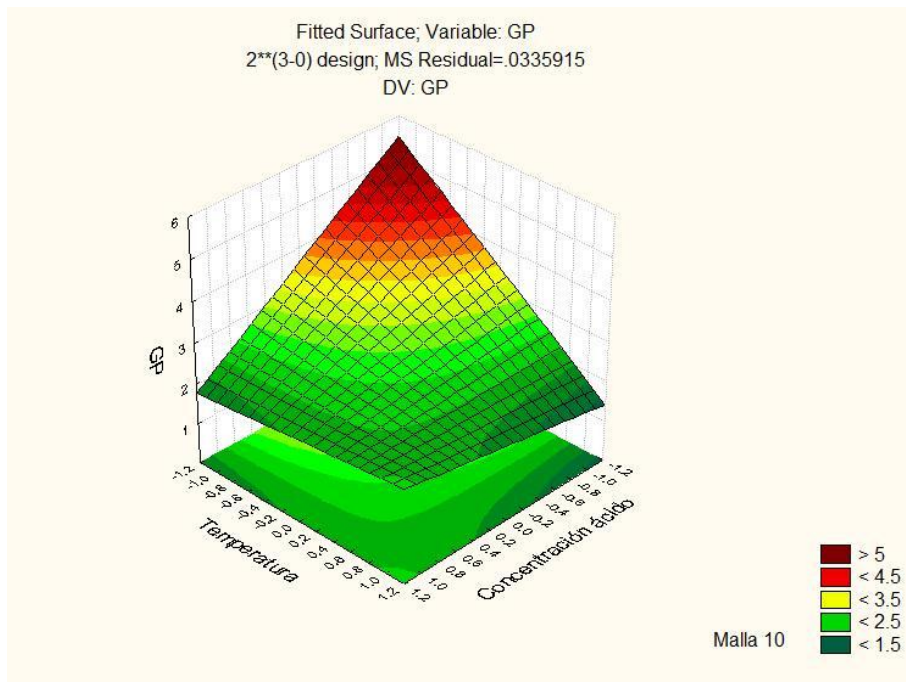


Figura B.1.6 Grado de Polimerización de los azúcares presentes en el jarabe proveniente del pretratamiento ácido. Residuos de malta de cerveza malla 10.

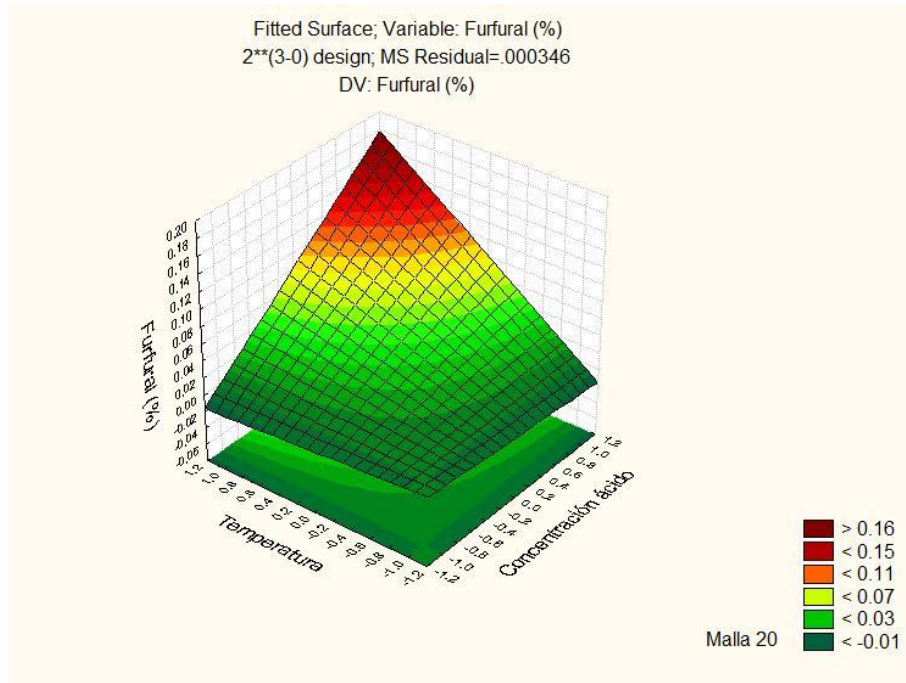


Figura B.1.7 Generación de furfural en el pretratamiento ácido de residuo de malta de cerveza malla 20.

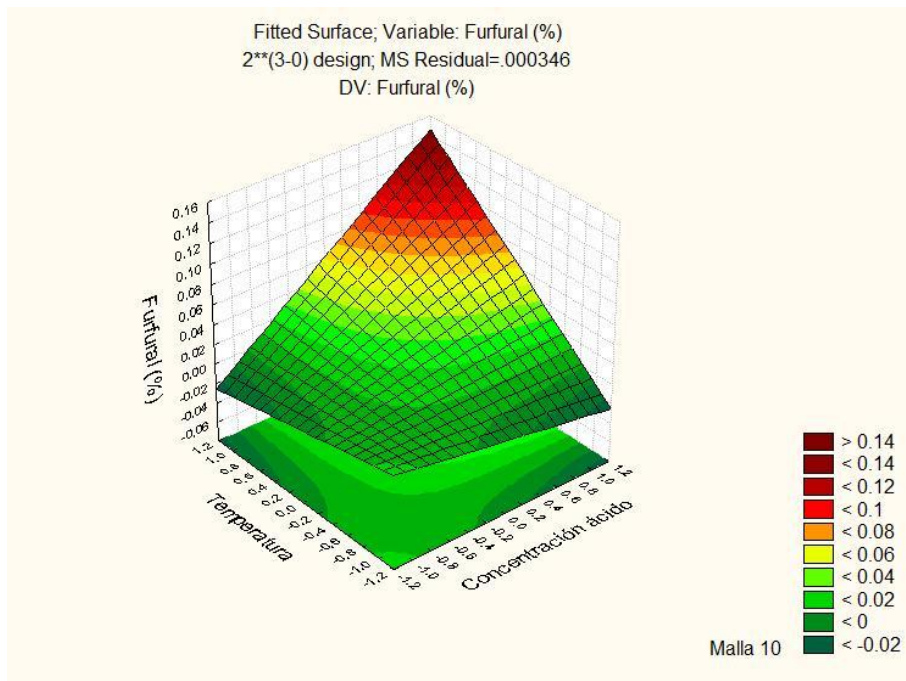


Figura B.1.8. Generación de furfural en el pretratamiento ácido de residuo de malta de cerveza malla 10.

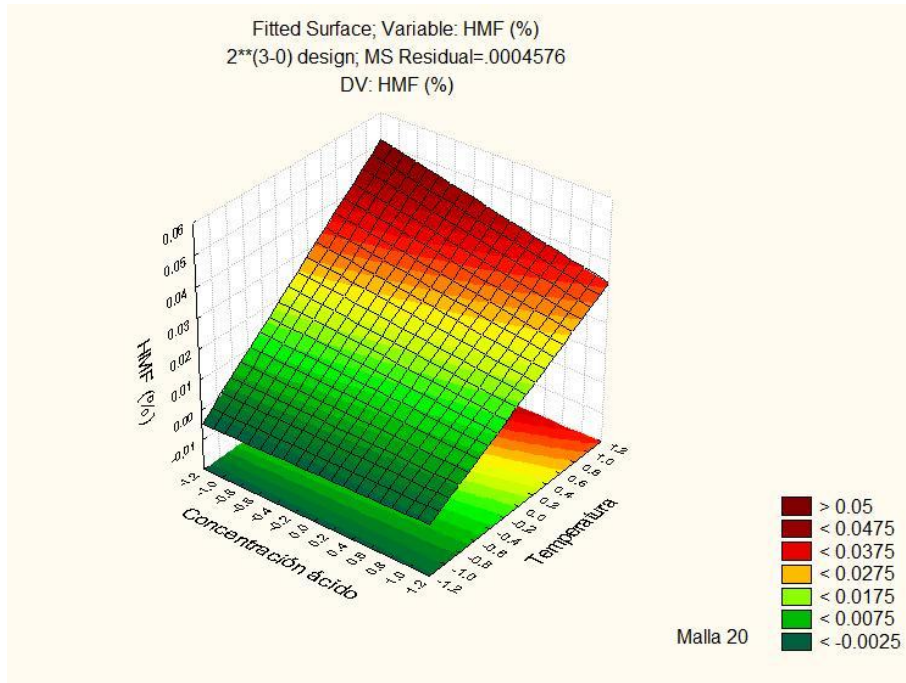


Figura B.1.9 Generación de HMF en el pretratamiento ácido de residuo de malta de cerveza malla 20.

