

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación técnica de procesos de hidrólisis para obtener azúcares fermentables a partir de afrecho residual de cerveza

Trabajo de graduación presentado por Luis Diego Sett Salguero  
Para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Química

Guatemala  
2024



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería




Evaluación técnica de procesos de hidrólisis para obtener azúcares fermentables a partir de afrecho residual de cerveza


Trabajo de graduación presentado por Luis Diego Sett Salguero  
Para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Química

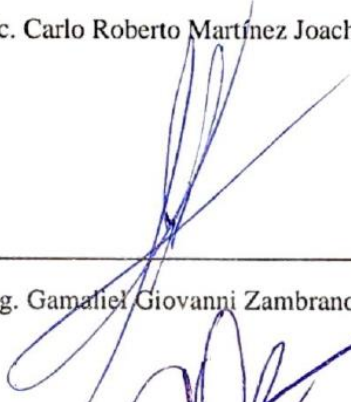
Guatemala  
2024

Vo. Bo.

(f)   
\_\_\_\_\_  
Lic. Carlo Roberto Martínez Joaquín

Terna examinadora

(f)   
\_\_\_\_\_  
Lic. Carlo Roberto Martínez Joaquín

(f)   
\_\_\_\_\_  
Msc. Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano

(f)   
\_\_\_\_\_  
Ma. Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda

Fecha de aprobación: Guatemala abril 29 de 2024

## PREFACIO

Agradezco a mi asesor, Lic. Carlo Martínez, por guiarme y apoyarme durante el desarrollo de este proyecto, así como, por permitirme el uso de las instalaciones de su laboratorio y la instrucción y ayuda durante la experimentación. También, agradezco a cada uno de mis catedráticos por su pasión, dedicación y apoyo incondicional a lo largo de la carrera en cada curso impartido.

Agradezco infinitamente a mis padres, Floridalma Salguero y Jorge Sett, por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida y por guiarme e instruirme para convertirme en la persona que soy hoy en día; por los regaños, las risas y las lágrimas y la oportunidad de dejarme seguir mis sueños. Siempre van a ser mi mayor inspiración y mi modelo a seguir. Agradezco a mi hermana, Sofía Sett, por apoyarme e impulsarme a seguir mejorando día con día.

Agradezco a mi mejor amigo, Diego Rojas, por apoyarme y estar conmigo en las buenas y en las malas, por las risas, por estar pendiente de mí y siempre ayudarme en lo que fuera necesario.

Agradezco enormemente a mi novia, Andrea Eskenasy, por las risas y el apoyo incondicional en todo momento; por alentarme y darme fuerzas cuando más lo necesitaba, por estar siempre a mi lado en los momentos difíciles y los felices. Agradezco a mi segunda familia, la familia Eskenasy, por apoyarme siempre y haberme hecho parte de sus vidas y quererme incondicionalmente.

Agradezco a mi grupo de amigos más cercanos: Allan Paniagua, Anibal Tenas, Dereck Woods, Diego Roche, Gean Pereira, Gabriel Monzón, Franz Much, Efraín Recinos, Estuardo Barahona y Pedro Galindo, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, las risas y el apoyo incondicional. Se convirtieron en mi familia.

Finalmente, agradezco a la Universidad del Valle por haber sido la casa de estudios que me vio crecer y desarrollarme como profesional.

# ÍNDICE

PREFACIO .....	vi
ÍNDICE .....	vii
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE ILUSTRACIONES .....	x
RESÚMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	14
II. OBJETIVOS.....	16
A. Generales .....	16
B. Específicos.....	16
III. DEFINICIÓN DE VARIABLES .....	16
IV. JUSTIFICACIÓN .....	17
V. MARCO TEÓRICO .....	20
A. Afrecho cervecero.....	20
B. Compuestos lignocelulósicos .....	22
C. Hidrólisis.....	25
D. Enzimas .....	27
E. Bioetanol.....	29
F. Bioetanol de segunda generación.....	29
G. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) .....	30
VI. ANTECEDENTES.....	32
VII. METODOLOGÍA .....	33
A. Equipos y Materiales.....	33
B. Cristalería .....	33
C. Reactivos .....	34
D. Determinación de humedad .....	34
E. Determinación del pH.....	34

F.	Preparación de la muestra.....	35
G.	Caracterización del afrecho de cerveza.....	35
H.	Hidrólisis Ácida.....	37
I.	Hidrólisis Enzimática .....	38
J.	Hidrólisis Combinada .....	38
K.	Cuantificación de Glucosa.....	39
VIII.	RESULTADOS .....	41
IX.	ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	48
X.	CONCLUSIONES.....	54
XI.	RECOMENDACIONES.....	55
XII.	REFERENCIAS.....	56
XIII.	ANEXOS .....	60
A.	Datos Originales.....	60
B.	Balance de masa Hidrólisis Ácida.....	93
C.	Balance de masa Hidrólisis Enzimática .....	94
D.	Balance de masa Hidrólisis Combinada .....	95
E.	Cálculo de muestra .....	96
XIV.	GLOSARIO.....	99

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. composición química del bagazo cervecero según diversos autores en % peso .....	20
Tabla 2. propiedades fisicoquímicas del bagazo cervecero .....	22
Tabla 3. equipos y materiales .....	33
Tabla 4. cristalería .....	33
Tabla 5. reactivos .....	34
Tabla 6. Composición de la muestra.....	41
Tabla 7. Humedad.....	41
Tabla 8. Cantidad de lignina .....	41
Tabla 9. Material residual .....	42
Tabla 10. Cantidad de celulosa .....	42
Tabla 11. Cantidad de hemicelulosa y otros componentes .....	42
Tabla 12. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis ácida #1 .....	43
Tabla 13. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis ácida #2 .....	43
Tabla 14. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis ácida #3 .....	43
Tabla 15. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis ácida #4 .....	44
Tabla 16. Azúcar presente en la muestra de hidrólisis ácida .....	44
Tabla 17. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis enzimática #1 .....	44
Tabla 18. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis enzimática #2.....	45
Tabla 19. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis enzimática #3.....	45
Tabla 20. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis enzimática #4.....	45
Tabla 21. Azúcar presente en la muestra de hidrólisis enzimática .....	46
Tabla 22. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis combinada #1.....	46
Tabla 23. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis combinada #2.....	46
Tabla 24. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis combinada #1.....	47
Tabla 25. Azúcar presente en la muestra de hidrólisis combinada .....	47
Tabla 26. Peso de muestra previo a molienda.....	60
Tabla 27. Perdidas de masa en proceso de molienda.....	60
Tabla 28. Peso de vidrios de reloj.....	60
Tabla 29. Masa de papeles filtro.....	60
Tabla 30. Acetato de sodio utilizado para solución Buffer.....	60
Tabla 31. Ácido acético glacial utilizado para solución Buffer.....	61

## LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Composición del afrecho de malta.....	21
Ilustración 2. Estructura de la celulosa .....	23
Ilustración 3. Estructura de Hemicelulosa .....	24
Ilustración 4. Estructura de Lignina.....	24
Ilustración 5. Estructura de la biomasa lignocelulósica.....	25
Ilustración 6. Enzima Celulasa de Trichoderma Reesei .....	29
Ilustración 7. Curva de calibración de HPLC para metodología de azúcares.....	62
Ilustración 8. Pesado de muestra previa a la molienda realizado en balanza analítica de Universidad del Valle de Guatemal.....	65
Ilustración 9. Pesado de muestra posterior a la molienda realizado en balanza analítica de Universidad del Valle de Guatemal .....	66
Ilustración 10. Proceso de degradación de muestra con Ácido Sulfúrico concentrado para la cuantificación de lignina realizado en Universidad del Valle de Guatemala.....	67
Ilustración 11. Filtrado de muestra realizado en Universidad del Valle de Guatemala.....	68
Ilustración 12. Hidrólisis para caracterización de afrecho filtrado realizado Universidad del Valle de Guatemal.....	69
Ilustración 13. Hidrólisis para caracterización de afrecho filtrado y seco realizado en balanza analítica de Universidad del Valle de Guatemala .....	70
Ilustración 14. Hidrólisis Ácida realizado Universidad del Valle de Guatemal .....	71
Ilustración 15. Muestra de Afrecho Molido realizado Universidad del Valle de Guatemala .....	72
Ilustración 16. Pesaje de reactivos para soluciones realizado en balanza analítica de Universidad del Valle de Guatemala .....	73
Ilustración 17. Soluciones para Hidrólisis Ácida realizado Universidad del Valle de Guatemala .....	74
Ilustración 18. Solución de Afrecho hidrolizado previo al centrifugado realizado Universidad del Valle de Guatemala.....	75
Ilustración 19. Residuos de Hidrólisis Ácida Centrifugada realizado Universidad del Valle de Guatemala ..	76
Ilustración 20. Muestras de Hidrólisis Ácida para Análisis HPLC realizado Universidad del Valle de Guatemala .....	77
Ilustración 21. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Ácida 1. ....	78
Ilustración 22. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Ácida 2 .....	80
Ilustración 23. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Ácida 3. ....	82
Ilustración 24. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Ácida 4. ....	84
Ilustración 25. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Enzimática 1.....	86
Ilustración 26. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Enzimática 2.....	87
Ilustración 27. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Enzimática 3.....	88
Ilustración 28. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Enzimática 4.....	89
Ilustración 29. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Combinada 1. ....	90
Ilustración 30. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad	

del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Combinada 2. ....	91
Ilustración 31. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Combinada 3. ....	92

## RESÚMEN

La producción de cerveza genera grandes cantidades de grano usado residual, que actualmente se utiliza como pienso animal. Lo cual representa una gran oportunidad de mejora en el manejo de los de desechos generados en la industria. El etanol, un producto de importancia industrial, puede obtenerse a partir de la celulosa presente en el grano usado mediante hidrólisis.

Este estudio evalúa la hidrólisis ácida y enzimática para la extracción de azúcares fermentables del grano usado residual de cerveza para la producción de etanol. Se comparan ambos métodos y se analiza una mezcla de ambos para aumentar el rendimiento en azúcares.

Se realizaron la hidrólisis ácida y enzimática del grano usado, y se analizaron los azúcares fermentables mediante HPLC. Se comparó el rendimiento de cada método y se evaluó una combinación de ambos.

Se determinó que la hidrólisis enzimática produce un mayor porcentaje de azúcares fermentables (146.651  $\mu\text{g}$ ) que la hidrólisis ácida (0  $\mu\text{g}$ ). La combinación de ambos métodos no mostró un aumento significativo del rendimiento en azúcares (144.701  $\mu\text{g}$ ).

La hidrólisis enzimática es un método viable para extraer azúcares fermentables del grano usado residual de la cerveza para la producción de etanol. La combinación de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática no proporciona un beneficio significativo en el rendimiento de azúcar.

---

**Palabras clave:** afrecho residual de cerveza, bioetanol, celulosa, hidrólisis, enzima, etanol.

## ABSTRACT

The production of beer generates large quantities of residual spent grain, which is currently used as animal feed. This represents a significant opportunity for improvement in the management of waste generated in the industry. Ethanol, an industrially important product, can be obtained from the cellulose present in spent grain through hydrolysis.

This study evaluates both acid and enzymatic hydrolysis for the extraction of fermentable sugars from residual beer grain for ethanol production. Both methods are compared, and a combination of the two is analyzed to increase sugar yield.

Acid and enzymatic hydrolysis of spent grain were performed, and fermentable sugars were analyzed using HPLC. The yield of each method was compared, and a combination of both was assessed.

It was determined that enzymatic hydrolysis produces a higher percentage of fermentable sugars (146.651  $\mu\text{g}$ ) compared to acid hydrolysis (0  $\mu\text{g}$ ). The combination of both methods did not show a significant increase in sugar yield (144.701  $\mu\text{g}$ ).

Enzymatic hydrolysis is a viable method for extracting fermentable sugars from residual beer grain for ethanol production. The combination of acid and enzymatic hydrolysis does not provide a significant benefit in sugar yield.

**Keywords:** beer spent grain, bioethanol, cellulose, hydrolysis, enzyme, ethanol.

## I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la cerveza representa una de las bebidas alcohólicas de mayor consumo. Sólo en Estados Unidos se fabrican alrededor de 2.869 millones de litros de cerveza al año, con un crecimiento del 11% respecto al año anterior. Entre los residuos que se producen a partir de la producción de cerveza encontramos el afrecho, el cual representa un volumen de producción de 85% en relación con el total de los residuos sólidos generados por la industria. Dicho afrecho, actualmente, sólo es vendido por las empresas para ser utilizado como alimento en la industria de la ganadería. Esto presenta una gran oportunidad para el mejoramiento en el ámbito del manejo de los residuos generados.

La biomasa lignocelulósica, sobre todo los subproductos agroindustriales, ha pasado de ser un residuo problemático a una materia prima potencial para diversos procesos. Uno de los más significativos de estos procesos es la producción de etanol. Sin embargo, la producción de etanol a partir de este tipo de material tiene limitaciones debido a su compleja estructura. Numerosas investigaciones han abordado este reto proponiendo soluciones alternativas, allanando el camino para la explotación de la biomasa lignocelulósica con este fin. Entre los diversos métodos para producir bioetanol, ha ganado popularidad la obtención a partir de la celulosa.

El etanol se ha convertido en un producto de suma importancia en muchos ámbitos de la industria. Actualmente se ha optado por utilizar métodos de producción más amigables con el medio ambiente. La producción mundial total de bioetanol aumentó un 430% a partir del año 2001 al 2009, con una tasa anual de crecimiento superior al 17%. Para el año 2020 los cinco principales productores de bioetanol son Estados Unidos (53 %), Brasil (28 %), China (4 %), India (3 %) y Canadá (1 %). El 11 % restante de la producción se distribuye en los demás países del mundo, con una participación destacada de Tailandia, Argentina, Francia y Alemania.

La celulosa, el biopolímero más abundante en la Tierra, se convierte en azúcares fermentables mediante hidrólisis química. Este proceso rompe los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos que unen las unidades de glucosa en la cadena de celulosa, liberando glucosa libre. Las pruebas experimentales, como la espectroscopia infrarroja, la cromatografía de gases y la hidrólisis, confirman la presencia de glucosa en la celulosa. La importancia de la celulosa como fuente de glucosa radica en su abundancia, lo que la convierte en una materia prima renovable y sostenible para la producción de biocombustibles, bioproductos y otros productos químicos.

La hidrólisis de la celulosa es un proceso clave para convertir la celulosa, el biopolímero más abundante de la Tierra, en glucosa. Esta glucosa puede utilizarse para la producción de bioetanol, un biocombustible renovable y sostenible. Existen dos métodos principales de hidrólisis: ácida y enzimática. La elección del método dependerá de varios factores, como

el tipo de materia prima, la escala de producción, el coste y la calidad del producto final. La hidrólisis ácida es rápida y eficaz, pero genera subproductos indeseables y es corrosiva. La hidrólisis enzimática es más lenta y cara, pero es más específica y respetuosa con el medio ambiente.

El objetivo de este trabajo de graduación fue evaluar técnicamente los procesos de hidrólisis para la extracción de azúcares fermentables útiles en la obtención de etanol a partir de la celulosa presente en el afrecho residual de cerveza con el fin de presentar una alternativa atractiva para el manejo de residuos de una industria tan grande cómo es la cervecera. Se realizó una comparación de dos métodos de hidrólisis (químico ácido y enzimático), para posteriormente realizar una mezcla de ambos procesos con el fin de buscar un incremento en el porcentaje de azúcares fermentables obtenidos de cada una de las metodologías por separado. De esta manera se busca presentar una nueva forma de aprovechamiento del afrecho residual de la industria cervecera.

## II. OBJETIVOS

### A. Generales

Evaluar técnicamente procesos de hidrólisis para la extracción de azúcares fermentables útiles en la obtención de etanol a partir de la celulosa presente en el afrecho residual de cerveza.

### B. Específicos

1. Realizar una caracterización del afrecho cervecero para determinar la cantidad de lignina, celulosa y hemicelulosa utilizando el método de cuantificación de Klason correspondiente a la norma TAPPI 222, para poder estandarizar el sustrato.
2. Realizar la cuantificación de humedad absoluta presente en el sustrato por medio de un proceso de secado en horno para obtener el porcentaje de humedad del sustrato para la estandarización del sustrato.
3. Acondicionar el *afrecho cervecero* por medio de secado, prensado, molienda y tamizado para facilitar los procesos de hidrólisis.
4. Realizar una comparación del método de hidrólisis ácida, enzimática y la mezcla de ambos procesos para evaluar la eficiencia en la obtención de azúcares fermentables los cuales serán cuantificados por HPLC.

## III. DEFINICIÓN DE VARIABLES

- Lignina
- Celulosa
- Hemicelulosa
- Humedad absoluta
- Azúcar

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los bioproductos de primera generación aún presentan un escenario inestable en términos de precio ante los precios relativos de productos genéricos. Sin embargo, cada vez más se está planteando el uso de bioproductos en diferentes ámbitos. Recientemente el uso de bioetanol ha tenido un gran auge en el mercado como fuente de biocombustible (Brambila-Paz, 2013). El bioetanol elaborado a partir de celulosa se denomina biocombustible de segunda generación y presenta una alternativa muy interesante para diversificar la matriz energética y expandir el mercado de los biocombustibles (Dagnino, 2014).

Su materia prima, la biomasa lignocelulósica proveniente de residuos agrícolas, forestales y urbanos, representa una fuente abundante. Solo en Latinoamérica y el Caribe se generan anualmente alrededor de 2.600 millones de toneladas de residuos agrícolas, según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).

Más allá de la diversificación energética, el bioetanol de segunda generación aporta beneficios ambientales. Al no competir con la producción de alimentos y reducir la cantidad de residuos en vertederos, contribuye a la sostenibilidad. Se estima que este biocombustible puede reducir las emisiones de gases de efecto invernadero hasta en un 80% comparado con la gasolina (Dagnino, 2014).

Actualmente, la conversión de celulosa a bioetanol se acerca al 50%, con potencial para seguir mejorando. Además, este biocombustible reduce las emisiones de CO<sub>2</sub> en comparación con los combustibles fósiles. Un estudio del Departamento de Energía de Estados Unidos indica que puede reducirlas en un 85% respecto a la gasolina (Rodríguez, C., 2012).

En cuanto a los avances tecnológicos, se han desarrollado métodos como la explosión con vapor o la hidrólisis ácida para pretratar la biomasa, aumentando la eficiencia de la hidrólisis enzimática. También se han creado enzimas más eficientes y rentables para descomponer la celulosa, como las celulasas y xilanasas, cuyo costo ha disminuido un 50% desde 2010. Por último, se han desarrollado nuevas cepas de levadura capaces de fermentar azúcares de cinco y seis carbonos.

El mercado global de biocombustibles está en auge, con un pronóstico de alcanzar los 250 mil millones de dólares para 2028. Este crecimiento se ve impulsado por la demanda y por incentivos como créditos fiscales y exenciones impositivas para la producción y consumo de biocombustibles. Por ejemplo, en Estados Unidos, el crédito fiscal federal para el bioetanol de segunda generación es de \$0.15 por galón. Además, la infraestructura para

la distribución y uso de bioetanol ya está bien desarrollada en muchos países. En Brasil, por ejemplo, la gasolina se mezcla con un 27% de bioetanol (Rodríguez, C., 2012).

Sin embargo, aún existen desafíos. El costo de producción de bioetanol de segunda generación sigue siendo mayor que el de los biocombustibles de primera generación. No obstante, se espera que disminuya con el avance tecnológico y la producción a mayor escala. Se estima que el costo podría alcanzar la paridad con la gasolina para 2030. La escalabilidad de la producción es otro reto, ya que actualmente se encuentra en fase de desarrollo. En 2022, la producción global de bioetanol de segunda generación apenas alcanzó los 10 millones de litros. Por último, se necesitan políticas públicas que apoyen el desarrollo y la producción de este biocombustible, creando un marco regulatorio favorable. La Unión Europea, por ejemplo, ha establecido un objetivo de 10% de participación de biocombustibles en el transporte para 2030.

El afrecho o bagazo obtenido de la producción de cerveza, actualmente, sólo es utilizado y puesto a la venta como fuente de alimento para ganado debido a su alto valor nutritivo y sus beneficios para la salud animal (Engormix, 2023). Es rico en proteínas, fibra, vitaminas y minerales, incluyendo calcio, fósforo, potasio y zinc (Nutreco, 2023). Contiene un alto contenido de energía, lo que lo convierte en una fuente ideal de calorías para animales de producción (Contexto Ganadero, 2023). El afrecho de cerveza mejora la digestión y la salud intestinal de los animales, estimula el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino y reduce el desperdicio de alimentos (Contexto Ganadero, 2023). También, se puede agregar a la dieta de las vacas lecheras para aumentar la producción de leche y mejorar la calidad de esta, así como también es un excelente alimento para cerdos, aves de corral y caballos (Engormix, 2023).

Actualmente no se le da ningún uso posterior al afrecho. En la industria cervecera, uno de los residuos de biomasa es el bagazo cervecero, con un volumen de producción de un 85% en relación con el total de los residuos sólidos generados por la industria (Rodríguez, C., 2012).

La presente investigación explora una alternativa para la utilización del salvado, un subproducto agroindustrial rico en celulosa y hemicelulosa. El objetivo principal es comparar distintos métodos de hidrólisis (ácido y enzimático) para obtener azúcares fermentables, esenciales para la producción de bioetanol, un combustible renovable y sostenible.

Los métodos más utilizados actualmente son:

- Hidrólisis ácida: Se utiliza ácido diluido (sulfúrico o clorhídrico) para romper los enlaces glucosídicos de la celulosa y la hemicelulosa. Este método es eficaz y barato, pero puede generar subproductos indeseables y corroer el equipo (Alvira et al., 2010).
- Hidrólisis enzimática: Se utilizan enzimas celulasas y xilanasas para descomponer los polímeros de celulosa y hemicelulosa en azúcares simples. Es un método más ecológico y selectivo que la hidrólisis ácida, pero tiene un coste y un tiempo de reacción mayores (Jönsson y Martín, 2016).

- Hidrólisis termoquímica: Combina calor y presión para romper los enlaces glucosídicos. Es un método rápido y eficaz, pero requiere un elevado consumo de energía y puede generar compuestos inhibidores de la fermentación (Mosier et al., 2005).

En resumen, a pesar de la inestabilidad en los precios de los bioproductos de primera generación, se está explorando cada vez más el uso de bioproductos en diversos campos. El bioetanol de segunda generación, elaborado a partir de celulosa, ha ganado popularidad como una alternativa prometedora en el mercado de biocombustibles. En este contexto, este trabajo propone una alternativa interesante para aprovechar el afrecho o bagazo cervecero, un residuo abundante en la industria cervecera. Se centra en el paso crucial de la hidrólisis, buscando convertir el sustrato en azúcares fermentables para la producción de etanol. Mediante esta investigación, se pretende contribuir a la diversificación de la matriz energética y a la expansión del mercado de biocombustibles, al tiempo que se busca encontrar un uso valioso para un residuo que actualmente no recibe ninguna utilidad adicional.

## V. MARCO TEÓRICO

### A. Afrecho cervecero

La industria cervecera que utiliza como materia prima la cebada, genera afrecho de malta de cebada como residuo de mayor volumen. Este es un subproducto húmedo y altamente perecedero, procedente del proceso de maceración (Guerra, W. 2012).

El afrecho cervecero es un subproducto de la producción de cerveza que presenta un contenido elevado de proteína y fibras, lo cual representa propiedades interesantes y beneficiosas para la dieta humana. Sin embargo, ya que es un producto de bajo costo y alto contenido nutricional se usa para alimentación de ganado más comúnmente (Cuadros, C. 1995).

