

Análisis fisicoquímico de la fermentación de bagazo de malta cervecera para la producción de bioetanol

Venus Melissa Gómez Lagunas¹, Luz María Teresita Paz Maldonado², Martha Imelda Maldonado Cervantes¹, José Luis Martínez Salgado², Hugo Sergio Aguilar Hernández² y Enrique Maldonado Cervantes¹

¹ Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Media, Carretera Rioverde-San Ciró km. 4, Col. Puente del Carmen, Rioverde, San Luis Potosí, enrique.maldonado@uaslp.mx

² Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, Av. Dr. Manuel Nava 6 - Zona Universitaria, 78210, San Luis Potosí, S.L.P.

Resumen

La producción de bioetanol a partir de biomasa está dando la oportunidad del aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos generados por la agroindustria. Además, el empleo de bioetanol para automóviles y máquinas reduce la emisión de gases de efecto invernadero, por lo que es una opción sustentable y sostenible. El bagazo cervecero es el principal residuo de la industria cervecera y es rico en lignocelulosa, el cual es el componente principal para la producción de bioetanol a partir de su fermentación. En el presente proyecto se analizan las características fisicoquímicas de bagazo de malta cervecera, antes y después de ser fermentada para la producción de bioetanol, la fermentación se realizó con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para elaboración de vino, buscando una mayor producción de etanol. Se emplearon dos tipos de mosto, uno claro y uno oscuro, a los cuales se les determinó la cantidad de azúcares totales y reductores contenidos por métodos de Dubois y Miller respectivamente, antes y después de la fermentación, para analizar si hubo disminución de estos. La fermentación se realizó en un biorreactor de 250ml, por 24 horas, en las cuales se estuvo tomando una muestra de 1.5 ml aproximadamente, cada 6 horas a partir del tiempo 0, en cual se agregó el inóculo de mil millones de levaduras. En las muestras tomadas se realizó conteo de levaduras en celda de Neubauer para analizar su reproducción, también se realizó la determinación de la cantidad de etanol por espectrofotometría con dicromato de potasio. Los resultados demuestran la producción de etanol, con la reproducción de levaduras a partir del consumo de azúcares contenidos en el bagazo de malta cervecera.

Palabras clave— Azúcares totales y reductores, Bagazo cervecero, Bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

The production of bioethanol from biomass is providing the opportunity to use the lignocellulosic waste generated by the agro-industry. Additionally, using bioethanol for cars and machines reduces greenhouse gas emissions, making it a sustainable and viable choice. Brewer's spent grain is the main waste of the brewing industry and is rich in lignocellulose, which is the primary part for bioethanol production through fermentation. This project analyzes the physicochemical characteristics of brewer's malt spent grain before and after fermentation for bioethanol production, which was conducted using a strain of *Saccharomyces cerevisiae* for wine production, aiming for higher ethanol yield. Two types of wort were used, one light and one dark, from which the total and reducing sugars were determined using Dubois and Miller methods respectively, before and after fermentation to assess any decrease. Fermentation was performed in a 250 ml bioreactor for 24 hours, with samples of approximately 1.5 ml taken every 6 hours starting from time zero, when a billion yeast cells were inoculated. Yeast counts were performed in a Neubauer chamber to analyze reproduction, and ethanol content was determined by spectrophotometry using potassium dichromate. The results demonstrate ethanol production along with yeast reproduction from the consumption of sugars contained in the brewer's malt spent grain.

Keywords— Total and reducing sugars, Brewer's spent grain, Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*.

I. INTRODUCCIÓN

El cuidado del medio ambiente ha llevado a todo el mundo a buscar alternativas sustentables. Se busca preservar los recursos tanto renovables como no renovables y maximizar el potencial de uso de productos agrícolas, y en especial de los subproductos que estos generan al someterlos a distintos procesos agroindustriales, cuya disposición final es un gran problema ambiental [2].

La obtención de bioetanol a partir de residuos agrícolas, maderables, y de todos los materiales que contengan celulosa y hemicelulosas, han revalorizado los desechos de varias industrias para convertirlos en materia prima para la obtención de alcohol. Estos materiales ricos en biomasa son la respuesta para la producción de etanol con beneficios medioambientales.

La producción a gran escala de bioetanol para emplearse como combustible de automóviles y maquinarias puede contribuir considerablemente a la reducción de gases de efecto invernadero como la emisión de CO₂, SO₂ y NO₂ desde los medios de transporte [10].