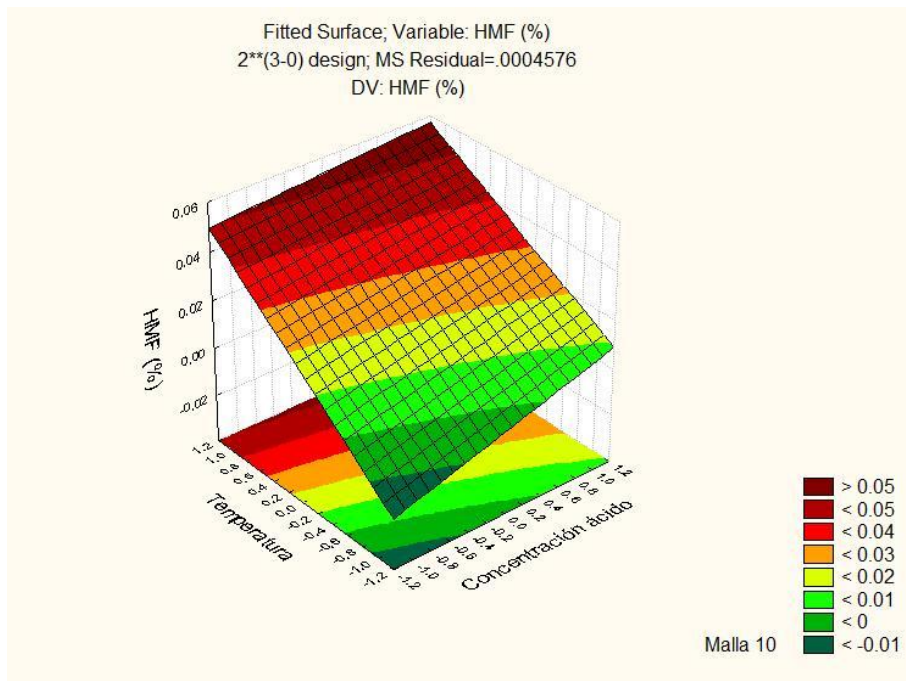


Figura B.1.10 Generación de HMF en el pretratamiento ácido de residuo de malta de cerveza malla 10.

B.2 Sacarificación enzimática del residuo sólido resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza

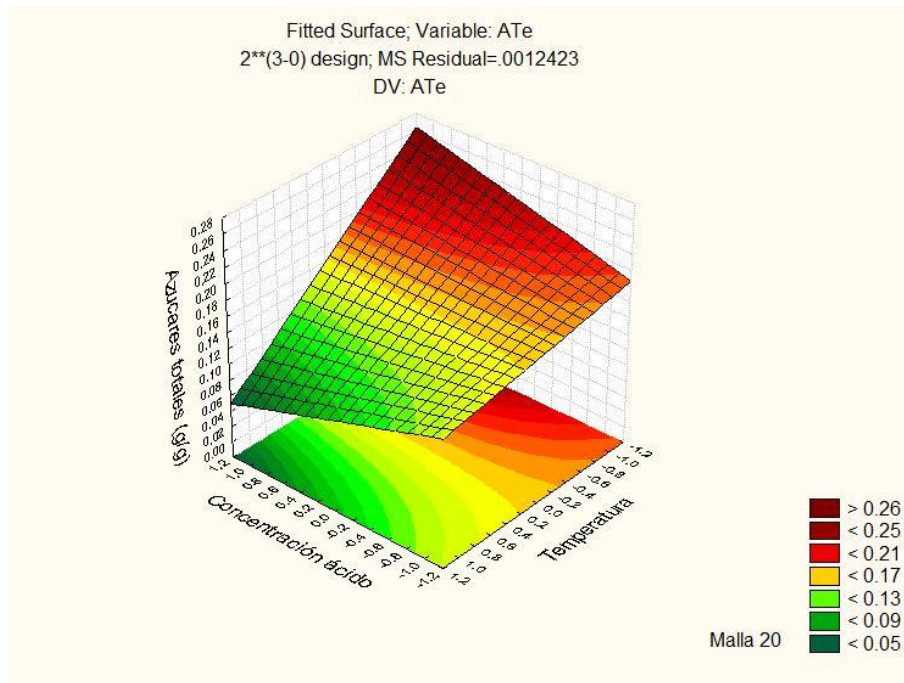


Figura B.2.1 Azúcares totales generados por el coctel enzimático E2 en la sacarificación del sólido resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta malla 20.

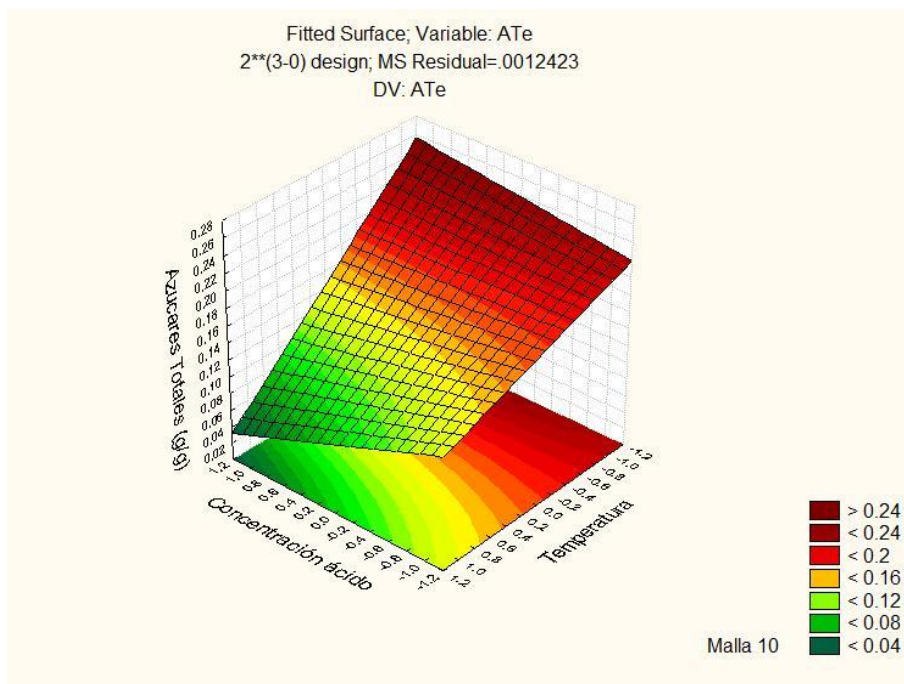


Figura B.2.2 Azúcares totales generados por el coctel enzimático E2 en la sacarificación del sólido resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta malla 10.