Dicho afrecho se compone principalmente de la cáscara, pericarpio y cubiertas de la semilla de la cebada. Dependiendo de la uniformidad del malteado, pueden quedar en mayor o menor cantidad restos de almidón en el endospermo y restos de pared celular. Aun así, el contenido de almidón es insignificante comparado a los compuestos de las paredes celulares de la cascara, pericarpio y cubiertas de la semilla, las cuales son abundantes en polisacáridos de celulosa y no-celulosa, lignina, algunas proteínas y lípidos. La cáscara a su vez presenta altos contenidos de silicio y polifenoles. (Mussatto et al., 2006).

Santos et al. (2003), explica que la composición química del bagazo o afrecho varía de acuerdo con las variedades de cebada utilizada, las condiciones de cosecha, malteado y maceración del proceso, como también, la calidad y cantidad de adjuntos agregados al momento de la elaboración. Dentro de su composición química, diversos autores coinciden en tratar al bagazo como un material lignocelulósico rico en proteínas y fibra.

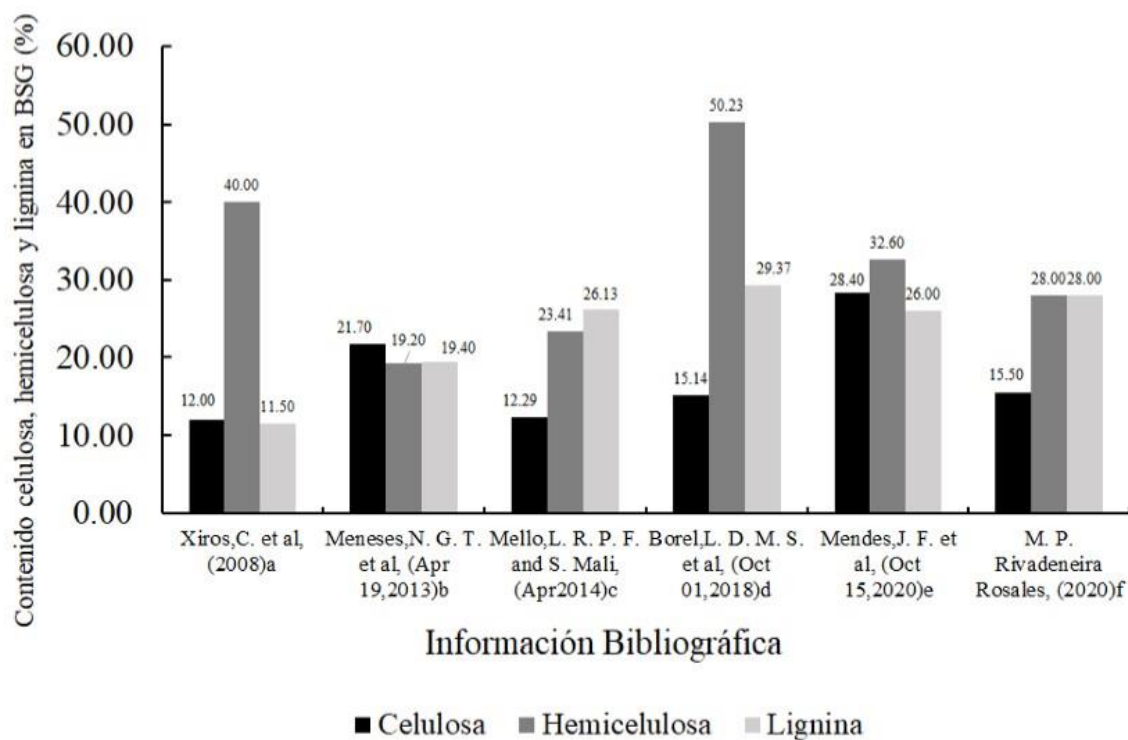
*Tabla 1. composición química del bagazo cervecero según diversos autores en % peso*

Componentes	Prentice y Refsguard (1978)	Kanauchi et al. (2001)	Kanauchi et al. (2001)
Proteínas	31	24	15.2
Pentosa	19	Nd	Nd
Lignina	16	11.9	27.8
Arabinoxilanos	Nd	21.8	28.4
Almidón y $\beta$ -glucanos	12	Nd	Nd
Celulosa	9	25.5	16.8
Lípidos	9	10.6	Nd
Ceniza	4	2.4	4.6

Fuente: Adaptado de Rodríguez, C. (2012)

### Ilustración 1. Composición del afrecho de malta

Datos bibliográficos de celulosa, hemicelulosa y lignina



Fuente: Adaptada de Iгурán (2022)

Las proteínas constituyen un sustrato muy importante en el proceso de digestión anaeróbica debido a que además de ser fuente de carbono y energía, los aminoácidos derivados de su hidrólisis tienen un elevado valor nutricional. Parte de estos aminoácidos son utilizados directamente en la síntesis de nuevo material celular y el resto son degradados a ácidos volátiles, dióxido de carbono, hidrógeno, amonio y sulfuro en posteriores fases del proceso.

La degradación de los lípidos en ambientes anaeróbicos comienza con la ruptura de las grasas produciendo ácidos grasos de cadena larga y glicerol. Y la velocidad de degradación de los materiales lignocelulósicos compuestos principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa, es tan lenta que suele ser la etapa limitante del proceso de hidrólisis. Esto es debido a que la lignina es muy resistente a la degradación por parte de los microorganismos anaeróbicos afectando también a la biodegradabilidad de la celulosa, de la hemicelulosa y de otros hidratos de carbono. (FAO, 2011). A su vez, Uzodinma y Ofoefule (2008), complementa con propiedades fisicoquímicas.

Tabla 2. propiedades fisicoquímicas del bagazo cervecero

Parámetro	Bagazo
Humedad	14.1%
pH	5.03%
Sólidos totales	67.3%
Sólidos volátiles	14.84%
Carbono	47%
Nitrógeno	1.82%
Relación C/N	25.9

Fuente: Adaptada de Rodríguez, C. (2012)

Las características bioquímicas de residuos deben permitir el desarrollo y la actividad microbiana del sistema anaeróbico. El proceso microbiológico no solo requiere de fuentes de carbono y nitrógeno, además, de rango neutro de pH para que el proceso se desarrolle satisfactoriamente. El valor del pH en el digestor no sólo determina la producción de biogás sino también su composición (FAO, 2011).

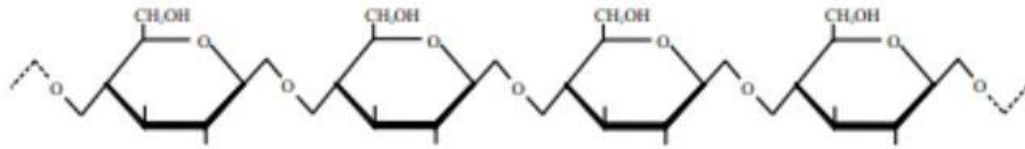
## B. Compuestos lignocelulósicos

Los compuestos lignocelulósicos, o plantas, constituyen principalmente en celulosa, hemicelulosas y lignina. La composición química y la morfología de la pared celular están relativamente bien conocidos. En general las paredes celulares de plantas consisten en polisacáridos, compuestos fenólicos y compuestos minoritarios (minerales, lípidos, proteínas, etc.). Los polisacáridos se clasifican en celulosa, hemicelulosas y pectinas. Gran parte de los compuestos fenólicos están presentes en la estructura de lignina (Prinsen, P. 2010).

### 1. Celulosa

Celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra. Consiste en cadenas lineales de celobiosa (D-glucopiranosil- $\beta$ -1,4-D-glucopiranososa) de aproximadamente 10.000 unidades glicosídicas en celulosa nativa de fibras madereras donde representan más de 50 % del peso. En la célula vegetal gran parte de la celulosa está presente como microfibrillas empaquetadas muy densamente. Poco se conoce sobre la regulación de este plegamiento. Contiene zonas amorfas y cristalinas. Las cadenas en la zona amorfa son susceptibles a bioconversión (celulasas) (Prinsen, P. 2010).

*Ilustración 2. Estructura de la celulosa*



Fuente: Adaptada Lee (2009)

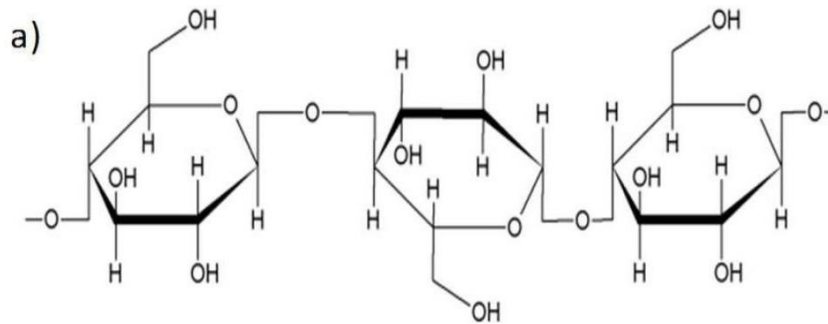
La celulosa es el principal componente estructural de los vegetales es la celulosa, la cual funciona en la mayoría de la materia prima vegetal como una barrera estructural que limita la liberación de componentes de sabor o de interés para la industria alimentaria (Rastogi et al. 1998; Sarker et al. 1999; Lee et al. 2005). La celulosa es un polisacárido formado por unidades de anhídrido glucosa, las cuales se mantienen unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4 a su efecto sinérgico, por el potencial que tienen sobre la hidrólisis de los componentes estructurales de la pared celular de los vegetales. (Sreenath, HK., 1987)

## 2. Hemicelulosa

La función principal de la hemicelulosa es proporcionar rigidez a la pared celular gracias a su interacción con la celulosa y lignina. Fisicoquímicamente podemos mencionar principalmente su capacidad de enlace y su comportamiento viscoelástico, es de gran importancia para proporcionar propiedades deseadas como grado de hinchamiento, (re)hidratación, plasticidad, flexibilidad, rigidez, dureza, etc. durante el proceso de fabricación de papel. Son insolubles en agua, pero en medio alcalino se disuelven. Las plantas herbáceas suelen contener más hemicelulosas y menos ramificados (Prinsen, P. 2010).

En contraste con la celulosa, la cual es cristalina, fuerte y resistente a la hidrólisis, las hemicelulosas son estructuras aleatorias, amorfas con pequeña solidez, 8 fácilmente hidrolizables en ácidos o bases diluidas. Las hemicelulosas son polímeros de diversas hexosas y pentosas, principalmente D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, y ácido D-galacturónico, que aparecen en las paredes celulares en forma amorfa. La mayoría de las hemicelulosas se presentan como heteropolisacáridos, poseen una especie de columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos casi siempre por enlaces  $\beta$ -1,4 (de menor longitud que la de celulosa), de la que pueden salir ramificaciones muy cortas, generalmente de un solo azúcar de longitud. Se clasifican usualmente de acuerdo con los azúcares residuales presentes. Los tipos y cantidades de hemicelulosa presentes en las paredes de las maderas de angiospermas y coníferas son diferentes (Espinosa, 2013).

*Ilustración 3. Estructura de Hemicelulosa*



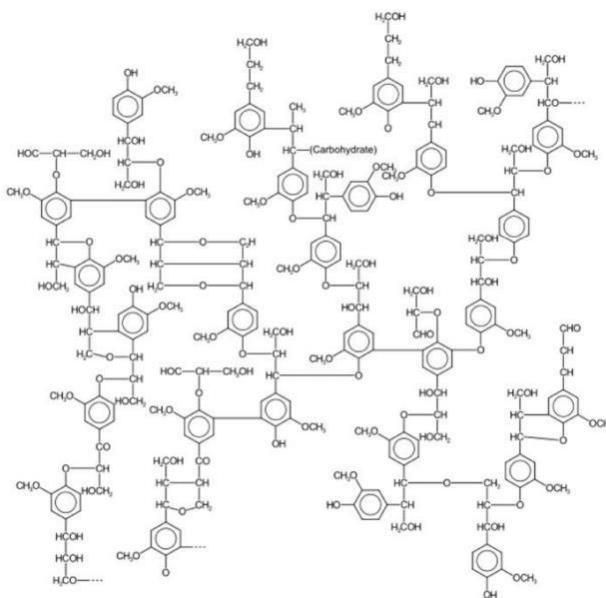
Fuente: Adaptada de Almeida (2015)

La hemicelulosa está compuesta principalmente por xilano, un polímero ramificado compuesto por un azúcar de cinco carbonos (xilosa). El grado de polimerización típico de la hemicelulosa es de 50-200, indicando que es un polímero de menor tamaño que las moléculas de celulosa. La hidrólisis ácida de la hemicelulosa ( $C_6H_{10}O_5$ ) produce principalmente xilosa ( $C_6H_{10}O_5$ ) y glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) (Lee, 2009).

### 3. Lignina

La lignina es un biopolímero aromático complejo de gran peso molecular y se forma por la polimerización de radicales alcoholes p-hydroxycinnamyl (Lee, 2009).

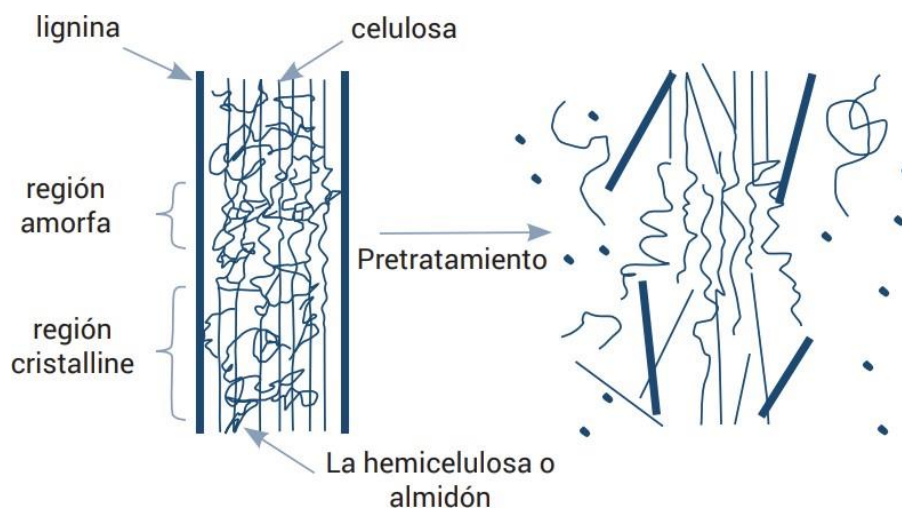
*Ilustración 4. Estructura de Lignina*



Fuente: Adaptada de Taiz, L. (2006)

Debido a su estructura la lignina es altamente resistente a la degradación. Hasta el momento los únicos organismos capaces de mineralizarla eficientemente llevándola a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O como productos finales son los hongos causantes de pudrición blanca. Estos hongos en su mayoría pertenecen a los órdenes de *Aphylliphorales* y *Agaricales* (Espinosa, 2013).

Ilustración 5. Estructura de la biomasa lignocelulósica



Fuente: Adaptada de Taiz, L. (2006)

La lignina representa entre el 25 y el 33 % de la biomasa en madera de especies coníferas y entre el 18 y el 34 % de frondosas (Aitken et al., 1988). Después de la celulosa y la hemicelulosa, es el tercer biopolímero más abundante en la Tierra. Se encuentra principalmente en la lámina media capas de la pared celular. La lignina es de vital importancia para el organismo vegetal. Desempeña funciones en el transporte de agua, nutrientes y metabolitos en el sistema vascular gracias a por sus propiedades como estructura macromolecular, además, debido a sus propiedades hidrofóbicas y el entrecruce con polisacáridos ayuda a la permeabilidad de los poros entre células vegetales (Prinsen, P. 2010).

Es importante comprender que el término lignina no se refiere a un compuesto específico, sino que es un colectivo que agrupa una serie de polímeros grandes con estructuras similares. La complejidad de la estructura química de la lignina hace que sea muy difícil de utilizar excepto como un combustible sólido, debido a su alto poder calorífico 8.19 kW/kg (12,700 BTU/lb) (Lee, 2009).

### C. Hidrólisis

Como menciona Campos, en la industria, la transformación de la celulosa en glucosa es el primer paso para su utilización a gran escala. La fermentación de la glucosa para la

obtención de etanol mediante técnicas industriales es una de las diferentes formas de obtener ese producto que puede ser utilizado como biocombustible. La obtención de glucosa a partir de materiales lignocelulósicos se basa, principalmente, en la hidrólisis. En las últimas décadas, la obtención de glucosa por este medio ha ganado mucha atención.

### 1. Hidrólisis Química

La hidrólisis química es un tipo de tratamiento que se basa en el uso de diferentes agentes químicos; como ácidos, bases y oxidantes. Este proceso es selectivo, por lo que el resultado obtenido dependerá directamente del agente químico utilizado. Los principales tipos de hidrólisis son la hidrólisis ácida, alcalina, con solventes orgánicos y con ozono. Estos métodos presentan la ventaja de su alta velocidad de reacción y su capacidad para eliminarla hemicelulosa y alterar la estructura de lignina.

### 2. Hidrólisis ácida

El uso de ácidos concentrados resulta menos atractivo para la obtención de azúcares, con miras a la producción de etanol, debido a la formación de compuestos inhibidores de los microorganismos utilizados en los procesos de fermentación. Además, ocurren problemas de corrosión en los equipos, difícil recuperación del ácido y alto costo de mantenimiento operacional, lo que hace que el método sea de poco interés a escala comercial (Chandler, C. 2012).

### 3. Hidrólisis alcalina

Es la adición de bases diluidas a la biomasa y su eficiencia depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos. El mecanismo de la hidrólisis alcalina de la biomasa parece estar basada en la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares que unen los xilanos de la hemicelulosa y otros componentes, como por ejemplo la lignina u otros componentes de la hemicelulosa. La efectividad de este pretratamiento depende del contenido de lignina del material a tratar. La literatura reporta que la digestibilidad de las maderas duras tratadas con NaOH aumenta de un 14% a un 55% con una remoción de lignina del 24-55%, con un contenido inicial del 20%. Para maderas blandas (contenido de lignina mayor al 26%) el método no es tan efectivo. La disolución de la lignina empieza con la ruptura de los enlaces  $\alpha$ -arileter y arilgliceron- $\beta$ -aril- eter, fragmentando la lignina (Espinosa, 2013).

La ruptura de los enlaces comienza con la protonación de grupos hidroxilo o éter en el carbono  $\alpha$  de un monómero dando lugar a la formación del correspondiente ácido

conjugado, esta especie puede progresar la ruptura de los enlaces  $\alpha$  y  $\beta$  o condensarse en otros monómeros (Espinosa, 2013).

#### 4. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa consiste en tres pasos: absorción de las enzimas celulasas en la superficie de la celulosa, la degradación de la celulosa a azúcares fermentables o glucosa y la deserción de las celulasas. La degradación enzimática de materiales celulósicos es estimulada por la perspectiva de que esta investigación contribuiría al desarrollo en gran escala a procesos de conversión que beneficiarían a la humanidad en una forma sustancial. Algunos de estos procesos de conversión potenciales son:

- Ayudar a resolver problemas de eliminación de desechos.
- Disminuir la contaminación del medio ambiente.
- Aliviar los escasos de alimentos y nutrientes para animales.
- Mejorar el manejo de bosques y tierras extensas, suministrando un mercado para maderas de baja calidad, que se desarrollan en tierras pobremente cultivadas.
- Disminuir la dependencia del hombre hacia los combustibles fósiles, proveyendo un recurso conveniente y renovable de energía en forma de etanol.

La sacarificación de los materiales celulósicos, utilizando las enzimas celulasas, no presentan el problema de la formación de productos indeseables como los que se presentan en las otras formas de hidrólisis (ácida, básica, etc.). En la actualidad los estudios de hidrólisis se están orientando a la utilización de enzimas para la sacarificación de subproductos celulósicos por las ventajas del proceso que ofrecen (Espinosa, 2013).

#### D. Enzimas

Las enzimas son proteínas, polímeros formados por aminoácidos covalentemente unidos entre sí, que catalizan en los organismos una gran variedad de reacciones químicas. La actividad catalítica de las enzimas depende de que mantengan su plegamiento, es decir, su estructura tridimensional. En esta estructura tridimensional se forman cavidades, llamadas “sitio activo”, las cuales muestran afinidad por las moléculas específicas (sustratos) que se convertirán en productos. Sus aplicaciones más antiguas tienen que ver con la alimentación, por ejemplo, la producción de pan y queso.

Como cualquier catalizador, al finalizar la transformación del sustrato y liberarse el producto del sitio activo, la enzima regresa a su estado original y puede involucrarse en un nuevo ciclo de catálisis (Ramirez, J., 2014).

## **1. Enzimas Celulasas**

La celulasa es un tipo importante y esencial de enzima para llevar a cabo la despolimerización de la celulosa en azúcares fermentables. Como un recurso importante para las energías renovables energía y materias primas, es ampliamente utilizado en la bioconversión de biomasa celulósica renovable. Glucosa, de la adecuada hidrólisis de esta biomasa celulósica bajo el tratamiento de la biotecnología avanzada puede ser utilizado en diferentes aplicaciones como la producción de combustible etanol, proteína unicelular, materia prima, productos químicos de importancia industrial, etc (Li, X. et al. 2009).

Las enzimas celulasas son proteínas derivadas de los procesos naturales de fermentación, capaces de degradar la celulosa. En realidad, una enzima de celulasas es una mezcla de diversos componentes enzimáticos, formando lo que se denomina un “complejo enzimático”, que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa (Espinosa, 2013).

Se han desarrollado extensas investigaciones de celulasas durante décadas. Dichos estudios de aplicación se han desarrollado a una velocidad tremenda. La biotecnología de las celulasas comenzó a principios de la década de 1980, primero en alimentación animal seguida de aplicaciones alimentarias. Posteriormente, se utilizaron en la industria textil, lavandería y en las industrias de pulpa y papel. Debido al desarrollo desde hace varios años, el uso de celulasas ha aumentado considerablemente, demostrando su enorme potencial biotecnológico en varias industrias, empezando a hacer su incursión en las industrias de cervecería y vino, agricultura, así como en investigación y desarrollo (Li, X. et al. 2009).

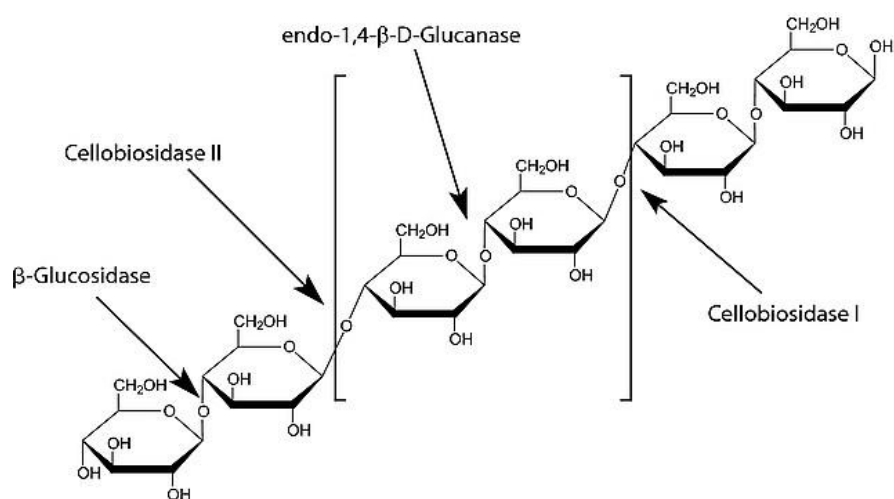
## **2. Trichoderma Reesei**

Las especies de Trichoderma son hongos que aparecen en cualquier tipo de suelo, produciendo colonias blancas, amarillas o más típicamente verdes cuando se cultivan. Las especies verdes de Trichoderma fueron inicialmente clasificadas como una especie única, T. Viride hasta que fueron subdivididas por Rifai. Las especies de Trichoderma se utilizan para producir celulasas. Sin embargo, son particularmente efectivas como antagonistas del crecimiento de otros hongos, muchos de ellos patógenos de plantas, con el resultado de que las especies de Trichoderma son importantes agentes en biocontrol. El hongo Trichoderma reesei es un microorganismo celulítico que contiene cuatro grandes celulasas (1.4-beta-D-glucancelobiohidrolasas CBHI y CBH II, endo-1.4-beta-D-glucanasa EG I y EGII). Desde el punto de vista genético, se han estudiado genes que codifican para las celulasas (cbh1, cbh2, egl1 y egl2), mediante sustitución por el marcador genético Amds de Aspergillus nidulans (Hayala, 2013).