El término biomasa es definido por [6] como: «las sustancias orgánicas que tienen su origen en los compuestos de carbono formados en la fotosíntesis». Incluye a sustancias que pudieron haber sido sometidas a distintos procesos, ya sean naturales o artificiales, complejos o no.

La biomasa está compuesta de una gran fracción orgánica, constituida de celulosa, hemicelulosa y lignina, la combinación de estas es llamada lignocelulosa. La biomasa también contiene agua, compuestos orgánicos y pequeñas cantidades de compuestos libres extraíbles, como las resinas, almidón y pigmentos. Aproximadamente la mitad de la materia vegetal

producida por la fotosíntesis está compuesta por lignocelulosa, y es la fuente renovable orgánica más abundante del planeta [1].

La utilización de desechos lignocelulósicos como materia prima en la producción de combustibles, a partir de su transformación por microorganismos es de gran interés desde hace varias décadas. Los principales motivos por los que se le ha dado gran interés a la utilización de estos son: la materia lignocelulósica es el producto agroindustrial de mayor abundancia; es una fuente renovable, por constituir una parte estructural en el reino vegetal; y la materia prima es menos costosa que los materiales convencionalmente utilizados para producir etanol [10].

En la industria cervecera, el principal residuo generado es el bagazo cervecero, el cual se compone principalmente de la cáscara, pericarpio y cubiertas de la semilla de la cebada [3]. Se generan 14-20 kg/hl de bagazo cervecero después del macerado y filtrado [1]. La composición porcentual de biomasa lignocelulósica del bagazo cervecero es, en promedio, 16.8-21.9 % celulosa, 28.4-29.6 % hemicelulosa, 21.7-23.0 % lignina y 15.3-24.6 % proteína, los cuales pueden ser transformadas en compuestos fermentables como glucosa, xilosa o sacarosa [8].

El bagazo proviene del procesamiento de los granos de cebada (*Hordeum vulgare*). Se distinguen dos etapas: el malteado y el macerado. El malteado consiste en el remojo, germinación y "kilning" de los granos, después de esto y tres semanas más, la malta está lista para elaborar cerveza. Para la producción de cerveza, la malta es molida y macerada. El maceramiento se refiere al remojo con agua caliente que hidrata la malta, gelatiniza sus almidones y libera sus enzimas naturales [1]. Como resultado del macerado se originan el mosto dulce y el bagazo cervecero, que son separados mediante el equipo "lautering", donde el bagazo es colectado y el mosto es recirculado y continúa en el proceso de elaboración de cerveza.

La fermentación tradicional convierte la glucosa en etanol, para el caso de los materiales lignocelulósicos, la celulosa debe ser convertida primero en azúcares simples por hidrólisis y después de esto es fermentada para producir etanol. En la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica se emplean ácidos fuertes, concentrados o diluidos, y temperaturas superiores a 90°C para generar azúcares libres [4].

La fermentación se realiza por medio de microorganismos fermentadores, el más importante *Saccharomyces cerevisiae*, el cual utiliza los azúcares como fuente de energía para metabolizarlos en bioetanol y dióxido de carbono. El proceso de fermentación se lleva a cabo por varios días y, al finalizar el proceso, el líquido fermentado debe ser destilado, puede realizarse mediante destilación simple, destilación fraccionada o destilación extractora, dependiendo de la pureza que se desee en el producto final. El propósito de la destilación es separar el agua del etanol, para que pueda ser aprovechado como combustible en automóviles o máquinas de combustión interna, ya sea de manera pura o mezclado con gasolina; de esta manera se logra disminuir la emisión de gases de efecto invernadero [4].

El objetivo de este proyecto es analizar las características fisicoquímicas de la fermentación de bagazo cervecero con

Saccharomyces cerevisiae, en dos tipos de mosto: uno claro y uno oscuro, para la producción de bioetanol. Por lo que se realiza la cuantificación de azúcares totales [9] y azúcares reductores [7], del bagazo antes y después de la fermentación, y se determina el contenido de etanol producido después de la fermentación, mediante dicromato de potasio [5].

