

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Fraccionamiento del bagazo cervecero bajo el concepto de biorrefinería.

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

MIGUEL ANGEL JURADO MORALES

Quito, 2017

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Miguel Angel Jurado Morales ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

PhD. Javier Carvajal

Director de la Disertación

Quito, 13 de Julio del 2017

Para mi amada familia

AGRADECIMIENTOS

Las palabras me faltarían para expresar mis agradecimientos a mi madre, Alicia Morales y mi padre, Darwin Jurado. Su apoyo incondicional, ejemplo, gran esfuerzo y sacrificio, forjaron la persona que soy, permitiéndome cumplir esta meta. A mi hermano Darwin, que con su alegría y rebeldía es mi motivación para siempre ser una mejor persona.

Al Doctor Javier Carvajal por permitirme integrar el grupo de trabajo en el CNIB, por su ayuda y consejos brindados durante mi etapa de investigación. A Patricia Portero y Bernardo Bastidas que con apoyo, colaboración y consejos permitieron terminar de mejor manera mi investigación.

A mis todos mis familiares en especial a Mairi y mi abuelo Jorge y mis amigos cercanos, Fernando, Elizabeth y Remigio; quienes con su ayuda me permitieron poder concluir mi carrera.

A todos mis amigos Leo, Gonzalo, Fernando, Edu, Franco, y todos los demás, gracias por su amistad y buenos momentos vividos durante nuestra etapa de estudiante de biología.

A mis amigos del CNIB, todos sin excepción (por eso no los nombro) por las matadas de risas, las bielas y por el compañerismo que nos permitió siempre apoyarnos y resolver cualquier problema durante la tesis.

Finalmente a Yeanina, quien ha sido mi mejor mi amiga, mi compañera y mi apoyo durante esta etapa universitaria, que con su alegría y dramatismo, siempre supo cómo sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Almidón
ANOVA	Analysis of variance
BC	Bagazo cervecero
BF	Bioproceso de fraccionamiento
C	Celulosa/hemicelulosa
CNIB	Centro Neotropical para Investigación de la Biomasa
CV	Coefficiente de variación
DCA	Diseño completamente al azar
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
L	Lípidos
P	Proteínas
PBB	Productos de base biológica
TIR	Tasa interna de retorno
VAN	Valor actual neto

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN	3
	3.1 El bagazo cervecero	3
	3.2 Métodos de extracción de macromoléculas en bagazo cervecero	6
	3.2.1 Método de extracción enzimática	7
	3.3 Concepto de Biorrefinería	7
4.	OBJETIVOS	11
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
	5.1 Muestra	12
	5.2 Pretratamiento físico	12
	5.3 Determinación de la composición del bagazo cervecero	12
	5.4 Fraccionamiento del bagazo cervecero	13
	5.4.1 Diseño del proceso de fraccionamiento del bagazo cervecero	13
	5.4.2 Extracción de lípidos	13
	5.4.3 Hidrólisis enzimática de almidón	14
	5.4.4 Hidrólisis enzimática de celulosa y hemicelulosa	15
	5.4.5 Desagregación física e hidrólisis enzimática de proteínas	15

5.5 Diseño experimental	16
5.6 Estudio financiero de la valorización del bagazo cervecero	16
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
6.1 Composición del bagazo cervecero	18
6.2 Diseño de bioproceso de fraccionamiento	21
6.3 Bagazo cervecero hacia una plataforma de Biorrefinería	26
7. CONCLUSIONES	30
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
9. FIGURAS	41
10. TABLAS	48
11. ANEXOS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Bioprocesos de fraccionamiento ensayados en la investigación	41
Figura 2.	Composición química del bagazo cervecero	41
Figura 3.	Cromatograma de azúcares simples	42
Figura 4.	Porcentaje en peso seco del total de biomasa extraída del bagazo cervecero en los cinco bioprocesos de fraccionamiento ensayados (almidón+lípidos+celulosa+proteína= % total de biomasa extraída). Tres repeticiones por proceso de fraccionamiento	42
Figura 5.	Porcentaje en peso seco de almidón extraído del bagazo cervecero en los cinco bioprocesos de fraccionamiento	43
Figura 6.	Porcentaje en peso seco de proteínas extraídas del bagazo cervecero en los cinco bioprocesos de fraccionamiento	43
Figura 7.	Porcentaje en peso seco de celulosa/hemicelulosa extraídas del bagazo cervecero en los cinco bioprocesos de fraccionamiento	44
Figura 8.	Porcentaje en peso seco de lípidos extraídos del bagazo cervecero en los cinco bioprocesos de fraccionamiento	44

Figura 9.	Gel de poliacrilamida SDS-PAGE de los cinco bioprocesos de fraccionamiento.	45
Figura 10.	Potencial de extracción de fracciones del bagazo cervecero en el Ecuador a partir del segundo bioproceso de fraccionamiento y las posibles aplicaciones industriales de los extractos	46
Figura 11.	Esquema de la biorrefinería diseñada para aprovechamiento del bagazo cervecero	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Análisis de Variancia de los cinco bioprocesos de fraccionamiento	48
Tabla 2.	Prueba de Levene para la homogeneidad de las variancias de los cinco bioprocesos de fraccionamiento.....	48
Tabla 3.	Prueba de Tukey $p \leq 0.05$ %	48
Tabla 4.	Concentración de azúcares de los cinco bioprocesos de fraccionamiento detectadas por HPLC	49
Tabla 5.	Concentración de hidrolizados proteicos de los cinco bioprocesos de fraccionamiento	49
Tabla 6.	Precios internacionales y mercado esperado hasta el 2021 a nivel global de los productos internacionales	50
Tabla 7.	Calculo de los ingresos en un periodo de diez años partir de los cuatro productos ofrecidos en el proyecto de biorrefinería	51
Tabla 8.	Cuadro de los egresos e ingresos asociados al proyecto de Biorrefinería.....	52
Tabla 9.	Flujo de dinero del proyecto de biorrefinería en 10 años	55
Tabla 10.	Resumen de los principales indicadores financieros del proyecto	55

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Lista de bloques de construcción creada por el el Departamento de Energía de los Estados Unidos	56
Anexo 2.	Potencial económico de las aplicaciones de los productos derivados de biomasa en biorrefinería	57
Anexo3.	Fórmula para calcular el Valor Actual Neto.....	58
Anexo 4.	Fórmula para calcular la Tasa Interna de Retorno.....	58

1. RESUMEN

El bagazo cervecero representa el 85 % de todos los residuos producidos en la industria cervecera y se genera a en la etapa de filtración y separación del mosto y grano de cebada. En los últimos años la atención se ha centrado en extraer los componentes de este residuo porque está conformado por alta cantidades de carbohidratos y proteínas pero también por lignina, lípidos y minerales. Varios estudios en base diferentes tecnologías han buscado extraer los componentes para producir productos de base biológica con alto valor comercial a partir de este desecho. En el Ecuador se producen aproximadamente 120,000 toneladas anuales de bagazo cervecero, el cual es generalmente utilizado como alimento crudo y de bajo costo para ganado. Por este motivo, esta investigación buscó explotar las macromoléculas de este residuo para la extracción y producción de productos de base biológica bajo el concepto de biorrefinería. Para lo cual, se realizó una caracterización de las macromoléculas con el objetivo de diseñar y ensayar cinco bioprocesos de fraccionamiento que maximicen la extracción de proteínas, lípidos y carbohidratos como almidón y celulósicos en base al uso principalmente de enzimas. De esta manera, se identificó que el segundo bioproceso de fraccionamiento extrajo 72,41 % de las macromoléculas del bagazo cervecero, logrando extraer el 93,79 % y 86,77 % del total de carbohidratos y proteínas respectivamente. Finalmente se ejecutó un análisis financiero que demostró la viabilidad económica del proyecto en una escala industria, con una Tasa de Retorno de Inversión de 98,92 %, un Valor Actual Neto de 355 385,744 USD y un periodo de recuperación de la inversión de dos años.

Palabras clave: bagazo cervecero, biorrefinería, bioproceso de fraccionamiento, productos de base biológica.

2. ABSTRACT

Brewer's spent grain represents 85 % of total waste produced by the brewing industry and undergoes in the state of filtration and separation of the wort and barley grain. In recent years, attention has focused on extracting the components of this residue because it is made up of high amounts of carbohydrates and proteins but also by lignin, lipids and minerals. Several studies based on different technologies have sought to extract the components to produce bio-based products with high commercial value from this waste. Ecuador produces about 120,000 tons per year of brewer's spent grain, which is generally used as raw and low-cost for animal feed. For this reason, this research sought to take advantage of the macromolecules from this waste for the extraction and production of bio-based products under the concept of biorefinery. For this, a characterization of macromolecules was carried out with the objective of designing and testing five fractionation bioprocesses that maximize the extraction of proteins, lipids and carbohydrates from starch and cellulosic based on the use of enzymes. In this way, it was identified that the second fractionation bioprocess extracted 72,41 % of the brewer's spent grain macromolecules, extracting 93,79 % and 86,77 % of the total carbohydrates and proteins respectively. Finally, a financial analysis was carried out that demonstrated the economic viability of the project on an industry scale, with an Investment Return Rate of 98.92%, a Net Real Value of USD 355 385,744 and a two-year investment recovery period.

Key words: Brewer's spent grain, biorefinery, fractionation bioprocess, bio-based products.

3. INTRODUCCIÓN

La sobrepoblación mundial ha aumentado el requerimiento de energía, alimentos y combustibles. Estas necesidades acarrearán y ahondarán otra serie de problemas como crisis energética, cambio climático, extinción de especies, rápido agotamiento de los recursos naturales y alta producción de desperdicios (Arancon, Lin, Chan, Kwan, y Luque, 2013). Por este motivo, es imprescindible buscar medidas a nivel mundial que contribuyan a mejorar el medioambiente y bienestar social y económico (Sheldon, 2016).

Una alternativa para solucionar algunas de estas problemáticas actuales es la valorización de residuos, actividad donde los desechos agrícolas, alimenticios e industriales son utilizados para convertirlos en nuevos productos con mayor valor comercial (Nzihou, 2010). Esta alternativa es 100 % renovable al aprovechar biomasa residual como materia prima y simultáneamente reduce la producción de residuos y costos de manejo de los mismos (Liguori, Amore y Faraco, 2013). Un ejemplo de esto, es la atención centrada en residuos producidos de la industria cervecera.

La industria cervecera genera una gran cantidad de residuos (Mussatto, Moncada, Roberto, y Cardona, 2013), puesto que es la quinta industria de bebidas más importante del mundo, con una producción 1,88 billones de hectolitros en el año 2015 (KIRIN, 2016). El desecho que genera esta industria se compone de aguas residuales y sólidos. Estos últimos se producen durante el proceso de producción de la cerveza y se clasifican en lúpulos, levaduras, tierra de diatomeas y el bagazo cervecero (dos Santos Mathias, T. R., de Mello, P. P. M y Sérvulo, 2014; Olajire, 2012).

3.1 El Bagazo Cervecero

Durante el proceso de maceración de la cerveza, el endospermo amiláceo de la cebada malteada es sometido a degradación enzimática, resultando en la solubilización del 70-80 % (Gupta, Abu-Ghannam y Gallagher, 2010) del contenido

original de cebada en polipéptidos, aminoácidos, carbohidratos fermentables (glucosa, maltosa y maltotriosa) y no fermentables (dextrinas) (Lynch, Steffen y Arendt, 2016). Después de este proceso, el remanente de la cebada es insoluble y se lo denomina bagazo cervecero (BC). Este residuo corresponde a aproximadamente el 85% del total de desechos generados en el proceso de elaboración de la cerveza (Mussatto, Dragone y Roberto 2006; Gonçalves et al., 2015) y su volumen de producción es entre 16 a 22 kg por hectolitro de cerveza elaborada (Lynch et al., 2016).

El BC es considerado biomasa lignocelulósica porque está conformado por cáscara del grano, pericarpio y fragmentos de endospermo (Buffington, 2014; S. I. Mussatto, Dragone y Roberto, 2006). Su composición química en peso seco es predominantemente de carbohidratos de celulosa y hemicelulosa (17-25 %) y no celulósicos (25-35 %), proteína (10-30 %), lignina (8-28%); y en menores cantidades por lípidos (< 11 %) y cenizas (5 %) (del Río et al., 2013; Mussatto et al., 2006; Mussatto et al., 2010; Niemi, Martins, Buchert, y Faulds, 2013). Cada una de estas macromoléculas presenta aplicaciones en casi todos los campos industriales.

La celulosa es una de las mayores fracciones del BC y está conformado por unidades de celobiosa, lo que le convierte en un recurso renovable, útil para la producción de etanol de segunda generación para biocombustibles (Joshi, Raj, Dinita, Jarina y Rajani, 2011). Además, otra aplicación del etanol celulósico es la producción de plástico altamente resistente y biodegradable obtenido a partir de la deshidratación de etanol a etileno (compuesto generalmente derivado del petróleo para la conversión a polietileno) (Bozell y Petersen, 2010). No obstante, el interés se ha centrado en la producción de nanocelulosa, un nanocompuesto con aplicaciones en ámbitos como farmacéutico, ambiental, alimenticio y ciencia de materiales, por su alta rigidez y resistencia (propiedades mecánicas), biocompatibilidad y una química superficial adaptable. (Lee, Aitomäki, Berglund, Oksman y Bismarck, 2014; Abitbol et al., 2016). Estudios han reportado que a partir de la matriz de celulosa del BC, se pueden inmovilizar enzimas (Rocha, Gonalves y Teixeira, 2011) y células, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para mejorar los procesos de fermentación en la cerveza (Brányik, Vicente, Machado Cruz y Teixeira, 2001).

La hemicelulosa está conformada principalmente por arabinoxilanos unidos por enlaces β - (1,4), pero también se encuentran en pequeñas cantidades monosacáridos de manosa y galactosa. (Lynch et al., 2016; Mandalari et al., 2005). Estudios han reportado aplicaciones a partir de xilosa y arabinosa para obtener xilitol y arabitol respectivamente, edulcorantes no calóricos y no cariogénicos (Mussatto y Roberto, 2005). Por otro lado, la xilosa mediante procesos de transformación puede convertirse en furanos, molécula que sirve como plataforma para la producción de solventes verdes (Bozell y Petersen, 2010).