Estas investigaciones han sugerido que la CBHII y la EGII son las más importantes en la actividad enzimática de la celulasa porque intervienen en la formación eficiente del inductor de estas en *T. Ressei* y que la eliminación de ambas cadenas celobiohidrolasas (CBHII y EGII) imposibilita a la enzima para desdoblar la celulosa cristalina. La mayor parte de los procedimientos estudiados a escala preindustrial utilizan enzimas producidas por *Trichoderma reesei*. Este microorganismo tiene la ventaja de excretar, en grandes cantidades, la mezcla adecuada de enzimas, que permite la hidrólisis de celulosas amorfas y cristalinas (Hayala, 2013).

La estructura química de la Celulosa proveniente de la *Trichoderma Reesei* es 1,4-(1,3:1,4)- $\beta$ -D-Glucan 4-glucono-hidrolasa

Ilustración 6. Enzima Celulasa de *Trichoderma Reesei*



Fuente: Adaptada de Merck/Sigma-Aldrich, (2022)

## E. Bioetanol

El bioetanol se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas. En este proceso se obtiene el alcohol hidratado, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser deshidratado se puede utilizar como combustible. El bioetanol mezclado con la gasolina produce un biocombustible de alto poder energético con características muy similares a la gasolina, pero con una importante reducción de las emisiones contaminantes en los motores tradicionales de combustión. El etanol se usa en mezclas con la gasolina en concentraciones del 5 o el 10%, E5 y E10 respectivamente, que no requieren modificaciones en los motores actuales (Espinosa, 2013).

## F. Bioetanol de segunda generación

El bioetanol de primera generación se obtiene mediante la fermentación de azúcares procedentes de diferentes vegetales (maíz, remolacha, cebada...). El problema es que esas

materias primas sirven para alimentar a las personas. El uso del bioetanol como combustible ha crecido en los últimos años en Europa, Estados Unidos, Brasil y Canadá, lo que ha repercutido en el precio de algunos alimentos.

La producción mundial total de bioetanol aumentó de 2001 a 2009 un 430%, con una tasa anual de crecimiento superior al 17%. El éxito en el uso del bioetanol se debe al aumento en el precio de los combustibles fósiles y a las ayudas gubernamentales que ha recibido en países como Brasil y Estados Unidos. Se ha conseguido incrementar la seguridad en el suministro doméstico de combustibles, reducir la emisión de gases de efecto invernadero y ayudar a las industrias y a las comunidades rurales.

Se llama biocombustibles de segunda generación a los que se obtienen de otras fuentes naturales alternativas, como lo es, la biomasa lignocelulósica, es decir, un componente esencial de la madera que incluye residuos forestales y agroindustriales como serrines, restos de molienda y de la fabricación de papel, etc., puede ser una de las más adecuadas. La producción de etanol a partir de este tipo de biomasa presenta algunas ventajas medioambientales respecto de la producción de etanol por fermentación de azúcares. Sin embargo, el grado de comercialización de este etanol de segunda generación todavía es lento.

Algunas plantas ya están realizando pruebas en América del Norte y Europa, pero el proceso de comercialización es lento por los riesgos asociados al desarrollo de la tecnología, la elevada inversión de capital necesaria y los escasos retornos previstos a corto plazo.

#### G. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es sílica que se ha tratado con  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$ . La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo con las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar. Todos los detectores para HPLC responden a alguna propiedad fisicoquímica del analito; esto puede incluir absorbancia UV, relación masa / carga, fluorescencia, índice de refracción, etc (Miranda, 2013).

Los detectores de HPLC más comunes se basan en la absorbancia de luz UV (o visible) por la molécula de analito. Estos detectores son populares debido a su bajo costo, robustez, límites de detección razonablemente bajos y facilidad de uso. Hay varios tipos comunes de detectores UV que incluyen configuraciones de una sola longitud de onda, de múltiples longitudes de onda o de diodos. El detector de matriz de diodos también permite algunas funciones cualitativas limitadas a través de la capacidad de recolectar espectros UV de forma dinámica. Hay varios otros tipos de detectores disponibles que utilizan otras propiedades fisicoquímicas de la molécula del analito, entre las que se incluyen:

- Fluorescencia
- Electroquímica
- Conductividad eléctrica

Estos detectores tienden a emplearse cuando se requiere una alta sensibilidad y / o la molécula de analito no absorbe la radiación UV. Los detectores de espectrometría de masas se han vuelto cada vez más importantes y ahora se utilizan ampliamente en muchas áreas de la química analítica, ya que se pueden utilizar para la detección de bajas concentraciones de analitos, para análisis cualitativos o en situaciones en las que la separación de los componentes del analito es difícil. La detección del índice de refracción es útil cuando las moléculas de analito no responden a ningún otro tipo de detector o si el analito muestra grandes diferencias en el índice de refracción de la fase móvil utilizada (ChromAcademy).

Los carbohidratos o azúcares pueden ser definidos de manera sencilla como polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas y sus derivados. Estas biomoléculas están ampliamente distribuidas y cumplen distintas funciones estructurales, así como de almacenamiento y fuente de energía. Los monosacáridos, también llamados azúcares sencillos, están constituidos por una sola unidad de polihidroxialdehído o polihidroxicetona, un disacárido está constituido por dos monosacáridos unidos por un enlace glucosídico y los polisacáridos contienen muchas unidades de monosacáridos enlazadas. La miel, el endulzante original de la naturaleza, es elaborada por las abejas con néctar floral y es esencialmente una solución acuosa altamente concentrada de dos azúcares, glucosa y fructosa, los cuales constituyen el 30 y el 38% de ésta respectivamente. Muchas otras sustancias también se encuentran en la miel, pero los carbohidratos son por mucho sus mayores constituyentes. La glucosa y la fructosa son monosacáridos los cuales poseen extremos reductores, al igual que algunos disacáridos, y polisacáridos, como el almidón, la celulosa y la quitina. En base a esto, la medición de la concentración de extremos reductores puede aportar información valiosa acerca de una muestra analizada. Debido especialmente a su presencia en muchos productos naturales, los azúcares reductores (AR) han recibido considerable atención, lo cual ha llevado a un incremento en el diseño de métodos para su cuantificación. La habilidad de medir la concentración de AR aporta mucho significado para determinar la cantidad de azúcar en productos alimenticios y bebidas, e incluso, aunque indirectamente, es una herramienta para determinar la actividad de algunas enzimas responsables de la hidrólisis de polisacáridos (Christopher Ugas, 2018).

Cómo menciona Brian A. Bidlingmeyer (1993), en el ámbito químico y/o bioquímico podemos encontrar aplicaciones tales como:

- Analizar mezclas complejas
- Purificación de compuestos químicos
- Síntesis de compuestos químicos
- Aislamiento de compuestos con características biológicas benéficas
- Predicción de propiedades físicas de compuestos

## VI. ANTECEDENTES

El tema de bioproductos ha tenido un gran auge durante los últimos años. A pesar de ser un tema relativamente nuevo, se han realizado varios estudios sobre la evaluación de procesos de hidrólisis para la obtención de etanol a partir de residuos de diferente índole.

Podemos mencionar algunos precedentes a dicha investigación, por ejemplo, en 2011, se realizó un estudio sobre la obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática.

En 2013, se publicó un estudio sobre la revalorización de descartes agroindustriales para la obtención de bioetanol, utilizando diferentes estrategias de hidrólisis enzimática y fermentación para obtener etanol a partir de masa de pan, zanahoria y salvado de trigo.

En 2015, se publicó un estudio para establecer la concentración óptima de  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas comerciales para la obtención de etanol a partir de cebada sin maltar.

Finalmente, en un estudio sin fecha de publicación, se abordan las variables que afectan el proceso de hidrólisis ácida utilizado para convertir los carbohidratos en azúcares fermentables. Además, otro estudio evaluó la producción de etanol a partir del bagazo de caña de azúcar utilizando hidrólisis química para obtener un mosto fermentable.

## VII. METODOLOGÍA

### A. Equipos y Materiales

*Tabla 3. equipos y materiales*

No	Equipo
1	Horno para secado
2	Molino de discos
3	HPLC
5	Tamizadora
6	Centrífuga
7	Bomba de filtrado
8	Balanza analítica
1	Tamices
2	Papel filtro
3	Embudo Büchner
4	Espátula para pesado
5	Vidrio de Reloj
6	Autoclave

Fuente: Elaboración propia

### B. Cristalería

*Tabla 4. cristalería*

No	Cristalería	Capacida d	Cantida d
1	Erlenmeyer	10 mL	3
2		25 mL	5
3		50 mL	5
4		100 mL	2
5		300 mL	3
6	Beaker	25 mL	5
7		50 mL	5
8		100 mL	4
9	Quitasato	1000 mL	1

Fuente: Elaboración propia

## C. Reactivos

Tabla 5. reactivos

No	Reactivo	Observaciones
1	Ácido sulfúrico concentrado (98% m/v)	4 L
2	Enzima <i>Celulasa</i> proveniente de <i>Trichoderma Reesei</i>	Bote de 50 mL de 10,000 unidades, con número de referencia de producto C8546-10KU de la casa MERCK.
3	Hidróxido de sodio (17.5% m/v)	4 L
4	Tween	3 mL
5	Agua desmineralizada	--
6	Cloruro de calcio	5 g
7	Ácido Acético glacial	--
8	Acetato de sodio	--
9	Azida de sodio	--

Fuente: Elaboración propia

## D. Determinación de humedad

El método utilizado fue la norma ASTM E871.

1. Pesar dos cajillas de aluminio en el horno hasta llegar a peso constante.
2. Tarar las cajillas de aluminio con sus respectivas tapaderas.
3. Pesar aproximadamente 10g de afrecho húmedo en cada una de las cajillas.
4. Dispersar lo más uniformemente posible el afrecho por todo el interior de las cajillas.
5. Cerrar las cajillas.
6. Anotar el peso de las cajillas con la muestra de afrecho.
7. Secar dentro del horno a 60°C durante 2 horas, cuidando de dejar las cajillas semidestapadas.
8. Luego del transcurrido el tiempo de secado se extraen las cajillas del horno y se dejan enfriar durante 20 min. aprox.
9. Se pesan nuevamente las cajillas y se calcula la cantidad de humedad utilizando la diferencia de pesos de las muestras.

## E. Determinación del pH

10. Tomar una muestra de paja de trigo, que fue pasada en tamiz No. 60.
11. Colocar 2 gramos de muestra tamizada en un matraz de 125 mL y agregar 20 mL de agua destilada para tener una relación 1:10.
12. Con el fin de estar en agitación constante se le colocó un agitador magnético. Agitar 4 horas.
13. Una vez pasada el tiempo, reposar por 1 hora, una vez asentada la muestra, filtrar y

medir el pH.

## F. Preparación de la muestra

Esta preparación fue realizada para la muestra utilizada en la caracterización del afrecho de malta

- Lavar la muestra con abundante agua para retirar todo tipo de materia soluble o suciedad presente en la muestra.
- Secar la muestra de afrecho utilizando un horno a 60 °C por un periodo de 12 horas.
- Moler la muestra para reducir el tamaño de partícula para conseguir una mayor área de contacto.
- Tamizar la muestra utilizando tamices de tamaño No.8, No.12 y No. 25.

## G. Caracterización del afrecho de cerveza

### 1. Cuantificación de Lignina

Para calcular la cantidad de lignina presente en una muestra de afrecho de cerveza, se puede utilizar el método Klason y método de Van Soest, que se basa en la hidrólisis ácida de la muestra para cuantificar la cantidad de lignina insoluble en ácido. Los pasos son los siguientes:

1. Pesar aproximadamente 0.5 g de muestra de afrecho de cerveza y transferirla a un matraz de digestión.
2. Agregar 3-4 mL de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al matraz y mezclar bien.
3. Colocar el matraz en un baño de agua hirviendo y dejar que la muestra se hidrolice durante 2-3 horas, revolviendo ocasionalmente.
4. Después del tiempo de hidrólisis, enfriar la muestra y agregar 150 mL de agua destilada.
5. Transferir la mezcla a un embudo de Buchner con un papel filtro y filtrar la muestra, lavando los residuos con agua destilada hasta que el filtrado sea neutro.
6. Secar los residuos en un horno a una temperatura de 105°C durante varias horas hasta que la muestra esté completamente seca y pesarla.
7. Calcular la cantidad de lignina presente en la muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Lignina (\%)} = [(\text{Peso de residuos secos}) - (\text{Peso de la muestra original})] / (\text{Peso de la muestra original}) \times 100$$

Donde: el peso de la muestra original es la cantidad de afrecho de cerveza que se utilizó en el paso 1. El resultado obtenido corresponderá a la cantidad de lignina insoluble en ácido presente en la muestra de afrecho de cerveza. Es importante destacar que el método Klason solo mide la lignina insoluble en ácido, por lo que no proporcionará una medida precisa de

la cantidad total de lignina presente en la muestra. Además, este método no es específico para la lignina y puede incluir otros componentes de la muestra.

**Fibra detergente neutro (FDN):**

1. Pesaje: Colocar la muestra desengrasada (1,5 g) en el crisol de vidrio con filtro de cuarzo poro 2.
2. Hidrólisis: Agregar detergente neutro y hervir durante 1 hora.
3. Lavado: Lavar el residuo con agua caliente y posteriormente con acetona fría.
4. Secado: Secar la fracción de fibra en una estufa a  $150 \pm 2$  °C durante 2 horas.
5. Enfriamiento: Enfriar la fracción de fibra y pesarla.
6. Calcinación: Calcinar la fibra para obtener la fracción inorgánica.

$$\% FDN = (P1 - P0) - (P2 - P0) / Pm \times 100$$

Dónde:

Pm= peso de muestra seca

Po= peso del crisol tarado

P1= peso del crisol + FND

seca  
P2= peso del crisol +  
cenizas

**Fibra detergente ácido (FDA):**

1. Pesaje: Colocar la muestra desengrasada (1,5 g) en el crisol de vidrio con filtro de cuarzo poro 2.
2. Hidrólisis: Agregar detergente ácido y hervir durante 1 hora.
3. Lavado: Lavar el residuo con agua caliente y posteriormente con acetona fría.
4. Secado: Secar la fracción de fibra en una estufa a  $150 \pm 2$  °C durante 2 horas.
5. Enfriamiento: Enfriar la fracción de fibra y pesarla.
6. Calcinación: Calcinar la fibra para obtener la fracción inorgánica.

$$\% FDA = (P1 - P0) - (P2 - P0) / Pm \times 100$$

Dónde:

Pm= peso de muestra seca

Po= peso del crisol tarado

P1= peso del crisol + FDA

seca  
P2= peso del crisol +  
cenizas

**Cálculo de la hemicelulosa:**

$$\text{Hemicelulosa} = \text{FDN} - \text{FDA}$$

**Cálculo de la lignina:**

$$\text{Lignina} = \text{FDA} - \text{Cenizas}$$

**Cálculo de la celulosa:**

$$\text{Celulosa} = \text{FDN} - \text{Hemicelulosa} - \text{Lignina}$$

AOAC INTERNATIONAL. (2005f). Official methods of analysis of AOAC International (18<sup>th</sup>ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.

**H. Hidrólisis Ácida****1. Eliminación de Lignina:****Procedimiento:**

1. **Sumergir las muestras:** Sumergir las muestras en la solución de NaOH 0,1N durante 15 minutos.
2. **Agregar cloruro de calcio:** Agregar 0,816 g de cloruro de calcio y dejar en reposo durante 3 horas.
3. **Separar el material particulado:** Separar el material particulado de la solución por centrifugación.
4. **Eliminar la lignina:** Eliminar la lignina disuelta por decantación.
5. **Conservar el sólido:** Conservar el sólido que contiene la celulosa y la hemicelulosa para la hidrólisis.

**Explicación:**

El hidróxido de sodio degrada la lignina y el cloruro de calcio ayuda a reducir la degradación de la celulosa causada por el hidróxido de sodio. Además, el cloruro de calcio ayuda con la precipitación de la lignina.

**2. Hidrólisis Ácida:****Procedimiento:**

1. **Preparar la solución de ácido sulfúrico:** Diluir ácido sulfúrico concentrado al 5%.
2. **Mezclar la solución con las muestras:** Mezclar 25 mL de la solución de ácido sulfúrico al 5% con cada 50 g de muestra en un Erlenmeyer de 250 mL.
3. **Autoclavar la mezcla:** Llevar la mezcla a una autoclave a 1 atm (15 psi) y 125 °C durante 15 minutos.

#### 4. **Centrifugar la mezcla:** Centrifugar la mezcla para separar el jarabe glucosado.

##### **Explicación:**

La hidrólisis ácida rompe los enlaces glucosídicos de la celulosa y la hemicelulosa, liberando azúcares simples como la glucosa.

##### I. Hidrólisis Enzimática

##### **Procedimiento:**

14. Pesaje y colocación de la biomasa: Pesar una muestra de biomasa equivalente al 1% de celulosa y colocarla en un reactor de 200 mL.
15. Preparación de la mezcla: Agregar 50 mL del buffer de ácido acético glacial y acetato de sodio, la cantidad de agua destilada necesaria para alcanzar un volumen total de 100 mL, considerando la densidad del material sólido de 1 g/mL y la cantidad de enzimas a adicionar.
16. Adición de azida de sodio y Tween 80: Agregar 0,3 mL de azida de sodio para evitar el crecimiento de organismos durante la digestión y 0,1 g/L de Tween 80 como surfactante.
17. Incubación: Colocar los tubos en un baño termostático a 50 °C con agitación durante 72 horas.
18. Adición de la enzima: Agregar la enzima comercial Sigma-Aldrich, celulasa de *Trichoderma reesei*, en una concentración de 10 kU/mg de celulosa.
19. Evaluación de la producción de azúcares: Evaluar la producción de azúcares durante 72 horas.

##### **Explicación:**

La hidrólisis enzimática utiliza enzimas celulasas para romper los enlaces glucosídicos de la celulosa y la hemicelulosa, liberando azúcares simples como la glucosa. Selig, M. J., Tucker, M. P., & Himmel, M. E. (2008). High-throughput screening of cellulase enzymes for biofuel production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4850-4856.

##### J. Hidrólisis Combinada

La metodología para la hidrólisis combinada (ácida y enzimática) de la biomasa comienza con la eliminación de la lignina mediante NaOH 0,1N y cloruro de calcio. Luego, se realiza una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico al 5% a 125°C durante 15 minutos, ajustando las condiciones según sea necesario. Tras la neutralización del jarabe obtenido con NaOH o CaCO<sub>3</sub> para un pH de 4.5-5.5, se lleva a cabo la hidrólisis enzimática con la adición de enzimas celulasa (Sigma-Aldrich, celulasas de *Trichoderma reesei*) a una temperatura de 45-50°C y un pH de 4.5-5.5 durante 24-72 horas. Finalmente, se separa el jarabe glucosado del sólido residual por centrifugación y se puede purificar mediante filtración, decoloración y desionización.

## K. Cuantificación de Glucosa

### Equipo:

- Sistema HPLC con detector de índice de refracción (RI)
- Columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5µm
- Termostato para columna
- Auto muestreador con termostato
- Viales para HPLC
- Jeringa
- Filtros de jeringa
- Software de análisis HPLC

### Reactivos:

- Agua desionizada
- Estándares de azúcares (p. ej., glucosa, fructosa, sacarosa)

### Preparación de la fase móvil:

- Desgasificar agua desionizada durante 30 minutos.
- Filtrar la fase móvil a través de una membrana de 0.45 µm.

### Preparación de la muestra:

- Diluir la muestra con agua desionizada según sea necesario.
- Filtrar la muestra a través de una membrana de 0.45 µm.

### Condiciones de operación:

- Columna: Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5µm
- Fase móvil: Agua desionizada
- Flujo: 0.6 mL/minuto
- Temperatura de la columna: 75 °C
- Temperatura del detector: 55 °C
- Temperatura del auto muestreador: 25 °C
- Volumen de inyección: 10 µL

### Procedimiento:

20. Equilibrar la columna con la fase móvil durante al menos 30 minutos.
21. Inyectar el estándar de azúcares.
22. Inyectar la muestra.
23. Registrar el cromatograma.
24. Identificar los picos de los azúcares.
25. Calcular la concentración de azúcares en la muestra utilizando el área de los picos.

**Análisis de datos:**

- El área del pico es proporcional a la concentración del azúcar.
- Se puede utilizar una curva de calibración para determinar la concentración de azúcares en la muestra.
- La curva de calibración se genera inyectando diferentes concentraciones del estándar de azúcares.

## VIII. RESULTADOS

*Tabla 6. Composición de la muestra*

	<b>Porcentaje (% m/m)</b>
Malta	80
Arroz	20

Nota: Elaboración propia. Esta es la composición de la muestra inicial utilizada para la receta de cerveza de donde fue obtenida la muestra de afrecho utilizada en este trabajo.

*Tabla 7. Humedad*

<b>No. Corrida</b>	<b>Porcentaje de humedad (%)</b>
1	80.27
2	79.55
3	82.67
<b>Promedio de humedad</b>	<b>80.83</b>

Nota: Elaboración propia. La humedad fue calculada a partir de la metodología mencionada en el apartado J. Este proceso se trabajó siguiendo los lineamientos del lugar que proporcionó el afrecho utilizado.

*Tabla 8. Cantidad de lignina*

<b>No. Corrida</b>	<b>Porcentaje Total de lignina (%)</b>
1	13.7507
2	12.9829
<b>Porcentaje promedio</b>	<b>13.3668</b>

Nota: Elaboración propia. El porcentaje de lignina fue calculada a partir de la metodología mencionada en el apartado J. En este caso se modificó y repitió la metodología originalmente propuesta ya que originalmente no se propuso pretratar físicamente la materia prima y esto dificultó la caracterización de la misma.

Tabla 9. Material residual

No. Corrida	Porcentaje de residuo (%)
1	86.2493
2	87.0171
<b>Porcentaje promedio</b>	<b>86.6332</b>

Nota: Elaboración propia. Por fines prácticos, esta tabla sólo muestra el porcentaje restante de materia de la muestra. No se discriminó entre los diferentes tipos de celulosa y otros componentes de la estructura lignocelulósica de la materia prima ya que esto no representa ningún valor relevante para el objetivo principal.

Tabla 10. Cantidad de celulosa

No. Corrida	Porcentaje Total de Celulosa (%)
1	10.527
2	12.017
<b>Porcentaje promedio</b>	<b>11.167</b>

Nota: Elaboración propia. El porcentaje de celulosa fue calculada a partir de la metodología mencionada en el apartado J. Esta sección fue trabajada siguiendo la metodología de Van Soest junto con la metodología de Klasson.

Tabla 11. Cantidad de hemicelulosa y otros componentes

No. Corrida	Porcentaje Total de Hemicelulosa (%)
1	75.7223
2	75.1157
<b>Porcentaje promedio</b>	<b>75.419</b>

Nota: Elaboración propia. El porcentaje de hemicelulosa fue calculada a partir de la metodología mencionada en el apartado J. Esta sección fue trabajada siguiendo la metodología de Van Soest junto con la metodología de Klasson.

Tabla 12. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis ácida #1

# Pico	Tiempo de Retención (min)	Ancho (min)	Área (nRIU*s)	Área %	Nombre
1	8.627	0.000	0.000	0.000	Sacarosa
2	10.516	0.000	0.000	0.000	Glucosa
3	13.290	0.000	0.000	0.000	Fructosa

Nota: Elaboración propia. Método para determinación de azúcares, columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5µm, fase móvil; agua, temperatura de 75, 55 en el detector y 25 en el termostato del auto muestreador (tcc), 0.6 mL/minuto.