II. METODOLOGÍA

En el desarrollo de este proyecto se utilizó levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Premier Cuvée, Red Star, para vino. Se inició con la activación de la levadura para posteriormente preparar reservas y cultivos activos para el desarrollo del proyecto. Para ello se prepararon 200ml de medio de cultivo líquido de papa y dextrosa, en un matraz Erlenmeyer de 250ml, se esterilizó en una autoclave Tuttnauer, modelo 2340E-B/L (Tuttnauer, hecha en Israel), y cuando estuvo a una temperatura aproximada a 50°C, se inoculó una pisco de la levadura dejándola caer directamente en el medio de cultivo, lo cual se realizó bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar Lab Tech, modelo LCB-0122H, (Labtech, hecha en Corea), se selló el matraz y se dejó en una incubadora de la marca Lab companion, modelo IB-11E (Jeio tech, hecha en Corea), a 28°C y en agitación a 150 rev/min, por tres días.

Para la preservación del hongo, se prepararon 200ml de agar papa y dextrosa, en un matraz de 250ml, se colocó en la autoclave a esterilizar, también se esterilizaron 30ml de glicerol en un tubo falcón de 50ml. Posteriormente, al alcanzar una temperatura de 50°C, el medio de cultivo se vertió en cajas Petri estériles de 20ml, dentro de la campana de flujo laminar, para evitar contaminación. Al solidificar el medio de cultivo, las cajas Petri se sellaron con film plástico y se refrigeraron por 24 horas. Se procedió a sembrar con la técnica de estriado, las cajas Petri preparadas con el medio de cultivo líquido inoculado previamente con *Saccharomyces cerevisiae*, en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar, se sellaron con film plástico y se dejaron en incubación a 28°C. Estos cultivos se utilizaron a lo largo del proyecto.

Con el glicerol estéril, se prepararon tubos eppendorf con 500µl de glicerol más 500µl del medio de cultivo líquido inoculado previamente con *Saccharomyces cerevisiae*, bajo condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar. Esto se realizó con el fin de tener reservas de la levadura, para ello se cerraron correctamente los tubos y se mantuvieron en congelación.

A. Obtención de la Materia Prima.

La materia prima que se utilizó en el presente proyecto fue el bagazo de cebada resultante de la práctica estudiantil de elaboración de cerveza artesanal. Se consiguió un mosto claro y uno oscuro, más tostado. Para su conservación, se llenaron bolsas de poli papel con los mostos, clasificando por mosto claro u oscuro, se amarraron las bolsas y se mantuvieron en congelación, para evitar su deterioro.

Para proceder con el proyecto se realizó una cuantificación de los azúcares totales y azúcares reductores presentes en la materia prima, con los métodos Dubois y Miller, respectivamente. Posteriormente se realizó una fermentación,

en la cual se midieron los azúcares, conteo de levaduras y producción de etanol a través del tiempo.

B. Cuantificación de Azúcares Totales por el Método Dubois.

Se realizó la curva de calibración a partir de una solución stock de dextrosa 100mg/l, de la cual se realizaron 5 soluciones patrón con las concentraciones 10, 20, 30, 40 y 50mg/l de dextrosa. Además, se contó con una muestra blanco consistente en solo agua destilada.

Para el tratamiento de los patrones, se colocaron 2ml de cada solución y el blanco en tubos de ensayo, se les agregó 1ml de una solución de fenol al 5% y enseguida 5ml de H₂SO₄ concentrado, todo dentro de la campana de extracción (Protector XStream Labconco, hecho en E.U.), enseguida se colocaron los tubos en un baño de hielo y se dejaron enfriar y en reposo durante 15min. Pasado el tiempo se analizaron en el espectrofotómetro (S-22 Boeco Germany, hecho en Reino Unido) se tomó su absorbancia a una longitud de onda de 490nm, se realizó el análisis por triplicado. Con los datos obtenidos se realiza la curva de calibración con una R²=0.9983, para la determinación de los azúcares totales contenidos en los mostos.

Para la cuantificación de los azúcares totales de los mostos claro y oscuro, primero, de cada mosto se pesó 1g, se colocó en un tubo falcón de 15ml y se agregaron 10ml de agua destilada, con el vórtex se mezcla. De la mezcla preparada, se realizó una solución con agua destilada con relación 1:100 para mosto claro y 1:200 para el mosto oscuro, de las cuales se tomaron 2ml en un tubo de ensayo y se les dio el mismo tratamiento que a las muestras para realizar la curva de calibración. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada tipo de mosto, las absorbancias obtenidas se interpolaron con la curva de calibración, para obtener la concentración de azúcares totales de cada mosto.