El almidón está conformado por amilosa y amilopectina (Briggs, Boulton, Brookes y Steven, 2004). Gracias a que se compone únicamente de glucosa, sus aplicaciones se encuentran en producción de energía, biocombustibles, cultivo de organismos, producción de enzimas y elaboración de bloques de construcción química (Mussatto, Fernandes, Dragone, Mancilha y Roberto, 2007; Mussatto et al., 2008; Zeikus, Jain y Elankovan, 1999). En esta última aplicación, la glucosa puede ser la plataforma para producir los 10 bloques de construcción del futuro (Bozell y Petersen, 2010; Jong, E., Higson A., Walsh, P y Wellisch, 2011; Werpy y Petersen, 2004). Ejemplos de estos bloques son el ácido láctico, ác. levulínico y ác. succínico; los cuales pueden ser empleados como fármacos, cosméticos y en la manufactura de plásticos biodegradables (Gao et al., 2016; Mussatto et al., 2007).

La fracción lipídica está conformada principalmente por triacilglicéridos pero también se encuentran en menor cantidad fitoesteroles y ácidos grasos libres como ác. palmítico, ác. oléico, ác. linoléico y ác. esteárico (Niemi, Tamminen, et al., 2012). Generalmente, los triacilglicéridos son empleado como plataforma para la producción de biodiesel. Sin embargo, la degradación de los triacilgliceridos a ácidos grasos permite tener un espectro más grande de aplicaciones como fármacos, aditivos alimenticios, cosméticos, alimentos, polímeros, jabones y detergentes biodegradables (del Río et al., 2013).

La lignina es un heteropolímero formado por varios compuestos polifenólicos, entre los que destacan lignosulfatos, útiles como precursores en la elaboración de compuestos aromáticos verdes (menos tóxicos) como xileno, benceno o tolueno (Jong, E., Higson A., Walsh, P y Wellisch, 2011). Por otro lado, estudios

recientes han demostrado la capacidad de los componentes de la lignina para atrapar metales pesados, dispersantes de pesticidas (Rencoret et al., 2015) y producción de carbón activado (Mussatto et al., 2010). Adicionalmente, a partir de lignina es posible extraer ácido ferúlico y p-cumárico que presentan actividades antioxidantes en la prevención de cáncer de colon (Hudson, Dinh, Kokubun, Simmonds y Gescher, 2000).

El BC contiene una alta cantidad de proteína al poseer tres grupos que están clasificados por el medio en el que se extraen: hordeínas (alcohol), glutelinas (detergentes) y globulinas (soluciones salinas) (Niemi et al., 2013; Baxter, 1981). Esta fracción es generalmente utilizada como alimento crudo para ganado. Sin embargo, tiene el potencial de servir como alimento humano porque contiene aproximadamente el 30% de los aminoácidos esenciales, siendo la lisina la más abundante (14,3 %) y en menor cantidad leucina (6,12 %) y fenilalanina (4,64 %) (Lynch et al., 2016; Waters, Jacob, Titze, Arendt y Zannini, 2012). Además, se han mencionado entre otras aplicaciones la fabricación de péptidos bioactivos que regulan la presión sanguínea al inhibir la enzima convertidora de angiotensina (Connolly, O’Keeffe, Piggott, Nongonierma y Fitzgerald, 2015; Kuba, Tanaka, Tawata, Takeda y Yasuda, 2003).

Finalmente, la ceniza es otro componente del BC y en la literatura citada reportan que está conformada por 18 minerales, donde los más abundantes son silicio, fósforo, magnesio y calcio (Mussatto, 2014; Waters et al., 2012). Estos minerales pueden servir como abonos necesarios para el desarrollo de las plantas.

3.2 Métodos de extracción de macromoléculas en el BC

Entre los métodos más utilizados para extraer los componentes del BC se encuentran pirolisis (Carvalho, Esteves, Parajó, Pereira y Gírio, 2004) e hidrólisis ácidas y alcalinas (Mandalari et al., 2005; Mussatto, Dragone y Roberto, 2007; Subramanian, Talluri y Christopher, 2015). Estos métodos han sido empleados principalmente para extraer los carbohidratos, los cuales por su naturaleza recalcitrante necesitan condiciones más severas que maximicen la extracción. Sin embargo, estos métodos de fraccionamiento de biomasa son altamente sensibles a pH y temperatura ya

que su variación puede comprometer la extracción y la calidad del extracto alterando las propiedades funcionales de las macromoléculas como las proteínas (Chiesa y Gnansounou, 2011; Niemi et al., 2013).

3.2.1 Método de extracción enzimática

Varios estudios se han centrado en otros métodos que mejoren la selectividad del fraccionamiento de las macromoléculas del BC. Uno de los métodos más utilizados es la desagregación mediante biocatalizadores como enzimas (altamente específicas), permitiendo una alta calidad en la extracción de macromoléculas de origen proteico, lipídico o amiláceo (Woodley, 2016). El uso de esta técnica permite obtener extractos solubles a partir de macromoléculas insolubles sin alterar las propiedades funcionales (Rocha, Goncalves y Teixeira, 2011).

Estudios han reportado resultados eficientes empleando enzimas para hidrolizar carbohidratos (Forssell et al., 2008; Niemi, Faulds, et al., 2012), proteínas (Celus, Brijs y Delcour, 2007; Niemi et al., 2013) y ácido ferúlico (Faulds, Sancho, & Bartolomé, 2003). No obstante, la mayoría de estudios se basan en mejorar la extracción de una o máximo dos macromoléculas y no en forma integral. Por lo cual, una forma de aprovechar en conjunto todas las macromoléculas del BC es emplear el concepto de biorrefinería, cuyo fin es potenciar los procesos de conversión de biomasa al emplearlos de forma continua y utilizando los residuos o subproductos como base (materia prima) en otros procesos (Liguori et al., 2013).

3.3 Concepto de Biorrefinería

Esta plataforma busca el procesamiento sostenible de la biomasa (primaria y residual) en un espectro de productos comercializables (alimentos, biopolímeros, químicos) y energía (biocombustibles) (Cherubini, 2010). El concepto de biorrefinería es similar a la valorización de residuos, con la diferencia que en biorrefinería se busca reemplazar el uso de derivados fósiles.

Estos productos comerciables obtenidos en biorrefinería son denominados moléculas de plataforma o bloques de construcción. Estos productos de base biológica son relativamente simples pero tienen múltiples funcionalidades en sus estructuras, apropiados para convertirlos a través de una serie de transformaciones químicas a compuesto más valiosos (Serrano-ruiz, Luque, Campelo y Romero, 2012).

Los procesos utilizados en biorrefinería para separar y transformar la biomasa son fraccionamiento (extracción, separación), conversiones químicas, termoquímicas (gasificación y pirólisis), físicas, físico-químicas y procesos biológicos como conversiones enzimáticas y microbianas (fermentación aeróbica y anaeróbica) (Jong y Jungmeier, 2015).

Con el objetivo de crear una producción sostenible es necesario integrar la química verde en biorrefinería. La química verde es un conjunto de principios para la fabricación y aplicación de productos que tienen por objeto eliminar el uso y la generación de residuos químicos nocivos para el medio ambiente y la salud humana (Buffington, 2014; H Clark, J., El Deswarte, F y J, Farmer, 2009; Wohlgemuth, 2009). La aplicación de este concepto procura la obtención de un producto final no tóxico, degradable en productos químicos inofensivos y con una producción mínima de residuos (Cherubini, 2010).

Uno de los campos que se ajusta a los principios de la química verde es la biotecnología industrial. Esta actividad emplea el uso de tecnologías biológicas, donde se aprovechan enzimas, microorganismos, y su genética para mejorar los procesos de conversión de biomasa renovable a partir de biotransformaciones (Buffington, 2014; Erickson, Nelson y Winters, 2012). Entre las técnicas de biotecnología industrial se pueden mencionar: el desarrollo y uso de biocatalizadores, el diseño de bioprocesos, tecnología de purificación de productos, interacción de reacciones orgánicas y el análisis de procesos (Wohlgemuth, 2009). De esta manera, se pueden producir productos químicos renovables (productos de base biológica) que ofrezcan alternativas económicas.

La obtención de productos de base biológica (PBB) no es una actividad nueva. Se calcula que la producción actual a nivel global (excluidos los biocombustibles y alimentos) es aproximadamente 50 millones de toneladas y podría generar entre \$ 10-

15 billones de dólares en ingresos hasta 2020 (Jong, E., Higson, A., Walsh, P y Wellisch, 2012). El mercado de los PBB es grande y se espera que siga creciendo, ya que en 2004 el Departamento de Energía de los Estados Unidos publicó una lista donde enumera a los 12 bloques de construcción renovables (se realizó una actualización en 2010) en el futuro que remplazarán los productos químicos derivados de biomasa fósil (Anexo 1) (Bozell y Petersen, 2010; Werpy & Petersen, 2004). El valor comercial de estos productos (Anexo 2) depende de su aplicación industrial, siendo las farmacéuticas y cosméticas las de mayor rédito económico (Buffington, 2014).

A nivel global la mayoría de estudios de mercado solo consideran a los PBB provenientes únicamente de fuentes de carbohidratos. Por lo cual, la incorporación de macromoléculas como proteínas, lípidos y lignina podría generar más ingresos (Bozell y Petersen, 2010; Jong, E., Higson, A., Walsh, P y Wellisch, 2012; Jong, E., Higson A., Walsh, P y Wellisch, 2011; Jong y Jungmeier, 2015).

Sin embargo, los productos químicos, combustibles y polímeros que se consumen a diario se derivan principalmente de materias primas basadas en fuentes fósiles (Jong, E., Higson, A., Walsh, P y Wellisch, 2012). Esto se debe a que en muchos casos, el costo de la producción de PBB excede el costo de producción de productos petroquímicos. De modo que el reto actual en biorrefinería es encontrar técnicas eficientes, de bajo costo, menor impacto ambiental y a la vez obtener rendimientos equiparables a la industria petroquímica (Jong, E., Higson A., Walsh, P y Wellisch, 2011).

En el Ecuador los estudios sobre biorrefinería son escasos y se han centrado principalmente en la producción biocombustibles como etanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulósica provenientes de desechos agrícolas como banano, caña de azúcar, tagua y palma africana (Carvajal et al., 2013; Garcia M., Machimura, & Matsui, 2013). El alto volumen de producción, bajo costo y la composición química, convierten al BC en una potencial materia prima para ser explotada en una plataforma de biorrefinería con el fin de elaborar productos de alto valor comercial apoyando la política pública de cambio de matriz productiva.

Por este motivo, esta investigación busca aprovechar el BC en un país en el cual la industria cervecera (tanto artesanal como comercial) genera cerca de 120.000

toneladas anuales (Cervecería Nacional, 2014) y únicamente es utilizado como alimento crudo para ganado. En este estudio se diseñaron y se ensayaron cinco bioprocesos de fraccionamiento y combinados con el uso de biocatalizadores maximizan el fraccionamiento del BC y la obtención de productos de alto valor comercial. Finalmente, se realizó un análisis financiero calculando la Tasa Interna de Retorno y Valor Actual Neto para representar la viabilidad económica en una potencial aplicación industrial.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Fraccionar el bagazo cervecero para la extracción de macromoléculas de valor comercial bajo el concepto de biorrefinería.

4.2 ESPECÍFICOS

- Determinar la composición del bagazo cervecero.

- Diseñar un proceso de fraccionamiento óptimo para la separación de macromoléculas del bagazo cervecero.

- Realizar un estudio financiero de la valorización del bagazo cervecero bajo el concepto de biorrefinería en el Ecuador.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MUESTRA

El bagazo cervecero fue proporcionado por el Centro Neotropical para Investigación de la Biomasa (CNIB). El bagazo cervecero fue secado en una estufa (Shell Lab 1350 GX) por 24 h a 70 °C.

5.2 PRETRATAMIENTO FÍSICO

Para aumentar el área de superficie de contacto para los procesos de hidrólisis enzimática y extracción de lípidos, el bagazo cervecero fue molido y tamizado (Galbe & Zacchi, 2007). La molienda se realizó en un molido de bolas Retsch MM400 y el producto obtenido fue tamizado en un tamiz Rotap-II DS hasta conseguir una harina con un tamaño de partículas menor a 100 μm (Bastidas, 2013).

5.3 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL BAGAZO CERVECERO

Con el fin de determinar el potencial de las macromoléculas presente en el bagazo cervecero se realizó un análisis de composición. Los porcentajes de sólidos totales, humedad, ceniza, lignina y carbohidratos fueron cuantificados en base a los protocolos Laboratory Analytical Procedures (LAPs) de la National Renewable Energy Laboratory (Sluiter, Hames, Hyman, et al., 2008; Sluiter, Hames, Ruiz, et al., 2008; Sluiter et al., 2012).

El porcentaje de lípidos totales fue cuantificado por el Método de Extracción de Grasas Soxhlet utilizando éter de petróleo como solvente orgánico (Luque de Castro y García-Ayuso, 1998).

El Nitrógeno total fue cuantificado por el Método de digestión con persulfato (TNT-Persulfate Digestion Method) de Hach. Se utilizó el factor de conversión de 6,25 para convertir el porcentaje de nitrógeno en porcentaje de proteína (Forssell et al., 2008; Jones, 1941).

Los azúcares simples como glucosa, maltosa y maltotriosa fueron cuantificados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) al hacer una solución con agua destilada y bagazo cervecero a una proporción de sólidos 10 % p/v.

5.4 FRACCIONAMIENTO DEL BAGAZO CERVECERO

5.4.1 DISEÑO DEL PROCESO DE FRACCIONAMIENTO DEL BAGAZO CERVECERO

El diseño del proceso fraccionamiento está basado en la extracción de las siguientes macromoléculas: lípidos, proteínas y carbohidratos (almidón y celulosa). Se diseñarán cinco procesos de fraccionamiento (Fig.1) en los cuales las macromoléculas fueron extraídas de forma continua y alternando su orden se identificó el mejor bioproceso de fraccionamiento en función de la suma total del porcentaje de extracción en peso seco de cada de las macromoléculas obtenidas. Cada bioproceso de fraccionamiento se realizó por triplicado partiendo de 25 gramos de bagazo cervecero por repetición.

5.4.2 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

La extracción de lípidos fue realizada por el Método Soxhlet usando hexano como solvente (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998). El proceso duró cinco horas con un promedio de diez reflujos por hora. La biomasa resultante fue secada en una estufa (Shell Lab 1350 GX) por 24 h a 60 °C (a fin de evaporar cualquier resto de hexano) para su posterior uso en otros pasos de fraccionamiento. La cuantificación de lípidos fue realizada por método gravimétrico.

5.4.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN

Esta parte consistió de dos etapas: una hidrólisis enzimática al BC y una hidrólisis enzimática al sobrenadante obtenido del BC. En la hidrólisis del BC se utilizó una endo alfa-amilasa termoestable (Termamyl® SC) que hidroliza los enlaces alfa-glucosídicos (1,4) del almidón. Esta enzima rompe la amilosa (cadena lineal) y la amilopectina (cadena ramificada) en azúcares de menor tamaño como dextrinas y en menor cantidad maltosa y glucosa (Paolucci-Jeanjean et al., 2000).