Tabla 13. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis ácida #2

# Pico	Tiempo de Retención (min)	Ancho (min)	Área (nRIU*s)	Área %	Nombre
1	8.627	0.000	0.000	0.000	Sacarosa
2	10.516	0.000	0.000	0.000	Glucosa
3	13.290	0.000	0.000	0.000	Fructosa

Nota: Elaboración propia. Método para determinación de azúcares, columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5µm, fase móvil; agua, temperatura de 75, 55 en el detector y 25 en el termostato del auto muestreador (tcc), 0.6 mL/minuto.

Tabla 14. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis ácida #3

# Pico	Tiempo de Retención (min)	Ancho (min)	Área (nRIU*s)	Área %	Nombre
1	8.627	0.000	0.000	0.000	Sacarosa
2	10.516	0.000	0.000	0.000	Glucosa
3	13.290	0.000	0.000	0.000	Fructosa

Nota: Elaboración propia. Método para determinación de azúcares, columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5µm, fase móvil; agua, temperatura de 75, 55 en el detector y 25 en el termostato del auto muestreador (tcc), 0.6 mL/minuto.

Tabla 15. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis ácida #4

# Pico	Tiempo de Retención (min)	Ancho (min)	Área (nRIU*s)	Área %	Nombre
1	8.627	0.000	0.000	0.000	Sacarosa
2	10.516	0.000	0.000	0.000	Glucosa
3	13.290	0.000	0.000	0.000	Fructosa

Nota: Elaboración propia. Método para determinación de azúcares, columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5um, fase móvil; agua, temperatura de 75, 55 en el detector y 25 en el termostato del auto muestreador (tcc), 0.6 mL/minuto.

Tabla 16. Azúcar presente en la muestra de hidrólisis ácida

No. De Muestra	Azúcar Presente (µg)
1	0
2	0
3	0
4	0
<b>Cantidad Promedio</b>	0

Nota: Elaboración propia. El cálculo de la cantidad de azúcar se realizó utilizando la concentración inicial de la solución (1.15 mg/mL). Durante la hidrólisis ácida de la materia se observó una gran cantidad de materia sólida que fue descartada ya que sólo se necesitaba el jarabe glucosado de la solución. En este caso el periodo catalítico dentro de la autoclave fue más de lo propuesto en la metodología ya que el ciclo de la misma ya estaba programado.

Tabla 17. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis enzimática #1

# Pico	Tiempo de Retención (min)	Tipo	Ancho (min)	Área (nRIU*s)	Área %	Nombre
1	8.627		-	-	-	Sacarosa
2	10.917	VBA	2.231056e <sup>-7</sup>	3.00723e <sup>-7</sup>	6.70928	Glucosa
3	13.294		-	-	-	Fructosa

Nota: Elaboración propia. Método para determinación de azúcares, columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5um, fase móvil; agua, temperatura de 75, 55 en el detector y 25 en el termostato del auto muestreador (tcc), 0.6 mL/minuto.

Tabla 18. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis enzimática #2

# Pico	Tiempo de Retención (min)	Tipo	Ancho (min)	Área (nRIU*s)	Área %	Nombre
1	8.627		-	-	-	Sacarosa
2	10.917	VV	$2.17632e^7$	$3.00723e^{-7}$	6.54469	Glucosa
3	13.294		-	-	-	Fructosa

Nota: Elaboración propia. Método para determinación de azúcares, columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5um, fase móvil; agua, temperatura de 75, 55 en el detector y 25 en el termostato del auto muestreador (tcc), 0.6 mL/minuto.

Tabla 19. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis enzimática #3

# Pico	Tiempo de Retención (min)	Tipo	Ancho (min)	Área (nRIU*s)	Área %	Nombre
1	8.627		-	-	-	Sacarosa
2	10.917	VBA	$2.10562e^7$	$3.00723e^{-7}$	6.33100	Glucosa
3	13.294		-	-	-	Fructosa

Nota: Elaboración propia. Método para determinación de azúcares, columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5um, fase móvil; agua, temperatura de 75, 55 en el detector y 25 en el termostato del auto muestreador (tcc), 0.6 mL/minuto.

Tabla 20. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis enzimática #4

# Pico	Tiempo de Retención (min)	Tipo	Ancho (min)	Área (nRIU*s)	Área %	Nombre
1	8.627		-	-	-	Sacarosa
2	10.917	VP	$2.14195e^7$	$3.00723e^{-7}$	6.44135	Glucosa
3	13.294		-	-	-	Fructosa

Nota: Elaboración propia. Método para determinación de azúcares, columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5um, fase móvil; agua, temperatura de 75, 55 en el detector y 25 en el termostato del auto muestreador (tcc), 0.6 mL/minuto.

Tabla 21. Azúcar presente en la muestra de hidrólisis enzimática

No. De Muestra	Azúcar Presente (µg)
1	154.313
2	150.528
3	145.613
4	148.151
<b>Cantidad Promedio</b>	<b>146.651</b>

Nota: Elaboración propia. El cálculo de la cantidad de azúcar se realizó utilizando la concentración inicial de la solución (1.15 mg/mL). En este se utilizó una enzima liofilizada, lo cual ayuda a la prolongación en el tiempo de vida de la misma. Dicha enzima fue cuidadosamente resguardada dentro del rango de temperatura propuesto por el fabricante, lo cual permitió que la enzima siguiera funcionando después de mucho tiempo.

Tabla 22. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis combinada #1

# Pico	Tiempo de Retención (min)	Tipo	Ancho (min)	Área (nRIU*s)	Área %	Nombre
1	8.627		-	-	-	Sacarosa
2	10.917	BB A	2.08448e <sup>7</sup>	3.00723e <sup>-7</sup>	6.26852	Glucosa
3	13.294		-	-	-	Fructosa

Nota: Elaboración propia. Método para determinación de azúcares, columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5µm, fase móvil; agua, temperatura de 75, 55 en el detector y 25 en el termostato del auto muestreador (tcc), 0.6 mL/minuto.

Tabla 23. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis combinada #2

# Pico	Tiempo de Retención (min)	Tipo	Ancho (min)	Área (nRIU*s)	Área %	Nombre
1	8.627		-	-	-	Sacarosa
2	10.917	BB A	2.04212e <sup>7</sup>	3.00723e <sup>-7</sup>	6.14112	Glucosa
3	13.294		-	-	-	Fructosa

Nota: Elaboración propia. Método para determinación de azúcares, columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5µm, fase móvil; agua, temperatura de 75, 55 en el detector y 25 en el termostato del auto muestreador (tcc), 0.6 mL/minuto.

Tabla 24. Cantidad de azúcares fermentables obtenida por análisis HPLC para muestra de hidrólisis combinada #1

# Pico	Tiempo de Retención (min)	Tipo	Ancho (min)	Área (nRIU*s)	Área %	Nombre
1	8.627		-	-	-	Sacarosa
2	10.917	BBA	$2.04234e^7$	$3.00723e^{-7}$	6.14180	Glucosa
3	13.294		-	-	-	Fructosa

Nota: Elaboración propia. Método para determinación de azúcares, columnas Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5um, fase móvil; agua, temperatura de 75, 55 en el detector y 25 en el termostato del auto muestreador (tcc), 0.6 mL/minuto.

Tabla 25. Azúcar presente en la muestra de hidrólisis combinada

No. De Muestra	Azúcar Presente (µg)
1	146.683
2	143.702
3	143.718
<b>Cantidad Promedio</b>	<b>144.701</b>

Nota: Elaboración propia. El cálculo de la cantidad de azúcar se realizó utilizando la concentración inicial de la solución (1.17 mg/mL). El pH de la solución obtenida de la hidrólisis ácida quedó en el rango alto del pH requerido para el funcionamiento de la enzima. En este caso no se retiró materia sólida disuelta en la solución para que esta estuviera a disposición de la enzima.

## IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Respecto al primer objetivo, se logró determinar una humedad absoluta del 80.83% con una desviación estándar de 1.63 y un error de 0.94. Esta humedad fue calculada con la muestra fresca después de salir del proceso de fermentación de cerveza. El secado de la muestra, junto con un almacenamiento en un lugar seco y con baja presencia de oxígeno, también prolongó el tiempo de vida de la muestra, de lo contrario la muestra hubiera seguido con una fermentación parcial y, posteriormente un proceso de putrefacción.

Luego, se determinó la cantidad presente de lignina (13.37%) en la muestra. Este valor es comparable con los resultados obtenidos en los trabajos de Kanauchi, Prentice y Xiros. en los cuales se reportaron valores del 16.8%, 9% y 11.50% de lignina, respectivamente. De esta manera podemos denotar que la cantidad de lignina presente en la muestra utilizada está dentro de los valores deseados. Esto demuestra que la materia prima utilizada contiene valores manejables, ya que, de poseer un mayor porcentaje de lignina en su composición, se complicaría en gran manera el poder degradar y romper las fibras de la lignina por lo que la obtención de azúcares se vería afectada.

El proceso para la determinación de la lignina fue repetido debido a que en la primera ocasión no se degradó correctamente el bagazo en presencia del ácido utilizado, obteniendo un valor fuera del rango especificado en la literatura citada. A pesar de ser un ácido concentrado en presencia de calor, la celulosa presentó gran dificultad a la hora de su degradación. En la segunda ocasión, se pulverizó la muestra con mortero y pistilo para posteriormente ser tamizada con un MESH de porosidad media-fina con el fin de utilizar un tamaño de partícula menor y, de esta manera, facilitar la hidrolización del producto

La principal fuente de error en la etapa del proceso de ruptura ácida de las fibras fue el tamaño de partícula de la muestra inicial. Dicha muestra no fue manipulada de ninguna manera previamente a la experimentación por lo que la fortaleza y el gran tamaño en la estructura molecular de la de celulosa y hemicelulosa presentes en el bagazo impidieron al ácido catalizado degradar dichas cadenas. Se recomienda la utilización de una molienda eléctrica y un tamizador con MESH más fino para obtener una mejor separación y un tamaño de partícula aún mejor para el proceso en cuestión.

La resistencia molecular de la celulosa y la hemicelulosa, caracterizadas por estructuras moleculares robustas y muy reticuladas, impidió que el catalizador ácido penetrara eficazmente y fragmentara las cadenas (Sun et al., 2016). La complejidad estructural, unida al considerable tamaño de las fibras, actuó como barrera para la acción del catalizador.

Hay que tener en cuenta que el tipo de catalizador ácido utilizado también puede influir en el proceso. Algunos catalizadores son más específicos para determinadas biomoléculas o requieren condiciones de reacción más precisas. Es posible que el catalizador elegido no fuera adecuado para la degradación de las fibras presentes en el bagazo (Zhao et al., 2019).

Durante la molienda del afrecho se observó que gran parte de la muestra no pudo ser pulverizada debido a la molienda manual utilizada, teniendo una gran presencia de cáscaras y cubiertas de la semilla de malta. Como menciona Mussatto, S. en su investigación, el afrecho se compone principalmente de la cáscara, pericarpio y cubiertas de la semilla de lcebada. Es por ello por lo que se recomienda utilizar un método de molienda eléctrico.

Posteriormente fue calculada la cantidad de celulosa y hemicelulosa de la muestra. Por fines prácticos se determinó que la experimentación no distingue entre celulosa y sus variantes. Se obtuvo un promedio de 11.167% con una desviación estándar de 0.766 y un error de 0.442 de celulosa. Este valor se compara a los valores presentes en la mayoría de los trabajos citados, especialmente a la investigación de Kanauchi, O. en donde el valor es de 11.9% representando únicamente un 6.16% de error respecto al valor obtenido en este trabajo.

También se obtuvo 75.32% de hemicelulosa, con una desviación estándar de 1.424 y un error de 0.821. Nuevamente este valor se encuentra del rango esperado, siendo comparable con los valores encontrados en la literatura de Kanauchi, O. con valores reportados de 76.20% respectivamente.

En este caso la celulosa (11.17%) es la materia que puede ser aprovechada para la obtención de glucosa fermentable más adelante en el proceso. Cabe mencionar que el afrecho, al ser un residuo de un proceso de fermentación de cerveza, es un producto degradado que ya ha cedido sus principales características, pero que aún posee ciertas propiedades atractivas que pueden ser aprovechadas con el fin de obtener etanol.

En este caso se busca determinar si es viable que el afrecho sea utilizado con un segundo propósito. Se realizó la hidrolización ácida de dicha materia prima y se determinó que, luego de la experimentación y el análisis HPLC, no se obtuvieron azúcares fermentables. La falta de resultados se atribuye a la dificultad que representa la degradación de la lignina y la poca selectividad que representa esta metodología.

La hidrólisis alcalina inicial propone poder degradar la lignina haciendo uso de hidróxido de sodio (NaOH) y altas temperaturas (60-80 °C). Para esta experimentación se propuso seguir la metodología propuesta por M. J. Taherzadeh y K. Karimi, haciendo uso de una solución de hidróxido diluida (1N) para evitar la pérdida de materia prima (celulosa y hemicelulosa) que se utilizaría posteriormente en la obtención de azúcares. La baja concentración de la solución no logró degradar las fibras de lignina impidió la obtención de

las fibras deseadas de celulosa. Además, es probable que la temperatura (50°C) utilizada no fue suficiente para poder romper las fibras de la lignina. Se recomienda hacer un estudio puntual para encontrar el punto óptimo en la concentración, temperatura y tiempo de reacción del hidróxido utilizado para dicho propósito.

En metodologías de este tipo, haciendo uso de otras materias primas cómo es el caso de Espinosa, F. quien indica que, para el excedente orgánico del banano, “la hidrólisis alcalina tiene problemas al trabajar con concentraciones y temperaturas elevadas, puesto que en los resultados de la deslignificación se evidencia que existe una pérdida excesiva de masa. Se observa que existe una pérdida considerable de estos dos compuestos, si bien el objetivo de la hidrólisis es la destrucción de la lignina, no es recomendable extremar las condiciones puesto que se reduce el rendimiento de la operación.”

En pro de disminuir la pérdida de materia prima se propuso trabajar con condiciones menos agresivas, pero no se alcanzaron los resultados deseados por lo que podemos decir que una hidrólisis por vía ácida con un pretratamiento alcalino no representa un buen método para dar un segundo uso a afrecho residual de un proceso cervecero. Tal cómo indica Mussatto, S. “Para separar las fibras de celulosa a partir de cualquier material lignocelulósico, es necesaria la solubilización de la lignina en el medio reaccional. Sin embargo, la remoción de esas fracciones debe ocurrir sin causar degradación de la cadencelulósica, para que ésta presente características adecuadas para su posterior utilización.”

Cómo nos indica Espinosa, F. “El modelado de la hidrólisis de un polímero es complicado, los factores que intervienen están estrechamente relacionados con los materiales lignocelulósicos como lo es tamaño, forma de partículas, y el tipo de estructura si es proveniente de maderas blandas o duras, de la misma manera intervienen las condiciones de la extracción, así la concentración del álcali, la temperatura, el tiempo, la agitación, se debe tener especial cuidado con la cantidad de material, el contacto interfacial, la interferencia con otros compuestos.” Por lo que, al no tener una metodología optimizada para la utilización de afrecho de malta es complicado obtener los resultados deseados.

El afrecho utilizado contaba con un bajo porcentaje de celulosa (11.17%) respecto a los otros compuestos lignocelulósicos, lo cual dificulta aún más la extracción de azúcares que puedan ser fermentados posteriormente. En términos industriales, la utilización de altas temperaturas y concentraciones representa un gasto aún mayor. Además, el hecho de la gran pérdida de materia utilizable representa un bajo rendimiento por lo que no se recomienda escalar este proceso. Se necesitaría cantidades demasiado grandes de afrechocervecero para que un proyecto de este tipo tuviera sentido.

Otro punto que pudo haber representado una fuente de error es el ácido que fue utilizado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ya que pueden existir ácidos más adecuados para romper las macromoléculas de la celulosa y poder degradarlas en azúcares. Este es un paso muy

importante y que debe ser considerada ya que la elección de un buen ácido influirá en gran manera en el rompimiento de las fibras que nos interesan.

En este caso se decidió trabajar con ácido sulfúrico debido a que es un ácido con alta capacidad de deshidratación, lo que lo hace muy efectivo para romper los enlaces glucosídicos que unen las unidades de glucosa en la celulosa. Además, es un reactivo relativamente barato y fácil de obtener. El  $H_2SO_4$  puede utilizarse en una amplia gama de condiciones de reacción, como temperatura, presión y concentración, lo que permite ajustar el proceso de hidrólisis a las necesidades específicas.

No obstante, cabe mencionar y tener en cuenta que el ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) es corrosivo que puede dañar el equipo y ser peligroso para los trabajadores si no se manipula adecuadamente. También, la hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$  puede producir subproductos indeseables, como furfural y el ácido levulínico, que pueden afectar a la calidad del producto final.

Así como la selección acertada del ácido utilizado y, de la misma manera que con la hidrólisis alcalina, Es importante investigar y definir los parámetros óptimos de reacción de la hidrólisis ácida (concentración, temperatura, tiempo de reacción, etc.) ya que la utilización de condiciones bajas puede no ser suficiente para lograr la despolimerización de la celulosa, pero condiciones muy severas pueden ingerir en una pérdida aún mayor de la celulosa deseada, imposibilitando de la misma manera la obtención de los azúcares deseados.

Uno de los cuellos de botella más importantes en el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica es la dificultad de realizar de una manera efectiva y económica en la hidrólisis de la celulosa. Los enlaces  $\beta$ -glicosídicos de las moléculas de azúcar contenidas en la celulosa o lignocelulosa son muy fuertes, además, la celulosa en las materias primas se encuentra formando una estructura de cadenas de celulosa en microfibras, que a su vez están unidas por numerosos puentes de hidrógeno entre ellas, lo que hace que sea muy difícil su hidrólisis (Morales, S. 2015).

En esta ocasión el tiempo de reacción entre el ácido y el afrecho pudo haber representado la mayor fuente de error, ya que se utilizó la autoclave durante unas cuantas horas a manera de catalizar la reacción, pero es recomendable dejar y controlar la acidez de la reacción durante un periodo de tiempo más largo para asegurar una despolimerización más efectiva.

Morales, S. indica que “Los métodos industriales de hidrólisis ácida se agrupan en dos tipos: los que emplean ácidos concentrados (10-30%), trabajan a bajas temperaturas (170-190°C) y mayor tiempo de residencia; y los que utilizan ácidos diluidos (1-5%), a temperaturas más altas (160-240°C), y tiempo de reacción de 6-12 segundos.” Es necesario analizar qué metodología se acopla de mejor manera para el afrecho de malta debido a su,

relativamente, baja concentración de celulosa requiere de un método que sea eficiente y efectivo.

Una importante fuente de error en esta etapa del proceso pudo ser la neutralización del pH básico que se encontraba en el medio antes de comenzar con la hidrólisis ácida, ya que si no se hubiera neutralizado de manera correcta será necesario añadir mayor cantidad de ácido a la solución para poder obtener las condiciones de operación deseadas, lo cual repercute en términos de eficiencia y a su vez en los costos de la experimentación.

Uno de los objetivos importantes de esta investigación fue el uso de enzimas para presentar una alternativa en la obtención de azúcar a partir del afrecho residual obtenido de la producción de cerveza. Haciendo uso de la enzima comercial Sigma-Aldrich, celulasa de *Trichoderma reesei* se obtuvieron resultados de 6.50658% de área en el análisis de HPLC. Lo cual nos demuestra la efectividad de la enzima para obtener azúcares a pesar de la baja cantidad de celulosa presente en la muestra utilizada.

La enzima utilizada demostró ser un método superior a la hora de obtener azúcares que posteriormente pueden ser fermentados. En promedio, se logró obtener una cantidad de 149.65 µg de azúcar para una concentración inicial de celulosa del 0.00115 g/mL. La celulasa, al ser una enzima dedicada a la obtención de azúcares partiendo de la celulosa del medio como fuente de materia prima generó mejores resultados obteniendo así una pequeña cantidad de azúcar. No obstante, la cantidad de azúcar obtenida fue mínima lo que nos indica que es necesario encontrar las concentraciones adecuadas para mejorar la eficiencia del proceso.

Es probable que utilizando una mayor concentración sea posible obtener una mayor cantidad de azúcar ya que se tendrá un mayor acceso a materia prima que puede descomponerse por medio de la enzima. Además, el pretratamiento mecánico inicial para la reducción de la partícula del afrecho podría realizarse con el fin de obtener una partícula aún más pequeña. Podría tamizarse utilizando un MESH aún más pequeño para lograr obtener un polvo fino que pueda ser digerido más fácilmente por la enzima.

Los tratamientos biológicos presentan una opción más amigable con el ambiente e incrementan la accesibilidad al material celulósico favoreciendo una subsecuente hidrólisis y/o fermentación, sin embargo, es un proceso lento que limita su aplicación a nivel industrial (Hatakka, 1983). Las principales ventajas son el alto rendimiento del producto, las condiciones moderadas de la reacción, la poca generación de compuestos tóxicos y una mínima demanda de energía (Kirk & Jeffries, 1996).

De ser un proyecto escalable a nivel industrial, una alternativa atractiva a la bioconversión es la sacarificación y fermentación simultánea (SSF), en donde las enzimas hidrolíticas y los microorganismos fermentativos están en un mismo reactor (Chandrakant

& Bisaria, 1998). La SSF consolida la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de los azúcares en un solo paso, sin embargo, la actividad de las celulasas puede ser inhibida por productos finales como la celobiosa y la glucosa.

En la industria, se han realizado numerosas investigaciones sobre la producción de etanol a partir de materiales celulósicos, y se ha utilizado la *Sacharomyces cerevisiae* para expresar genes de celulasas con el propósito de sacarificar y fermentar al mismo tiempo. Se ha logrado expresar genes que codifican para celulasas de hongos y bacterias para evaluar la hidrólisis de varios polisacáridos en la pared celular. El hongo ascomiceto *Trichoderma reesei* expresó dos celobiohidrolasas (CBHI y CBHII) con eficacia, y se descubrió que ambas enzimas tenían la capacidad de hidrolizar celulosa amorfa e incluso celulosa cristalina.

El mayor problema, actualmente, es que la enzima representa un costo muy elevado respecto a la utilización de ácidos y bases para hidrolizar los compuestos lignocelulósicos. Esto dificulta la utilización de enzimas a nivel industrial.

La búsqueda de mejores resultados en la extracción de azúcar de la celulosa ha llevado a proponer la combinación de dos métodos: la hidrólisis ácida seguida de la hidrólisis enzimática. Esta estrategia pretende aprovechar las ventajas de cada método para conseguir mayores rendimientos.

Aunque la hidrólisis ácida es rápida y eficaz, no dio resultados positivos en la extracción. Sin embargo, la hidrólisis enzimática posterior sí logró resultados similares a la experimentación independiente con hidrólisis enzimática, obteniéndose 144,70 µg de azúcar para una concentración inicial de 0,00117 g/mL de celulosa.

La ligera disminución de la cantidad de azúcar obtenida con la hidrólisis combinada se atribuye a las condiciones ácidas residuales de la hidrólisis ácida anterior, ya que el ácido presente en el medio puede afectar al pH óptimo para la actividad de la celulasa. Para mejorar la eficacia de la extracción, pueden emplearse distintas estrategias, como una mejor neutralización del ácido, el uso de enzimas más tolerantes a los ácidos o la optimización de las condiciones de hidrólisis.