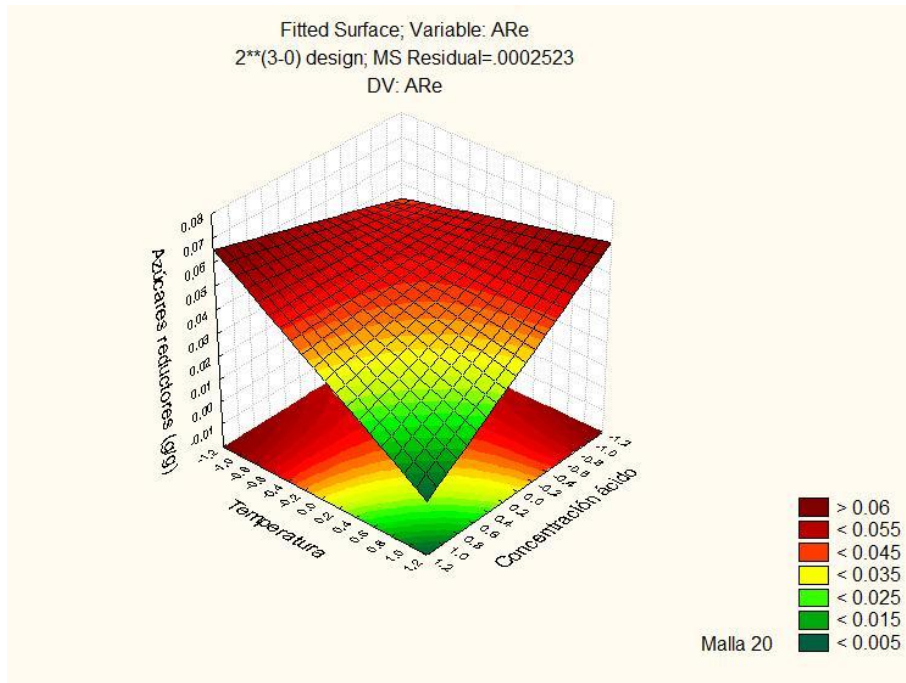


Figura B.2.3 Azúcares reductores generados por el coctel enzimático E2 en la sacarificación del sólido resultante del pretratamiento del residuo de malta malla 20.

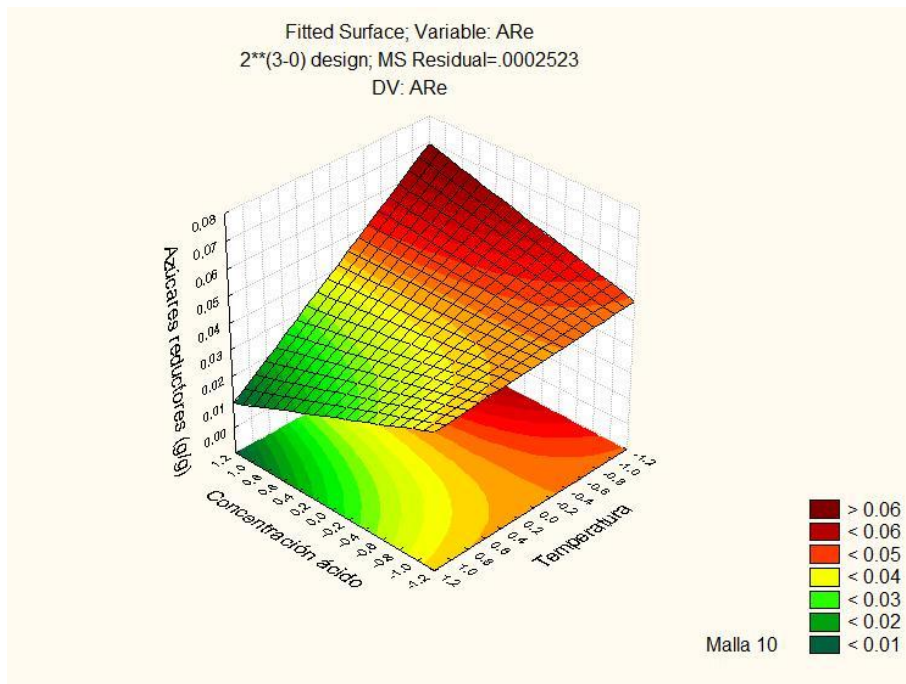


Figura B.2.4 Azúcares reductores generados por el coctel enzimático E2 en la sacarificación del sólido resultante del pretratamiento del residuo de malta malla 10.

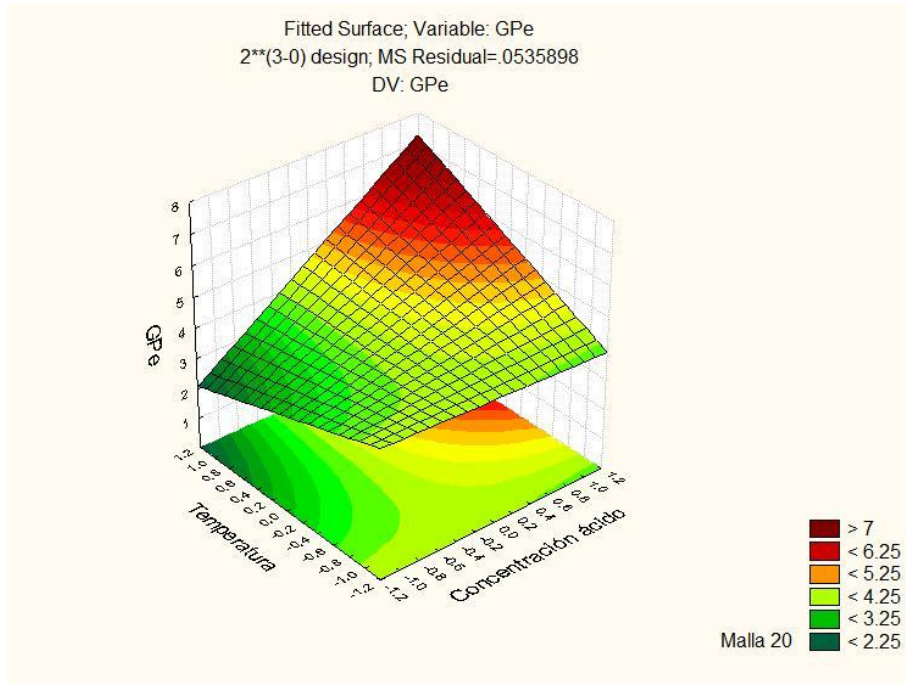


Figura B.2.5 Grado de polimerización de los azúcares obtenidos mediante la sacarificación enzimática del sólido resultante del pretratamiento ácido y malla 20.

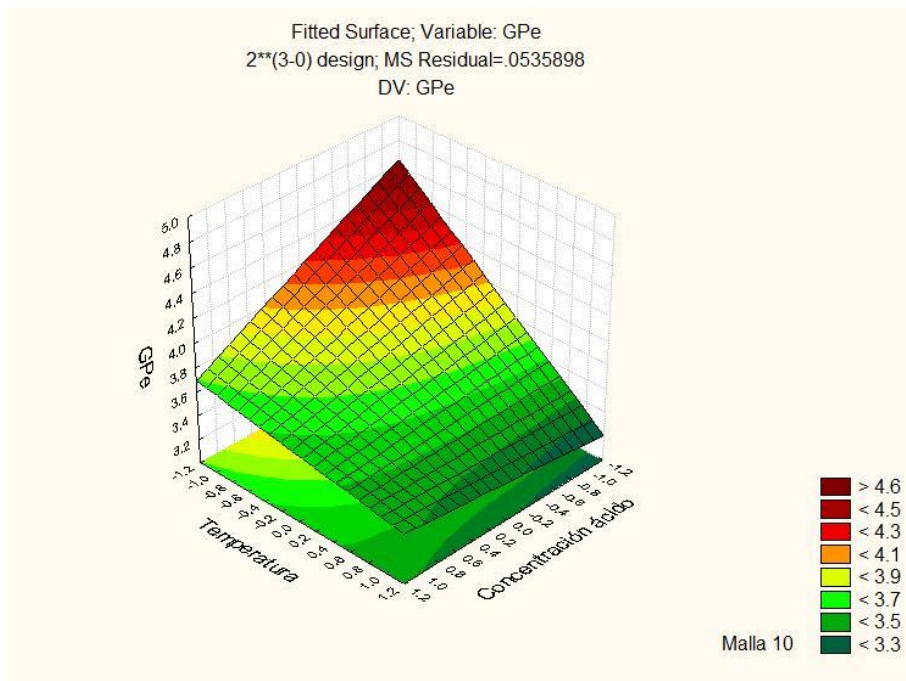


Figura B.2.6 Grado de polimerización de los azúcares obtenidos mediante la sacarificación enzimática del sólido resultante del pretratamiento ácido y malla 10.