Las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática del sobrenadante fueron una exo glucoamilasa (AMG® 300 L) y una pululanasa (Promozyme ®). La exo glucoamilasa corta los enlaces alfa 1,4 de cadenas lineales, mientras que pululanasa desramifica las cadenas al cortar enlaces alfa 1,6. Estas enzimas fueron empleadas para obtener azúcares fermentables como glucosa y maltosa hidrolizar los azúcares a partir del sobrenadante obtenido en la primera hidrólisis enzimática (Bertoldo et al., 2004).

La hidrólisis enzimática del bagazo cervecero se llevó a cabo a una proporción de sólidos 10 % p/v y se añadió 0.05 % v/v de Termamyl SC®. Las muestras fueron incubadas en una placa de calentamiento (Boeco MSH-420) a 120 rpm, por 90 minutos a 90 °C a pH 6. Al finalizar la hidrólisis, las muestras fueron centrifugadas para separar pellet y obtener el sobrenadante para su posterior hidrólisis. El pellet fue lavado con agua destilada (dH₂O), centrifugado y secado en una estufa (Shell Lab 1350 GX) por 24 h a 60 °C para su posterior uso en otros pasos de fraccionamiento.

El sobrenadante recolectado de la hidrólisis previa fue hidrolizado al añadir 0.05% v/v de AMG® 300 L y Promozyme ®. Las muestras fueron incubadas en un agitador mecánico (Labnet 311 DS) a 300 rpm por 90 minutos a 65 °C a pH 5. Alícuotas de 1 mL del sobrenadante fueron recuperadas para determinar la concentración de azúcares por HPLC.

5.4.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CELULOSA Y HEMICELULOSA

Las enzimas utilizadas fueron CTEC y HTEC (Cellic 3®). CTEC es un complejo de celulasas que hidroliza la celulosa en celobiosa, celodextrina y glucosa. Por otro lado, HTEC es un complejo de hemicelulasas que hidrolizó la hemicelulosa en xilosa (Wang, Templer, & Murphy, 2012; Teter, 2012).

Esta hidrólisis fue llevada a cabo a una proporción de sólidos 10 % p/v y se añadieron 0.5 % y 0.1% v/v de las enzimas CTEC y HTEC respectivamente. Las muestras fueron incubadas en un agitador mecánico (Labnet 311 DS) a 300rpm, por 72h a de 50 °C a pH 5. Al finalizar la hidrolisis, las muestras fueron centrifugadas y se colectó y almacenó el sobrenadante. El pellet fue lavado con dH₂O y secado en una estufa (Shell Lab 1350 GX) por 24 h a 60 °C para su posterior uso en otros pasos de fraccionamiento. Alícuotas del sobrenadante fueron recuperadas para determinar la concentración de azúcares por HPLC.

5.4.5 DESAGREGACIÓN FÍSICA E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

La desagregación física de proteínas se realizó por ultrasonido a una proporción de sólidos 10 % p/v por 4 minutos a 20 Khz para fraccionar y aumentar el área de superficie de contacto con el sustrato y la enzima antes de la hidrólisis enzimática de proteínas.

La hidrólisis enzimática fue llevada a cabo a una proporción de sólidos 10 % p/v y se añadieron 0,02% v/v tripsina (Sigma®) y 0,05 % v/v de Neutrase® 0.8L (metaloproteasa). Las muestras fueron incubadas en un agitador mecánico (Labnet 311 DS) a 300rpm, por 18h a 40 °C a pH 8. Al finalizar la reacción, las muestras fueron centrifugadas y se colectó y almacenó el sobrenadante. El pellet fue lavado con dH₂O y

secado en una estufa (Shell Lab 1350 GX) por 24 h a 60 °C para su posterior uso en otros pasos de fraccionamiento.

La concentración de los hidrolizados proteicos obtenidos de los sobrenadantes fue determinada mediante el Método Bradford (1976). El reactivo de Bradford se preparó al disolver 100 mg de Coomassie Blue G250 en 50 ml de etanol al 95%. Después, la solución se mezcló con 100 ml de ácido fosfórico al 85% y se aforó hasta 1 L con dH₂O (Walker, 1996). Se tomaron 100 uL de las muestras obtenidas de la hidrólisis y se mezcló con 1 mL de reactivo Bradford. Luego se incubaron a temperatura ambiente por dos minutos y se midió la absorbancia de 595nm (Bradford, 1976). Los pesos moleculares de los péptidos obtenidos de la hidrólisis de proteínas fueron identificados por medio de geles de poliacrilamida 20% en una electroforesis SDS-PAGE (Walker, 1996).

5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA), donde los cinco bioprocesos de fraccionamiento ensayados fueron tomados como tratamientos. Los datos analizados fueron los porcentajes totales en peso seco extraídos de las cuatro macromoléculas (almidón+ lípidos+celulosa+proteína= % total extraído). Los análisis estadísticos utilizados fueron: un Análisis de la Variancia (ANOVA) para determinar diferencias existentes entre los cinco bioprocesos de fraccionamiento, una prueba de Levene para la homogeneidad de las variancias, coeficiente de variación y una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para identificar el o los mejores bioprocesos de fraccionamiento. Los análisis fueron corridos empleando el paquete estadísticos SPSS.

5.6 ESTUDIO FINANCIERO DE LA VALORIZACIÓN DEL BAGAZO CERVECERO

Se llevó a cabo un estudio financiero para analizar la viabilidad económica del proyecto de la valorización del bagazo cervecero en una plataforma de biorrefinería. Para determinar la viabilidad del proyecto a nivel industrial se calcularon dos indicadores:

el valor actual neto (VAN) (Anexo 3) y tasa interna de retorno (TIR) (Anexo 4). Para calcular estos dos indicadores se utilizó una tasa de descuento de 13,76 %, utilizada por Carvajal et al., (2012) en el proyecto de biorrefinería Recursos Sustentables para Etanol (RESETA).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 COMPOSICIÓN DEL BAGAZO CERVECERO

Se realizó un análisis de composición para identificar el potencial y la concentración de las macromoléculas presentes en el bagazo cervecero. Previo a la determinación de los componentes químicos, se determinaron los porcentajes de sólidos totales y humedad. El porcentaje de humedad fue de 4,38 % mientras que los sólidos totales de 95,62 %. El contenido de humedad obtenido es menor a los reportados en otros estudios, donde a partir de un tamaño de partículas inferior a 100 μm del BC, obtienen valores entre 8 a 11 % (Santos, Jiménez, Bartolomé, Gómez-Cordovés y Del Nozal, 2003).

Los carbohidratos fueron la fracción mayoritaria en relación al peso seco del BC y representaron el 54,48 % (Figura 2), donde el 0,82 % correspondió a azúcares simples (AS), los cuales fueron maltosa (66,98 %) y maltotriosa (33,02 %), en el análisis por HPLC no se detectó glucosa (Figura 3). En ningún estudio se ha reportado la presencia de AS, posiblemente porque la mayoría de estudios utilizan el BC proveniente de cervezas industriales, las cuales utilizan tecnologías de filtrado prensa que maximiza la extracción total AS durante la elaboración de cerveza (Mussatto, Dragone y Roberto 2006). La presencia AS en esta investigación es consecuencia de la metodología empleada en la elaboración de la cerveza artesanal, donde la etapa de filtración se lleva a cabo porque los revestimientos de la cebada permanecen intactos para formar un filtro adecuado (cama filtro). Este proceso es menos eficiente lo que permite la presencia de AS (Gupta et al., 2010; Lynch et al., 2016).

El porcentaje de carbohidratos obtenido en esta investigación es similar a los reportados Jay et al. (2008) y Robertson et al. (2010), quienes mencionan que los sacáridos corresponden aproximadamente 50 % del total de los componentes químicos del BC. Se ha reportado que la concentración de carbohidratos puede variar entre 40 % hasta el 60% (Mussatto et al., 2006; Santos et al., 2003), debido a que su concentración

está sujeta al rendimiento en los procesos de maceración en la elaboración de cerveza (Mussatto, 2014).

En esta investigación no se realizó una caracterización individual de todos los carbohidratos. Generalmente, la celulosa y hemicelulosa se encuentran en mayor cantidad. Mientras que, en menor cantidad se encuentran el almidón, beta glucanos y azúcares simples (Forssell et al., 2008; Lynch et al., 2016; Mandalari et al., 2005). La variación de carbohidratos está sujeta a los métodos empleados durante la etapa de maceración de la cerveza. En esta investigación, la glucosa fue el monosacárido en mayor proporción de los carbohidratos; este azúcar puede ser la plataforma para la producción de otros compuestos como por ejemplo los diez bloques de construcción como ácido succínico, ácido láctico y xilitol (Jong, E., Higson A., Walsh, P y Wellisch, 2011).

Para obtener el porcentaje de proteína, primero se determinó el porcentaje de nitrógeno (2,73 % N). Este valor se multiplicó por 6,25, factor de conversión nitrógeno-proteína sugerido por Jones (1941) para bioma lignocelulósica, obteniendo 17.09 % de proteína. El porcentaje de proteína obtenido en esta investigación es similar al reportado por Jay et al., (2008), Mussatto et al., (2006) y Robertson et al., (2010), no obstante, Santos et al., (2003) reporta la presencia de proteínas de hasta un 30 % en peso seco. En la literatura citada esta fracción varía desde el 10 hasta el 30 % (Mussatto et al., 2006; Niemi et al., 2013), esta variación está ligada a la cosecha de la cebada, el tipo de malta empleada y la actividad enzimática de las endopeptidasas en la elaboración de la cerveza (Celus, Brijs y Delcour, 2006; Gupta et al., 2010; Santos et al., 2003), pero se estima que el 65% de las proteínas presentes en la malta (cebada) permanecen en el BC después del proceso de filtración de la cerveza (Celus et al., 2006). El alto porcentaje de proteína determinado en esta investigación es equiparable al valor nutricional de proteína presente en carnes como la de pollo (22-25 %). Además, aproximadamente el 30% del contenido total de proteína es conformado por aminoácidos esenciales (Lynch et al., 2016; Waters et al., 2012), por lo cual esta fracción tiene potencial para ser empleada como alimento humano.

Los lípidos representaron el 10 %, este porcentaje obtenido es similar a los reportados por Niemi et al. (2012) y del Río et al., (2013) quienes reportan que los lípidos representan menos del 11 % del contenido total en peso seco del BC. Sin embargo, Santos

et al., (2003) y Jay et al., (2008) mencionan valores inferiores al 6 %, esta fracción es una de las que más varía, puesto que es escasa la información sobre lípidos en el BC. Respecto a otros tipos de biomasa lignocelulósica, el BC contiene una alta cantidad de lípidos si se compara con el bagazo de caña de azúcar, bagazo de raquis de palma africana, o residuos de maíz (conformadas en su mayoría por celulosa, hemicelulosa y lignina); las cuales carecen o poseen mínimas cantidades de lípidos (Isikgor & Becer, 2015; Pointner, Kuttner, Obrlik, Jäger y Kahr, 2014). No se ha reportado hasta la presente fecha estudios sobre la valorización de lípidos en el BC; por este motivo, en esta investigación se extrajeron los lípidos con el objetivo de aprovechar su composición (conformada principalmente por triacilglicéridos) como materia prima para el uso en áreas como cosméticos o jabones y detergentes biodegradables (del Río et al., 2013).

La lignina tuvo un porcentaje 14.12 %. Este valor se obtuvo al sumar los dos componentes que conforman la lignina, el porcentaje de lignina ácido soluble (3.78 %) y el porcentaje de lignina ácido insoluble (10.34 %). Por otro lado, la fracción de ceniza correspondió al 4.12% y fue la menor porcentaje obtenido de las fracciones del bagazo cervecero. Los valores de lignina y ceniza son similares a los reportados por Santos et al. (2003) y Buffington (2014). Adicionalmente, el porcentaje de lignina en el BC está relacionado con el porcentaje de proteínas en una relación inversamente proporcional, puesto que estas íntimamente asociadas en la pared celular (Faulds, Robertson y Waldron, 2008).

Finalmente, la presencia y concentración de las macromoléculas en el BC pueden variar según la muestra (se ha reportado que existen diferencias en composición provenientes de diferentes cervecías), el tipo de malta, estilo de cerveza y tecnologías empleadas en proceso de producción de la cerveza. (Mussatto 2014; Santos et al. 2003). Además, el tamaño de partículas del BC utilizado en los análisis de composición es un factor que puede variar (aumentar o disminuir) los resultados como lo menciona Jay et al., (2008).

6.2 DISEÑO DE BIOPROCESO DE FRACCIONAMIENTO

Hay que mencionar, que hasta la presente fecha no se ha reportado estudios donde se empleen bioprocesos fraccionamiento para extraer los componentes del BC. La mayoría de estudios se han centrado en emplear métodos enzimáticos, alcalinos, ácidos y menor cantidad termoquímicos (Carvalho et al. 2004; Faulds, Robertson, y Waldron 2008; Mandalari et al. 2005; Mussatto et al. 2007), con el fin de extraer una o máximo dos macromoléculas en su mayoría carbohidratos y proteínas. Por eso, una vez identificado la cantidad de carbohidratos, proteína y lípidos, se diseñaron y se ensayaron cinco bioprocesos de fraccionamiento y que combinados con el uso de enzimas (para carbohidratos y proteínas) mejoren la solubilización y por consiguiente la extracción de estas macromoléculas.

Mediante un análisis de variancia ANOVA se comparó el promedio del % de extracción total del BC (almidón+ lípidos+celulosa+proteínas) y se demostró que existieron diferencias significativas entre los cinco bioprocesos de fraccionamiento (BFs) ensayados con valor de $p \leq 0.01\%$ (Tabla 1). La prueba de Levene demostró que la homogeneidad de las variancias entre los cinco BFs no fue significativa, por lo cual no hubo factores externos que pudieran interferir en los resultados en el experimento (Tabla 2). Finalmente, el coeficiente de variación (CV) fue de 3,9 %, un valor óptimo para experimentos manejados bajo condiciones de laboratorio donde se requiere valores inferiores al 5%.