## X. CONCLUSIONES

1. Se determinó que el afrecho residual de cerveza utilizado se compone principalmente de 80% malta y 20% arroz. Estructuralmente su composición es de 13.4% lignina, 11.17% celulosa y 75.42% hemicelulosa y componentes.
2. Se determinó que la humedad presente en el afrecho es de 80.83%, la cual representa una cantidad considerable. Por ello, se concluye que el secado es una parte primordial del proceso, ya que, de no eliminarse la humedad, la vida útil del afrecho disminuye considerablemente y se dificulta su almacenamiento.
3. Se determinó que el proceso de hidrolización de la muestra se logra de manera más eficiente si el afrecho es tratado por molienda y tamizado para asegurar el menor tamaño de partícula durante el proceso. Trabajar, en la medida de lo posible, con harina de afrecho reduce el tiempo de hidrolización y, por ende, aumenta la eficiencia del proceso.
4. El pretratamiento alcalino con NaOH diluido no logró degradar la lignina, lo que afectó el resultado de la hidrólisis ácida con ácido sulfúrico diluido imposibilitando la obtención de azúcares fermentables. La hidrólisis enzimática con celulasa de *Trichoderma reesei*, por otro lado, fue el método más efectivo logrando obtener 149.65 µg de azúcar para una concentración inicial de celulosa del 0.00115 g/mL. La combinación de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática no produjo resultados significativamente mejores que la hidrólisis enzimática sola, obteniendo 144,70 µg de azúcar para una concentración inicial de 0,00117 g/mL de celulosa.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la maceración y/o molienda de la muestra, seguido de un tamizado para facilitar la ruptura de la celulosa con el fin de obtener un mejor resultado en los valores de lignina presentes en la muestra durante su caracterización. De esta manera, la hidrólisis con ácido concentrado será más eficiente.
2. Se recomienda realizar una experimentación puntual para encontrar las condiciones más eficientes para la hidrólisis alcalina del material lignocelulósico para degradar la mayor cantidad de lignina posible sin perder mucha celulosa. Se recomienda evaluar la eficacia de una hidrólisis ácida para eliminar la lignina del afrecho y verificar si es una opción más efectiva en cuanto a la cantidad de celulosa obtenida.
3. Se recomienda evaluar las condiciones de operación durante la hidrólisis enzimática a manera de encontrar los parámetros óptimos para que la enzima produzca la mayor cantidad de azúcares posibles.
4. Se recomienda realizar un híbrido entre ambos métodos (hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática), haciendo uso del pretratamiento mecánico junto con el tratamiento alcalino, para garantizar una mejor ruptura de la lignina presente y, luego, realizar la hidrólisis enzimática. De esta manera, se plantea una mejor obtención de azúcares.

## XII. REFERENCIAS

- Alvarado-Lassman, A., Mendoza-Pérez, J. A., & Sánchez-Ramírez, E. (2017). Evaluación de levaduras nativas productoras de etanol presentes en el bagazo de caña de azúcar. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(1), 79-87. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-78582017000100080&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-78582017000100080&script=sci_arttext)
- Ayala, H., & Romero, H. (2013). Hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz utilizando *Trichoderma reesei*.
- Borel, L. D. M. S., et al. (2018, October 1). Pyrolysis of brewer's spent grain: Kinetic study and products identification. *Industrial Crops and Products*. <https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.051>. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.05.051
- Brian, A. B. (1993). *Practical HPLC Methodology and Applications*. <https://books.google.com.gt/books?id=iF36W3d2STMC&pg=PA13&lpg=PA13&dq=HPL#v=onepage&q&f=false>
- Camargo, C., & Melo, R. (n.d.). Producción de glucosa a partir de celulosa mediante hidrólisis ácida y enzimática.
- Campos, C., & Melo, R. Producción de glucosa a partir de celulosa mediante hidrólisis ácida y enzimática.
- Chandrakant, P., & Bisaria, V. S. (1998). Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. *Critical Reviews in Biotechnology*, 18(4), 295–331.
- Chandler, C., Villalobos, N., González, E., Arenas, E., Mármol, Z., Ríos, J., & Mazzarri, C. A. (2012). Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *Multiciencias*, 12(3), 245-253.
- ChromAcademy. *HPLC Detectors*. <https://www.chromacademy.com/channels/hplc/instrumentation/hplc-detectors/>
- Cuadros, C. C. (1995). La producción de salvado a partir del afrecho cervecero. *Ingeniería Industrial*, (013), 101-108.
- de la Rosa, S. M. (2015). Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos.
- Espinosa Cajas, F. J. (2013). Obtención de etanol mediante hidrólisis alcalina, enzimática y fermentación a partir del excedente orgánico del banano variedad *Musa paradisiaca*.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2011). *Manual de Biogás*. Santiago, Chile.

- García-Mena, J., López-Ramírez, J. A., & González-Díaz, J. A. (2018). Avances en la producción de bioetanol a partir de residuos de la industria cervecera. En *Avances de la Ciencia en México*, 8, 131-142. [https://www.cio.mx/archivos/avances\\_de\\_la\\_ciencia\\_en\\_Mexico\\_2018/Capitulo\\_7.pdf](https://www.cio.mx/archivos/avances_de_la_ciencia_en_Mexico_2018/Capitulo_7.pdf)
- Guerra, W. F. (2012). Evaluación de las características fisicoquímicas del concentrado de vaca lechera a base de afrecho de malta de cebada.
- Hatakka, A. I. (1983). Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 18, 350–357.
- Iguarán Arteaga, S. P., & Otálora Martínez, M. A. (2022). Obtención de papel artesanal a partir de afrecho de malta proporcionado por la empresa Merak Colombia (Tesis de licenciatura, Fundación Universidad de América).
- Kanauchi, O., Mitsuyama, K., & Araki, Y. (2001). Development of a functional germinated barley foodstuff from brewers' spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59, 59–62.
- Kirk, T. K., & Jeffries, T. W. (1996). Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. En T. W. Jeffries & L. Viikari (Eds.), *Enzymes for pulp and paper processing* (pp. 2–14). American Chemical Society.
- Lee, J. (2009). *Biochemical Engineering* (2nd ed.). Washington: Washington State University Press.
- Li, X. H., Yang, H. J., Roy, B., Wang, D., Yue, W. F., Jiang, L. J., ... & Miao, Y. G. (2009). The most stirring technology in future: Cellulase enzyme and biomass utilization. *African Journal of Biotechnology*, 8(11).
- Mendes, J. F., et al. (2020, October 15). Development, physical-chemical properties, and photodegradation of pectin film reinforced with malt bagasse fibers by continuous casting. *Journal of Applied Polymer Science*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.49178>. DOI: 10.1002/app.49178
- Meneses, N. G. T., et al. (2013, April 19). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*. <https://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.015>. DOI: 10.1016/j.seppur.2013.02.015
- Merck KGaA, Darmstadt, Alemania/Sigma-Aldrich. (2022). Cellulase from *Trichoderma Reesei* ATCC 26921. <https://www.sigmaldrich.com/GT/es/product/sigma/c8546>
- Mello, L. R. P. F., & Mali, S. (2014, April). Use of malt bagasse to produce biodegradable baked foams made from cassava starch. *Industrial Crops and Products*. <https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.015>. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.02.015

- Miranda, A., & Martín, O. (2013). *Cromatografía Líquida (HPLC)*. <https://www.ucm.es/data/cont/docs/650-2013-12-02-gases%20%C3%Adquidos.pdf>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Fernandes, M., Rocha, G., & Roberto, I. (2006). Efectos de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de malta para liberación de fibras de celulosa. *XXII IACChE (CIHQ)*, 10.
- Nava-Ruíz, C., López-Munguía, A., & García-Alvarado, M. A. (2015). Producción de etanol a partir de cebada no malteada hidrolizada con  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(2), 461-468. <https://www.redalyc.org/pdf/499/49912228005.pdf>
- Ovando-Chacón, S. L., & Waliszewski, K. N. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21(42), 113-122.
- Pérez-Mateos, M., & Martín-Martínez, E. (2013). Revalorización de descartes agroindustriales para la obtención de bioetanol. *Actas de Ingeniería*, 1(2), 53-63. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4210450.pdf>
- Pineda-Medina, L. F., & Ospina-Noreña, J. A. (2011). Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(1), 53-62.
- Prentice, N., & Refsguard, J. (1978). Enzymatic hydrolysis of brewers' spent grain. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 36, 196-200
- Prinsen, P. (2010). Desarrollo de bioprocesos para la obtención de biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos. En *Memorias del VIII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Procesos Químicos*, Cartagena, Colombia.
- Reiss, T. (1984). Processing of brewing wastes. *Journal of the Institute of Brewing*, 90(2), 87-95.
- Rodríguez, C. L., Bustamante, F. C., & Castillo, M. L. (2016). Evaluación de las características fisicoquímicas de bioplásticos obtenidos a partir de residuos orgánicos de la industria cervecera. *Revista de Ingeniería en Procesos Químicos*, 11(2), 33-45.
- Román, L. H., Franco, W. A., & Morales, E. M. (2017). Uso del bagazo de malta para la producción de bioplásticos biodegradables. *Revista Ciencia y Tecnología*, 20(1), 45-56.
- Sharma, S. K., & Khare, S. K. (2016). Lignocellulose based biorefineries: Challenges and opportunities. *Industrial Crops and Products*, 7(3), 1020-1035.
- Sorensen, M. (1981). Biological treatment of brewery spent grains. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 31(1), 7-12.

- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9), 1621-1651. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Tapia, F. (2014). Efectos de diferentes tratamientos de pretratamiento en la producción de biogás a partir de afrecho de cervecería. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 65-78.
- Torres-Rivas, F. A. (2009). Hidrólisis enzimática de bagazo de malta para la producción de bioetanol. *Memorias del VI Congreso Nacional de Biotecnología*, Ciudad de México.
- Trejo, A., & Serrano, J. (2011). Utilización de residuos agroindustriales en la producción de bioetanol. *Revista de Ciencias Ambientales*, 28(1), 29-35.
- Valerio, C., & Rossi, F. (2013). Producción de bioetanol a partir de residuos sólidos industriales. *Revista Ingeniería Química*, 12(2), 221-230.
- Zeng, M., & Zhang, H. (2013). Advances in enzyme technology for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *BioResources*, 8(4), 5475-5490.

### XIII. ANEXOS

En este capítulo, se presentan recursos de apoyo de la investigación. Primero, se proporcionan los datos originales del afrecho utilizado como materia prima y los reactivos necesarios. Segundo, se ilustran los resultados obtenidos en los análisis HPCL para la determinación de azúcares fermentables.

#### A. Datos Originales

*Tabla 26. Peso de muestra previo a molienda.*

<b>Muestra</b>	<b>Masa (g <math>\pm 0.001</math>)</b>
1	0.5499
2	0.5058
3	0.5337

Fuente: Elaboración propia

*Tabla 27. Perdidas de masa en proceso de molienda.*

<b>Muestra</b>	<b>Masa (g <math>\pm 0.001</math>)</b>
1	0.018
2	0.024
3	0.013

Fuente: Elaboración propia

*Tabla 28. Peso de vidrios de reloj.*

<b>Muestra</b>	<b>Masa (g <math>\pm 0.001</math>)</b>
1	28.9232
2	28.9205
3	28.9336

Fuente: Elaboración propia

*Tabla 29. Masa de papeles filtro.*

<b>Muestra</b>	<b>Masa (g <math>\pm 0.001</math>)</b>
1	0.2441
2	0.2396
3	0.2407

Fuente: Elaboración propia

*Tabla 30. Acetato de sodio utilizado para solución Buffer.*

<b>Muestra</b>	<b>Masa (g <math>\pm 0.001</math>)</b>
1	35.102

Fuente: Elaboración propia

*Tabla 31. Ácido acético glacial utilizado para solución Buffer.*

<b>Muestra</b>	<b>Volumen (mL <math>\pm 0.01</math>)</b>
1	28.63

Fuente: Elaboración propia

Ilustración 7. Curva de calibración de HPLC para metodología de azúcares

```

Method C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLCA.M

=====
                        Calibration Table
=====

CURVA DE CALIBRACIÓN DE AZUCARES

Calib. Data Modified   :      Tuesday, March 05, 2024 11:25:40 AM

Calculate              :      External Standard
Based on               :      Peak Area

Rel. Reference Window :      5.000 %
Abs. Reference Window :      4.500 min
Rel. Non-ref. Window  :      5.000 %
Abs. Non-ref. Window  :      0.000 min
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Uncalibrated Peaks    :      not reported
Partial Calibration    :      Yes, identified peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times:      No, only for identified peaks

Curve Type             :      Linear
Origin                 :      Forced
Weight                 :      Equal

Recalibration Settings:
Average Response       :      Average all calibrations
Average Retention Time:      Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
Printout of recalibrations within a sequence:
  Calibration Table after Recalibration
  Normal Report after Recalibration
If the sequence is done with bracketing:
  Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime  Lvl  Amount      Area      Amt/Area  Ref Grp Name
[ min ]  Sig  [ % (p/v) ]
-----|---|-----|-----|-----|-----
  8.627  1  1  5.00000e-1  1.10351e6  4.53098e-7  SACAROSA
         4  1.00000  1.92504e6  5.19469e-7
         2  2.00000  4.42948e6  4.51520e-7
         3  4.00000  7.74296e6  5.16598e-7
  10.516 1  1  5.00000e-1  1.70114e6  2.93921e-7  GLUCOSA
         4  1.00000  3.05856e6  3.26952e-7
         2  2.00000  6.75370e6  2.96134e-7
         3  4.00000  1.33116e7  3.00489e-7
  13.294 1  1  5.00000e-1  1.89700e6  2.63574e-7  FRUCTOSA
         4  1.00000  3.50007e6  2.85709e-7
         2  2.00000  6.07860e6  3.29023e-7
         3  4.00000  1.49829e7  2.66971e-7

Instrument 2 3/5/2024 11:25:52 AM AdEM

```

Method C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLCA.M

More compound-specific settings:

Compound: SACAROSA  
Time Window : From 7.576 min To 9.676 min

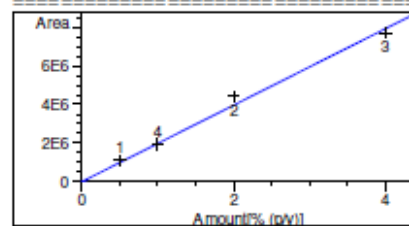
Compound: GLUCOSA  
Time Window : From 9.690 min To 12.290 min

Compound: FRUCTOSA  
Time Window : From 12.427 min To 16.027 min

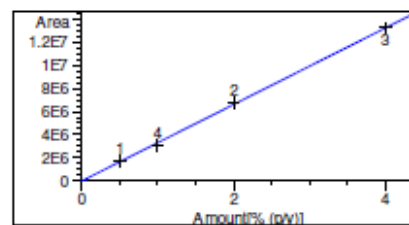
=====  
Peak Sum Table  
=====

\*\*\*No Entries in table\*\*\*  
=====

=====  
Calibration Curves  
=====

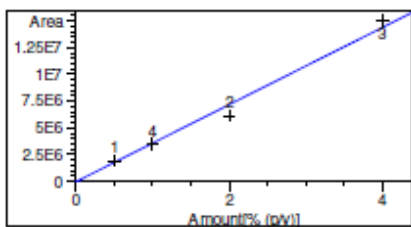


SACAROSA at exp. RT: 8.627  
RID1 A, Refractive Index Signal  
Correlation: 0.99843  
Residual Std. Dev.: 297276.29427  
Formula:  $y = mx$   
m: 1.99095e6  
x: Amount[% (p/v)]  
y: Area



GLUCOSA at exp. RT: 10.516  
RID1 A, Refractive Index Signal  
Correlation: 0.99982  
Residual Std. Dev.: 166706.20461  
Formula:  $y = mx$   
m: 3.32532e6  
x: Amount[% (p/v)]  
y: Area

Method C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLCA.M



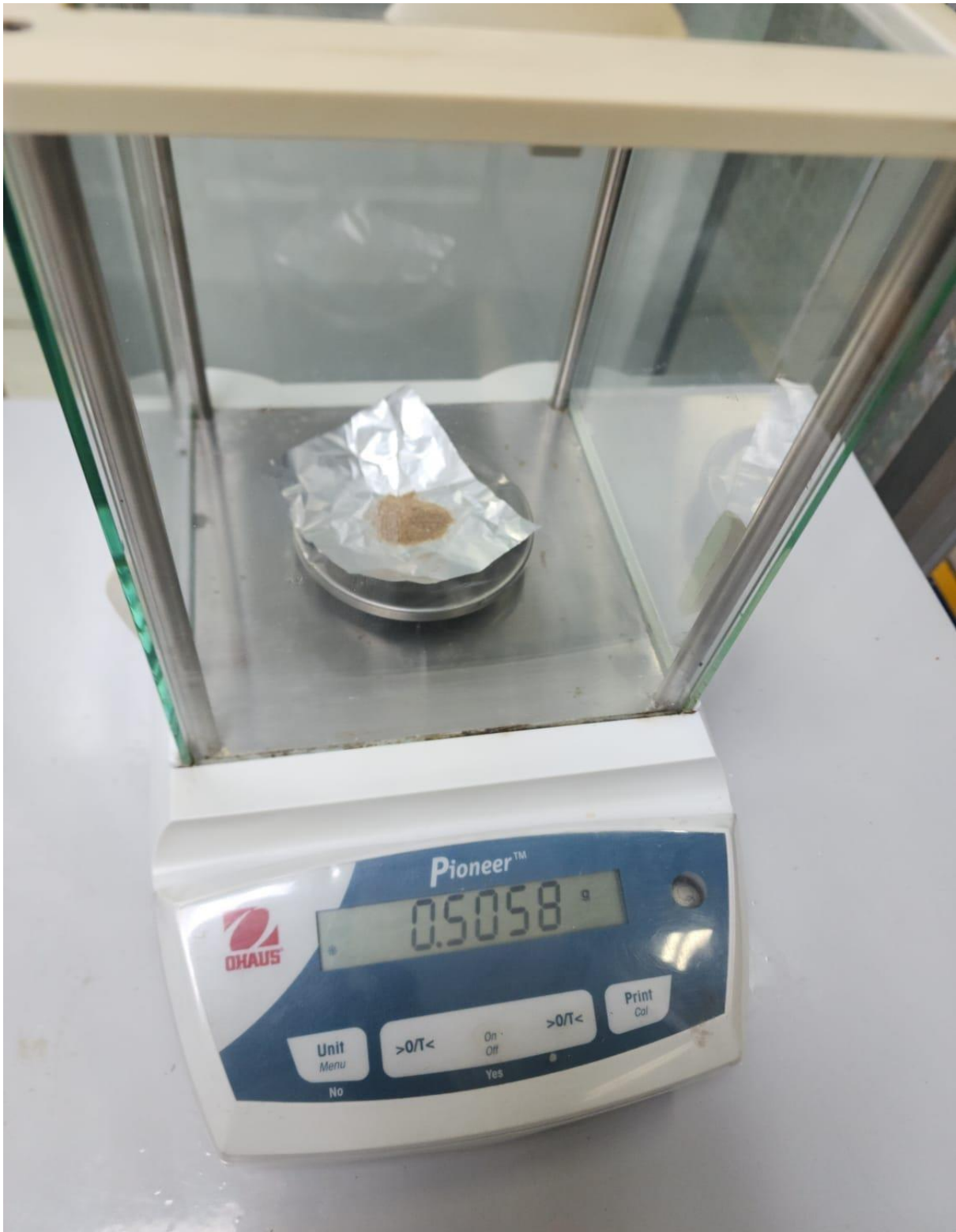
FRUCTOSA at exp. RT: 13.294  
RID1 A, Refractive Index Signal  
Correlation: 0.99708  
Residual Std. Dev.: 734088.84520  
Formula:  $y = mx$   
m: 3.60176e6  
x: Amount[% (p/v)]  
y: Area

=====

*Ilustración 8. Pesado de muestra previa a la molienda realizado en balanza analítica de Universidad del Valle de Guatemala*



*Ilustración 9. Pesado de muestra posterior a la molienda realizado en balanza analítica de Universidad del Valle de Guatemala*



*Ilustración 10. Proceso de degradación de muestra con Ácido Sulfúrico concentrado para la cuantificación de lignina realizado en Universidad del Valle de Guatemala*



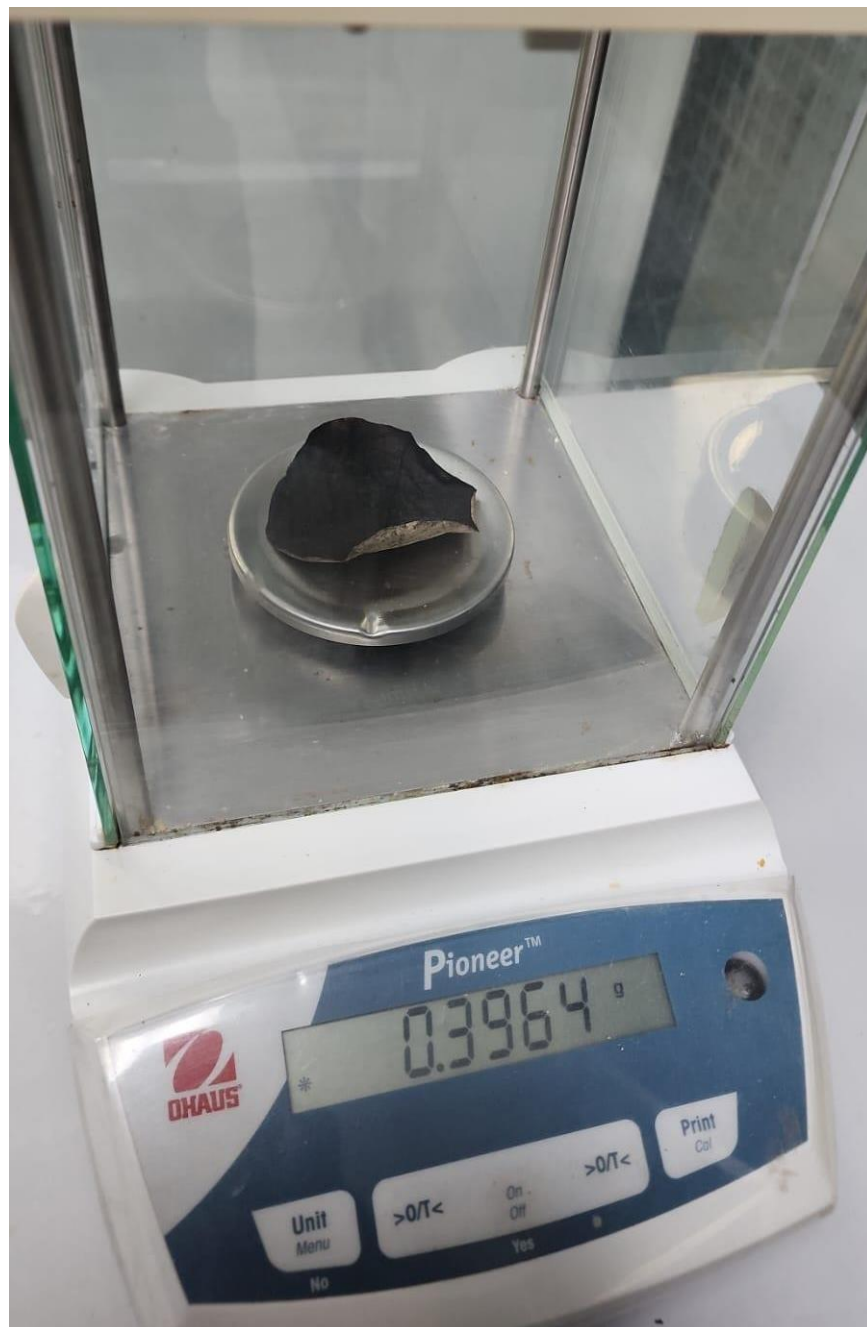
*Ilustración 11. Filtrado de muestra realizado en Universidad del Valle de Guatemala*