C. Cuantificación de Azúcares Reductores por el Método de Miller.

Para la realización de la curva de calibración se prepararon soluciones patrón de 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700mg/l de dextrosa, a partir de un stock de dextrosa 1000mg/l.

Primero, se preparó el reactivo ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS), para ello en un vaso de precipitados de 100ml se disolvieron 1.6g de NaOH en 50ml de agua destilada, enseguida se agregaron 3g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 1g de DNS, se mezcló hasta diluir por completo y se aforó a 100ml con agua destilada, en un matraz volumétrico de 100ml. La solución se almacenó en un frasco color ámbar, en el refrigerador a 4°C.

Para el tratamiento de las muestras patrón y blanco (solo agua destilada), se tomó 1ml de estas en un tubo de ensayo y se agregó 1ml del reactivo DNS, se homogenizaron con vórtex por 20s y se colocaron en baño maría a 80°C por 10min, enseguida se dejaron enfriar en un baño de hielo y se agregaron 3ml de agua destilada, para alcanzar el volumen de 5ml y se dejaron reposar por 10min. Se toma su absorbancia a 540nm en el espectrofotómetro. De igual forma se realizaron triplicados de

cada uno de los patrones. La curva de calibración obtiene un R²=0.9951.

Para cuantificar los azúcares reductores de los mostos claro y oscuro, se utilizó la solución de 1g de mosto en 10ml de agua destilada, para cada mosto. Para cada tipo de mosto, se realizaron disoluciones de las soluciones realizadas, con una relación 1:10, solución concentrada: agua destilada. De las disoluciones 1:10, se tomó 1ml en un tubo de ensayo y se aplicó el mismo tratamiento que a las muestras para realizar la curva de calibración. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada tipo de mosto y las absorbancias obtenidas se interpolaron con la curva de calibración, para obtener la concentración de azúcares reductores de cada mosto.

D. Fermentación Alcohólica

Para la fermentación, se utilizó un biorreactor de 250ml, se fermentó por 24 horas, tomando muestras cada 6 horas, de 1.5ml aproximadamente. Se fermentaron volúmenes de 200ml, aplicando una formulación 10% p/v, es decir, 20g de mosto disueltos en 200ml de agua destilada. Para la preparación del biorreactor, previamente se esterilizó en la autoclave todas las piezas del biorreactor que tuvieran contacto con la solución, el mosto, agua destilada, una manguera de látex y una jeringa de 5ml, que se utilizaron para la toma de muestras cada 6 horas. No se realizó hidrólisis para la lignocelulosa.

La preparación del biorreactor se realizó dentro de la campana de flujo laminar, se agregó el mosto, agua destilada y se inocularon mil millones de UFC's de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, del medio de cultivo líquido de papa y dextrosa, enseguida se tomó la primera muestra (tiempo 0). Se determinó la cantidad de levaduras mediante conteo en cámara de Neubauer.

Rápidamente se cerró herméticamente el biorreactor, el cual ya tenía implementada la manguera de muestreo se montó el equipo y se activó a 120 rev/min, a una temperatura de 25°C, regulada con un recirculador de agua. Se tomaron muestras a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas, de aproximadamente 1.5ml, se colocaron en tubos eppendorf y se refrigeraron a 4°C para su posterior estudio.

Para el análisis de las muestras tomadas, primero se realizó el conteo de levaduras en cámara de Neubauer, después se cuantificaron azúcares totales, azúcares reductores, y se cuantificó el etanol producido. Se estudió la cantidad de ambos tipos de azúcares, y la producción de etanol con la cantidad de UFC's de levaduras.

E. Conteo en Cámara Neubauer.

La cuantificación de levaduras viables se realizó por medio de conteo microscópico en una cámara de Neubauer Counting Chamber Neubauer-improved (Marienfeld, hecha en Alemania). A partir del conteo por triplicado de levaduras, se calculó la cantidad de medio de cultivo líquido para inocular mil millones de levaduras a cada prueba en el biorreactor.

Al realizar el conteo de levaduras en las muestras tomadas cada 6 horas, en ambos tipos de mosto, se optó por realizar soluciones de estas con buffer de fosfatos pH 7, debido a que la cantidad de UFC's era excesiva y era difícil contarlas, se

realizaron disoluciones 1:10, muestra del biorreactor: buffer de fosfatos pH 7.

F. Cuantificación de Etanol Mediante Dicromato de Potasio.

Para la realización de la curva de calibración se realizaron soluciones patrón a partir de etanol al 96% con agua destilada, se tomaron concentraciones de etanol al 3, 6, 9, 12 y 15%.