B.3 Sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza.

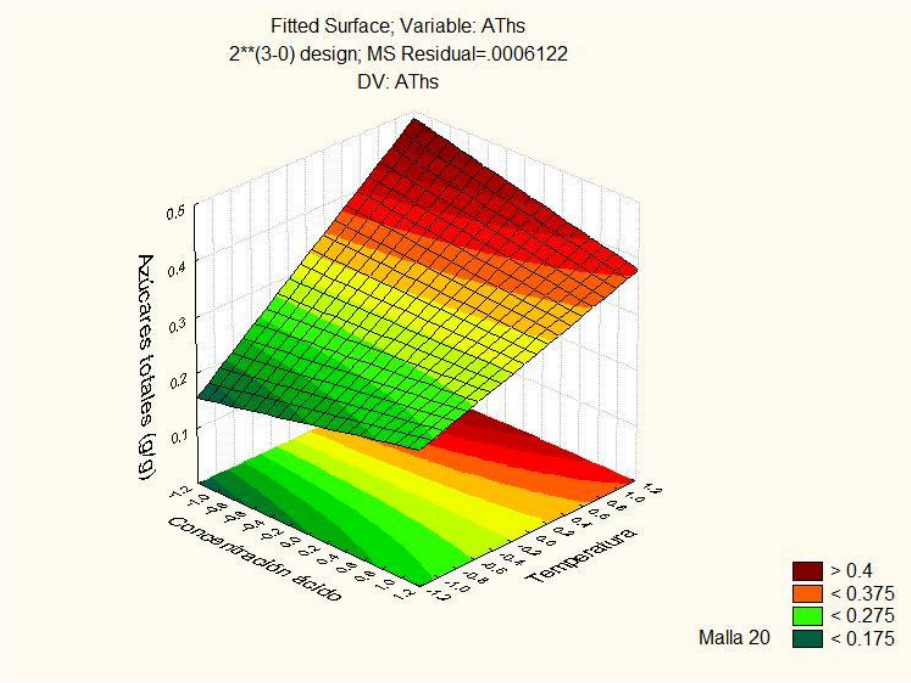


Figura B.3.1 Azúcares totales obtenidos mediante la sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza malla 20.

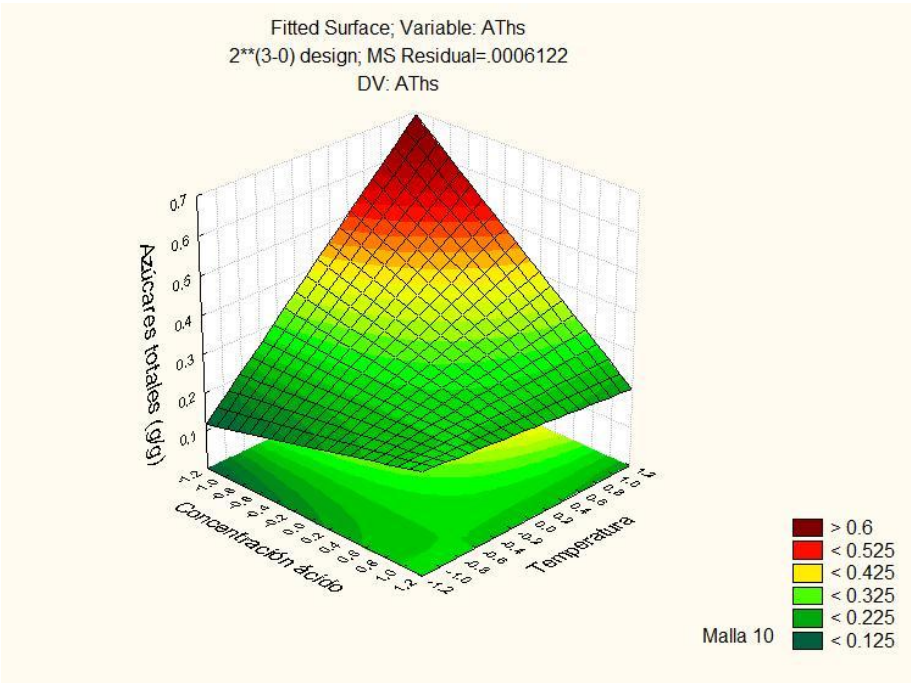


Figura B.3.2 Azúcares totales obtenidos mediante la sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza malla 10.

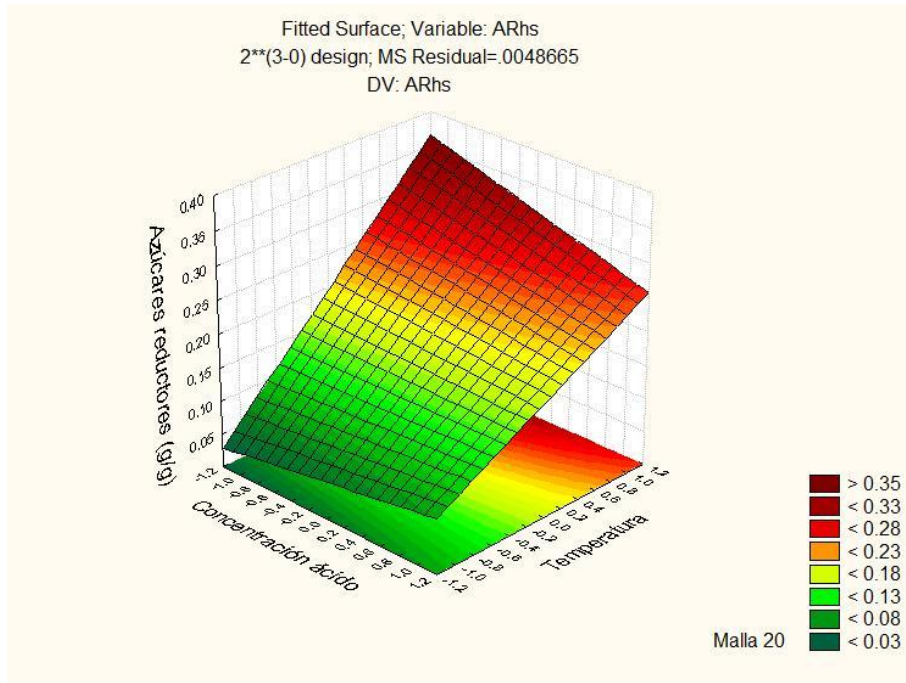


Figura B.3.3 Azúcares reductores obtenidos mediante la sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza malla 20.

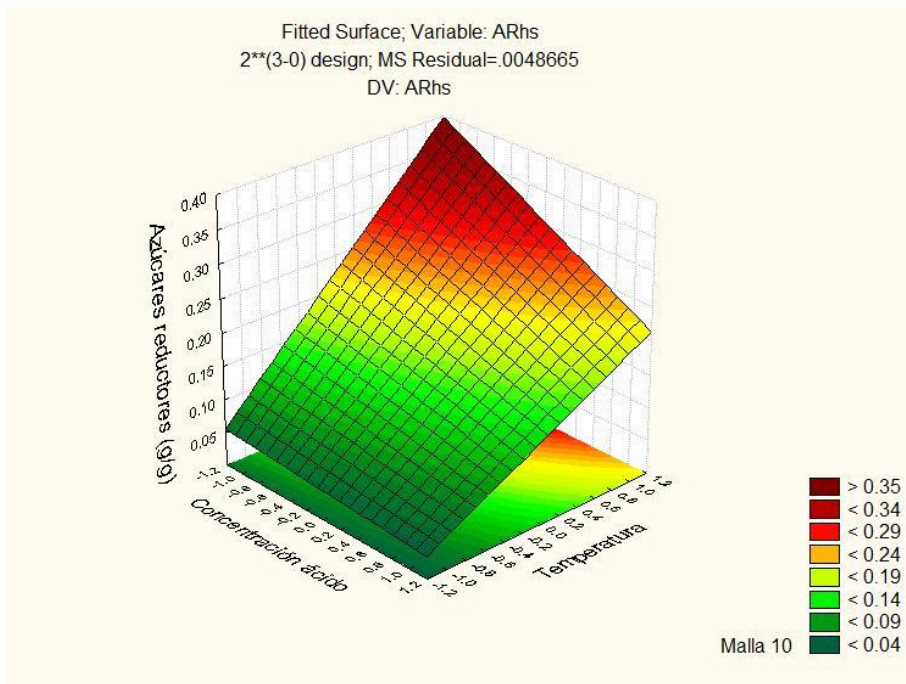


Fig. B.3.4 Azúcares reductores obtenidos mediante la sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza malla 10.