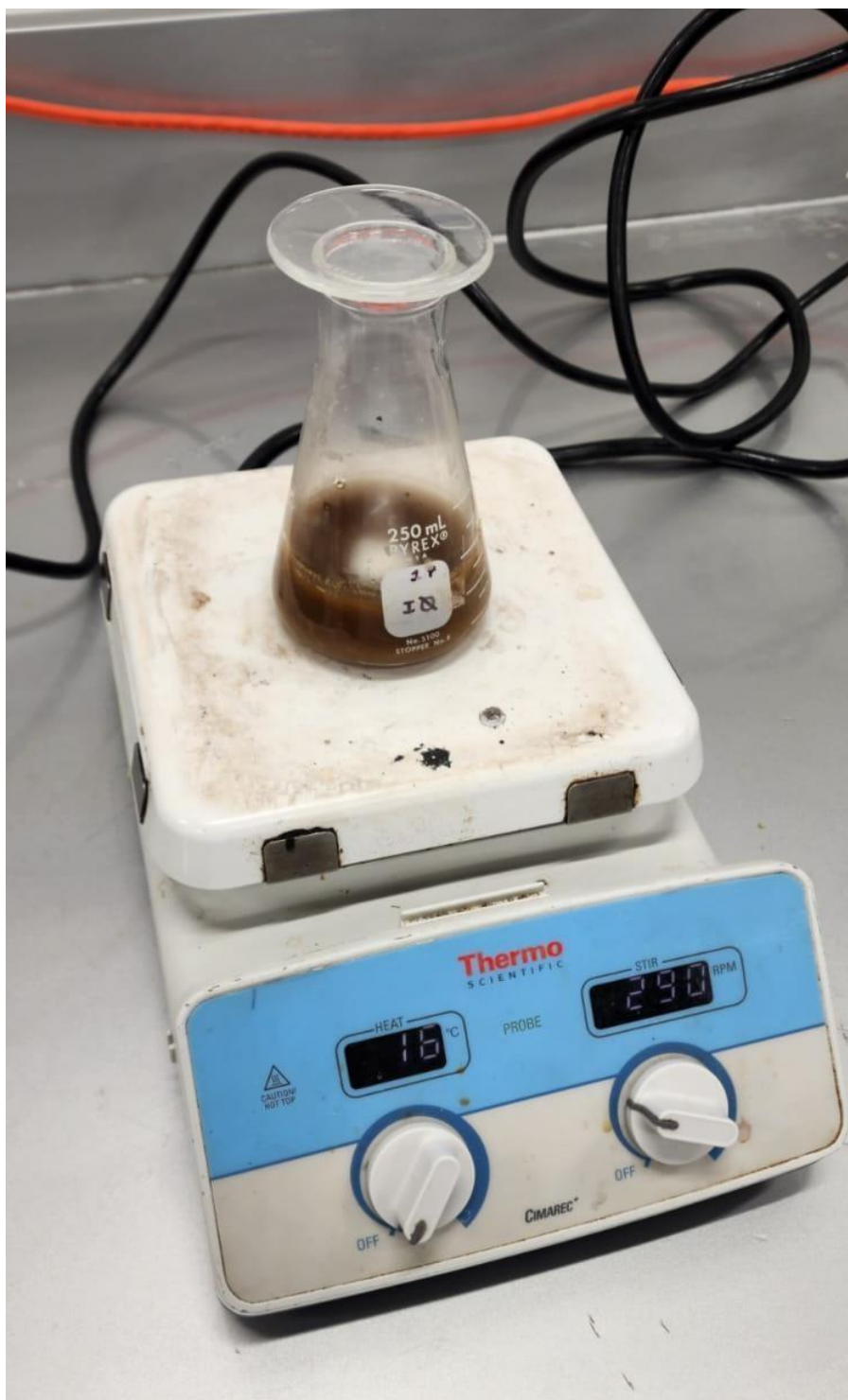
*Ilustración 12. Hidrólisis para caracterización de afrecho filtrado realizado Universidad del Valle de Guatemala*



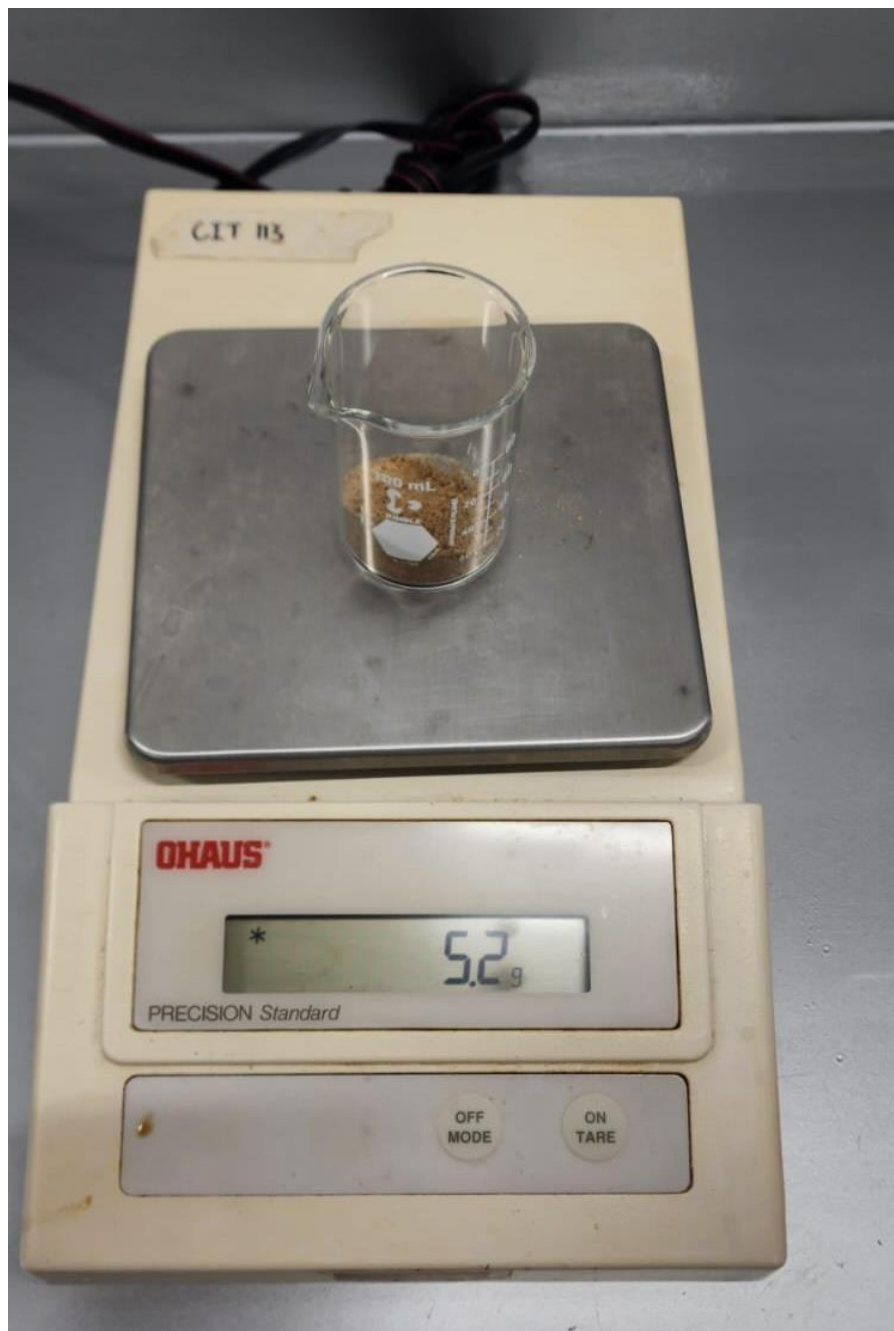
*Ilustración 13. Hidrólisis para caracterización de afrecho filtrado y seco realizado en balanza analítica de Universidad del Valle de Guatemala*



*Ilustración 14. Hidrólisis Ácida realizado Universidad del Valle de Guatemala*



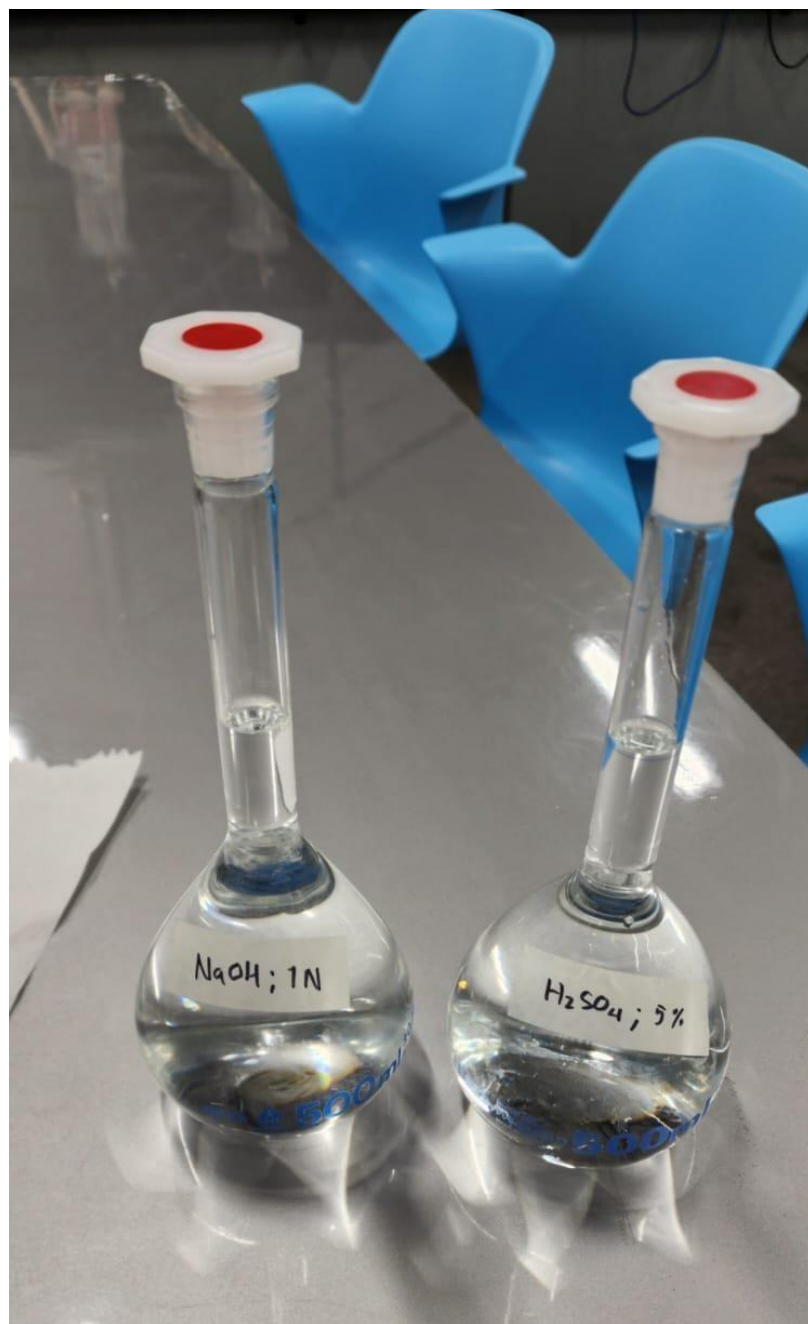
*Ilustración 15. Muestra de Afrecho Molido realizado Universidad del Valle de Guatemala*



*Ilustración 16. Pesaje de reactivos para soluciones realizado en balanza analítica de Universidad del Valle de Guatemala*



*Ilustración 17. Soluciones para Hidrólisis Ácida realizado Universidad del Valle de Guatemala*



*Ilustración 18. Solución de Afrecho hidrolizado previo al centrifugado realizado Universidad del Valle de Guatemala*



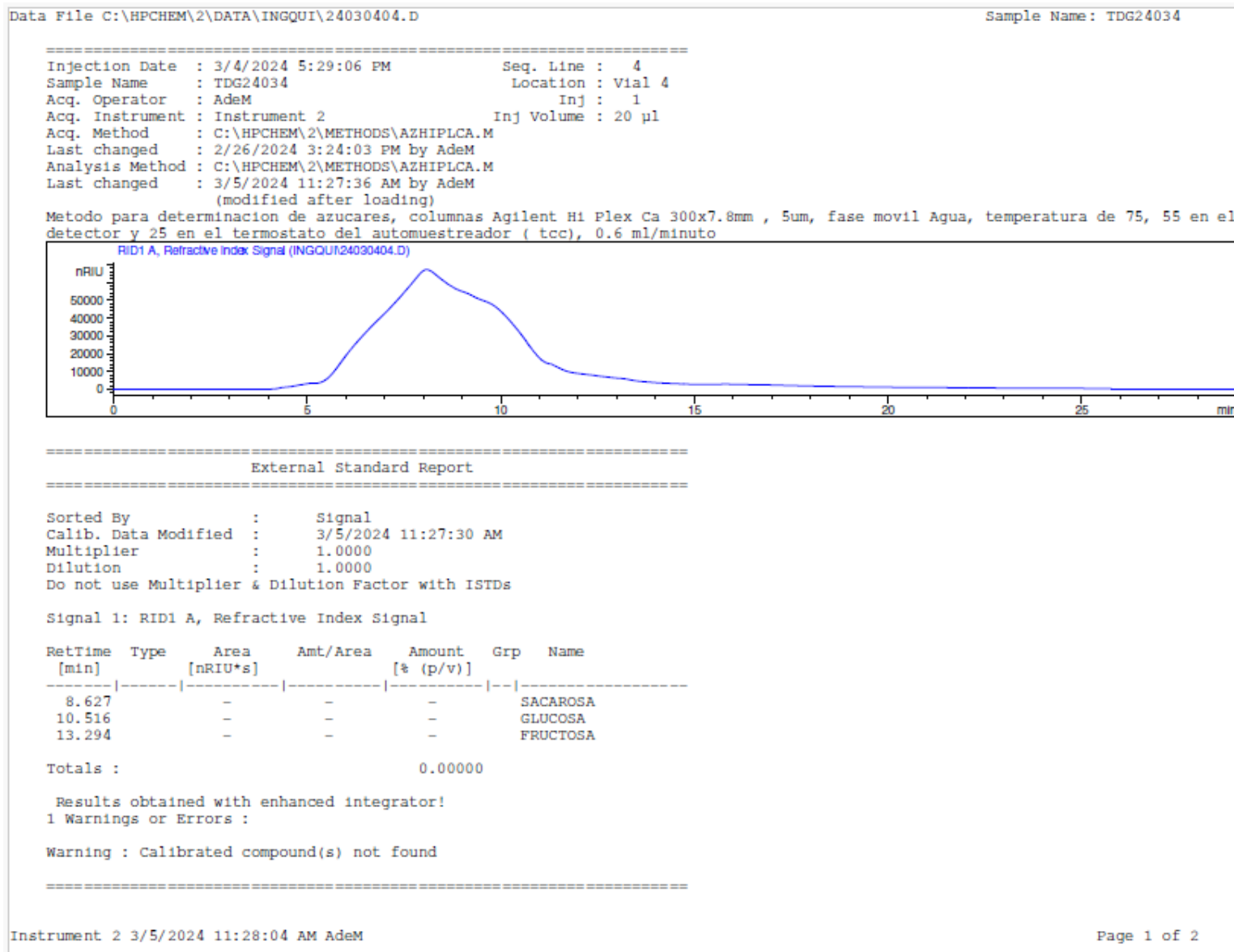
*Ilustración 19. Residuos de Hidrólisis Ácida Centrifugada realizado Universidad del Valle de Guatemala*



*Ilustración 20. Muestras de Hidrólisis Ácida para Análisis HPLC realizado Universidad del Valle de Guatemala*



Ilustración 21. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Ácida 1.



=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 3/5/2024 11:27:30 AM  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Area %	Name
1	8.627		0.0000	0.00000	0.0000	SACAROSA
2	10.516		0.0000	0.00000	0.0000	GLUCOSA
3	13.294		0.0000	0.00000	0.0000	FRUCTOSA

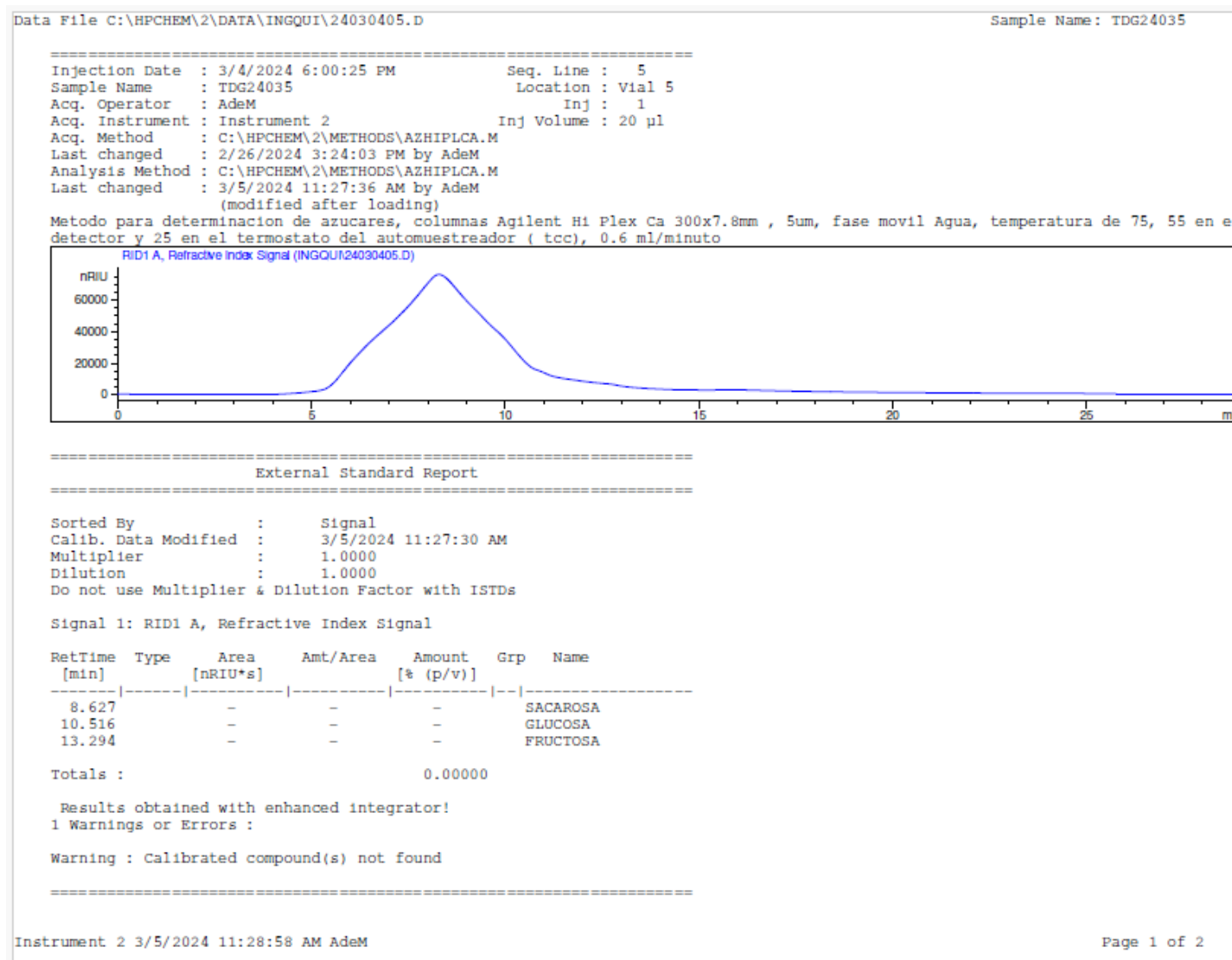
Totals : 0.00000 0.0000

Results obtained with enhanced integrator!  
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*  
=====

Ilustración 22. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Ácida 2



=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 3/5/2024 11:27:30 AM  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Area %	Name
1	8.627		0.0000	0.00000	0.0000	SACAROSA
2	10.516		0.0000	0.00000	0.0000	GLUCOSA
3	13.294		0.0000	0.00000	0.0000	FRUCTOSA

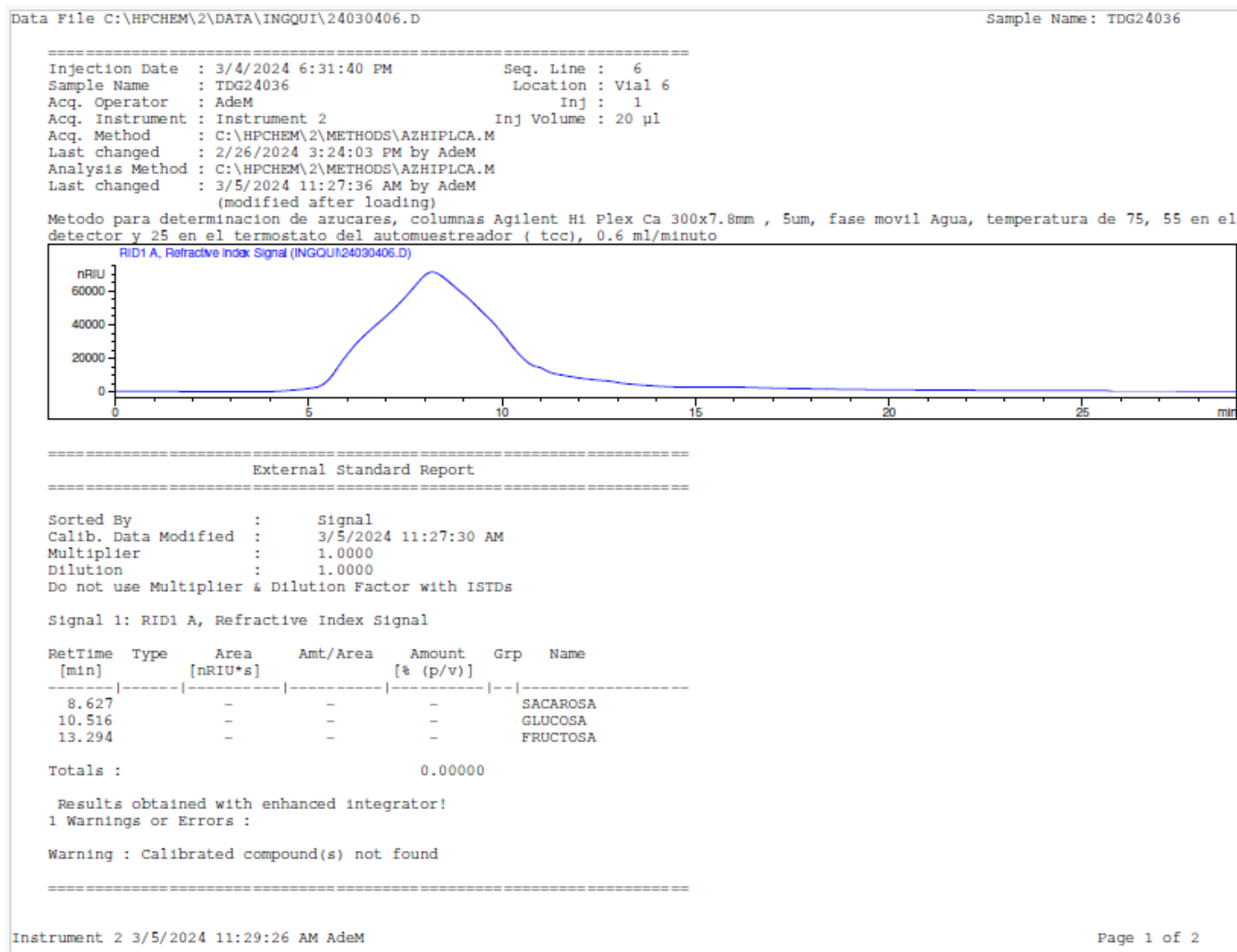
Totals : 0.00000 0.0000

Results obtained with enhanced integrator!  
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

Ilustración 23. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Ácida 3.