Cuatro de los cinco BFs sobrepasaron el 60% de extracción del BC (Figura 4), donde el segundo BF (A-C-P-L) fue el más eficiente en extraer los componentes del BC, mientras que el primer BF (L-A-C-P) presentó el valor más bajo de extracción. La prueba de Tukey corroboró este hecho (Tabla 3), ya que demostró que existieron tres subconjuntos en los cinco bioprocesos de fraccionamiento. Siendo el primer subconjunto el menos eficiente (BF 1) y el tercer subconjunto el más eficiente. El cuarto BF (A-L-C-

P) y segundo BF (A-C-P-L) pertenecieron al tercer subconjunto pero el segundo BF fue el más eficiente ya que perteneció únicamente al tercer subconjunto mientras el cuarto BF perteneció al segundo y tercer subconjunto. Los porcentajes totales de extracción de extracción en peso seco en los cinco bioprocesos ensayadas, superan a los reportados por Treimo et al., (2009) y Faulds et al., (2008) donde lograron extraer 42 % y 36 % del total del BC respectivamente. En estos estudios utilizan diferentes enzimas comerciales y condiciones pH para extraer proteínas y carbohidratos. Por otro lado, en esta investigación si solo se toma en cuenta todos los carbohidratos y proteínas presentan un resultado de 66 %, similar al reportado Niemi et al., (2012). No obstante, en este estudio citado no se esclarece el porcentaje de individual de extracción es estas fracciones mencionadas, ni su rendimiento y además, no valoriza la fracción de lípidos.

El segundo BF (A-C-P-L) extrajo el 72,4 % del total de componentes que contiene el BC, logrando los porcentajes más alto de extracción en almidón (Figura 5) y proteínas (Figura 6) pero presentó porcentaje inferiores de lípidos y celulosa/hemicelulosa respecto a los demás BFs (Figuras 7 y 8). El porcentaje extraído en peso seco de almidón fue de 40.21 % (Figura 5), con una concentración de azúcar de 21.12 g/l (Tabla 4) y estaba conformado por glucosa y en menor cantidad maltosa. En esta investigación no se realizó una caracterización de este tipo de carbohidratos, pero el porcentaje (en peso seco) extraído es superior a los reportados en otros estudios, donde la composición varía desde el 2% hasta un máximo del 20 % (Forssell et al., 2008; Jay et al., 2008). Adicionalmente, la fracción almidón residual fue mayor a fracción de celulosa/hemicelulosa, la cual generalmente se encuentra en una proporción mayor a la concentración de almidón en el BC. El alto porcentaje posiblemente sea resultado del BC, ya que al provenir de una cerveza elaborada artesanalmente, se emplea tecnologías de menor rendimiento frente a las tecnologías empleadas en escala industrial (Lynch et al., 2016; Santos et al., 2003). Sin embargo, sería necesario realizar una caracterización de estas fracciones previamente mencionadas para aseverar esta hipótesis.

El porcentaje de extracción de almidón extraído (40.21 %) representó el 73,8 % del contenido original de carbohidratos. Además junto al porcentaje extraído de celulosa/hemicelulosa (10.90 %) representan el 93.79 % del contenido total de sacáridos, lo que constituyó el 51.1 % del total de componentes fraccionados del BC. El resultado

en base a los carbohidratos totales extraídos es óptimo por dos razones: primero, por la complejidad que resulta fraccionar los carbohidratos del BC por su naturaleza recalcitrante (en especial celulosa y hemicelulosa); y segundo, porque el porcentaje extraído es superior a los reportados por Niemi et al. (2012), Treimo et al. (2009), Faulds et al. (2008) y Forssell et al. (2008), en los cuales lograron solubilizar el 48 %, 39 %, 36 % y 28 % del total de carbohidratos respectivamente. Los bajos rendimientos reportados en los estudios mencionados al hidrolizar carbohidratos podría deberse a que emplean métodos enzimáticos para degradar únicamente carbohidratos como celulosa, hemicelulosa y beta glucanos. Generalmente, estas fracciones contenidas en los carbohidratos son sometidas a pre-tratamientos ácidos y alcalinos por su posterior hidrólisis enzimática (Lynch et al., 2016); Xiros et al. (2011) reporta valores de extracción mayor al 90 % de celulosa y hemicelulosa del BC. No obstante, emplear metodologías en base al uso de ácidos y bases fuertes puede destruir otras macromoléculas contenidas en el BC (Chiesa & Gnansounou, 2011).

Los resultados obtenidos en la figura 6 muestran que el porcentaje extraído de proteínas en el BF 2 (A-C-P-L) fue de 14.83 %, con una concentración de 2.03 mg/ml (Tabla 5), lo que representa el 86.77 % del contenido original de proteínas presentes en el BC (Figura 2). El resultado en esta investigación es superior a los reportados por Celus et al. (2007), Niemi et al. (2013) y Treimo et al., (2009), quienes mencionan la extracción del 60 %, 76 % y 80 % del total de proteínas contenidas en el BC respectivamente. Los estudios de Celus et al. (2007), Niemi et al. (2013) y Treimo et al., (2009) emplean una metodología de dos etapas para fraccionar el BC, que consiste en la hidrólisis enzimática de carbohidratos y posteriormente de proteínas. Los resultados mencionados en estos estudios al hidrolizar proteínas se obtienen por emplear la enzima Alcalase™, una serina endopeptidasa que consiste principalmente en subtilisina A (Sousa et al., 2004),

La eficiencia del segundo BF (A-C-P-L) para hidrolizar las proteínas radicó en la desagregación física por ultrasonido realizada previo a la hidrólisis enzimática de proteínas y a las dos endopeptidasas utilizadas en la presente investigación. La desagregación física permitió aumentar el área de superficie de contacto entre el sustrato y la enzima. Por otra parte, combinar dos tipos de proteasas; una serina proteasa

(tripsina) con especificidad de sustrato basada en cadenas positivas de lisina y arginina (corta los péptidos en el lado C-terminal de los residuos de aminoácidos lisina y arginina) (Qi & He, 2006) y una metaloproteasa con tres ligandos que pueden ser histidina, glutamato, aspartato, lisina y arginina (Matthews, 1988), permitió tener más sitios de corte, mejorando la hidrólisis y reducción de las proteínas de alto peso molecular (>90 kDa) (Celus et al., 2006). Respecto al uso de endopeptidasas, ningún estudio ha reportado el uso de metaloproteasas para hidrolizar proteínas del BC, teniendo en cuenta que Jones (2005) reportó a estas endopeptidasas como las responsables directas en la solubilización de las proteínas de almacenamiento de la cebada durante el malteado y la etapa de maceración en la elaboración de la cerveza.

El uso de metodologías diferentes a las enzimáticas para hidrolizar proteínas ha sido reportado por Vieira et al. (2014), quien menciona porcentajes de extracción entre 79-85 % del total de proteínas en el BC, resultados similares a los obtenidos en este estudio. Vieira et al. (2014) emplea una metodología de extracción que combina una hidrólisis alcalina y una posterior hidrólisis ácida. Sin embargo, al emplear métodos alcalinos o ácidos se contraponen a los principios de química verde que persigue el concepto de biorrefinería (Sheldon, 2016). Además, la modificación enzimática utilizando proteasas específicas presenta varias ventajas frente al método mencionado (así como otros métodos), ya que no es un método agresivo, conserva las propiedades funcionales de las proteínas y no destruye los aminoácidos (Kotlar, Ponce y Roura, 2013).

Mediante un gel de poliacrilamida SDS-PAGE se identificó que los pesos moleculares de los hidrolizados proteicos tuvieron un tamaño inferior a 10 kDa (Figura 9), este resultado se evidenció en todos los BFs. Los pesos moleculares obtenidos son menores a los reportados por Celus et al. (2007,) Niemi et al. (2013) donde los tamaños oscilan entre 10-20 kDa y 10-50 kDa respectivamente

En esta investigación no se ensayó bajo diferentes condiciones de pH pero sí se realizó una revisión bibliográfica para buscar las condiciones de pH óptimas para el fraccionamiento del BC. Estudios de Treimo et al. (2009) y Celus et al. (2007)

demonstraron que en pHs alcalinos se obtienen altos porcentajes de solubilización de proteínas mientras que en pHs ácidos ocurre lo opuesto. Esto se debe a que el punto isoeléctrico de las proteínas del BC se encuentran en pHs ácidos, lo que produce que la solubilidad sea casi nula (Faulds et al., 2008; Niemi et al., 2013).

El porcentaje de proteína extraída (Figura 6) y la concentración de los hidrolizados (Tabla 5) fueron mayores en los BF 2 (A-C-P-L) y BF4 (A-L-C-P), ambos procesos iniciaron con una hidrólisis enzimática de almidón, pero el segundo BF presentó un valor mayor al hidrolizarse de manera consecutiva las dos fracciones de carbohidratos. Por el contrario, los BFs que no fueron sometidos en el inicio de los bioprocesos de fraccionamiento a una hidrólisis enzimática de almidón presentaron porcentajes de extracción más bajos. Además, Faulds et al., (2008) demostró que utilizar peptidasas sobre BC no pre-tratado con otras enzimas disminuye la hidrólisis de proteínas. Por lo cual, se podría inferir que la extracción previa de almidón permitió una mejor extracción de proteínas; este hecho ya fue reportado Niemi et al., (2013), quien sugiere que la proteínas en el BC están rodeadas por una pared celular de polisacárido que restringe su liberación.

Por otra parte, los BF 1 (L-A-C-P) y BF 5 (L-A-P-C) presentaron los porcentajes de extracción de lípidos más alto respecto a los demás BFs. Sin embargo, estos porcentajes de extracción superan al contenido original detectado en análisis de composición (Figura 2). Este resultado no se debe a un mayor contenido de lípidos, puesto que en todos los estudios se reportan porcentajes inferiores al 11 % (del Río et al., 2013; Niemi, Tamminen, et al., 2012; Santos et al., 2003) . Los altos porcentajes (en peso seco) se deben a la combinación de dos factores: a la capacidad de extracción del solvente utilizado en los BFs (éter de petróleo en análisis de composición) y el inicio de los procesos de fraccionamiento. Los BF 1 (L-A-C-P) y BF5 (L-A-P-C) iniciaron el proceso con una extracción de lípidos utilizando hexano, por lo cual, hubo extracción de otras macromoléculas como proteínas, las cuales están unidas a los lípidos que conforman la pared celular de la cebada; y al almidón, donde el 45% de los lípidos se localizan en el endospermo y en el embrión amiláceo del grano de cebada (Cozzolino y Degner, 2016). Este resultado es contrastable ya que BF 2 y BF4 no iniciaron los procesos de

fraccionamiento con una extracción de lípidos, por lo que mostraron resultados inferiores a los demás BFs (Figuras 5 y 6).

Los resultados obtenidos con el segundo BF son notables, ya que en esta investigación se logró extraer 86.77 % del contenido total de proteínas. Esta fracción tiene potencial directo como alimento humano al no requerir de un gran proceso de refinamiento para su comercialización inmediata. El resultado de combinar un bioproceso fraccionamiento continuo y el uso de diferentes enzimas ayudo a mejorar la extracción de las fracciones que generalmente son insolubles en el BC y es aquí donde recae el éxito del segundo BF,

Por lo tanto, a partir de este biorproceso se puede aprovechar el volumen del BC generado en el país para producir 17,803 ton/a de péptidos y aminoácidos de fácil asimilación y que puede completar la dieta diaria requerida para contrarrestar los problemas desnutrición infantil en el país. Además 61,325 ton/a de carbohidratos hidrolizados (Figura 10), de las cuales 48,255 ton/a son provenientes de almidón y 17,070 ton/a provenientes de celulosa/hemicelulosa, pudiendo ser la materia prima para elaborar los 10 bloques de construcción de futuro. Finalmente se podrían extraer 3,845 ton/a de ceniza y 17,749 ton/a. Esta última fracción no fue valorizada en esta investigación pero puede ser empleada en la elaboración de PBB, puesto que no requiere de métodos extremos para su liberación, ya que al final de todos BFs era notoria su presencia al extraer la mayoría de los componentes del BC.

6.3 BAGAZO CERVECERO HACIA UNA PLATAFORMA DE BIORREFINERÍA

El alto volumen de producción y bajo costo, así como su composición química (alta cantidad de carbohidratos, proteína y lípidos) y sus potenciales aplicaciones convierte al bagazo cervecero en una potencial materia prima para la producción de productos de base biológica en una plataforma de biorrefinería.

Sin embargo, aplicar plataformas biorrefinerías basadas principalmente en la producción de biocombustibles (bioetanol) enfrentan varios retos como los costos de producción, el precio de mercado y menor desempeño frente a combustibles fósiles, lo que dificulta su aceptación comercial (Jong, E., Higson A., Walsh, P y Wellisch, 2011). En referencia a los precios de mercado, el Gobierno del Ecuador fijó el litro de bioetanol en 0,76 USD con el fin de aumentar la producción de gasolina mezclada ECOPAÍS (Carvajal et al., 2013; IPEI, 2013). El bajo precio del etanol tanto a nivel local como global, produce una menor rentabilidad por los altos costos de producción, este es un fenómeno que se repite para los biocombustibles en otros países de la región y en muchos de los casos, dependen de los subsidios gubernamentales para ser proyectos económicamente viables (Eisentraut, 2010).

El emplear un modelo de biorrefinería diferente al de producción de biocombustibles permite tener una gama diferente de productos pero a su vez permitiría que las investigaciones no se centren en mejorar e innovar los procesos de extracción y/o producción de un solo producto o macromolécula. Consecuentemente, producir un espectro de diferentes productos permitiría acceder a mercados más variados y grandes, donde las ganancias los PBB dependerán de las aplicaciones de los productos, siendo aplicaciones cosméticas, farmacéuticas y alimenticias las más remuneradas económicamente (Anexo 2). Por esta razón, en el país se podría aprovechar las macromoléculas del BC y el segundo BF diseñado en esta investigación para concebir un modelo de biorrefinería visualizando los carbohidratos como materia prima en una plataforma para azúcares de seis carbonos capaz de producir los 12 bloques de construcción, pero que también integre la co-producción de otros productos a partir, de proteínas, lípidos, lignina y ceniza. (Figura 11). Puesto que se ha reportado que producir co-productos permite un enfoque más integrado y más eficiente de producción, lo que a su vez reduce los costos de producción y máxima las ganancias (Jong, E., Higson, A., Walsh, P y Wellisch, 2012; Jong, E., Higson A., Walsh, P y Wellisch, 2011).

Por ese motivo, se realizó un análisis financiero para determinar para determinar la viabilidad económica de un hipotético proyecto de biorrefinería donde se produzcan derivados de alto valor comercial a partir del BC en el Ecuador. La

infraestructura de la biorrefinería fue diseñada para una capacidad de procesamiento de 60 mil t/año lo que representaría la producción de BC en Pichincha y sus alrededores. Se tomaron cuatro productos en la biorrefinería siendo el principal producto el ácido succínico (carbohidratos), pero que integre la producción de oleoquímicos (lípidos), aminoácidos y péptidos (proteína) y fertilizante (ceniza y lignina). La planta tiene una capacidad de producción de 23,120 ton/a de ácido succínico, 8,901 ton/a de péptidos y aminoácidos, 3,497 ton/a de oleoquímicos y 16,548 ton/a de fertilizante (Tabla 7). Los precios de los productos se basaron en precios internacionales (Tabla 6).