Se preparó una solución oxidante elaborada de la siguiente manera: se pesaron 3g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), se colocaron en un matraz volumétrico de 100ml, se le agregó 1ml de H_2SO_4 concentrado y se aforó hasta la marca de aforo con agua desionizada.

Para la construcción de la curva de calibración, se tomaron 300µl de las soluciones patrón, se colocaron en un tubo de ensayo y se agregaron 3ml de la solución oxidante, se dejaron reposar por 30min y después se tomó lectura de su absorbancia en el espectrofotómetro a longitud de onda de 590nm. Se realizaron las lecturas por triplicado. La curva de calibración obtiene una $R^2=0.9981$.

Para la cuantificación de etanol producido por la levadura, en las fermentaciones, para cada mosto se realizaron soluciones con relación 1:10, sobrenadante fermentado: agua destilada. Se tomaron 300µl de la solución en un tubo de ensayo, y se le agregaron 3ml de la solución oxidante de dicromato de potasio, enseguida se dejaron reposar por 30min. Se lee su absorbancia a 590nm, en el espectrofotómetro y se interpola en la curva de calibración para obtener el contenido de etanol. Se realiza por triplicado.

G. Análisis con Prueba T.

Para analizar si hay o no diferencias significativas en los resultados del mosto claro contra los del mosto oscuro, se utilizó la prueba t del programa Excel del paquete de Microsoft Office. Esta prueba nos da el valor de p tomando como referencia $\alpha=0.05$, si el valor de p es menor que el valor de α significa que hay diferencia entre los datos comparados, pero si $p \geq \alpha$ significa que no hay diferencias significativas entre los datos.

Se tomaron datos por triplicado, se tomaron 2 colas y con muestras pareadas. Se evaluó el valor de p y se realizó el gráfico de cajas y bigotes, para observar la diferencia entre el mosto claro y el oscuro.

III. RESULTADOS

A. Caracterización de Materia Prima

La cantidad de azúcares totales determinados por el método de cuantificación de Dubois y la cantidad de azúcares reductores cuantificados por el método de Miller, de los mostos claro y oscuro se muestra en la Tabla I.

TABLA I
CARACTERIZACIÓN DE LOS MOSTOS CLARO Y OSCURO

	Componente	P1	P2	P3	Promedio	Contenido mg/L
Mosto C.	Azúcares reductores	0.309	0.31	0.325	0.315	600.000
	Azúcares totales	0.516	0.471	0.503	0.497	36.866
Mosto O.	Azúcares reductores	0.92	0.89	0.811	0.874	828.424
	Azúcares totales	0.621	0.708	0.658	0.662	48.959

Contenido de azúcares reductores y totales para el mosto claro (Mosto C.) y mosto oscuro (Mosto O.). Se realizaron las pruebas por triplicado, se añaden los resultados de las 3 pruebas realizadas (P1, P2 y P3).

Para la realización de la curva de calibración se realizaron soluciones patrón a partir de etanol al 96% con agua destilada, se tomaron concentraciones de etanol al 3, 6, 9, 12 y 15%.

B. Análisis de la Fermentación.

A continuación, se presenta el análisis realizado a las muestras tomadas durante la fermentación. Se tomaron 5 muestras en 24 horas, a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas, a partir de agregar el inóculo.

C. Cuantificación de Levaduras en Celda de Neubauer.

El conteo de levaduras en cámara de Neubauer se convirtió a UFC's/ml, de acuerdo con las dimensiones indicadas en la celda utilizada. Los resultados se muestran en la Tabla II para la fermentación del mosto claro y en la Tabla III para el mosto oscuro.

TABLA II
CONTEO DE UFC'S DE *Saccharomyces Cerevisiae*, EN LA FERMENTACIÓN DEL MOSTO CLARO

Tiempo (hrs)	Conteo 1	Conteo 2	Conteo 3	Promedio	UFC's/ml
0	2630	2673	2773	2670	10,680,000,000
6	4757	4181	4617	4518	18,073,333,333
12	7409	6900	8500	7603	30,412,000,000
18	7810	9700	8630	8713	34,853,333,333
24	12860	12500	12040	12467	49,866,666,667

TABLA III
CONTEO DE UFC'S DE *Saccharomyces cerevisiae*, EN LA FERMENTACIÓN DEL MOSTO OSCURO

Tiempo (hrs)	Conteo 1	Conteo 2	Conteo 3	Promedio	UFC's/ml
0	5560	8380	8350	7430	29,720,000,000
6	15000	15350	14080	14810	59,240,000,000
12	24670	22000	21510	22727	90,906,666,667
18	32840	32640	32810	32763	131,053,333,333
24	38260	37240	38400	37967	151,866,666,667

Se obtuvo un crecimiento muy acelerado, resaltando en el mosto oscuro, con una cantidad final del 304.5% mayor que las levaduras finales contenidas en la fermentación del mosto claro.