=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 3/5/2024 11:27:30 AM  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Area %	Name
1	8.627		0.0000	0.00000	0.0000	SACAROSA
2	10.516		0.0000	0.00000	0.0000	GLUCOSA
3	13.294		0.0000	0.00000	0.0000	FRUCTOSA

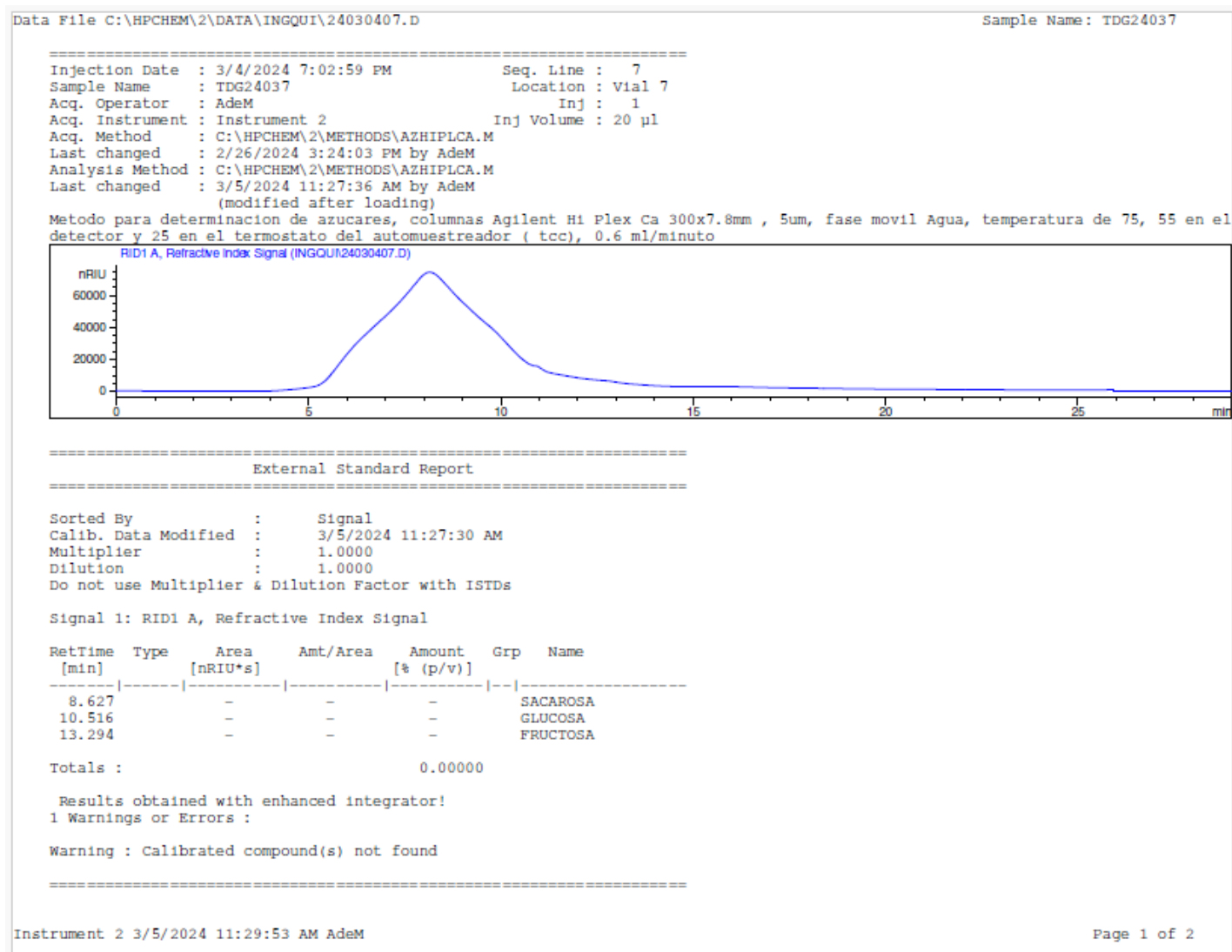
Totals : 0.00000 0.0000

Results obtained with enhanced integrator!  
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

Ilustración 24. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Ácida 4.



=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 3/5/2024 11:27:30 AM  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Area %	Name
1	8.627		0.0000	0.00000	0.0000	SACAROSA
2	10.516		0.0000	0.00000	0.0000	GLUCOSA
3	13.294		0.0000	0.00000	0.0000	FRUCTOSA

Totals : 0.00000 0.0000

Results obtained with enhanced integrator!

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

Ilustración 25. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Enzimática 1.

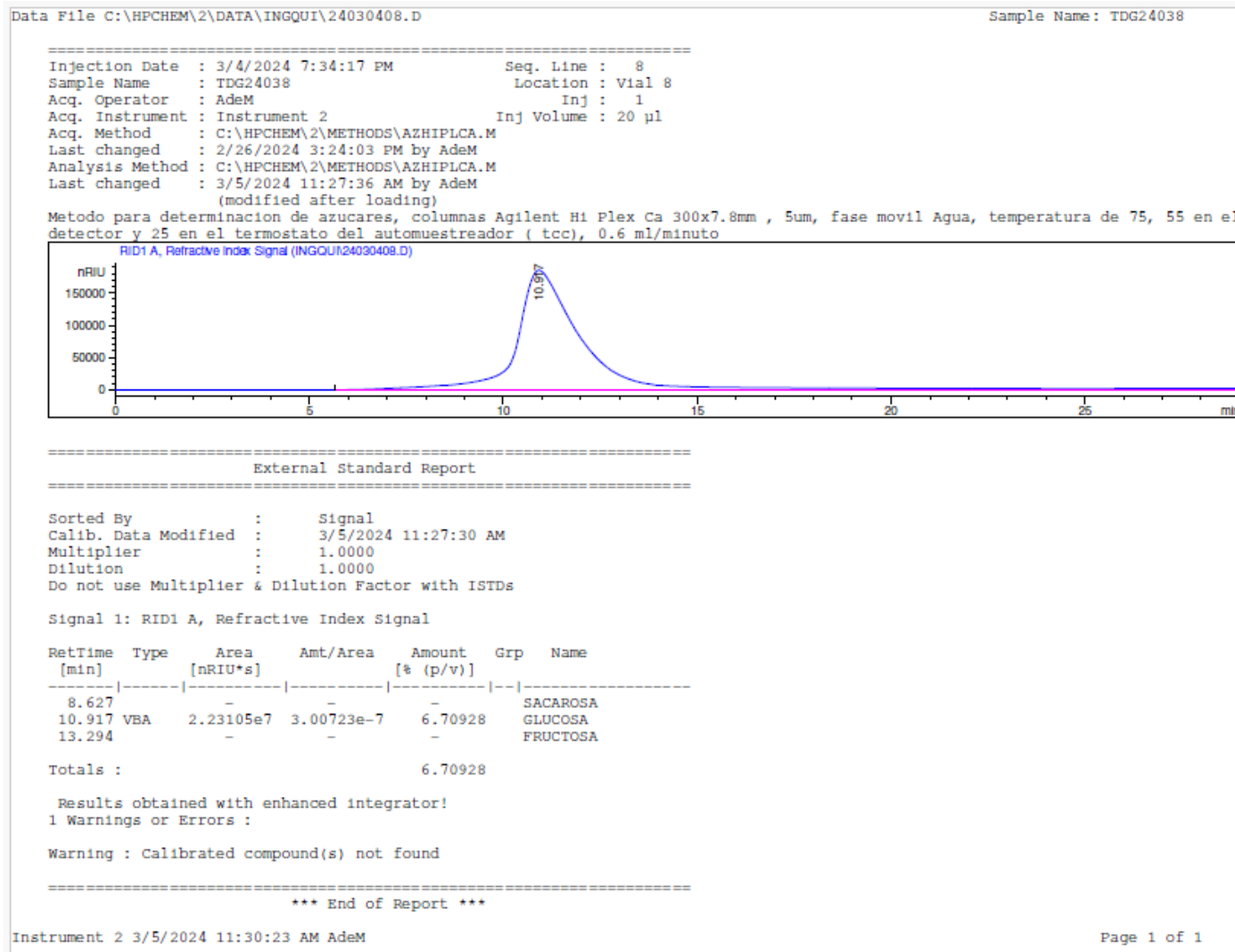


Ilustración 26. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Enzimática 2.

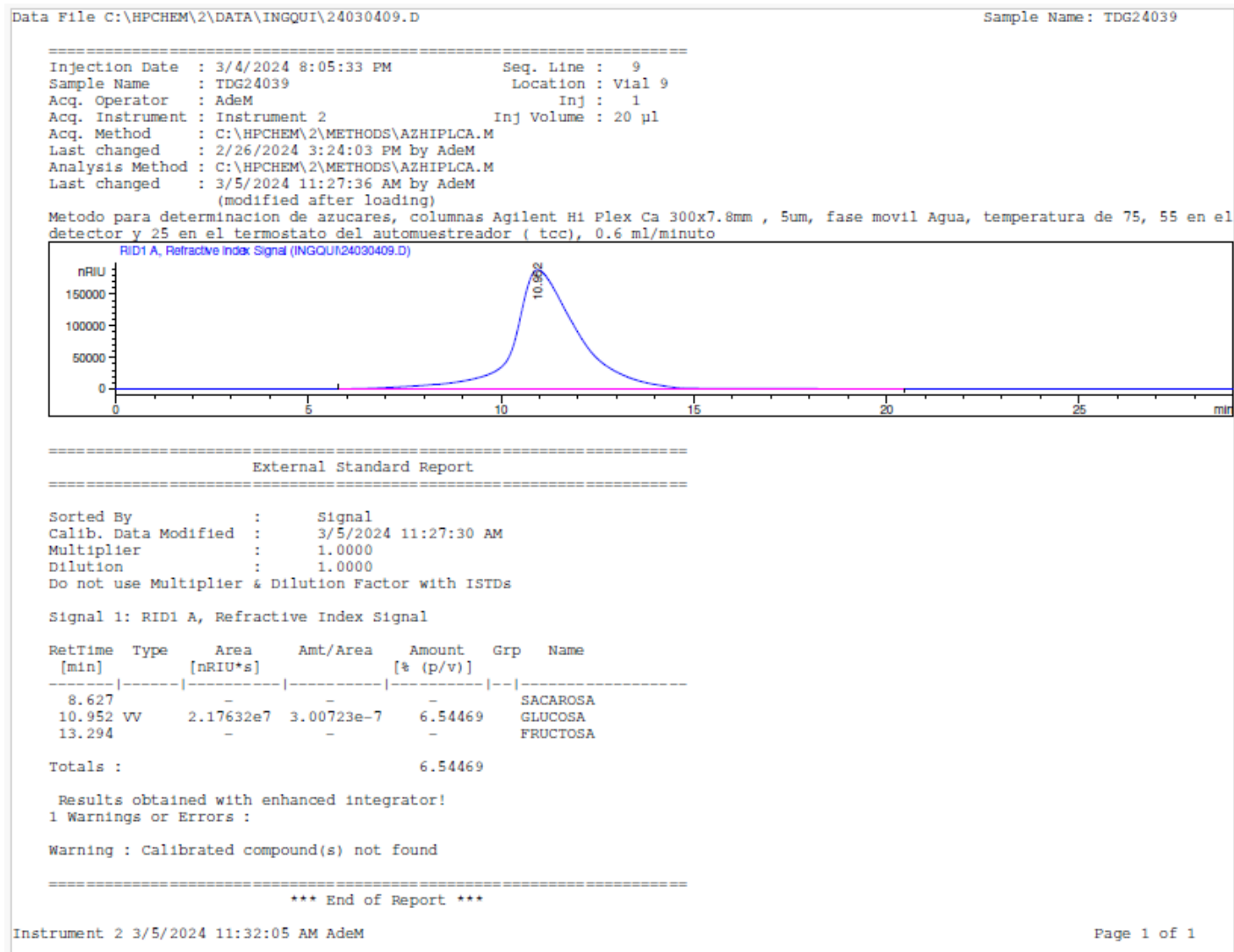


Ilustración 27. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Enzimática 3.

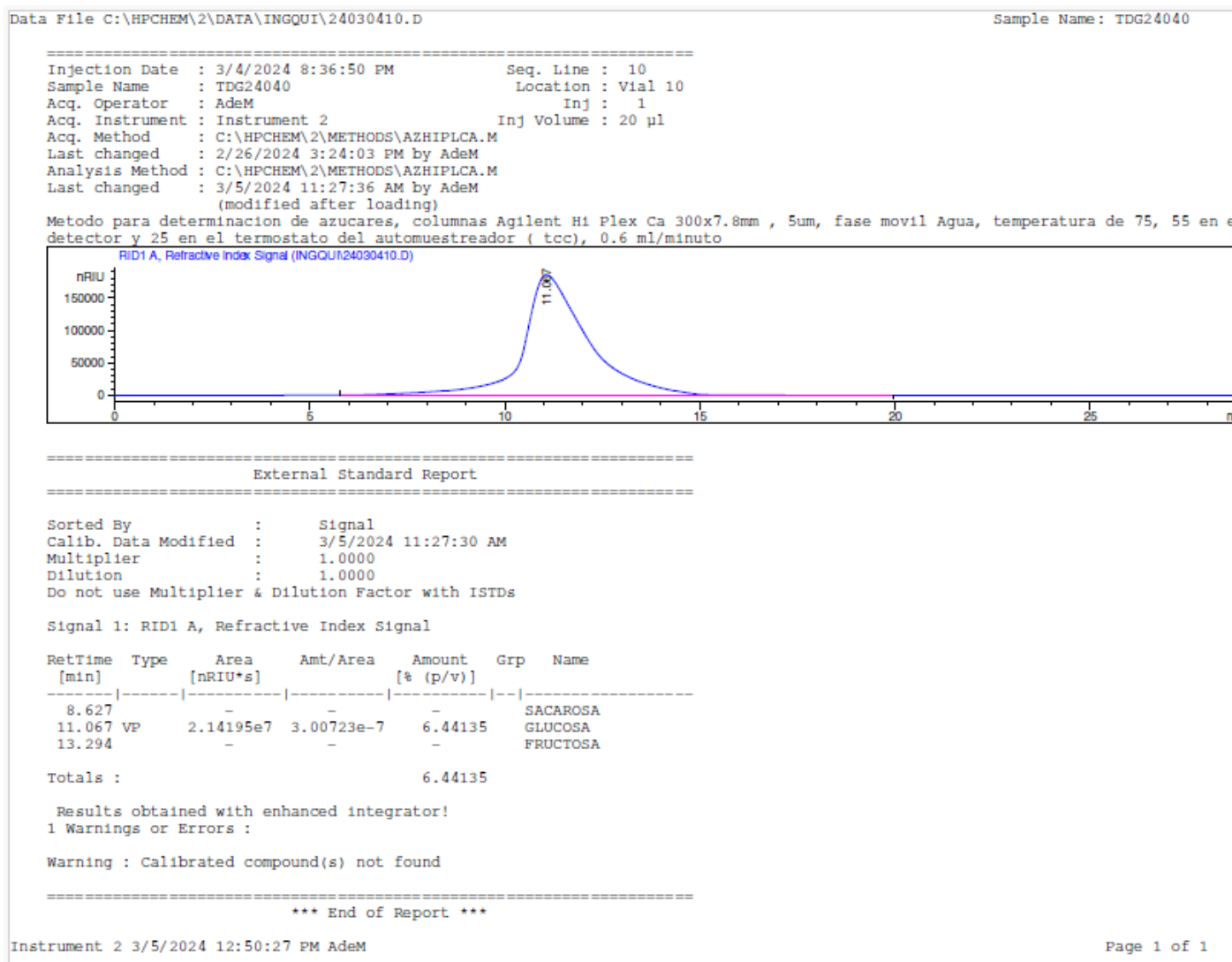


Ilustración 28. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Enzimática 4.

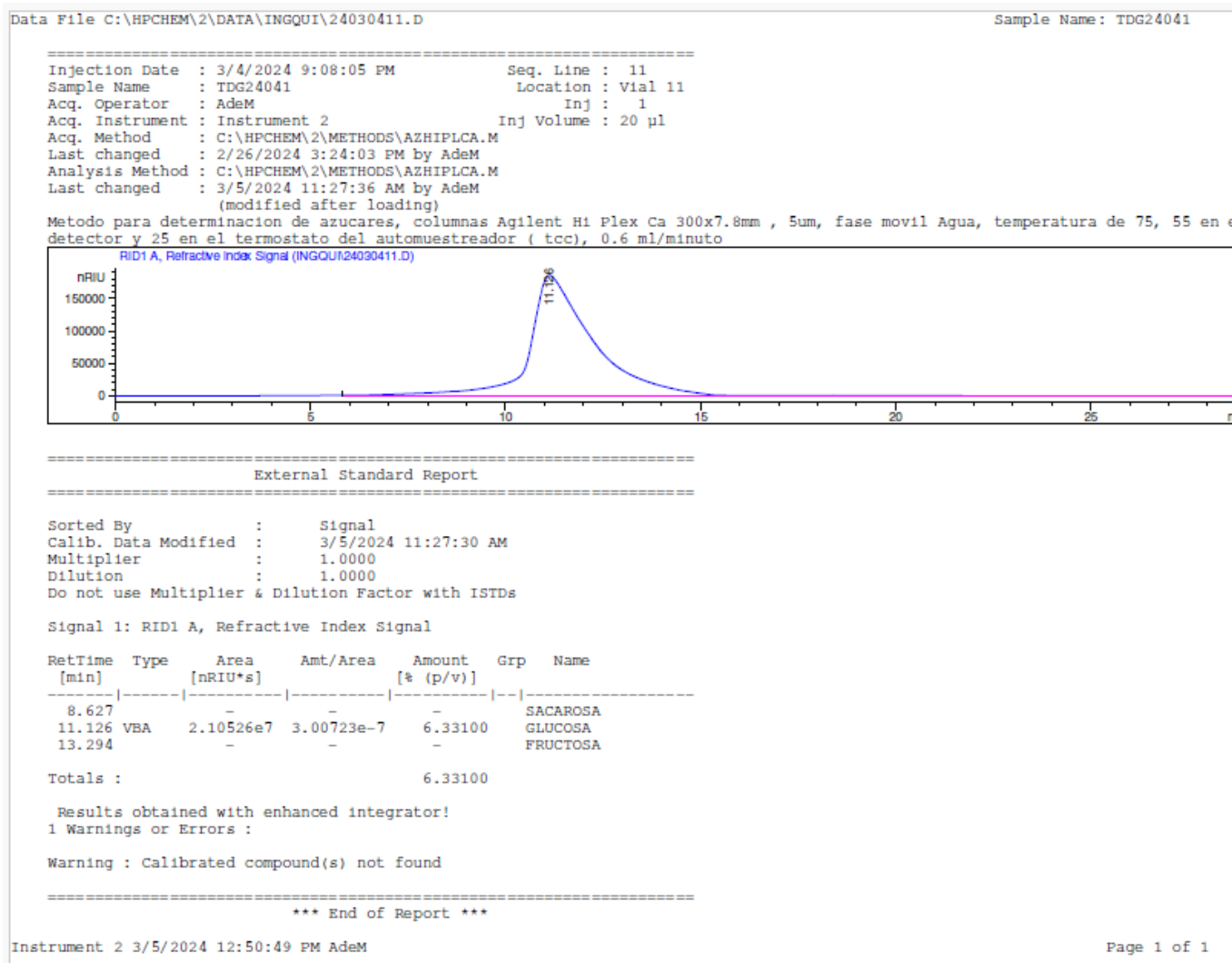


Ilustración 29. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Combinada 1.

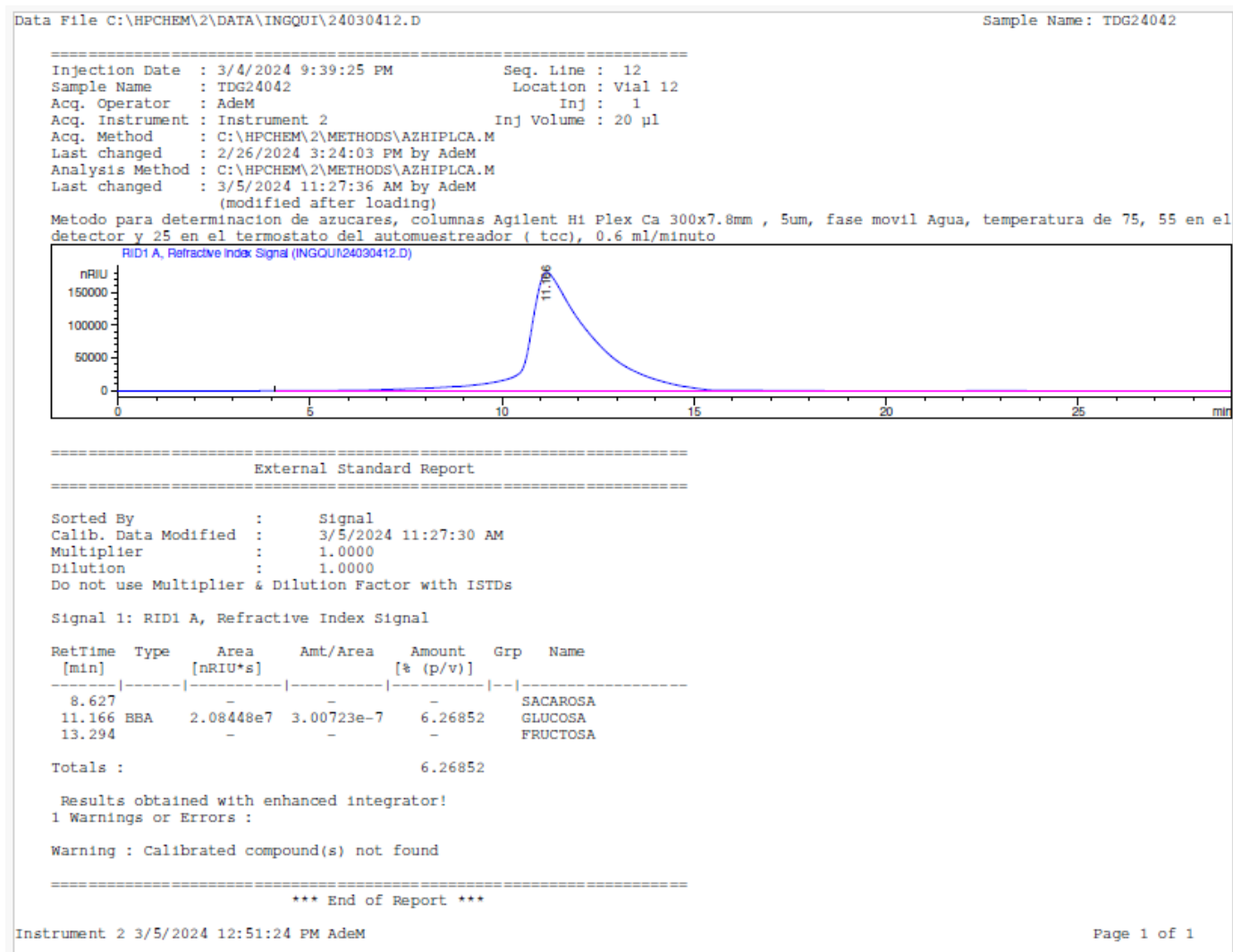


Ilustración 30. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Combinada 2.