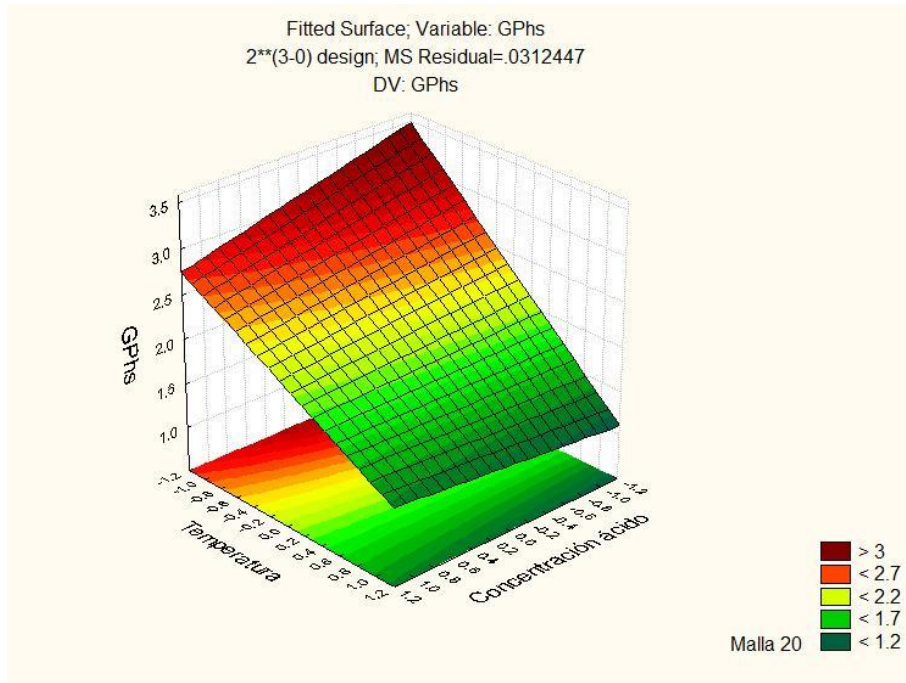


Fig. B.3.5 Grado de polimerización de los azúcares obtenidos mediante la sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza malla 20.

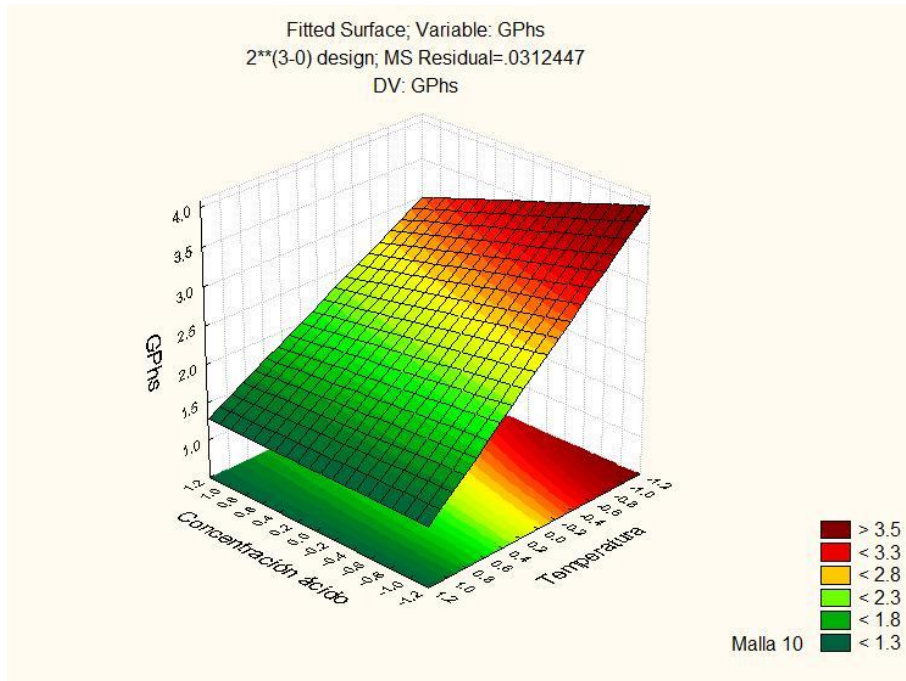
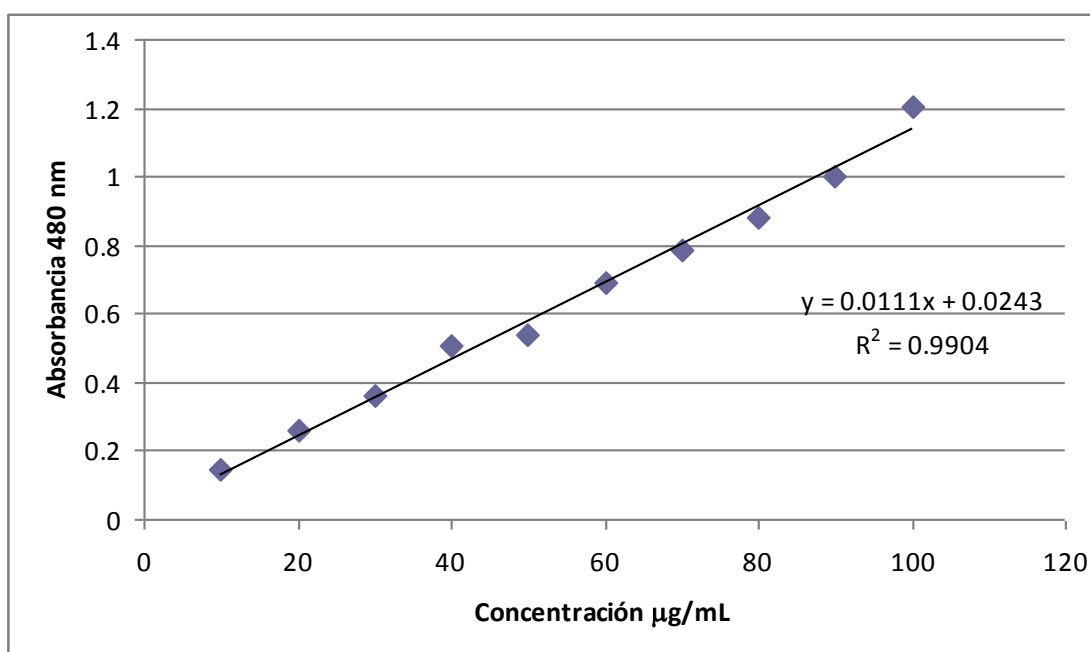


Fig. B.3.6 Grado de polimerización de los azúcares obtenidos mediante la sacarificación enzimática del jarabe resultante del pretratamiento ácido del residuo de malta de cerveza malla 10.

Anexo C. Curva patrón azúcares Totales (Fenol/ H₂SO₄)

Concentración (µg/mL)	Absorbancia 480 nm
10	0.143
20	0.259
30	0.358
40	0.505
50	0.539
60	0.688
70	0.788
80	0.882
90	1.001
100	1.206

Tabla C. Datos curva patrón azúcares totales (Fenol/ H₂SO₄).