Los resultados mostraron una Tasa de Interna de Retorno de 98.92 % (mayor a la tasa descuento) y un Valor Neto Actual de \$ 355 385,744, con un periodo de recuperación de inversión de dos años (Tablas 9 y 10). Estos resultados son indicadores positivos de la viabilidad del proyecto a nivel industrial.

El porcentaje de la TIR es alto y puede parecer por encima de lo normal ya que los estudios factibilidad económica presentan valores TIR en el 40 a 50 % (Mackevičius y Tomašević, 2010), pero el resultado se debe a dos factores. Primero, el emplear biomasa residual como materia prima reduce los costos de producción y se aumentan las ganancias, ya que en muchos casos la materia prima puede representar hasta el 50% de los costos totales de producción para PBB (Moncada, El-Halwagi y Cardona, 2013). Y segundo por altos precios a nivel global de los productos obtenidos (Tabla 6), es así que un litro de etanol tiene un precio internacional de 0.60 USD mientras que el precio de un litro de ácido succínico oscila entre 3-9 USD. El alto precio es consecuencia de las diferentes aplicaciones que posee el ácido succínico frente al etanol (Zeikus et al., 1999).

En esta investigación, el análisis financiero no consideró las externalidades y los beneficios sociales, económicos y ambientales que un proyecto de biorrefinería puede ofrecer a las poblaciones aledañas. En estos aspectos, los resultados de esta investigación puede ser la base para futuros proyectos de biorrefinería, donde por ejemplo se podría aprovechar la biomasa producida de los diferentes residuos agrícolas (u otro

tipo de desecho) de zonas que generalmente son subdesarrolladas para mejorar las condiciones socio-económicas. Esto debido a que la biorrefinería puede ser aplicable tanto a grande, mediana y pequeña escala (Carvajal et al., 2013). Es así que, la biorrefinería es una actividad que podría cambiar la matriz productiva del país, al reemplazar una economía de extractivismo y primario exportadora a una bioeconomía, la cual a su vez permita la creación de nuevas tecnologías y un desarrollo sostenible.

El desafío más grande que enfrenta la biorrefinería es la aceptación de la industria y su inversión de capital necesaria para llevar la tecnología a escala comercial (Bozell y Petersen, 2010). En este aspecto, dos factores pueden mejorar los réditos económicos de una plataforma de biorrefinería empleando el BC. Primero, aplicar técnicas de inmovilización para células y enzimas, prolongaría el tiempo de vida útil de las enzimas y células, y reduciría los costos asociados a la compra de estos. Segundo, aprovechar la gran biodiversidad de microorganismos en el país.

En especial, identificar y usar bacterias, hongos y levaduras con aplicaciones biotecnológicas aumentaría el rendimiento y velocidad de las biotransformaciones en los procesos de producción. Estos microorganismos pueden ser la fuente para investigar nuevos y más eficientes biocatalizadores. Por lo cual, el uso de la biodiversidad local podría mejorar los procesos de producción, disminuir los costos de producción y aumentar las ganancias.

7. CONCLUSIONES

1. El bagazo cervecero estuvo compuesto en su mayoría por carbohidratos, proteínas y lignina. Sin embargo, determinación de todos los componentes puede variar según la fuente que provengan, ya que la composición depende de factores como el tipo de malta, estilo de cerveza y tecnologías empleadas en la elaboración de la cerveza.

2. El segundo bioproceso de fraccionamiento presentó los porcentajes más alto de carbohidratos y proteínas, siendo los mejores resultados reportados hasta la fecha empleando biocatalizadores.

3. Iniciar los procesos de fraccionamiento con una hidrólisis enzimática de almidón influyó directamente en una mayor eficiencia en al hidrolizar enzimáticamente las proteínas.

4. Emplear dos diferentes tipos de proteasas permitió obtener péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos, lo cual aumenta sus aplicaciones y precio.

5. La perspectivas para la producción e ingresos asociados a productos de base biológica a partir del bagazo cervecero en el Ecuador son positivas, se prevé un aumento continuo en la producción de cerveza (industrial y artesanal) y, en consecuencia, una mayor producción de bagazo cervecero y el mercado a nivel global se espera que crezca a una tasa compuesta de crecimiento anual del 10%, convirtiendo el proyecto de biorrefinería dispuesto en esta investigación en económicamente viable.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abitbol, T., Rivkin, A., Cao, Y., Nevo, Y., Abraham, E., Ben-Shalom, T. y Shoseyov, O. (2016). Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 39(I), 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.002>
- Arancon, R. A. D., Lin, C. S. K., Chan, K. M., Kwan, T. H. y Luque, R. (2013). Advances on waste valorization: new horizons for a more sustainable society. *Energy Science & Engineering*, 1, 53–71. <https://doi.org/10.1002/ese3.9>
- Bastidas, B.D. (2013). Sacarificación y fermentación continua (SSF) de raquis de palma afrinaca (*Elaeis guineensis*) pretratado con ácido y álcali para la producción de etanol de segunda generación. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Baxter, E. . (1981). Hordein in barley and malt - a review. *J. Inst. Brew.*, 87(3), 173–176.
- Bertoldo, C., Armbrrecht, M., Becker, F., Scha, T., Antranikian, G. y Liebl, W. (2004). Cloning, sequencing, and characterization of a heat- and alkali-stable type I pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3407–3416. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3407>
- Bozell, J. J. y Petersen, G. R. (2010). Cutting-edge research for a greener sustainable future Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates — the US Department of Energy ’ s “ Top 10 ” revisited. <https://doi.org/10.1039/b922014c>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brányik, T., Vicente, A. A., Machado Cruz, J. M. y Teixeira, J. A. (2001). Spent grains - A new support for brewing yeast immobilisation. *Biotechnology Letters*, 23(13), 1073–1078. <https://doi.org/10.1023/A:1010558407475>

- Briggs, D. E., Boulton, C. a., Brookes, P. a. y Steven, R. (2004). *Brewing: science and practice. Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 86).
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2344>
- Buffington, J. (2014). The Economic Potential of Brewer ' s Spent Grain (BSG) as a Biomass Feedstock. *Advances in Chemical Engineering and Science*, (July), 308–318. <https://doi.org/10.4236/aces.2014.43034>
- Carvajal, J. E ., Guamán-Burneo, C., Portero, P., Barahona, E. S., Tufiño, C. y Bastidas, B. (2013). Second Generation Ethanol from Residual Biomass : Research and Perspectives in Ecuador. *Biomass Now - Sustainable Growth and Use*, (September), 265–284. <https://doi.org/10.5772/54528>
- Carvalho, F., Esteves, M. P., Parajó, J. C., Pereira, H. y Gírio, F. M. (2004). Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*, 91(1), 93–100. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00148-2)
- Celus, I., Brijs, K. y Delcour, J. A. (2006). The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *Journal of Cereal Science*, 44(2), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.003>
- Celus, I., Brijs, K. y Delcour, J. A. (2007). Enzymatic hydrolysis of Brewers' spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8703–8710. <https://doi.org/10.1021/jf071793c>
- Cervecería Nacional. (2014). Memoria de sostenibilidad 2013. Guayaquil.
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept : Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Chiesa, S. y Gnansounou, E. (2011). Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery - Possible dietary applications: Use as animal feed and potential extension to human consumption. *Bioresource Technology*, 102(2), 427–436. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.125>
- Connolly, A., O'Keeffe, M. B., Piggott, C. O., Nongonierma, A. B. y Fitzgerald, R. J. (2015). Generation and identification of angiotensin converting enzyme (ACE)

inhibitory peptides from a brewers' spent grain protein isolate. *Food Chemistry*, 176, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.027>

Cozzolino, D. y Degner, S. (2016). An overview on the role of lipids and fatty acids in barley grain and their products during beer brewing. *Food Research International*, 81, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.003>

del Río, J. C., Prinsen, P. y Gutiérrez, A. (2013). Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. *Journal of Cereal Science*, 58(2), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.07.001>

dos Santos Mathias, T. R., de Mello, P. P. M. y Servulo, E. F. C. (2014). Solid wastes in brewing process: A review. *Journal of Brewing and Distilling*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.5897/JBD2014.0043>

Eisentraut, A. (2010). Sustainable Production of Second- generation Biofuels -. *Renewable Energy*, 1–39. <https://doi.org/10.1787/9789264084247-en>

Erickson, B., Nelson y Winters, P. (2012). Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnology Journal*, 7(2), 176–185. <https://doi.org/10.1002/biot.201100069>

Faulds, C. B., Robertson, J. A. y Waldron, K. W. (2008). Effect of pH on the solubilization of Brewers' spent grain by microbial carbohydrases and proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7038–7043. <https://doi.org/10.1021/jf800433c>

Faulds, C. B., Sancho, A. I. y Bartolomé, B. (2003). Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(4), 489–493. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1140-3>

Forsell, P., Kontkanen, H., Schols, H. A., Hinz, S., Eijsink, V. G., Treimo, J. y Buchert, J. (2008). Hydrolysis of Brewers' Spent Grain by Carbohydrate Degrading Enzymes. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(4), 306–314. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00774.x>

Galbe, M. y Zacchi, G. (2007). Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production, (July), 41–65.

- Gao, C., Yang, X., Wang, H., Rivero, C. P., Li, C., Cui, Z. y Lin, K. (2016). Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0597-8>
- Gonçalves, I. C., Fonseca, A., Morão, A. M., Pinheiro, H. M., Duarte, A. P. y Ferra, M. I. A. (2015). Evaluation of anaerobic co-digestion of spent brewery grains and an azo dye. *Renewable Energy*, 74, 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.08.053>
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N. y Gallagher, E. (2010). Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 318–328. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x>
- H Clark, J., El Deswarte, F. y J Farmer, T. (2009). The integration of green chemistry into future biorefineries. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 3(1), 72–90. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Hames, B., Scarlata, C. y Nrel, A. S. (2008). Determination of Protein Content in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 05 / 23 / 2008 Determination of Protein Content in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP), (May).
- Hudson, E. A., Dinh, P. A., Kokubun, T., Simmonds, M. S. J. y Gescher, A. (2000). Characterization of Potentially Chemopreventive Phenols in Extracts of Brown Rice That Inhibit the Growth of Human Breast and Colon Cancer Cells Characterization of Potentially Chemopreventive Phenols in Extracts of Brown Rice That Inhibit the Growth of H, 9(November), 1163–1170.
- Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. (2013). Biocombustibles, 1–26.
- Isikgor, F. H. y Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.*, 6(25), 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>
- Jay, A. J., Parker, M. L., Faulks, R., Husband, F., Wilde, P., Smith, A. C. y Waldron, K. W. (2008). A systematic micro-dissection of brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, 47(2), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.05.006>

- Jones, D. B. (1941). Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. *United States Department of Agriculture, 183*, 1–22.
- Jong, E., Higson, A., Walsh, P. y Wellisch, M. (2012). Product developments in the bio-based chemicals arena. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 6*(6), 606–624. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Jong, E., Higson A., Walsh, P. y Wellisch, M. (2011). *Bio-based Chemicals, Value Added Products from Biorefineries*.
- Jong, E. D. y Jungmeier, G. (2015). *Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries. Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00001-X>
- Joshi, B., Raj, M., Dinita, B., Jarina, S. y Rajani, J. (2011). Lignocellulosic ethanol production : Current practices and recent developments. *Biotechnology and Molecular Biology Review, 6*(November), 172–182.
- KIRIN. 2015. Kirin Beer University Report Global Beer Production by Country in 2015. Recuperado de: http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2016/0810_01.html
- Kotlar, C. E., Ponce, A. G. y Roura, S. I. (2013). LWT - Food Science and Technology Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically. *LWT - Food Science and Technology, 50*(2), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.005>
- Kuba, M., Tanaka, K., Tawata, S., Takeda, Y. y Yasuda, M. (2003). Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Isolated from Tofuyo Fermented Soybean Food. *Biosci. Biotechnol. Biochem, 67*(6), 1278–1283. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1278>
- Lee, K. Y., Aitomäki, Y., Berglund, L. A., Oksman, K. y Bismarck, A. (2014). On the use of nanocellulose as reinforcement in polymer matrix composites. *Composites Science and Technology, 105*, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2014.08.032>
- Liguori, R., Amore, A. y Faraco, V. (2013). Waste valorization by biotechnological conversion into added value products, 6129–6147. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5014-7>

- Luque de Castro, M. D. y García-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5)
- Lynch, K. M., Steffen, E. J. y Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>
- Mackevičius, J. y Tomašević, V. (2010). Evaluation of Investment Projects in Case of Conflict between the Internal Rate of Return and the Net Present Value Methods. *Ekonomika*, 89(4), 116–130.
- Mandalari, G., Faulds, C. B., Sancho, A. I., Saija, A., Bisignano, G., Locurto, R. y Waldron, K. W. (2005). Fractionation and characterisation of arabinoxylans from brewers' spent grain and wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 42(2), 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.03.001>
- Moncada, J., El-Halwagi, M. M. y Cardona, C. A. (2013). Techno-economic analysis for a sugarcane biorefinery: Colombian case. *Bioresource Technology*, 135, 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.137>
- Mussatto, S., Dragone, G. y Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- Mussatto, S. I. (2014). Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(7), 1264–1275. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>
- Mussatto, S. I., Dragone, G. y Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- Mussatto, S. I., Dragone, G. y Roberto, I. C. (2007). Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*, 25(2), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.11.001>
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Dragone, G., Mancilha, I. M. y Roberto, I. C. (2007).

Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnology Letters*, 29(12), 1973–1976.
<https://doi.org/10.1007/s10529-007-9494-3>

Mussatto, S. I., Fernandes, M., Milagres, A. M. F. y Roberto, I. C. (2008). Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 124–129.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.006>

Mussatto, S. I., Fernandes, M., Rocha, G. J. M., Órfão, J. J. M., Teixeira, J. A. y Roberto, I. C. (2010). Production, characterization and application of activated carbon from Brewer's spent grain lignin. *Bioresource Technology*, 101(7), 2450–2457. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.025>

Mussatto, S. I., Moncada, J., Roberto, I. C. y Cardona, C. A. (2013). Techno-economic analysis for brewer's spent grains use on a biorefinery concept: The Brazilian case. *Bioresource Technology*, 148, 302–310.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.046>

Mussatto, S. I. y Roberto, I. C. (2005). Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14), 2453–2460. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2276>

Niemi, P., Faulds, C. B., Sibakov, J., Holopainen, U., Poutanen, K. y Buchert, J. (2012). Effect of a milling pre-treatment on the enzymatic hydrolysis of carbohydrates in brewer's spent grain. *Bioresource Technology*, 116, 155–160.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.043>

Niemi, P., Martins, D., Buchert, J. y Faulds, C. B. (2013). Pre-hydrolysis with carbohydrases facilitates the release of protein from brewer's spent grain. *Bioresource Technology*, 136, 529–534.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.076>

Niemi, P., Tamminen, T., Smeds, A., Viljanen, K., Ohra-Aho, T., Holopainen-Mantila, U. y Buchert, J. (2012). Characterization of lipids and lignans in brewer's spent grain and its enzymatically extracted fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9910–9917. <https://doi.org/10.1021/jf302684x>

Nzihou, A. (2010). Waste and biomass valorization. *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), 1-2.

- Olajire, A. A. (2012). The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.03.003>
- Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M. P., Zakhia, N. y Rios, G. M. (2000). Kinetics of cassava starch hydrolysis with Termamyl?? enzyme. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(1), 71–77. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000405\)68:1<71::AID-BIT8>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000405)68:1<71::AID-BIT8>3.0.CO;2-5)
- Pointner, M., Kuttner, P., Obrlik, T., Jäger, A. y Kahr, H. (2014). Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agronomy Research*, 12(2), 391–396.
- Rencoret, J., Prinsen, P., Gutiérrez, A., Martínez, Á. T. y Del Río, J. C. (2015). Isolation and structural characterization of the milled wood lignin, dioxane lignin, and cellulolytic lignin preparations from brewer's spent grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 603–613. <https://doi.org/10.1021/jf505808c>
- Rocha, C., Goncalves, M. P. y Teixeira, J. A. (2011). Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 46(2), 505–511. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.001>
- Santos, M., Jiménez, J. J., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. y Del Nozal, M. J. (2003). Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chemistry*, 80(1), 17–21. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00229-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00229-7)
- Serrano-ruiz, J. C., Luque, R., Campelo, J. M. y Romero, A. A. (2012). Continuous-Flow Processes in Heterogeneously Catalyzed Transformations of Biomass Derivatives into Fuels and Chemicals, 114–132. <https://doi.org/10.3390/challe3020114>
- Sheldon, R. A. (2016). Green Chemistry, Catalysis and Valorization of Waste Biomass. *“Journal of Molecular Catalysis. A, Chemical.”* <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2016.01.013>
- Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C. y Nrel, J. W. (2008). Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples, (March).

- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. y Templeton, D. (2008). Determination of Ash in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 7 / 17 / 2005 Determination of Ash in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP), (January).
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. y Nrel, D. C. (2012). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, (August).
- Sousa, R., Lopes, G. P., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C., Almeida, P. I. F. y Giordano, R. C. (2004). Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(2), 147–153. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322004000200003>
- Subramanian, M. R., Talluri, S. y Christopher, L. P. (2015). Production of lactic acid using a new homofermentative *Enterococcus faecalis* isolate. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 221–229. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12133>
- Teter, S. (2012). DECREASE Final Technical Report: Development of a Commercial Ready Enzyme Application System for Ethanol. *Doe*, (April). <https://doi.org/10.2172/1039767>
- Vieira, E., Rocha, M. A. M., Coelho, E., Pinho, O., Saraiva, J. A., Ferreira, I. M. P. L. V. O. y Coimbra, M. A. (2014). Valuation of brewer ' s spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Industrial Crops & Products*, 52, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.012>
- Wang, L., Templer, R. y Murphy, R. J. (2012). High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. *Applied Energy*, 99(April 2015), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.03.045>
- Waters, D. M., Jacob, F., Titze, J., Arendt, E. K. y Zannini, E. (2012). Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. *European Food Research and Technology*, 235(5), 767–778. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1805-9>
- Werpy, T. y Petersen, G. (2004). *Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I*

— *Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas Top Value Added Chemicals From Biomass Volume I: Results of Screening for Potential Candidates. Other Information: PBD: 1 Aug 2004.*
<https://doi.org/10.2172/15008859>

- Wohlgemuth, R. (2009). The locks and keys to industrial biotechnology. *New Biotechnology*, 25(4), 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.01.002>
- Woodley, J. M. (2016). Bioprocess intensification for the effective production of chemical products. *Computers and Chemical Engineering*.
<https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2017.01.015>
- Xiros, C., Katapodis, P. y Christakopoulos, P. (2011). Factors affecting cellulose and hemicellulose hydrolysis of alkali treated brewers spent grain by *Fusarium oxysporum* enzyme extract. *Bioresource technology*, 102(2), 1688-1696
- Zeikus, J. G., Jain, M. K. y Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 545–552. <https://doi.org/10.1007/s002530051431>

9. FIGURAS

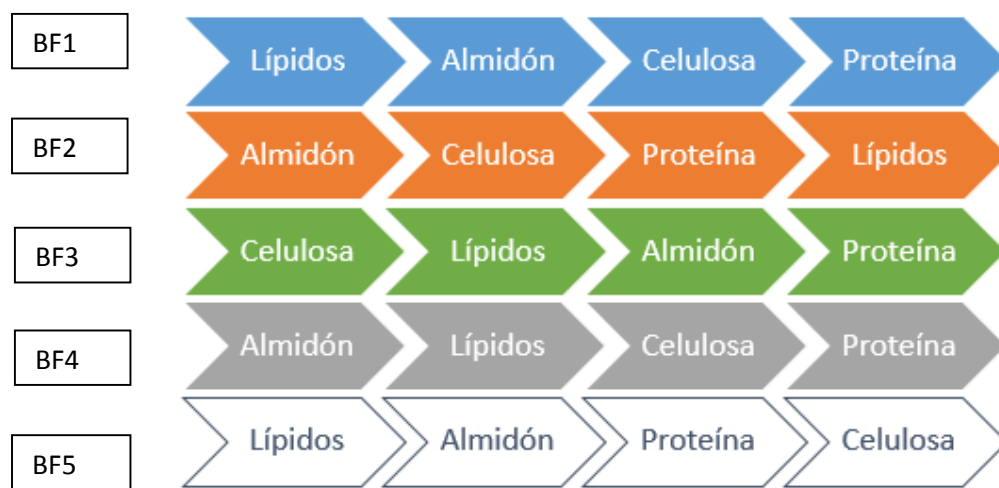


Figura 1. Bioprocesos de fraccionamiento ensayados en la investigación. Todos los bioprocesos constaron de una extracción de lípidos por Método Soxhlet e hidrólisis enzimática de proteínas, almidón y celulosa/hemicelulosa. Cada bioproceso se realizó por triplicado.

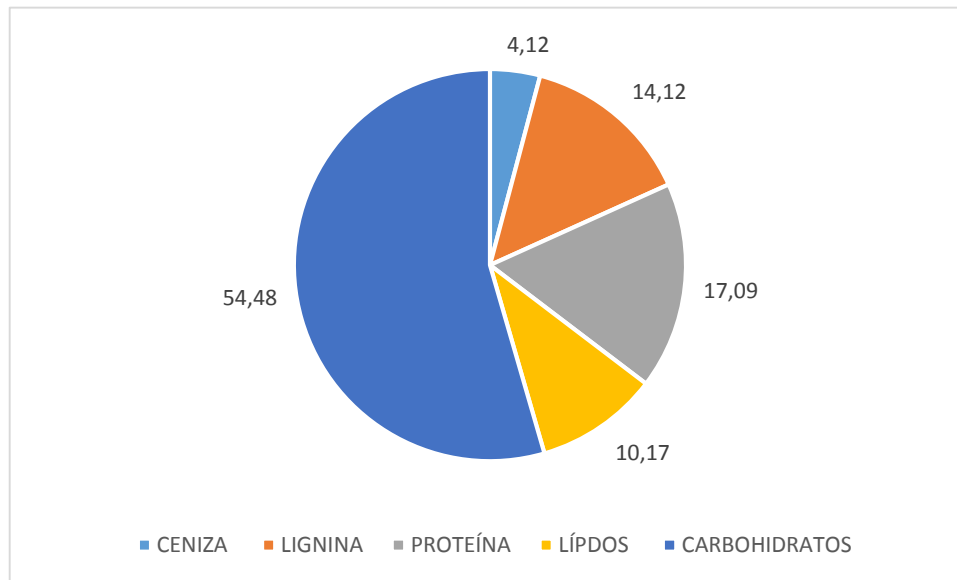


Figura 2. Composición química del bagazo cervecero. La determinación de proteínas, carbohidratos, lípidos, lignina y ceniza es en base a peso seco.

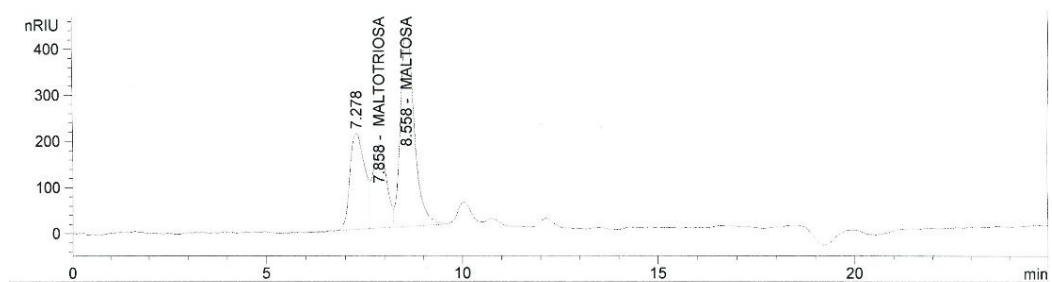


Figura 3. Cromatograma de azúcares simples. Composición de los azúcares simples contenidos en el bagazo cervecero por HPLC.

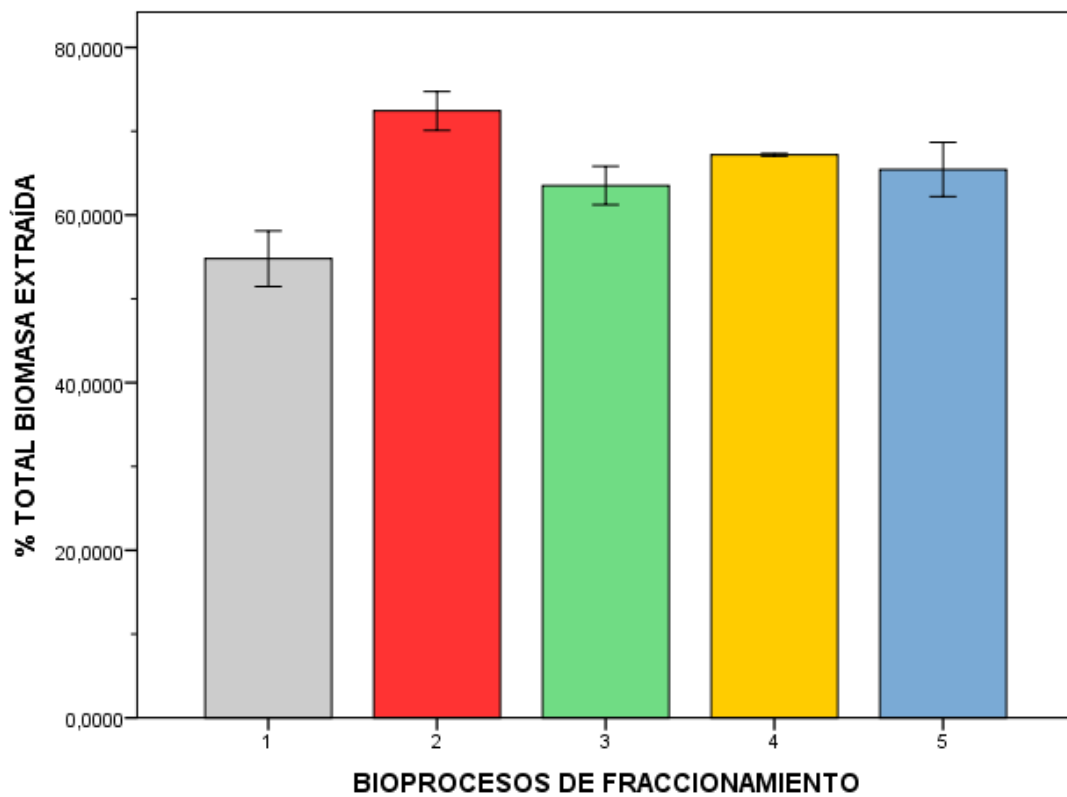


Figura 4. Porcentaje en peso seco del total de biomasa extraída del bagazo cervecero en los cinco bioprocesos de fraccionamiento ensayados (almidón+lípidos+celulosa+proteína= % total de biomasa extraída). Tres repeticiones por bioproceso de fraccionamiento ensayado. Las barras negras muestran la desviación estándar.

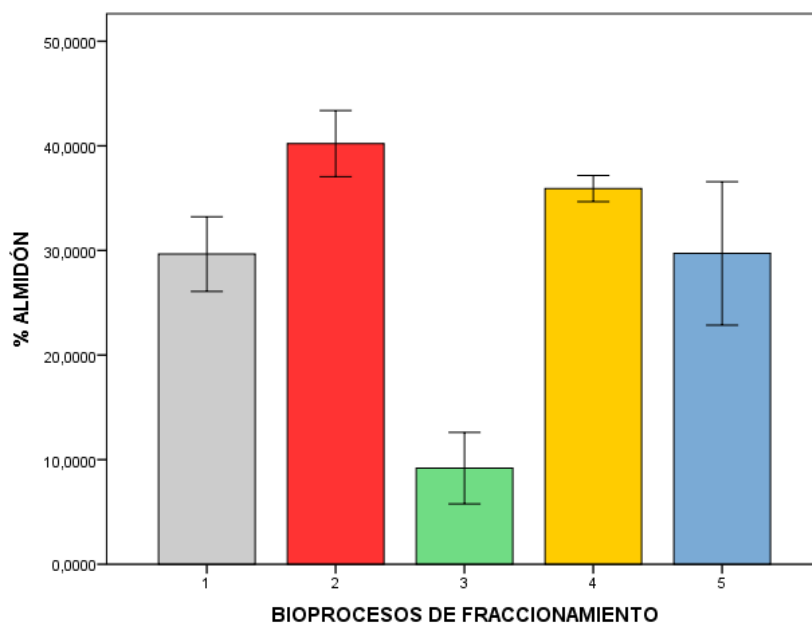


Figura 5. Porcentaje en peso seco de almidón extraído del bagazo cervecero en los cinco bioprocesos de fraccionamiento ensayados. Tres repeticiones por bioproceso de fraccionamiento ensayado. Las barras negras muestran la desviación estándar.