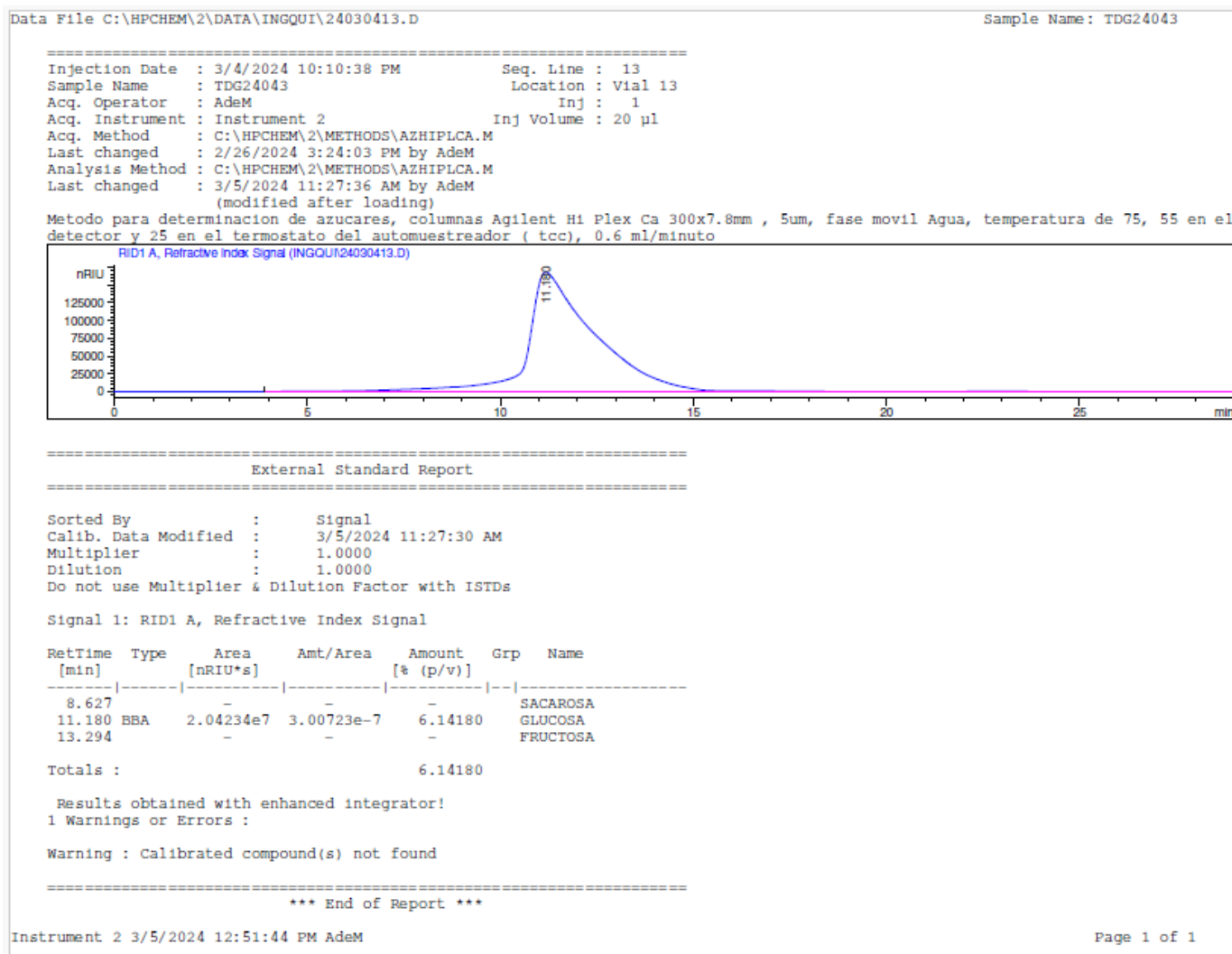
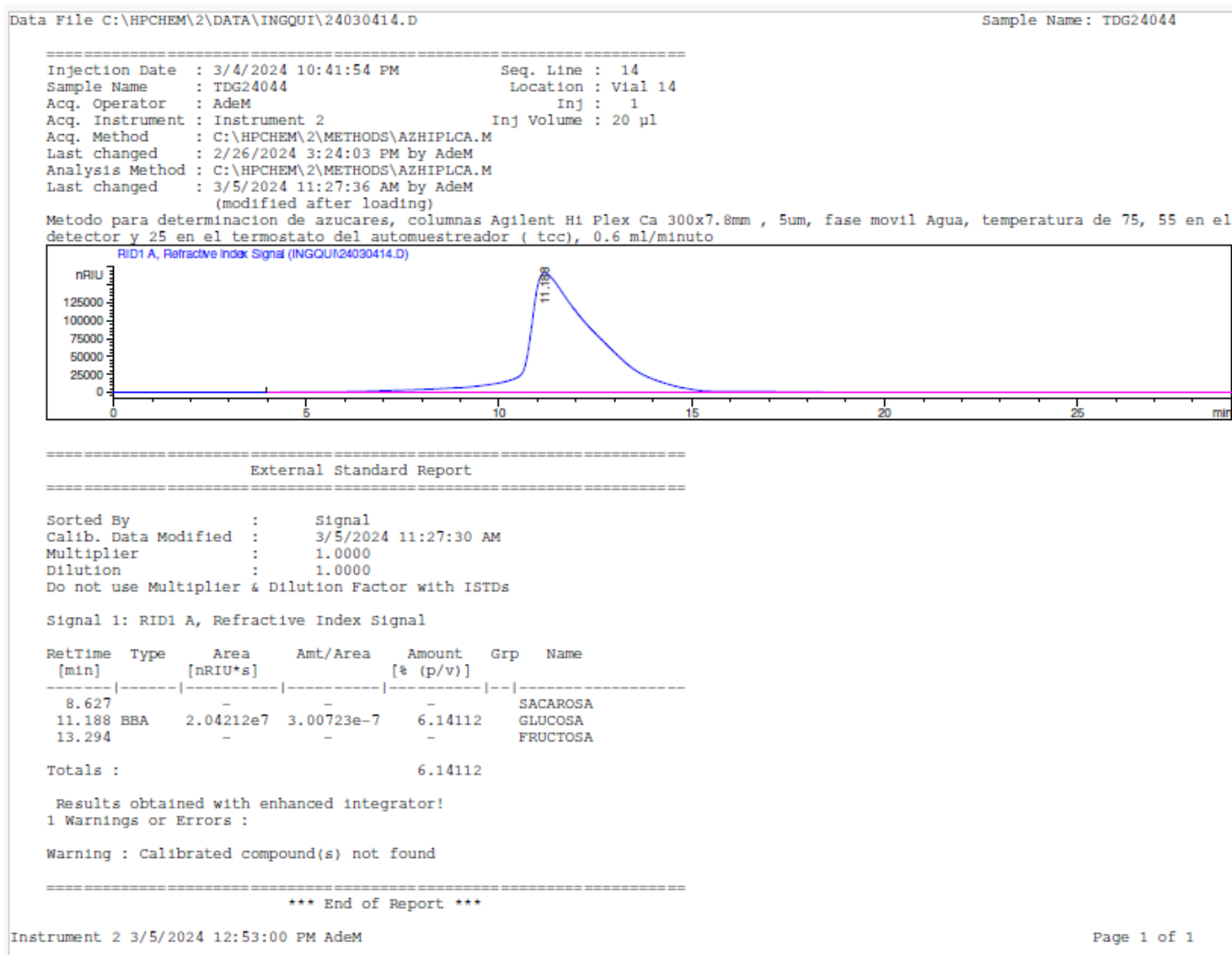
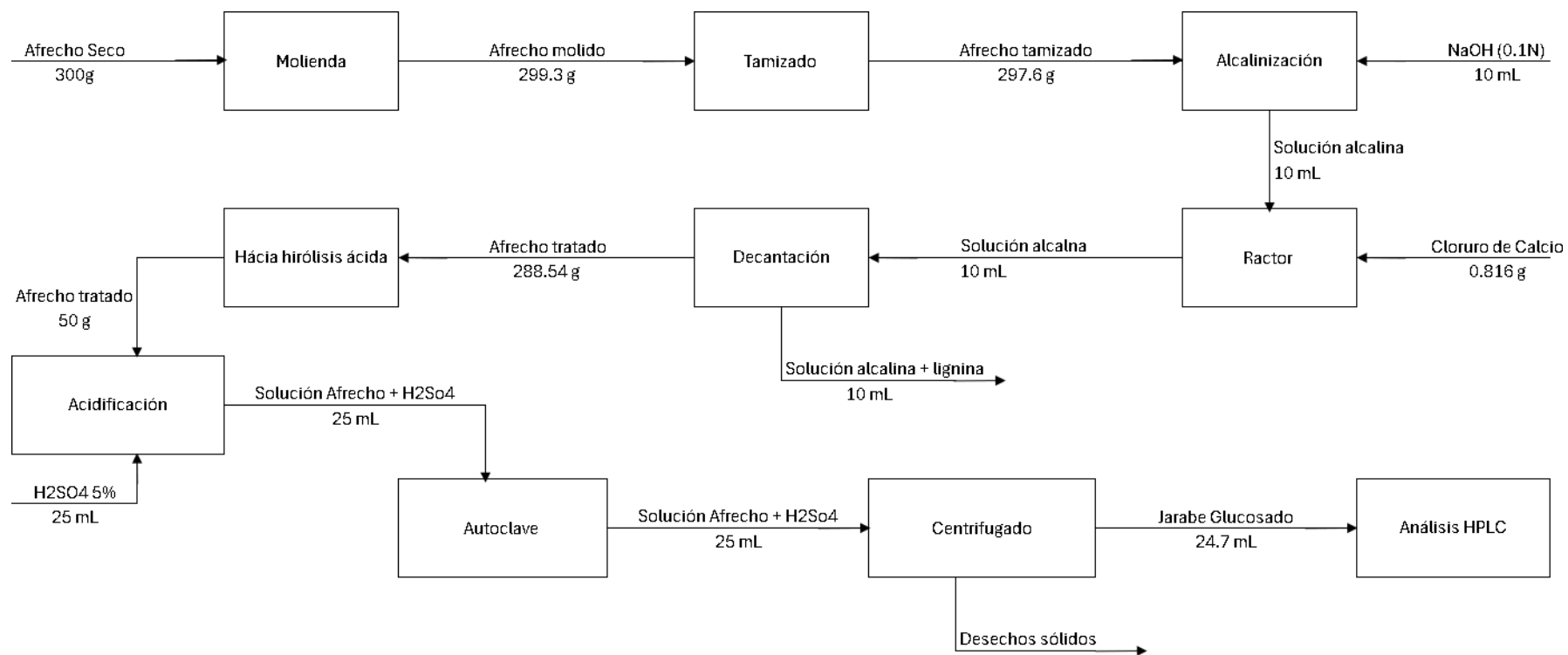


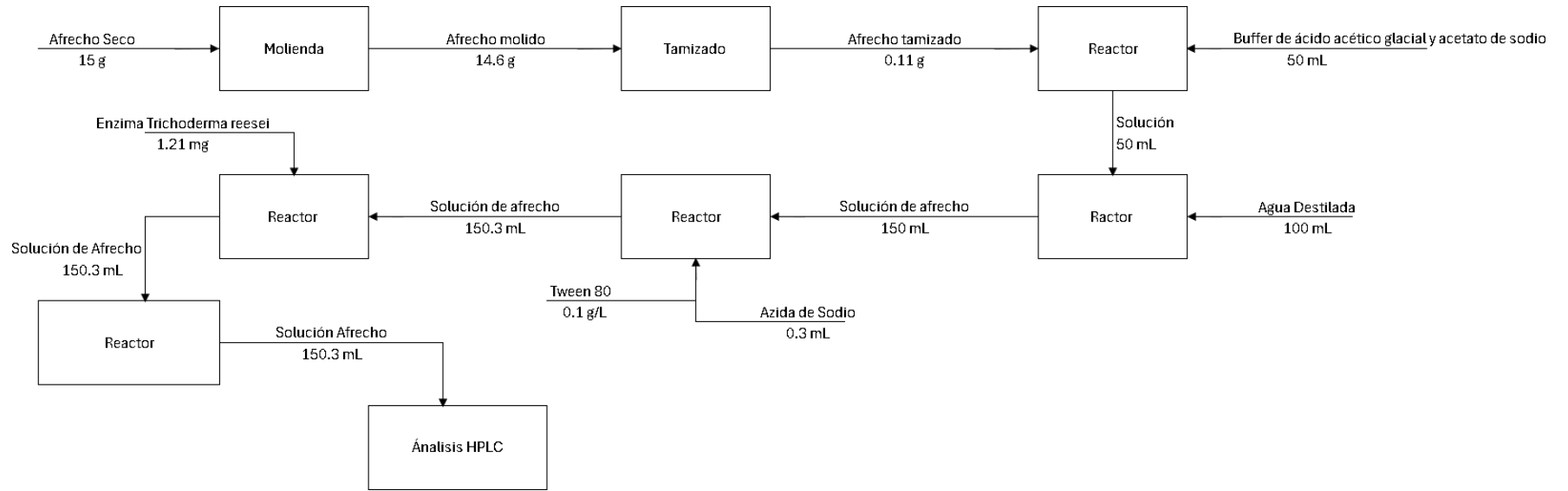
Ilustración 31. Gráfico de Azúcares Fermentables obtenido por análisis HPLC realizado en la Universidad del Valle de Guatemala para muestra de Hidrolisis Combinada 3.



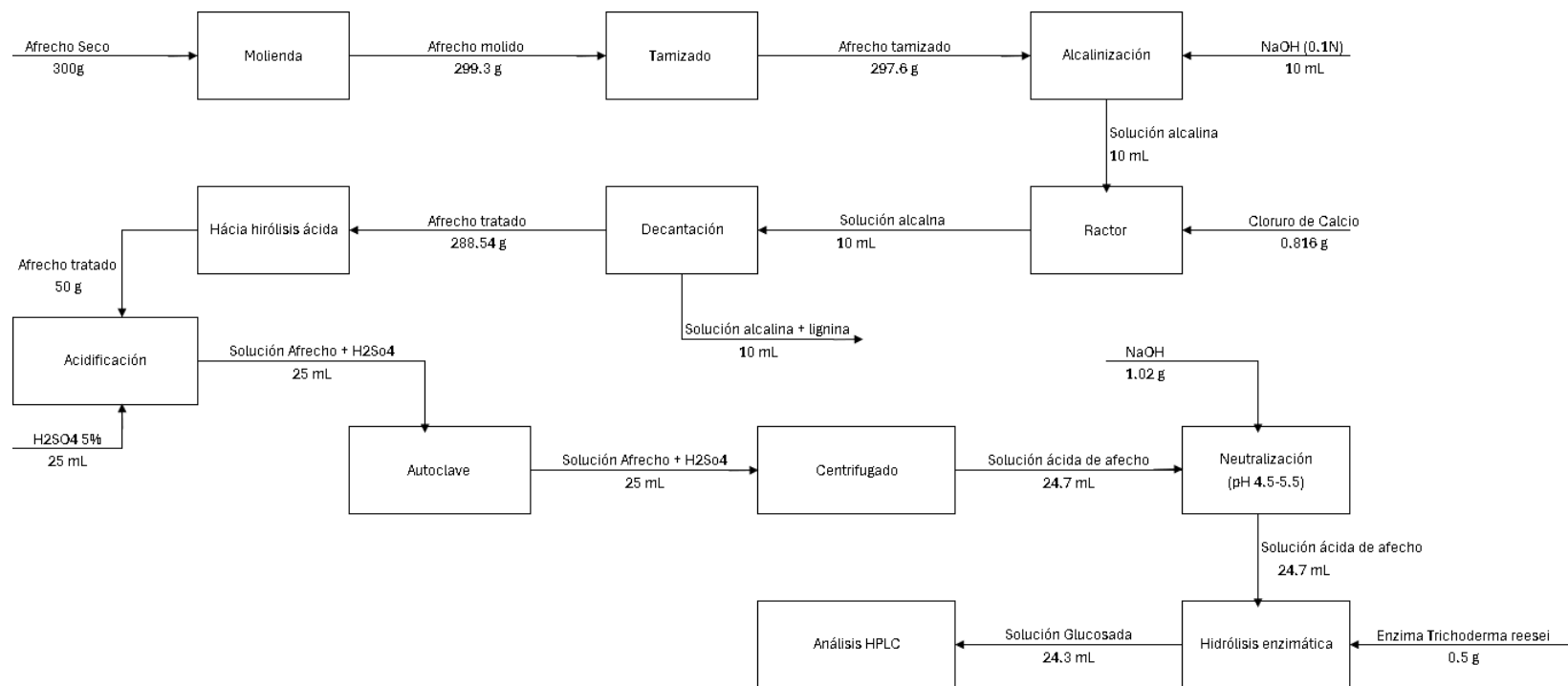
## B. Balance de masa Hidrólisis Ácida



### C. Balance de masa Hidrólisis Enzimática



## D. Balance de masa Hidrólisis Combinada



## E. Cálculo de muestra

### Cálculo de Lignina

$$\%Lignina = \frac{[(Pr) - (Po)]}{Po} * 100$$

Pr= peso de residuos secos

Po= peso de muestra original

$$\%Lignina = \frac{21.5502g - 1.5}{1.5} * 100 = 13.3668\%$$

\*Se utilizó la misma fórmula para el cálculo de las otras muestras

### Cálculo de fibra detergente neutra (FDN)

$$\%FDN = \frac{(P1 - Po) - (P2 - Po)}{Pm} * 100$$

Pm= peso de muestra seca

Po= peso del crisol tarado

P1= peso del crisol + FDN

secaP2= peso del crisol +  
cenizas

$$\%FDN = \frac{(27.778g - 22.1572g) - (26.2787g - 22.1572g)}{1.5g} * 100$$

$$\%FDN = 99.953\%$$

\*Se utilizó la misma fórmula para el cálculo del %FDA

#### Cálculo de la hemicelulosa

$$\begin{aligned} \text{Hemicelulosa} &= \text{FDN} - \text{FDA} \\ \text{Hemicelulosa} &= 99.953 - 24.534 = 75.42\% \end{aligned}$$

\*Se utilizó la misma fórmula para el cálculo de las otras muestras

#### Cálculo de la celulosa

$$\begin{aligned} \text{Celulosa} &= \text{FDN} - \text{Hemicelulosa} - \text{Lignina} \\ \text{Celulosa} &= 99.953\% - 75.419\% - 13.3668\% = 11.1672\% \end{aligned}$$

\*Se utilizó la misma fórmula para el cálculo de las otras muestras

#### Cálculo de azúcares presentes en la muestra

$$\text{Concentración total} = \frac{m}{v}$$

$$\text{Concentración total} = \frac{0.115g}{100mL} = 0.00115 \frac{g}{ml}$$

$$0.00115 \frac{g}{mL} * \left( \frac{1000mg}{1g} \right) = 1.15 \frac{mg}{mL}$$

$$\text{Concentración de azúcar} = \% \text{ de área} * \text{Concentración total}$$

$$\text{Concentración de azúcar} = 6.70928\% * 1.15 \frac{mg}{mL} = 7.715672 \frac{mg}{mL}$$

$$\text{Masa de azúcar} = \text{Concentración de azúcar} * \text{Volúmen inyectado}$$

$$\text{Masa de azúcar} = 7.715672 \frac{mg}{mL} * 20 \mu L = 154.31344 \mu g$$

\*Este método se utilizó para calcular todas las concentraciones de azúcar de los diferentes resultados de los análisis de HPLC.

#### **Cálculo de la cantidad de enzima necesaria**

$$\text{Cantidad de celulosa en muestra} = 50g * 11\% = 5.5g$$

$$\text{Actividad deseada por gramo} = 1 \frac{U}{mg} = 1000 \frac{U}{g}$$

$$\text{Actividad enzimática} = 5.5g * 1000 \frac{U}{g} = 5500 U$$

$$5500 U * 1000 = 5,500,000 mU$$

$$\text{Masa de afrecho} = \frac{5,500,000mU}{10 \frac{kU}{mg}} = 550 mg$$

## XIV. GLOSARIO

- 1. Afrecho:** también conocido como salvado, es la capa externa del grano de cereal que se separa durante el proceso de molienda. A pesar de eliminarse en la producción de harina refinada, el afrecho tiene un alto valor nutritivo y diversas aplicaciones que lo convierten en un aliado para la salud. Es una fuente de fibra dietética, vitaminas del grupo B, minerales (como hierro, magnesio y fósforo) y antioxidantes. Su consumo regular proporciona beneficios como la mejora del tránsito intestinal, el control del peso, la salud cardiovascular y la prevención de enfermedades como la diabetes tipo 2, algunos tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias. El salvado puede incorporarse a la dieta de varias formas: añadirse al pan, las galletas, los pasteles, los cereales, el yogur, los batidos o incluso las sopas. También puede utilizarse como exfoliante para la piel o como abono natural para las plantas.
- 2. Polímero:** molécula grande formada por unidades repetitivas de moléculas más pequeñas, llamadas monómeros. Los polímeros pueden ser naturales, como las proteínas y los polisacáridos, o sintéticos, como el nylon y el polietileno.
- 3. Despolimerización:** proceso químico por el cual un polímero se descompone en sus monómeros constituyentes. Puede ocurrir por diversos medios, como la hidrólisis, la oxidación o la termólisis.
- 4. Celulasas:** conjunto complejo de enzimas que desempeñan un papel fundamental en la degradación de la celulosa. Estas enzimas se encuentran en una gran variedad de organismos, como hongos, bacterias y algunas plantas. Su función principal es descomponer la celulosa, en moléculas de glucosa más pequeñas. Este proceso, conocido como celulólisis, es esencial para diversos procesos biológicos, como la digestión en los animales herbívoros y el reciclaje de la materia orgánica en la naturaleza.
- 5. Xilanasas:** grupo de enzimas presentes en hongos y bacterias que descomponen las paredes celulares de las plantas. Su función específica es degradar el xilano, un tipo de hemicelulosa presente en las estructuras vegetales. El proceso de descomposición se produce mediante la fragmentación del xilano en moléculas más pequeñas de xilosa. Las xilanasas tienen diversas aplicaciones industriales, como el blanqueo de la pasta en la fabricación de papel, la mejora de la digestibilidad de los piensos y la producción de biocombustibles.
- 6. HPLC:** siglas de (high performance liquid chromatography) (Cromatografía Líquida de Alta Presión). Es una técnica analítica que se utiliza para separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla. Se basa en la interacción de los componentes de la mezcla con una fase estacionaria y una fase móvil.

7. **Deslignificación:** proceso por el cual se elimina la lignina de un material vegetal. La lignina es un polímero complejo que se encuentra en las paredes celulares de las plantas proporcionándoles rigidez y resistencia. Se puede realizar por diversos medios, como el uso de productos químicos, enzimas o calor.
8. **Celobiohidrolasas:** enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos en las celobiosas, que son disacáridos formados por dos moléculas de glucosa. Las celobiohidrolasas son importantes en la digestión de la celulosa.
9. **Sacarificar:** convertir un polisacárido en azúcares simples, como la glucosa o la fructosa. La sacarificación se puede realizar por diversos medios, como la hidrólisis ácida o enzimática
10. **Furfural:** compuesto orgánico heterocíclico de cinco carbonos con un grupo aldehído. Se produce por la deshidratación de azúcares pentosas, como la xilosa y la arabinosa. Se utiliza como materia prima para la producción de diversos productos químicos, como el furfuraldehído y el ácido furánico.
11. **Ácido levulínico:** compuesto orgánico de cinco carbonos con un grupo carboxilo y un grupo cetona. Se produce por la deshidratación de la fructosa y se utiliza como materia prima para diversos productos químicos, como el ácido 2,5-dihidrolevulínico y el ácido  $\gamma$ -valerolactona.
12. **Solución Buffer:** también conocidas como soluciones amortiguadoras o tampón, son mezclas de dos o más sustancias químicas que tienen la capacidad de mantener un pH relativamente constante dentro de un intervalo específico, incluso cuando se añaden pequeñas cantidades de ácidos o bases fuertes. Estas soluciones están compuestas por un ácido débil y su base conjugada. El ácido débil se disocia parcialmente en el agua, liberando iones  $H^+$ , mientras que la base conjugada se forma al perder un protón ( $H^+$ ) del ácido. Las soluciones tampón funcionan gracias al equilibrio establecido entre el ácido débil y su base conjugada. Cuando se añade un ácido fuerte a la solución, reacciona con la base conjugada, consumiendo los iones  $H^+$  y evitando que el pH cambie significativamente. Del mismo modo, si se añade una base fuerte, reaccionará con el ácido débil, liberando  $H^+$  y manteniendo el pH dentro del intervalo deseado.