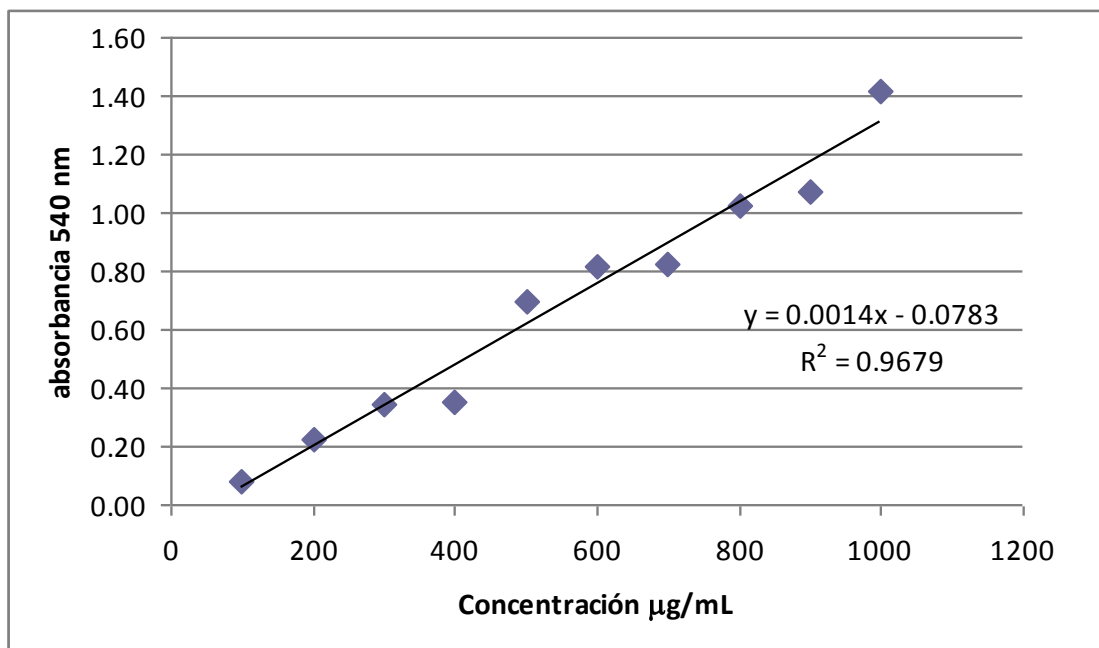


Gráfica C. Curva patrón azúcares totales (Fenol/ H₂SO₄).

Anexo D. Curva patrón azúcares reductores (DNS)

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia 540 nm
100	0.08
200	0.226
300	0.343
400	0.354
500	0.697
600	0.818
700	0.825
800	1.022
900	1.074
1000	1.418

Tabla D. Datos curva patrón azúcares reductores (DNS).



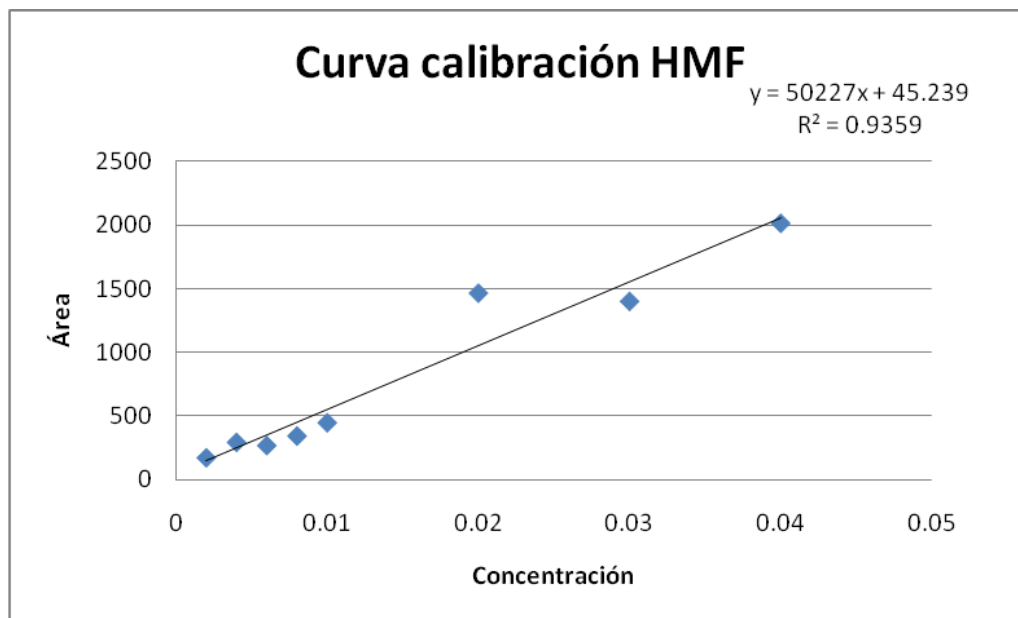
Gráfica D. Curva patrón azúcares reductores (DNS).

Anexo E. Curva patrón HMF y furfural.

HMF

Determinación	Concentración %	Área	Promedio
1	0.002	171.5	169.2
		166.9	
2	0.004	296.3	290.55
		284.8	
3	0.006	254.7	265.25
		275.8	
4	0.008	337.4	340.1
		342.8	
5	0.01	448.2	444.65
		441.1	
6	0.02	1474	1464.95
		1455.9	
7	0.03	1342.9	1399.95
		1457	
8	0.04	1971.3	2014.5
		2057.7	

Tabla E1. Datos curva HMF.

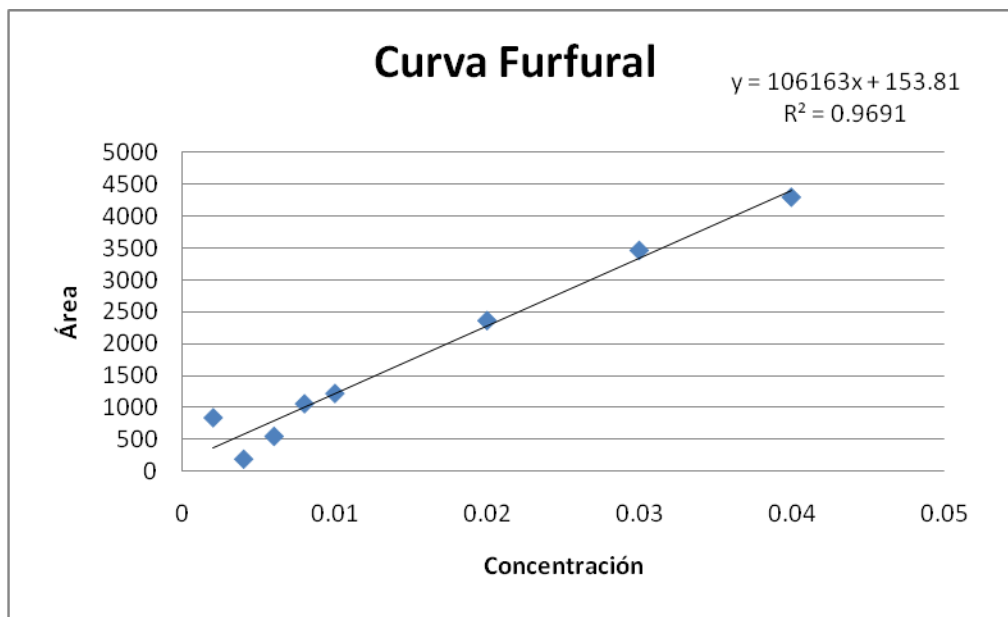


Grafica E1. Curva de calibración HMF.

Furfural

Determinación	Concentración	Área	Promedio área
1	0.002	828.8	836.3
		843.8	
2	0.004	201.5	184.3
		167.1	
3	0.006	346.6	542.85
		739.1	
4	0.008	1052.4	1056.15
		1059.9	
5	0.01	1197.6	1217.3
		1237	
6	0.02	2241.1	2363.15
		2485.2	
7	0.03	3563	3466.6
		3369	
8	0.04	4291.8	4303.4
		4315	

Tabla E2. Datos curva furfural.



Gráfica E2. Curva de calibración furfural.