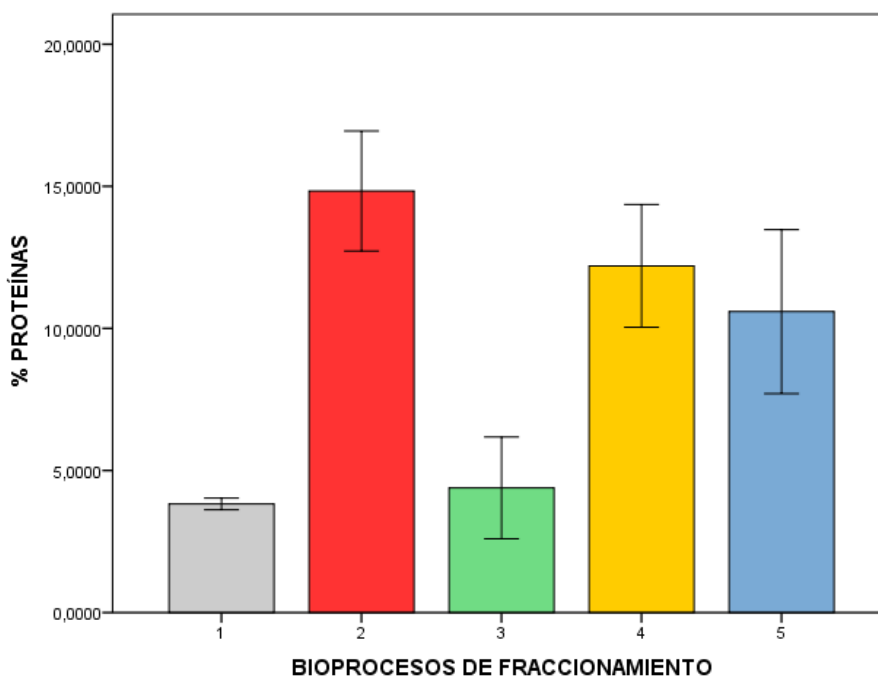


Figura 6. Porcentaje en peso seco de proteínas extraídas del bagazo cervecero en los cinco bioprocesos de fraccionamiento ensayados. Tres repeticiones por bioproceso de fraccionamiento ensayado. Las barras negras muestran la desviación estándar.

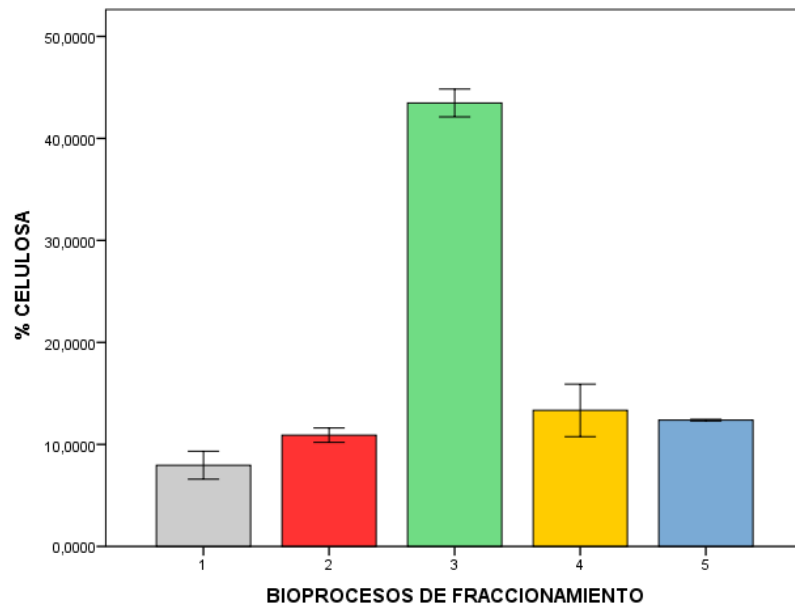


Figura 7. Porcentaje en peso seco de celulosa/hemicelulosa extraídas del bagazo cervecero en los cinco bioprocesos de fraccionamiento ensayados Tres repeticiones por bioproceso de fraccionamiento ensayado. Las barras negras muestran la desviación estándar.

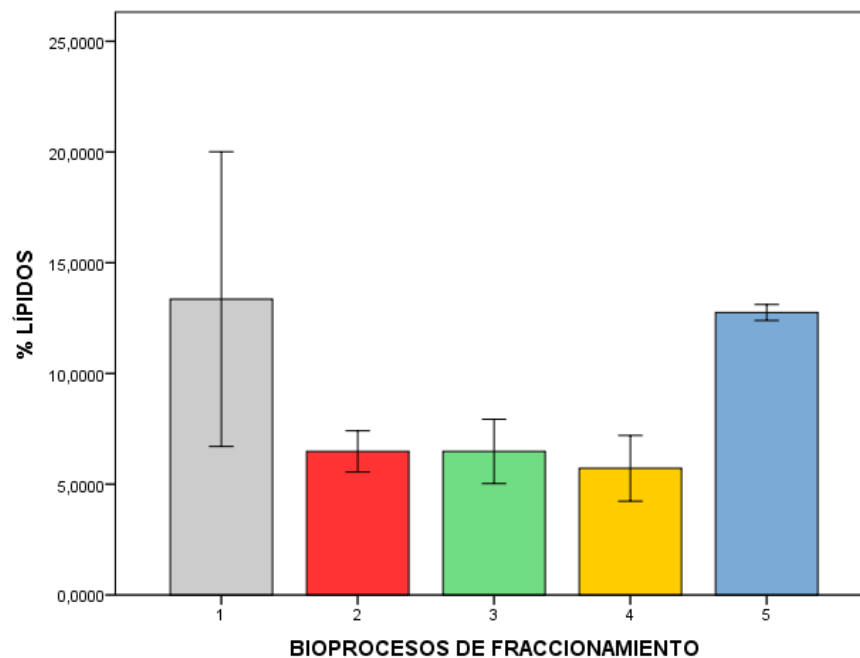


Figura 8. Porcentaje en peso seco de lípidos extraídos del bagazo cervecero en los cinco bioprocesos de fraccionamiento ensayados. Tres repeticiones por bioproceso de fraccionamiento ensayado. Las barras negras muestran la desviación estándar.

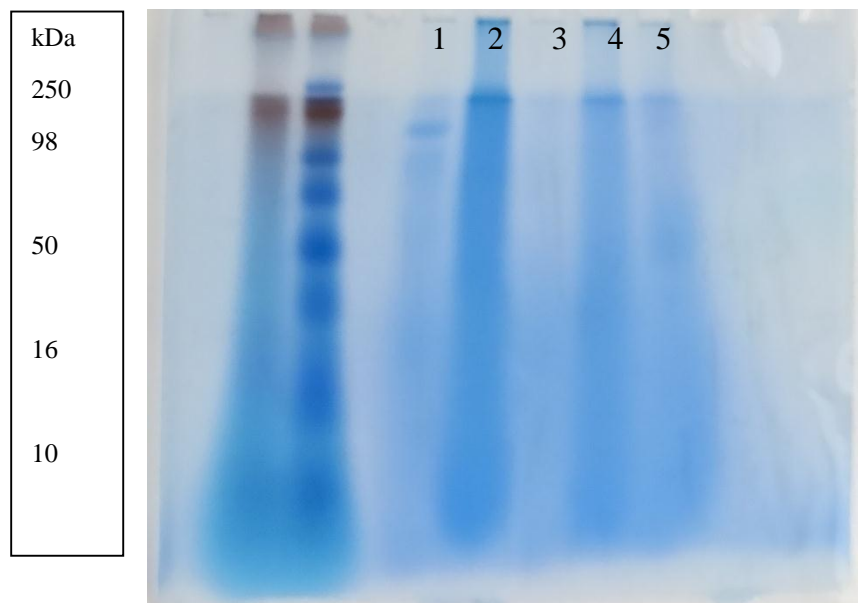


Figura 9. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE de los hidrolizados proteicos obtenidos en los cinco bioprocesos de fraccionamiento. De izquierda a derecha, ladder, ladder, BF1, BF2, BF3, BF4 y BF5. En los BF 2 y BF 4 se observan péptidos con un tamaño inferior al 10 kDa.

Figura 10. Potencial de extracción de fracciones del bagazo cervecero en el Ecuador a partir del segundo bioproceso de fraccionamiento y las posibles aplicaciones industriales de los extractos.



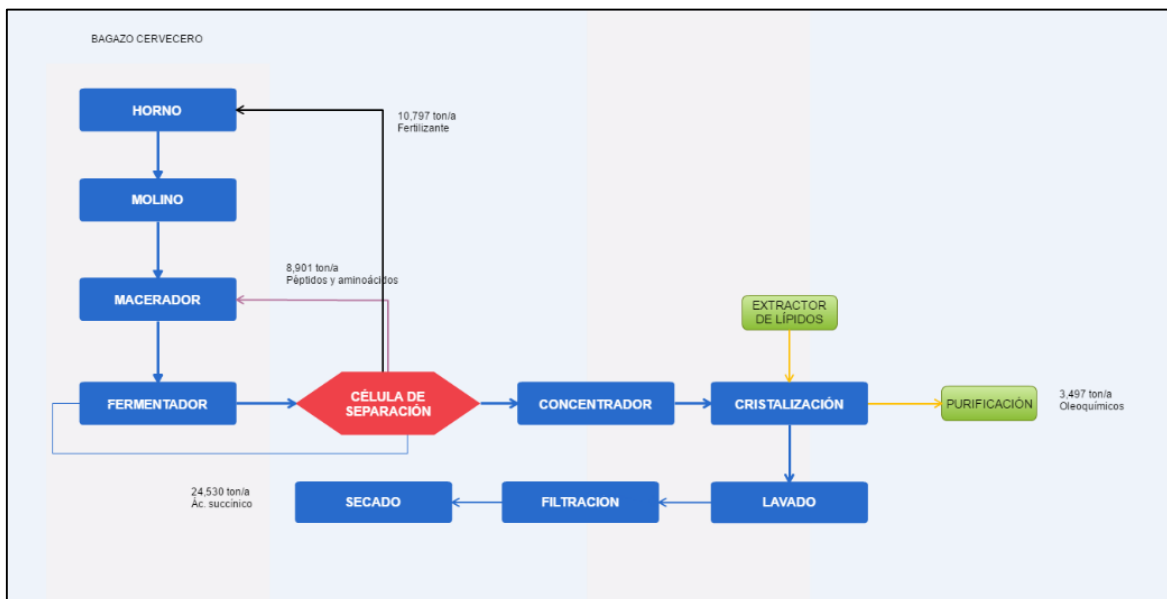


Figura 11. Esquema de la biorrefinería diseñada para aprovechamiento del bagazo cervecero. El diseño está basado en extracción de carbohidratos, proteínas y lípidos para producción de ácido succínico, péptidos y aminoácidos y oleoquímicos respectivamente.

10. TABLAS

Tabla 1. Análisis de Variancia de los cinco bioprocesos de fraccionamiento.
Se comparan los promedios obtenidos en peso seco del total de biomasa extraída del bagazo cervecero en los cinco bioprocesos de fraccionamiento ensayados (almidón+lípidos+celulosa+proteína= % total de biomasa extraída).

	ANOVA				
	Suma de cuadrados	Total gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	497,32	4	124,33	19,23	,00
Dentro de grupos	64,64	10	6,46		
Total	561,96	14			

Tabla 2. Prueba de Levene para la homogeneidad de las variancias.

Prueba de homogeneidad de varianzas			
	Total		
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,746	4	10	,21

Tabla 3. Prueba de Tukey $p \leq 0.05$ %.

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1	3	54,79		
3	3		63,51	
5	3		65,43	
4	3		67,17	67,17
2	3			72,41
Sig.		1,00	,44	,16

Tabla 4. Concentración de azúcares de los cinco bioprocesos de fraccionamiento detectadas por HPLC.

Concentración de azúcar g/l

Bioproceso de fraccionamiento	Almidón	Celulosa/Hemicelulosa
1	11,19	3,93
2	21,12	7,21
3	8,72	7,51
4	27,10	4,57
5	24,59	3,92

Tabla 5. Concentración de hidrolizados proteicos de los cinco bioprocesos de fraccionamiento

Bioprocesos de fraccionamiento	Concentración mg/ml
1	0,2
2	2,05
3	0,33
4	1,47
5	0,3

Tabla 6. Precios internacionales y mercado esperado hasta el 2021 a nivel global de los productos internacionales. Fuente: Markets&Markets (<http://www.marketsandmarkets.com/>).

Producto	Precio USD/t	Mercado esperado 2020-2021
Biodiesel	600-1200	41,18
Oleoquímicos	1,000-6,000	25,91
Ésteres metílicos de ácidos grasos	800-1,500	22,13
Ác. Succínico	2,000-9,000	0,71
Ác. Láctico	800-2,000	3,82
Etanol	600-1,000	23,90
Sorbitol	900-4,000	3,99
Xilitol	1,000-5,000	1
Péptidos y aminoácidos	1,000-4,000	20,51

Tabla 7. Calculo de los ingresos en un periodo de diez años partir de los cuatro productos ofrecidos en el proyecto de biorrefinería.

	AÑO 0 (INVERSION)		AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3	AÑO 4	AÑO 5	AÑO 6	AÑO 7	AÑO 8	AÑO 9	AÑO 10	TOTAL
<i>INGRESOS PRODUCCION GENERAL</i>	<i>CANT ANUAL</i>	<i>Precion ton</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	
Ácido succínico	23,120	\$ 3,200.00	\$ 73,984,000.00	\$ 77,683,200.00	\$ 81,567,360.00	\$ 85,645,728.00	\$ 89,928,014.40	\$ 98,920,815.84	\$ 108,812,897.42	\$ 119,694,187.17	\$ 131,663,605.88	\$ 144,829,966.47	\$ 1,012,729,775.18
Péptidos y aminoácidos	8,901	\$ 2,800.00	\$ 24,922,800.00	\$ 26,168,940.00	\$ 27,477,387.00	\$ 28,851,256.35	\$ 30,293,819.17	\$ 33,323,201.08	\$ 36,655,521.19	\$ 40,321,073.31	\$ 44,353,180.64	\$ 48,788,498.71	\$ 341,155,677.46
Oleoquímicos	3,497	\$ 3,800.00	\$ 13,288,600.00	\$ 13,953,030.00	\$ 14,650,681.50	\$ 15,383,215.58	\$ 16,152,376.35	\$ 17,767,613.99	\$ 19,544,375.39	\$ 21,498,812.93	\$ 23,648,694.22	\$ 26,013,563.64	\$ 181,900,963.59
Fertilizante	16,548	\$ 300.00	\$ 4,964,400.00	\$ 5,212,620.00	\$ 5,473,251.00	\$ 5,746,913.55	\$ 6,034,259.23	\$ 6,637,685.15	\$ 7,301,453.67	\$ 8,031,599.03	\$ 8,834,758.93	\$ 9,718,234.83	\$ 67,955,175.39
TOTAL INGRESOS DEL PROYECTO		\$ 10,100.00	\$ 117,159,800.00	\$ 123,017,790.00	\$ 129,168,679.50	\$ 135,627,113.48	\$ 142,408,469.15	\$ 156,649,316.06	\$ 172,314,247.67	\$ 189,545,672.44	\$ 208,500,239.68	\$ 229,350,263.65	\$ 1,603,741,591.62

Tabla 8. Cuadro de los egresos e ingresos asociados al proyecto de biorrefinería.