D. Comparación de la Cantidad de UFC's Obtenidas en la Fermentación para Ambos Mostos.

A través de la prueba t se realizó la comparación de la cantidad de UFC's/ml contenidas a las 24 horas de fermentación de los mostos. Se obtuvo un valor de $p=0.00034$ el cual es menor al valor de $\alpha=0.05$, lo que indica la existencia de una diferencia significativa en las cantidades producidas de UFC's/ml entre los tipos de mostos. Esto puede ser debido a que el mosto oscuro contenía una mayor disponibilidad de los azúcares reductores, favoreciendo la reproducción de las levaduras.

E. Determinación de Azúcares Totales por Método Dubois.

Se realizaron triplicados y la absorbancia promedio de cada muestra fue convertida a mg/l de azúcares totales. Se graficó la cantidad de azúcares totales junto con la cantidad de UFC's/ml de *Saccharomyces cerevisiae*, obtenidas en las muestras tomadas. En la Fig. 1 se observan los resultados para el mosto claro y en la Fig. 2 para el mosto oscuro.

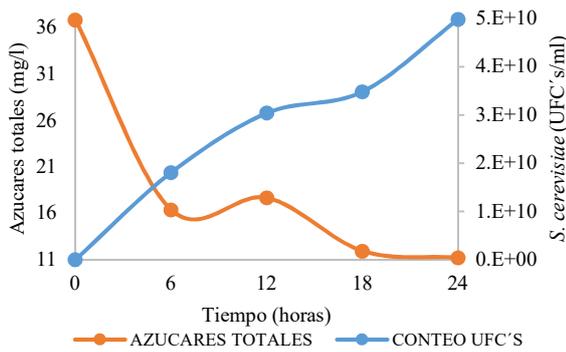


Fig. 1. Cuantificación de azúcares totales contra las UFC's de *S. cerevisiae* de las muestras del mosto claro.

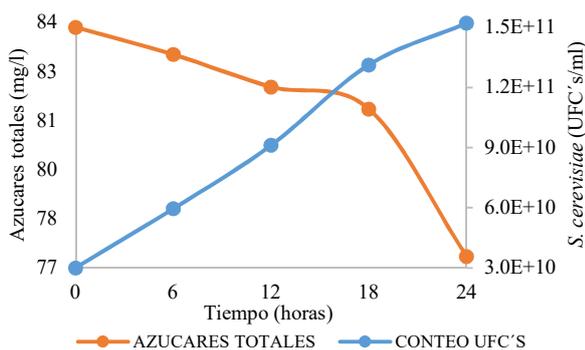


Fig. 2. Cuantificación de Azúcares totales Contra las UFC's de *S. cerevisiae* de las Muestras del Mosto Oscuro.

Se obtienen comportamientos diferentes en los mostos, pero se muestra disminución de los azúcares totales y fluctuación de acuerdo con el crecimiento de levaduras.

F. Comparación de la cantidad de azúcares totales.

La evaluación de los mg/l de los azúcares totales contenidos, se realizó a los resultados obtenidos a las 24hrs de fermentación

para ambos mostos, aplicando la prueba t. El valor de p obtenido fue de $p=0.00022$, el cual indica diferencia significativa en los tipos de mosto.

G. Determinación de Azúcares Reductores por Método de Miller.

La absorbancia promediada de los triplicados fue convertida a unidades de mg/l de azúcares reductores. Se realizaron las gráficas para el mosto claro Fig. 3 y mosto oscuro Fig. 4, donde se muestran la cantidad de azúcares reductores contrastada con la cantidad de UFC's/ml de *S. cerevisiae*, de las muestras tomadas.