Anexo F. Diluciones probadas para los diferentes cocteles enzimáticos (E2, E6, E7) y la generación de azúcares reductores para cada una de estos.

Se probaron diferentes diluciones de cada coctel enzimático y se determinó la cantidad de azúcares reductores generados para cada coctel enzimático (Tabla E1, E2, E3).

Coctel enzimático E2

Aforo		Dilución	(mg azúcares reductores /0.5 mL dilución enzima)
0.2 mL del coctel enzimático	1 mL (0.2 mL coctel enzimático + 0.8mL agua destilada)	0.2 (dilución1)	3.82
0.9 mL de dilución 1	1.8 mL (0.9 mL dilución 1 + 0.9 mL agua destilada)	0.1 (dilución 2)	3.29
1 mL de dilución 2	2 mL (1 mL dilución 2 + 1 mL agua destilada)	0.05 (dilución 3)	1.16

Tabla F1. Diluciones para coctel enzimático E2 y azúcares reductores generados.

Coctel enzimático E6

Aforo		Dilución	(mg azúcares reductores /0.5 mL dilución enzima)
0.2 mL del coctel enzimático	1 mL (0.2 mL coctel enzimático + 0.8 mL agua destilada)	0.2 (dilución 4)	4.81
0.9 mL de dilución 4	2 mL (0.9 mL dilución 4 + 1.1mL agua destilada)	0.09 (dilución 5)	1.66

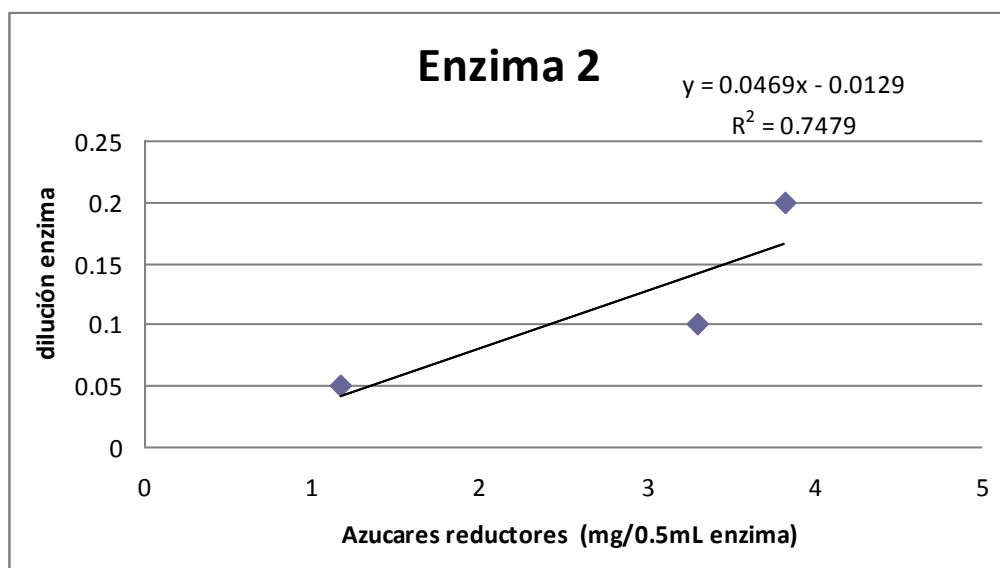
Tabla F2. Diluciones para coctel enzimático E6 y azúcares reductores generados.

Coctel enzimático E7

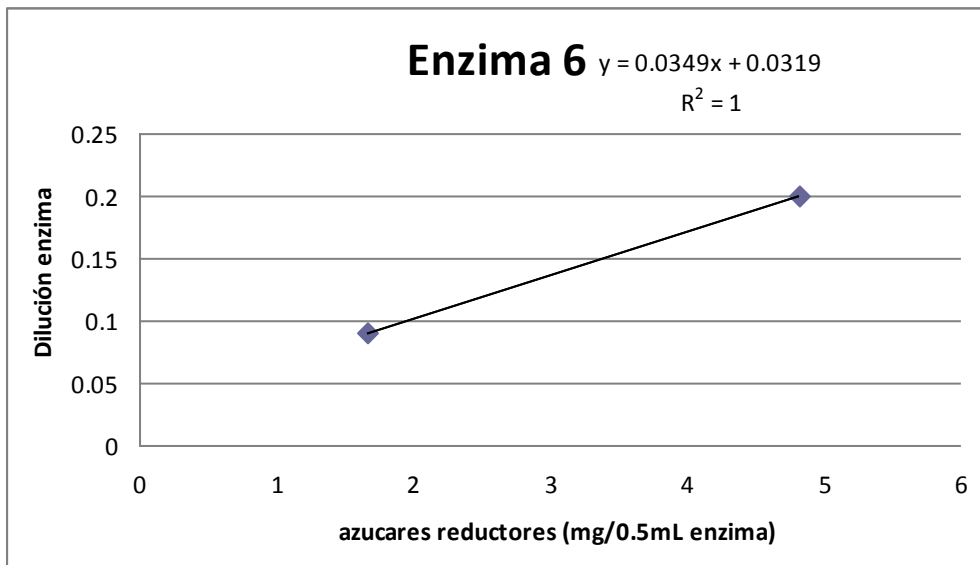
	Aforo	Dilución	(mg azúcares reductores /0.5 mL dilución enzima)
0.2 mL del coctel enzimático	1 mL (0.2 mL coctel enzimático + 0.8 mL agua destilada)	0.2 (dilución 6)	6.56
0.9 mL de dilución 6	3 mL (0.9 mL dilución 4 + 2.1 mL agua destilada)	0.06 (dilución 7)	1.76

Tabla F3. Diluciones para coctel enzimático E7 y azúcares generados.

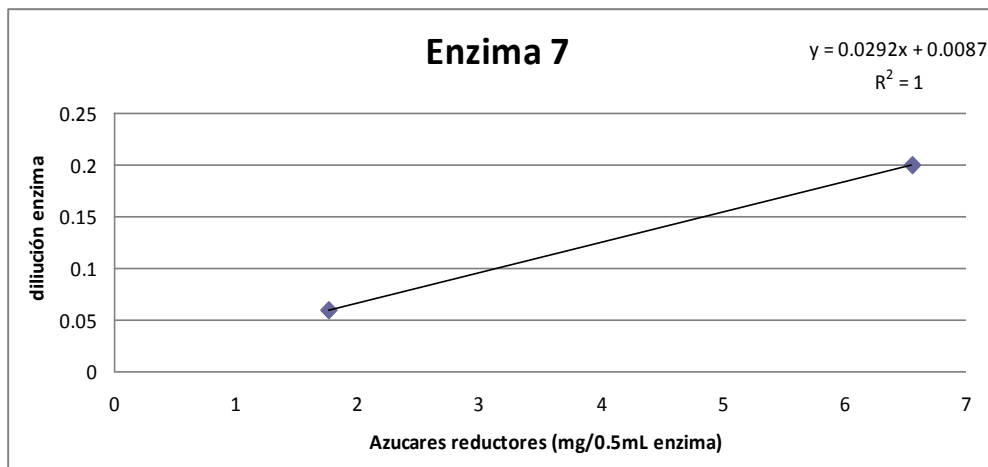
Con los datos anteriores (Tabla E1, E2, E3), se realizó una gráfica de dilución de la enzima vs mg azúcares reductores / 0.5mL enzima, para cada coctel enzimático, y con ésta se determinó la dilución que se le tiene que realizar a cada coctel enzimático para la obtención de 2 mg de azúcares reductores.



Gráfica F1. Curva para la determinación de la dilución del coctel enzimático E2.



Gráfica F2. Curva para la determinación de la dilución del coctel enzimático E6.



Gráfica E3. Curva para la determinación de la dilución del coctel enzimático E7.

Ejemplo de la determinación de dilución para coctel enzimático E2.