<i>EGRESOS PRODUCCION GENERAL</i>	<i>CANT ANUAL</i>	<i>PVP</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>VALOR</i>	<i>TOTAL</i>
COSTOS PREOPERATI VOS		10.2	\$ 323,00 0.00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
Capital de Trabajo	<i>I</i>	\$ 51,00 0.00	\$ 51,000. 00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
Terreno	<i>I</i>	\$ 250,0 00.00	\$ 250,00 0.00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
Electrificacio n de la zona	<i>I</i>	\$ 10,00 0.00	\$ 10,000. 00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
Potabilizacio n del agua	<i>I</i>	\$ 8,000. 00	\$ 8,000.0 0	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
Movimiento de Tierras	<i>I</i>	\$ 4,000. 00	\$ 4,000.0 0	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
COSTOS OPERATIVOS			\$ 78,128, 000.00	\$ 19,352, 200.00	\$ 23,221,040 .00	\$ 27,863,6 48.00	\$ 33,434, 777.60	\$ 40,120,1 33.12	\$ 48,142,5 59.74	\$ 57,769,4 71.69	\$ 69,321,7 66.03	\$ 83,184,5 19.24	\$ 99,819,8 23.09	\$ 502,229, 38.51	
Infraestruct ura	<i>I</i>	\$ 78,12 0,000. 00	\$ 78,120, 000.00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
Bagazo cervecero	<i>60, 000</i>	\$ 300.0 0	\$ 18,000, 000.00	\$ 21,600,000 .00	\$ 25,920,0 00.00	\$ 31,104, 000.00	\$ 37,324,8 00.00	\$ 44,789,7 60.00	\$ 53,747,7 12.00	\$ 64,497,2 54.40	\$ 77,396,7 05.28	\$ 92,876,0 46.34	\$ 467,256,2 78.02		

Tabla 8. Cuadro de los egresos e ingresos asociados al proyecto de biorrefinería (continuación...)

Levadura	1	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		10,00	10,000.	12,000.00	14,400.0	17,280.	20,736.0	24,883.2	29,859.8	35,831.8	42,998.1	51,597.8	259,586.8
		0.00	00		0	00	0	0	4	1	7	0	2
Enzimas	8	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		74,00	592,00	710,400.00	852,480.	1,022,9	1,227,57	1,473,08	1,767,70	2,121,24	2,545,49	3,054,58	15,367,53
		0.00	0.00		00	76.00	1.20	5.44	2.53	3.03	1.64	9.97	9.81
Reactivos	6	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		48,00	288,00	345,600.00	414,720.	497,664	597,196.	716,636.	859,963.	1,031,95	1,238,34	1,486,01	7,476,100
		0.00	0.00		00	.00	80	16	39	6.07	7.28	6.74	.45
Honorarios operadores de planta	12	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		2,100.	201,60	241,920.00	290,304.	348,364	418,037.	501,645.	601,974.	722,369.	866,843.	1,040,21	5,233,270
		00	0.00		00	.80	76	31	37	25	10	1.72	.31
Honorarios obreros	10	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		700.0	84,000.	100,800.00	120,960.	145,152	174,182.	209,018.	250,822.	300,987.	361,184.	433,421.	4,813,964
		0	00		00	.00	40	88	66	19	62	55	.45
Honorario administrativo	6	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		1,100.	6,600.0	7,920.00	9,504.00	11,404.	13,685.7	16,422.9	19,707.4	23,648.9	28,378.7	34,054.5	171,327.3
		00	0		80	6	1	9	9	9	9	5	0
Otros imprevistos		\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		8,000.	8,000.0	8,000.0	8,000.00	8,000.0	8,000.00	8,000.00	8,000.00	8,000.00	8,000.00	8,000.00	80,000.00
		00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Servicios Basicos	4	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		180,0	132,00	158,400.00	190,080.	228,096	273,715.	328,458.	394,149.	472,979.	567,575.	681,091.	3,426,546
		00.00	0.00		00	.00	20	24	89	87	84	01	.04
Mantenimiento	1	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		10,00	10,000.	12,000.00	14,400.0	17,280.	20,736.0	24,883.2	29,859.8	35,831.8	42,998.1	51,597.8	259,586.8
		0.00	00		0	00	0	0	4	1	7	0	2
Transporte de materia prima	1	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		20,00	20,000.	24,000.00	28,800.0	34,560.	41,472.0	49,766.4	59,719.6	71,663.6	85,996.3	103,195.	519,173.6
		0.00	00		0	00	0	0	8	2	4	61	4
COSTOS POST-OPERATIVOS			\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
			35,000.	8,600.0	10,320.00	12,384.0	14,860.	17,832.9	21,399.5	25,679.4	30,815.3	36,978.4	223,244.6
			00	0	0	80	6	5	6	5	3	1	7
Camion de distribucion	1	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		35,00	35,000.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		0.00	00										
Marketing y Publicidad	1	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$
		1,000.	1,000.0	1,200.00	1,440.00	1,728.0	2,073.60	2,488.32	2,985.98	3,583.18	4,299.82	5,159.78	25,958.68
		00	0			0							

Tabla 8. Cuadro de los egresos e ingresos asociados al proyecto de biorrefinería (continuación)

Gastos de venta incluye impuestos	<i>I</i>	\$ 900.00	\$ 900.00	\$ 1,080.00	\$ 1,296.00	\$ 1,555.20	\$ 1,866.24	\$ 2,239.49	\$ 2,687.39	\$ 3,224.86	\$ 3,869.84	\$ 4,643.80	\$ 23,362.81
Suministros y Materiales Distribucion	<i>I</i>	\$ 2,400.00	\$ 2,400.00	\$ 2,880.00	\$ 3,456.00	\$ 4,147.20	\$ 4,976.64	\$ 5,971.97	\$ 7,166.36	\$ 8,599.63	\$ 10,319.56	\$ 12,383.47	\$ 62,300.84
Desarrollo Imagen del Producto	<i>I</i>	\$ 1,800.00	\$ 1,800.00	\$ 2,160.00	\$ 2,592.00	\$ 3,110.40	\$ 3,732.48	\$ 4,478.98	\$ 5,374.77	\$ 6,449.73	\$ 7,739.67	\$ 9,287.60	\$ 46,725.63
Desarrollo con la comunidad	<i>I</i>	\$ 2,500.00	\$ 2,500.00	\$ 3,000.00	\$ 3,600.00	\$ 4,320.00	\$ 5,184.00	\$ 6,220.80	\$ 7,464.96	\$ 8,957.95	\$ 10,749.54	\$ 12,899.45	\$ 64,896.71
TOTAL COSTOS DEL PROYECTO		\$ 78,486,000.00	\$ 19,360,800.00	\$ 23,231,360.00	\$ 27,876,032.00	\$ 33,449,638.40	\$ 40,137,966.08	\$ 48,163,959.30	\$ 57,795,151.16	\$ 69,352,581.39	\$ 83,221,497.66	\$ 99,864,197.20	\$ 502,453,183.18
EBITDA beneficio antes de intereses, impuestos, depreciaciones y amortizaciones			<u>\$ 76,283,220.00</u>	<u>\$ 77,833,415.40</u>	<u>\$ 79,008,265.05</u>	<u>\$ 79,698,430.56</u>	<u>\$ 79,770,992.39</u>	<u>\$ 84,618,578.28</u>	<u>\$ 89,324,895.28</u>	<u>\$ 93,750,611.02</u>	<u>\$ 97,717,418.77</u>	<u>\$ 100,999,131.83</u>	<u>\$ 859,004,958.59</u>

Tabla 9. Flujo de dinero del proyecto de biorrefinería en 10 años.

Período	Flujo de Fondos
0	\$ -78 486,000
1	\$ 76 283,220
2	\$ 77 833,415
3	\$ 79 008,265
4	\$ 79 698,430
5	\$ 79 770,992
6	\$ 84 618,578
7	\$ 89 324,895
8	\$ 93 750,611
9	\$ 97 717,418
10	\$100 999,131

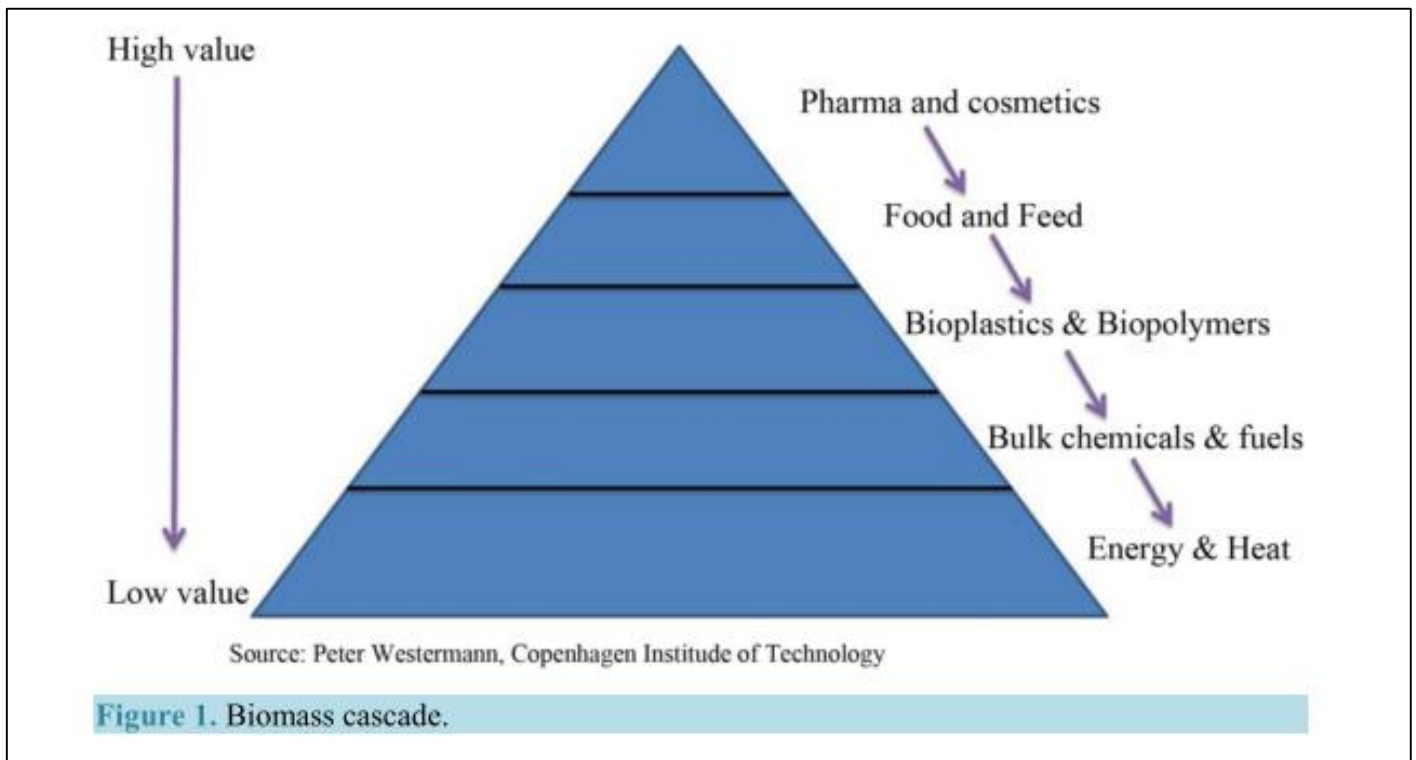
Tabla 10. Resumen de los principales indicadores financieros del proyecto.

TIR	98.92%
VAN	\$ 355 385,744
Tasa de descuento	16,96 %
Periodo de recuperación de inversión	2 años

1. ANEXOS

Bio-based chemical opportunities	
2004	2010
1,4-Dicarboxylic acids (succinic, fumaric and malic)	Succinic acid
2,5-Furan dicarboxylic acid	Furanics
3-Hydroxy-propionic acid	Hydroxypropionic acid/aldehyde
Glycerol	Glycerol and derivatives
Sorbitol	Sorbitol
Xylitol/Arabinitol	Xylitol
Levulinic acid	Levulinic acid
Aspartic acid	–
Glucaric acid	–
Glutamic acid	–
Itaconic acid	–
3-Hydroxybutyrolactone	–
–	Biohydrocarbons
–	Lactic acid
–	Ethanol

Anexo 1. Lista de bloques de construcción creada por el el Departamento de Energía de los Estados Unidos. La lista fue actualizada por Bozell & Petersen en 2010. Fuente: Jong & Jungmeier, 2015.



Anexo 2. Potencial económico de las aplicaciones de los productos derivados de biomasa en biorrefinería. Fuente: Buffington, 2014.

$$VPN = \sum_{t=0}^{t=n} FC_t / (1+r)^t$$

Donde:

t = tiempo

n = años de vida útil del negocio

FC_t = Flujo de caja neto en el periodo indicado

r = tasa de descuento

Anexo 3. Fórmula para calcular el valor Actual Neto (VAN o VPN). Fuente: Mateus et al. (2010).

$$TIR = \sum_{t=1}^n [FC_t / (1+i)^t] - I_0 = 0$$

Donde:

I₀ = inversión inicial

FC = flujo de caja del proyecto (ingresos menos egresos)

i = tasa de descuento o costo de oportunidad del capital

t = tiempo

n = vida útil del proyecto.

Anexo 4. Fórmula para calcular la Tasa Interna de Retorno. Fuente: Mateus et al. (2010).

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Miguel Angel Jurado Morales, con CC. 1722404959, autora del trabajo de graduación titulado: "Fermentación de mosto cervecero mediante un sistema semi-continuo con levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en una matriz mixta de nanofibras de celulosa de tagua y alginato de sodio.", previa la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIA BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea entregado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 3 Agosto del 2017



CC# 1722404959