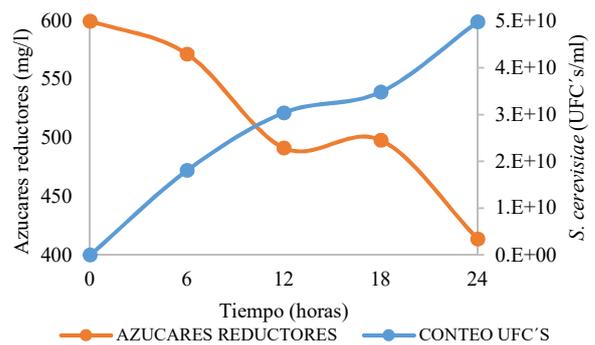


Fig. 3. Cuantificación de azúcares reductores contra las UFC's de *S. cerevisiae* de las muestras del mosto claro.

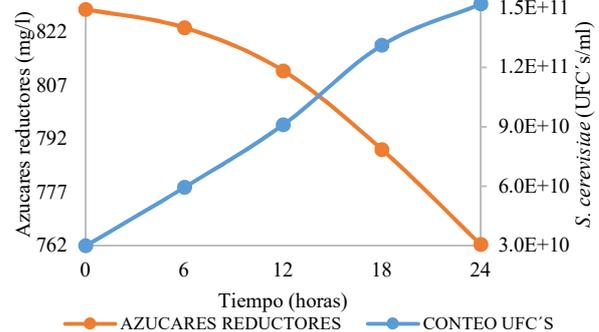


Fig. 4. Cuantificación de azúcares reductores contra las UFC's de *S. cerevisiae* de las muestras del mosto oscuro.

Igual que en el caso anterior, hay disminución de los azúcares, pero no se muestra el mismo comportamiento en los mostos.

H. Comparación de la Cantidad de Azúcares Reductores.

De igual forma, la evaluación de los mg/l de los azúcares reductores de los mostos, se realizó a las 24hrs de fermentación, aplicando la prueba t. El valor de p obtenido fue de $p=0.00911$, el cual indica diferencia significativa en los tipos de mosto.

I. Cuantificación de Etanol Mediante Dicromato de Potasio.

La absorbancia promedio fue convertida a porcentaje de etanol contenido en las muestras. A continuación, se presentan las gráficas del desarrollo de la cantidad de etanol (% de etanol), contra la cantidad de UFC's/ml de *S. cerevisiae*, Fig. 5 mosto claro y Fig. 6 mosto oscuro.

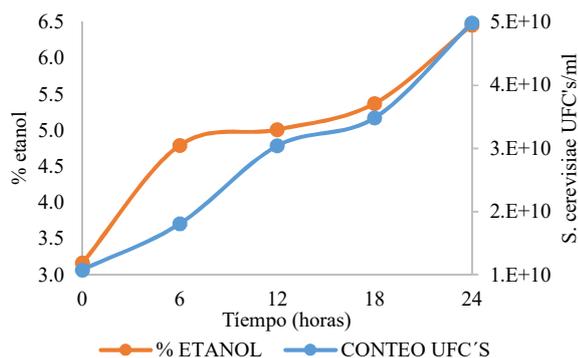


Fig. 5. Contenido de etanol (% etanol) contra las UFC's de *S. cerevisiae* de las muestras del mosto claro.

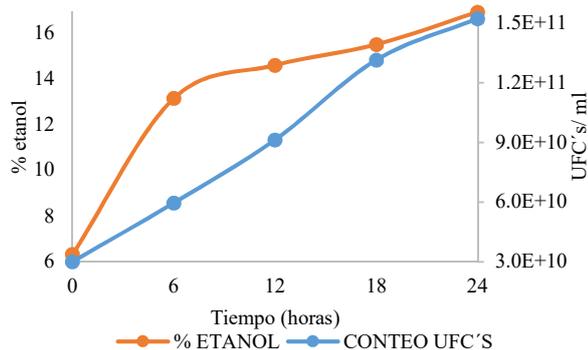


Fig. 6. Contenido de etanol (% etanol) contra las UFC's de *S. cerevisiae* de las muestras del mosto oscuro.

Se obtiene un crecimiento en la producción de etanol con el crecimiento de levaduras y a través del tiempo. También se obtiene una mayor producción con la fermentación del mosto oscuro, esto sucede debido a la mayor cantidad de levaduras reproducidas.

J. Comparación de la Producción Final de Etanol.

Se tomaron los porcentajes de etanol producido a las 24hrs de fermentación por triplicado para aplicar la prueba t en ambos mostos. El valor de p obtenido fue de $p=0.00011$, el cual indica diferencia significativa en los tipos de mosto.