De la grafica D1 tenemos la ecuación $Y=0.0469x-0.0129$, ya que se requiere saber la dilución para la obtención de 2 mg de azúcares reductores se sustituye como sigue.

$$Y = (0.0469) \cdot (2) - 0.0129$$

$$Y = 0.0809$$

Lo que quiere decir que se le tiene que hacer una dilución de 0.0809 al coctel E2 para obtener 2mg de azúcares reductores.

Se realizó este mismo procedimiento para cada coctel enzimático (Tabla D4).

Coctel enzimático	Dilución
E2	0.080
E6	0.101
E7	0.067

Tabla E4. Coctel enzimático y dilución unidades "FPU".

Anexo F. Determinación unidades FPU

Para determinar las unidades FPU se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades de papel Filtro} = \frac{0.37}{[\text{Enzima}] \text{ libera 2 mg glucosa}} \text{ unidades/mL}$$

Donde 0.37 se obtiene de la siguiente ecuación:

$$\frac{(2 \text{ mg glucosa} / 0.18016 \text{ mg glucosa}/\mu\text{mol})}{(0.5 \text{ mL dilución enzima} \times 60 \text{ min.})} = 0.37 \mu\text{mol} / \text{minuto- mL}$$

Ejemplo para el coctel enzimático E2

$$\text{FPU} = 0.37 / 0.0809 = 4.57 \text{ FPU/mL.}$$

Estos cálculos se realizaron para cada coctel enzimático.

Bibliografía

- Aburto Anell J., Tabata Martínez., Florentino Murrieta. Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos Tecnología, Ciencia, Educación, (IMIQ) 23(1): 23-30, 2008. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/482/48223104.pdf>
- Aburto Anell J., Análisis de la situación actual de los biocombustibles y su relación con la industria petrolera. IMP 2005
- Alvarez Maciel C. Desarrollo histórico-tecnológico mercados actuales y comercio internacional. Economía Informa. Número 359. Julio-Agosto 2009. Disponible en: <http://www.economia.unam.mx/publicaciones/econinforma/pdfs/359/04carlo salvarez.pdf>
- ARPEL-ICCA Manual de biocombustibles, en línea, Internet 29 de marzo de 2011. Disponible en http://www.iica.int/Esp/regiones/sur/argentina/Documents/Agroenergia/Manual_Biocombustibles_ARPEL_IICA.pdf
- Aserca (Apoyos y servicios a la comercialización agropecuaria), en línea, Internet 21 de Marzo del 2010, disponible en www.infoaserca.gob.mx/dgof/Noti-CA20100601a.pdf
- B. Adney, J. Baker Measurement of cellulose activities. Laboratory analytical procedure 1998.
- Caballero Martínez Karla Sué Evaluación de la producción de bioetanol a partir de residuos de malta. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de química, UNAM 2011.
- Campa Michelena, Manuel Los biocombustibles 2ª edición Edit. Mundi prensa 2008.
- Castello Luis. Biocombustibles y seguridad alimentaria. Representante FAO Colombia. 2008, en línea, Internet 21 de Marzo del 2011 disponible en: www.fao.org.co/articbiocomb.pdf

- Cortínez Villalobos Andrea Victoria. Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: Hidrólisis ácida y líquidos iónicos. Tesis para optar al título de ingeniero civil químico. Universidad de Chile. Santiago de Chile. Enero, 2010
- Cuervo, Laura, Folch J. Luis, Quiroz R. Estela. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. Biotechnologies. Vol. 13:11-25, 2009.
- 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, 1996
- Douglas C. Montgomery Diseño y análisis de experimentos Edit. Limaza 2005
- Edward M. Rubin Genomics of cellulosic biofuels Nature International Weekly journal of science. 454: 841-845, 2008.
- Fenema, Owen R., Química de los alimentos Zaragoza, España: Acriba, 1995
- González Merino. Castañeda Zavala Biocombustibles, biotecnología y alimentos: Impactos sociales para México. Argumentos (México, D.F.) V21 N57 may-ago Pago. 55-83, 2008
- Guarnizo Franco, NET Kartlínés, Valencia Sánchez Hoover. Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. Scientia et Technica Vol. 42:284-289. 2009. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Hernández Sampedro Patricia. Evaluación del pretratamiento básico-oxidante, ácido diluido y de la sacarificación enzimática mediante E6 de diferentes materiales lignocelulósicos en la obtención de azúcares reductores y totales. Estadía Profesional para obtener el título de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, 12 de agosto de 2010, Universidad Politécnica de Puebla.
- Hosney, R. Carl. Principios de ciencia y tecnología de los cereales. Editorial Acriba, 1995.

- INEGI. El sector alimentario en México 2010. Serie estadísticas sectoriales, en línea, Internet 3 de Junio de 2011 disponible en: http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/SAM/2010/sam2010.pdf
- Kent N. Leslie Tecnología de los cereales, Edit. Zaragoza Acribia.1988
- Larsson S., Cassland P., & Jönsson L. J. Development of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1163-1170, 2001.
- Lee, Byong H. Fundamentos de biotecnología de los alimentos. Edit. Acribia 2002.
- López Sánchez Ángel. Influencia del proceso de reciclado sobre las propiedades de los materiales compuestos obtenidos por inyección de poliestireno con fibras lignocelulósicas. Tesis de doctorado. Universidad de Girona. 2004. Disponible en: www.tesisenred.net/handle/10803/7759
- Martínez Cisneros, Tabata Jahel Evaluación técnica-económica de la producción biotecnológica de etanol a partir de bagazo de caña de azúcar mediante la utilización del software Superpro Designer. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM 2009.
- Medrano Buenrostro, Brenda Jazmín Evaluación de la producción de etanol a partir del salvado de trigo: efecto de diferentes pretratamientos químicos. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de química UNAM 2010.
- Mousdale David M. Introduction to biofuels. Mechanical engineering series. Florida, 2010.
- Mosier N., Wyman C. Features of promising technologies for preatreat of lignocellulosic biomass. *Bioresourse Technology* 96, 673-686

- Mussato 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.
- Nielsen, S., Análisis de los alimentos: manual de laboratorio, ed. 2da., Ed. Zaragoza: Acribia, 2007. pp. 147-150.
- Oliva J. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *kluuyveromyces marxianus*. Tesis doctoral. Universidad complutense de Madrid España. Agosto 2010.
- Palmqvist Eva; Hahn-Hagerman Bärbel. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology. 2000, vol. 74: 25-33
- Ponce T., Pérez A. Celulasas y Xilanasas en la industria Revista Avance y Perspectiva V21:273-277 Septiembre- Octubre 2002
- Sánchez Riaño, A.M.; Gutiérrez Morales, A. I.; Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, C. A. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. Vol. 5:61-91 *Tumbaga* (2010).
- SENER Consultado en línea, Internet 6 de junio del 2011a www.sener.gob.mx
- SENER Programa de introducción de los bioenergéticos, 2011b. Disponible en: <http://www.energia.gob.mx/res/0/Prog%20Introd%20Bioen.pdf>
- SNITT. Plan estratégico de investigación y transferencia de tecnología. Cadena agroalimentaria de cebada. en línea 6 de Junio del 2011 Disponible en: <http://snitt.org.mx/pdfs/demanda/cebada.pdf>
- Singh N. P, Khan A. Acetaldehyde: Gonotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 337:9-17, 1995.
- Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. *Bioresource Technology*. 83: 1-11, 2010.
- Taherzadeh M. J., Gustafsson L., Niklasson C., & Lidén G. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosc. Bioeng.* 87: 169-174, 2000.

- Tapia Peña Ericka Sacarificación enzimática de diferentes materiales lignocelulósicos. Estadía Profesional para obtener el título de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, 12 de agosto de 2010, Universidad Politécnica de Puebla.
- Villaseñor Solís Alicia. Tesis Evaluación del efecto de diferentes pretratamientos en la producción de etanol a partir del olote Maíz. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de química, UNAM 2010
- Wade L. J. Jr. Química Orgánica 5ª edición Edit. Pearson education. 2003
- White S., Jane, Yohannan K., Biju y Walker M., Graeme, Bioconversion of brewer's spent grain to bioethanol, FEMS, 2008. pp. 1175-1183.