En la Fig. 7 se muestra el gráfico de cajas y bigotes de los resultados de la cantidad de etanol obtenido a las 24 horas de fermentación de ambos mostos.

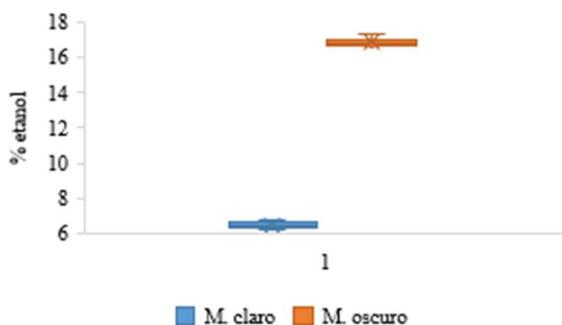


Fig. 7. Grafico de cajas y bigotes con los resultados de la producción de etanol a las 24 horas de fermentación de los mostos.

El gráfico de la Fig. 7 presenta la notable mayor producción de etanol en la fermentación del mosto oscuro (16.9% de etanol) que la del mosto claro (6.5% de etanol).

IV. CONCLUSIÓN

El mosto oscuro tiene una mayor cantidad de azúcares totales y reductores que el mosto claro, presentó mayor crecimiento de levaduras y, por tanto, mayor producción de etanol en la fermentación. Con esto se concluye que el mosto oscuro es mejor para producción de bioetanol, ya que su composición favorece el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, así como su capacidad para transformar los azúcares en etanol, pues se obtuvo menor consumo de los azúcares en la fermentación con el mosto oscuro que con el claro.

Es evidente que el mayor rendimiento se obtiene con el mosto oscuro, sin embargo, faltan análisis para identificar correctamente el motivo de este mayor rendimiento. Por otro lado, para el presente trabajo de investigación el principal objetivo es la producción de etanol a partir de la fermentación de bagazo cervecero con *Saccharomyces cerevisiae*.

Las comparaciones realizadas con la prueba t, comprueban la diferencia entre los tipos de mosto y se puede decir con seguridad que el mosto oscuro es mejor, pues hubo un mínimo consumo de los azúcares, las levaduras se reprodujeron rápidamente y produjeron una mayor cantidad de etanol.

De esta forma, la realización a escala de la fermentación de los mostos, inoculando un millón de UFC's de *Saccharomyces cerevisiae*, nos ayuda a analizar si se está dando un buen aprovechamiento de los azúcares contenidos en la biomasa del bagazo cervecero, la velocidad con que se está reproduciendo la levadura y la cantidad de etanol que está produciendo.

REFERENCIAS

- [1] A. Camarena, *Caracterización fisicoquímica e hidrólisis del bagazo cervecero para la obtención de azúcares reductores*. (1), [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Baja California], 2017, pp. 6-7.
- [2] A. Sánchez, A. Gutiérrez, J. Muñoz and C. Rivera, "Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos", *Tumbaga*, ISSN-e 1909-4841, Vol. 1, N°. 5, 2010, pp. 61-91.
- [3] B. González, "BIOGÁS a partir del BAGAZO CERVECERO", Tesis de grado, UNMDP, 2020.
- [4] C. Caiza and L. Cumbal, "Obtención de bioetanol a partir del bagazo cervecero", Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE, unpublished.
- [5] F. González, *Determinación de etanol en productos alimenticios por métodos ópticos*. [Tesis de licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo], 2013, pp. 28-29.
- [6] F. S. Nogués, D. Galindo and A. Rezeau, "Energía de la biomasa", vol. I, Zaragoza: Prensas Universitarias de Zaragoza, 2010, pp. 27.
- [7] G. Miller, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Anal.Chem.* 31, 1959, pp. 426-428.
- [8] J. White, B. Yohannan, and G. Walker, "Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol," *Federation of European Microbiological Societies*, 2008.
- [9] M. Dubois, K. Gilles, J. Hamilton, P. Robers and F. Smith, "Colorimetric method for the determination of sugars and related substances", *Anal. Biochem.* 28, 1956, pp. 350-356.
- [10] M. Viñals, A. Bell, G. Michelena and M. Ramil, "Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica" ICIDCA. *Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, vol. 46, núm. 1, pp. 7-16 Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba, (2012).